

••• БІОТЕХНОЛОГІЯ ••• BIOTECHNOLOGY •••

УДК: 617.751:[535.316/.317:576.524]

Культивирование адгезивных клеточных культур на мягких контактных линзах А.С.Кавелина

*Институт неотложной и восстановительной хирургии им. В.К.Гусака (Донецк, Украина)
annakavelina@mail.ru*

Изучено *in vitro* влияние физико-химических свойств мягких контактных линз на процессы адгезии и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток, аллогенных фибробластов и лимбальных стволовых клеток роговицы. Клеточные линии культивировали на внутренней поверхности мягких контактных линз фирм «Аквалан» (Украина) с влажностью до 50%, «Focus» (USA) – до 90%, «Baush & Lomb» (США) – до 55%, «Ciba Vision» (Германия) – 35%. Для проведения исследования были получены гомогенные культуры адгезивных к пластику фибробластов, мезенхимальных стволовых клеток и лимбальных эпителиальных клеток роговицы, идентификацию и доказательство стволовости которых проводили в процессе культивирования. Для достижения конфлюэнтного монослоя на внутренней поверхности мягкой контактной линзы необходимо определенное соотношение таких свойств, как кислородная проницаемость и содержание воды, а также правильно подобранная питательная среда. Поставленная задача была реализована с помощью линз «Ciba Vision» с влажностью 35% в культуральной среде, обогащенной факторами роста.

Ключевые слова: *мягкие контактные линзы, мезенхимальные стволовые клетки, фибробласты, лимбальные стволовые клетки.*

Культивування адгезивних клітинних культур на м'яких контактних лінзах Г.С.Кавеліна

Вивчено *in vitro* вплив фізико-хімічних властивостей м'яких контактних лінз на процеси адгезії та проліферації мезенхімальних стовбурових клітин, алогенних фібробластів і лімбальних стовбурових клітин рогівки. Клітинні лінії культивували на внутрішній поверхні м'яких контактних лінз фірм «Аквалан» (Україна) з вологовмістом до 50%, «Focus» (USA) – до 90%, «Baush & Lomb» (США) – до 55%, «Ciba Vision» (Німеччина) – 35%. Для проведення дослідження були отримані гомогенні культури адгезивних до пластика фібробластів, мезенхімальних стовбурових клітин та лімбальних епітеліальних клітин рогівки, ідентифікацію і доказ стовбуровості яких проводили в процесі культивування. Для досягнення конфлюентного моношару на внутрішній поверхні м'якої контактної лінзи необхідно певне співвідношення таких властивостей, як киснева проникність і вміст води, а також правильно підібране живильне середовище. Поставлена задача була реалізована з допомогою лінз «Ciba Vision» з вологовмістом 35% у культуральному середовищі, збагаченому факторами росту.

Ключові слова: *м'які контактні лінзи, мезенхімальні стовбурові клітини, фібробласти, лімбальні стовбурові клітини.*

Cultivation of adhesive cell cultures on soft contact lenses A.S.Kavelina

The influence of physical and chemical properties of soft contact lenses on adhesion processes and proliferation of mesenchymal stem cells, allogenic fibroblasts and corneal limbal stem cells has been studied *in vitro*. Cell lines were cultured on the inner surface of the soft contact lenses of firms "Akvalan" (Ukraine) with a moisture content up to 50%, «Focus» (USA) – up to 90%, «Baush & Lomb» (USA) – up to 55%, «Ciba Vision» (Germany) – 35%. There have been obtained homogeneous cultures of plastic-adherent fibroblasts, mesenchymal stem cells and limbal corneal epithelial cells, their identification and proof of stemness have been performed during culturing. Obtaining confluent monolayer on the inner surface of soft contact lens needs a certain ratio of properties, such as oxygen permeability and water content, as well as proper growing medium. The objective has been realized by lenses «Ciba Vision» with a moisture content of 35% in a culture medium supplemented with growth factors.

Key words: *soft contact lenses, mesenchymal stem cells, fibroblasts, limbal stem cells.*

Введение

Проблема реконструкции поврежденной роговичной ткани при патологии, сопровождающейся синдромом лимбальной недостаточности, остается актуальной для фундаментальной биологии и офтальмохирургии. Данное состояние обусловлено дефицитом лимбальных стволовых клеток, вследствие деструкции их стромы, и постепенным заселением роговицы конъюнктивальным эпителием. Лимбальная недостаточность протекает по типу медленно прогрессирующего заболевания. В результате подавления миграционной активности стволовых клеток лимба снижается структурное замещение роговичных клеток (Ченцова и др., 1999).

В настоящее время предложено достаточно много средств и методов лечения эпителиальных дефектов роговицы, однако процент неблагоприятных исходов и осложнений все еще остается довольно высоким (Степанов, 2006). Вследствие этого продолжается поиск эффективных и безопасных средств, ускоряющих процессы регенерации роговичного эпителия и улучшающих зрительные функции.

Значительным шагом явилось открытие региональных стволовых клеток роговичного эпителия. Лимбальные клетки, обладающие фенотипом, сходным с мезенхимальными стволовыми клетками костного мозга, благодаря своим паракринным свойствам и межклеточным взаимодействиям отвечают за процессы самоподдержания эпителиальных стволовых/прогениторных клеток и регенерацию роговицы (Polisetty et al., 2008; Holan et al., 2010; Dua et al., 2005; Garfias et al., 2012; Umemoto et al., 2006). Были предприняты успешные попытки трансплантации эпителиальных стволовых клеток при разнообразных кератопатиях, химических и термических ожогах, синдроме Стивена-Джонса, трахоме.

Перспективным и целесообразным считается использование трансплантатов, содержащих большое количество стволовых клеток, позволяющих влиять на ход репарации (Numata et al., 2014; Liu et al., 2010). Некоторые исследователи (Scalise et al., 2001) используют для этих целей полимерные пленки, коллагеновые матрицы, губки, гели, амниотическую мембрану, мягкие контактные линзы, на поверхности которых культивируют фибробласты, эндотелиальные и эпителиальные клетки роговицы.

В течение последних четырех лет в лаборатории клеточного и тканевого культивирования Института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К.Гусака проводятся исследования в области создания тканеинженерных конструкций, основанных на использовании выращенных *in vitro* клеток роговицы человека, разработаны технологии культивирования мезенхимальных стволовых клеток и лимбальных клеток роговицы на различных субстратах. Выбор оптимального носителя для клеточной экспансии является ключевой задачей при разработке тканеинженерных конструкций.

Целью настоящего исследования явилось изучение *in vitro* влияния физико-химических свойств мягких контактных линз на процессы адгезии и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток, аллогенных фибробластов и лимбальных стволовых клеток роговицы.

Методы и материалы

Для определения возможности культивирования клеточных линий на внутренней поверхности мягких контактных линз было проведено 3 серии экспериментов с 4 группами линз: в первой группе линзы фирмы «Аквалан» (Украина) с влагосодержанием до 50%, во второй – линзы с влагосодержанием до 90% фирмы «Focus» (USA), в третьей – линзы «Vaush & Lomb» (США) с влагосодержанием до 55%, в четвертой – линзы «Ciba Vision» (Германия) с влагосодержанием 35%.

Выделение и культивирование клеточных линий проводили в соответствии с законодательством Украины, в лаборатории клеточного и тканевого культивирования Института неотложной и восстановительной хирургии им. В.К.Гусака, отвечающей стандартам GMP.

В первой серии эксперимента для культивирования на внутренней поверхности линз использовали аллогенные фибробласты. Культуру фетальных фибробластов человека выделяли из абортивного материала, полученного в ходе плановых операций по прерыванию беременности при сроках гестации до 12 недель. Фрагменты кожно-мышечной ткани эмбриона обрабатывали раствором 0,25% трипсина при температуре 37°C в течение 15 мин. Трипсин инактивировали добавлением 10% сыворотки эмбриона крупного рогатого скота в течение 2 мин. Фибробласты культивировали в среде Игла («Биолот», Россия) с добавлением той же сыворотки 10% в атмосфере 5% CO₂ с влагосодержанием 95% при 37°C. При пассировании клетки обрабатывали смесью растворов трипсин/Версен («Биолот», Россия) в соотношении 1:3. Для исследования использовали 1, 2 пассажи.

После достижения 80% конфлюэнтности в клеточных культурах на предварительно подготовленные линзы переносили суспензию клеток в количестве 2×10^5 с добавлением 1 мл питательной среды. Перед погружением в ячейки 24-луночного планшета линзы промывали раствором PBS (Sigma, США). Для каждой линии клеток использовали по одному планшету, где размещали по 6 линз каждой группы. Через два часа после достижения адгезивности добавляли в лунку 1 мл питательной среды. Смену среды проводили через 1–2 сутки.

Во второй серии эксперимента использовали культуру мезенхимальных стволовых клеток. Источником таковых являлся костный мозг, который получали при пункции подвздошной кости. Аспират костного мозга разводили раствором Хэнкса и разливали по центрифужным пробиркам объемом 50 мл, добавляли градиент в соотношении 1:1, центрифугировали 2000 оборотов/мин в течение 30 мин при комнатной температуре. В центрифужную пробирку с раствором Хэнкса собирали клетки интерфазы, ресуспендировали. Центрифугировали 1000 оборотов/мин в течение 10 минут. Сливали надосадок в раствор Хэнкса. Повторяли центрифугирование трижды, после осадок ресуспендировали в питательной среде Dmem/F12 (Sigma, США), L-глутамин (Appasani, Appasani, 2010; Фрешни, 2010), 20% ЭТС (Sigma, США), высевали в культуральные флаконы 75 см² (Nuclon, США) и культивировали при 37°C в CO₂ инкубаторе с влажностью 95% на протяжении трех суток. Неприкрепившиеся клетки удаляли при первой смене среды.

Третья серия эксперимента включала выделение, культивирование и идентификацию лимбальных эпителиальных стволовых клеток роговицы человека. Для получения лимбальных эпителиальных клеток, содержащих в своем составе стволовые клетки, выкраивали лимбальный трансплантат со всей окружности лимба цельного энуклеированного глаза, при этом достигалась равномерная толщина трансплантата, не более 1/2 толщины склеры. Полученное корнеосклеральное кольцо помещали в стерильную чашку Петри d=60 мм, несколько раз промывали раствором PBS, измельчали до размера 2×2 мм и аккуратно помещали на дно культурального флакона, обработанного коллагеном. Затем флаконы заполняли питательной средой, содержащей DMEM/F12, L-глутамин, аскорбиновую кислоту, эмбриональную телячью сыворотку, эпидермальный фактор роста (EGF) и фактор роста фибробластов (bFGF), пенициллин, стрептомицин, инсулин, изопротеринол, трансферрин, гидрокортизон. На первые сутки наблюдали миграцию округлых базальных клеток из экспланта. По достижению конфлюэнтного слоя для снятия клеток использовали смесь растворов трипсина 0,5% (Sigma, США) и Версена в соотношении 1:1 в течение 1–2 минут.

На протяжении этого периода наблюдали за сменой активности пролиферации клеток, их морфологии, отмечали временные интервалы изменений характеристик клеточных культур.

Для доказательства стволовости лимбальных клеток роговицы человека использовали ряд маркеров, среди которых наиболее демонстративными являются рb3 – маркер стволовых клеток, цитокератин 19 – маркер базальных лимбальных клеток, цитокератин 3/12 – маркер дифференцировки стволовых клеток, кератансульфат, альфа-гладкомышечный актин, панцитокератин общий, виментин, CD 34, CD 45, CD 117, ALDH3A1.

Проводили окрашивание гематоксилином и эозином культур фибробластов и лимбальных стволовых клеток.

Прижизненные микроскопические наблюдения, микрофотосъемку, а также анализ окрашенных препаратов клеточных культур выполняли с использованием микроскопа Leica PMIL, рабочей станции с обработкой изображения LEICA QWIN 500 Standard, видеокамеры JVC–C 1380, светового микроскопа Olympus AX 50 и видеокамеры Olympus DR 70.

Результаты

Основные физико-химические свойства линз определяются материалом, из которого они изготовлены. Из-за высокого содержания воды мягкие контактные линзы обладают повышенной чувствительностью к механическим повреждениям по сравнению с другими линзами среднего содержания воды. Если высокогидрофильные линзы чрезвычайно тонки, они могут сильно дегидратироваться при ношении. У силикон-гидрогелиевых линз пропускная способность не связана с содержанием воды. Учитывая, что для большинства клеток характерна избирательная адгезия, в этом исследовании использованы линзы длительного ношения с высокой кислородной проницаемостью и влажностью от 35% до 90%.

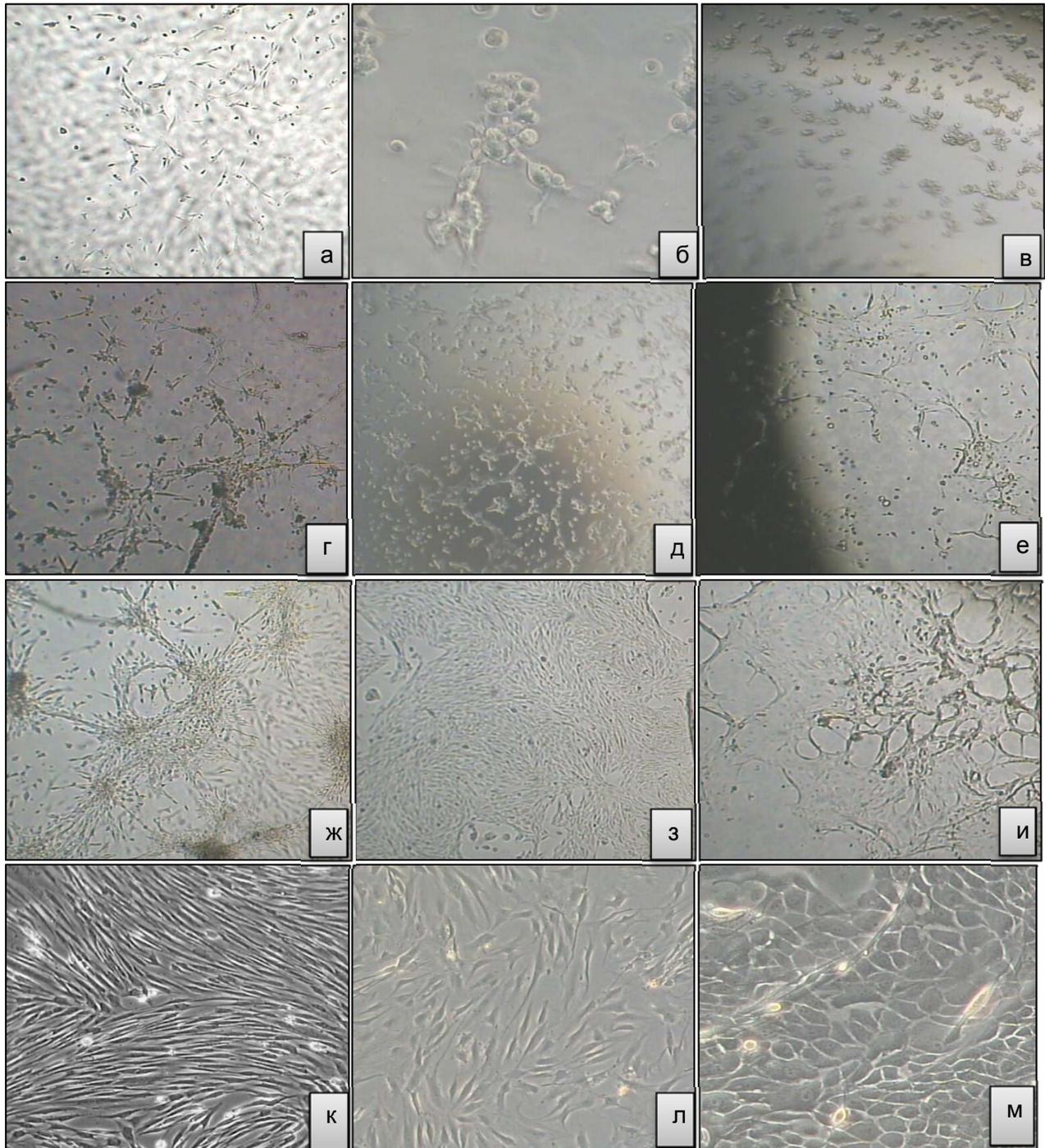


Рис. 1. Фазово-контрастная микроскопия

Первые сутки культивирования на мягких контактных линзах «Ciba Vision»: аллогенных фибробластов, окуляр $\times 10$, объектив $\times 4$ (а), мезенхимальных стволовых клеток, окуляр $\times 10$, объектив $\times 10$ (б), лимбальных стволовых клеток, окуляр $\times 10$, объектив $\times 4$ (в); третьи сутки культивирования аллогенных фибробластов, окуляр $\times 10$, объектив $\times 4$ (г), мезенхимальных стволовых клеток, окуляр $\times 10$, объектив $\times 4$ (д), лимбальных стволовых клеток, окуляр $\times 10$, объектив $\times 4$ (е); пятые сутки культивирования аллогенных фибробластов, окуляр $\times 10$, объектив $\times 4$ (ж), мезенхимальных стволовых клеток, окуляр $\times 10$, объектив $\times 4$ (з), лимбальных стволовых клеток, окуляр $\times 10$, объектив $\times 4$ (и); контроль: конфлуэнтный монослой, культивированный на пластике: аллогенных фибробластов (к), мезенхимальных стволовых клеток (л), лимбальных стволовых клеток (м), объектив $\times 10$, окуляр $\times 10$.

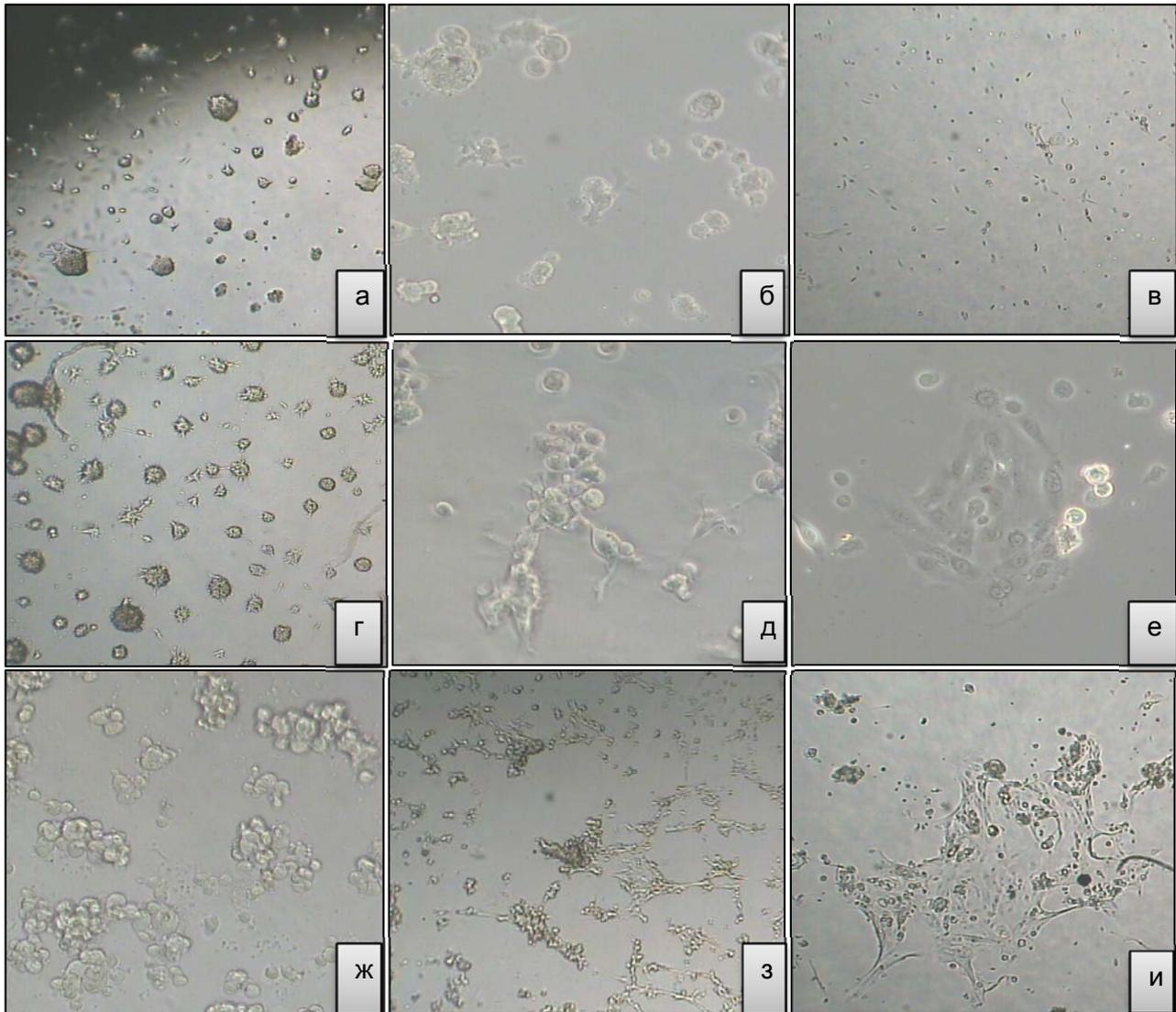


Рис. 2. Фазово-контрастная микроскопия

Первые сутки культивирования аллогенных фибробластов на линзах «АкваЛан» (а), объектив $\times 10$, окуляр $\times 4$; мезенхимальных стволовых клеток на внутренней поверхности линз «Focus» (б), объектив $\times 10$, окуляр $\times 10$; лимбальных стволовых клеток на линзах «Vaush & Lomb» (в), объектив $\times 10$, окуляр $\times 4$; третьи сутки культивирования аллогенных фибробластов (г), объектив $\times 10$, окуляр $\times 4$; мезенхимальных стволовых клеток (д), объектив $\times 10$, окуляр $\times 10$; лимбальных стволовых клеток (е), объектив $\times 10$, окуляр $\times 10$; пятые сутки культивирования аллогенных фибробластов (ж), объектив $\times 10$, окуляр $\times 10$; мезенхимальных стволовых клеток (з), объектив $\times 10$, окуляр $\times 4$; лимбальных стволовых клеток (и), объектив $\times 10$, окуляр $\times 4$.

Для проведения исследования были получены гомогенные культуры адгезивных к пластику фибробластов, мезенхимальных стволовых клеток и лимбальных эпителиальных клеток роговицы, идентификацию и доказательство стволовости которых проводили в процессе культивирования.

Прижизненные микрофотографии аллогенных фибробластов на линзах фирмы «Ciba Vision» представлены на рис. 1. Для первых суток культивирования характерны хорошо распластанные пролиферирующие клетки, которые имели небольшой размер и вытянутую форму (а). По мере культивирования они занимали все большую поверхность линз от центра к периферии. К третьим

суткам преобладало небольшое количество пролиферирующих клеток, с вытянутыми лучеобразными отростками (г). К концу пятых суток характерны образовавшиеся плотные кластеры, часто контактирующие друг с другом. В их составе преобладали клетки с удлинёнными отростками (ж).

В первые сутки культивирования стволовых мезенхимальных клеток характерна миграция округлых базальных клеток, вытянутой формы, часто с несколькими отростками (б), образовавшие небольшие кластеры. При дальнейшем культивировании на третьи сутки клетки распластывались по поверхности линз, увеличивались в размерах, при этом сохраняли свою форму и отростки (д). На пятые сутки образованный конфлюэнтный слой состоял из веретенообразных клеток (з). Зона роста имела плотно упакованного в виде «потоков» и «завитков» монослоя мезенхимальных клеток.

На рис. 1 (в) для лимбальной эпителиальной культуры представлена фиксация клеток небольшими скоплениями по всей поверхности линзы. К третьим суткам наблюдали высокую пролиферативную активность. Субконфлюэнтный слой образован к пятым суткам клетками, которые не только прикрепились друг к другу, но и образовали отростчатые структуры различной плотности и протяженности, в некоторых случаях связывающие близлежащие клеточные агрегаты (и).

Контроль культивированных клеток на пластике представлен на микрофотографиях рис. 1: для фибробластов – к, мезенхимальных стволовых клеток – л, лимбальных стволовых клеток – м.

На рис. 2 представлены прижизненные микрофотографии аллогенных фибробластов (а, г, ж) на внутренней поверхности линз фирмы «Аквалан», мезенхимальных стволовых клеток (б, д, з) на линзах фирмы «Focus», лимбальных стволовых клеток (в, е, и) на линзах фирмы «Baush & Lomb».

Для первых суток культивирования фибробластов на поверхности линз «Аквалан» характерны небольшие скопления клеток, образовавших сферические агрегаты (а). При дальнейшем культивировании наблюдалось небольшое увеличение в размерах, что говорит о медленной активности роста клеток (г). К пятым суткам клетки в плотных сферических скоплениях, не имеющие отростков, увеличивались в размерах, но активной пролиферации по всей поверхности линзы не наблюдалось (ж).

Для культивирования мезенхимальных стволовых клеток в первые сутки характерна адгезивность полусферических скоплений клеток с небольшими отростками и единичными клетками только в центральной части линзы (б). К пятым суткам наблюдалось распластывание клеток с длинными лучеобразными отростками, сформировавших сеть при дальнейшем культивировании (з).

Через 2 часа культивирования лимбальные стволовые клетки равномерно располагались на всей поверхности линзы (в). К третьим суткам морфология адгезивных клеток была характерна для культивированных клеток на пластике (е). Хорошо видно, что они не только прикрепились друг к другу, но и образовали отростчатые структуры различной плотности и протяженности, в некоторых случаях связывающие близлежащие клеточные агрегаты. К пятым суткам основная часть клеток характеризовалась эпителиоподобной морфологией, но конфлюэнтного монослоя по всей поверхности линзы не наблюдалось, так как распластанные клетки с длинными отростками образовывали небольшие островки кластеров, неравномерно рассеянных по всей поверхности (и).

Обсуждение

Анализ морфологических характеристик лимбальных эпителиальных клеток при культивировании показал, что эти клетки в обычной среде составляют колонии, которые при исследовании под инвертированным микроскопом без окрашивания не могут быть идентифицированы, т.е. количество полученных колоний не отображает истинного состояния культуры.

Для доказательства стволовости лимбальных эпителиальных клеток использовали иммуногистохимию. С помощью моноклонального антитела р63 среди лимбальных стволовых клеток обнаруживались окрашенные ядра. Возможно, что увеличение относительного числа экспрессирующих клеток в процессе культивирования может свидетельствовать об обогащении культуры стволовыми клетками. Можно полагать, что они обладают высоким пролиферативным потенциалом. Установлено, что лимбальные эпителиальные стволовые клетки имеют мезенхимальный фенотип, являются виментин-позитивными, а также обладают эпителиальной

морфологией, являются цитокератин 19 и цитокератин 3/12-позитивными. Ядерная экспрессия роговичного кристаллина ALDH3A1 предполагает поддержание прозрачности роговицы. Увеличение экспрессии CD 117 (c-kit) на протяжении культивирования свидетельствует о важной роли цитокинового рецептора в клеточном выживании, пролиферации и дифференцировке.

Исследуемые клетки не экспрессировали следующие антитела: CD 34, CD 45, кератансульфат, альфа-гладкомышечный актин.

Для достижения конфлюэнтного монослоя на внутренней поверхности мягкой контактной линзы необходимо определенное соотношение таких свойств, как кислородная проницаемость и содержание воды, а также правильно подобранная питательная среда. Несмотря на адгезивность и пролиферацию клеточных культур, ни одна линза с лимбальными стволовыми клетками не прошла весь процесс иммуногистохимических окрашиваний.

Поставленная задача получение конфлюэнтного монослоя 70–90 % была реализована с помощью линз «Ciba Vision» с влажосодержанием 35%. На поверхности линз клетки формировали интенсивные межклеточные контакты. Для культивирования лимбальных стволовых клеток была использована обогащенная питательная среда. Поэтому высокая пролиферативная активность, вероятно, обусловлена выбросом в ткани значительного количества активных веществ – пролиферативных мессенджеров, которые являются митогенами и стимулируют клеточную пролиферацию.

Проведено сравнительное исследование культивированных линий фибробластов, мезенхимальных стволовых клеток и лимбальных стволовых клеток роговицы человека, данные которого свидетельствуют о том, что свойствами, способствующими процессам адгезии и пролиферации клеточных линий, обладают линзы «Ciba Vision» с влажосодержанием 35% в культуральной среде, обогащенной факторами роста.

Разработана методика получения культуры лимбальных стволовых клеток, впервые проведена идентификация лимбальных стволовых клеток роговицы человека. Получены патенты Украины на полезную модель: способ культивирования лимбальных стволовых клеток (Гринь та ін., 2011) и способ культивирования монослоя на внутренней поверхности мягких контактных линз (Попандопуло та ін., 2014).

Таким образом, полученные данные существенны для трансплантологии и клинической медицины, подсказывая пути создания оптимальных «репаративных эквивалентов».

Список литературы

- Гринь В.К., Попандопуло А.Г., Кавеліна А.С. та ін. Спосіб отримання культивованих лімбальних клітин. Пат. України №65507. Заявл. 04.05.2011. Опубл. 12.12.2011. Бюл. №23. /Gryn' V.K., Popandopulo A.G., Kavelina A.S. та ін. Sposib otrymannya kul'tyvovanykh limbal'nykh klityn. Pat. Ukrainy №65507. Zayavl. 04.05.2011. Opubl. 12.12.2011. Byul. №23./
- Попандопуло А.Г., Кавеліна Г.С., Іванова О.М., Дрожжина Г.І. Спосіб отримання моношару культивованих клітин рогівки на внутрішній поверхні м'яких контактних лінз. Пат. №86892 України, МПК А61F9/00. Заявл. 06.08.13. Опубл. 10.01.2014. Бюл. №1. /Popandopulo A.G., Kavelina G.S., Ivanova O.M., Drozhzhina G.I. Sposib otrymannya monosharu kul'tyvovanykh klityn rogovivky na vnutrishniy poverkhni m'yakyykh kontaktnykh linz. Pat. №86892 Ukrainy, MPK A61F9/00. Zayavl. 06.08.13. Opubl. 10.01.2014. Byul. №1./
- Степанов В.К. Комплексное лечение больных гнойными кератитами и их последствия. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Москва, 2006. – 293с. /Stepanov V.K. Kompleksnoye lecheniye bol'nykh gnoynymi keratitami i ikh posledstviya. Avtoref. dis. ... d-ra med. nauk. – Moskva, 2006. – 293s./
- Ченцова Е.В., Петриашвили Г.Г., Арутюнова И.Р. Применение фетальных клеток роговицы человека для лечения различной патологии органа зрения и др. // Офтальмохирургия. – 1999. – №4. – С. 3–9. /Chentsova Ye.V., Petriashvili G.G., Arutyunova I.R. Primeneniye fetal'nykh kletok rogovitsy cheloveka dlya lecheniya razlichnoy patologii organa zreniya i dr. // Oftal'mokhirurgiya. – 1999. – №4. – С. 3–9./
- Фрешни Р.Я. Культура животных клеток: практическое руководство. – Москва: Бином. Лаборатория знаний, 2010. – 691с. /Freshni R.Ya. Kul'tura zhyvotnykh kletok: prakticheskoye rukovodstvo. – Moskva: Binom. Laboratoriya znaniy, 2010. – 691s./
- Appasani K., Appasani R. Stem cells & regenerative medicine: from molecular embryology to tissue engineering. – Springer Science+Business Media, LLC, 2010. – 629p.

-
- Dua H., Shanmuganathan V., Powell-Richards A. et al. Limbal epithelial crypts: a novel anatomical structure and a putative limbal stem cell niche // *Br. J. Ophthalmol.* – 2005. – Vol.89. – P. 529–532.
- Garfias Y., Nieves-Hernandez J., Garcia-Mejia M. et al. Stem cells isolated from the human stromal limbus possess immunosuppressant properties // *Mol. Vis.* – 2012. – P. 2087–2095.
- Numata R., Okumura N., Nakahara M. et al. Cultivation of corneal endothelial cells on a pericellular matrix prepared from human decidua-derived mesenchymal cells // *PLoS ONE.* – 2014. – Vol.9 (2). – e88169.
- Holan V., Pokorna K., Prochazkova J. et al. Immunoregulatory properties of mouse limbal stem cells // *The Journal of Immunology.* – 2010. – P. 2124–2129.
- Liu J., Sheha H., Fu Y. et al. Update on amniotic membrane transplantation // *Expert. Rev. Ophthalmol.* – 2010. – №5. – P. 645–661.
- Polisetty N., Fatima A., Madhira S. et al. Mesenchymal cells from limbal stroma of human eye // *Mol. Vis.* – 2008. – P. 431–442.
- Scalise A., Pierangeli M., Di Benedetto G. et al. Cultured autologous fibroblast and keratinocyte grafts: applications in plastic surgery // *Annals of Burns and Fire Disasters.* – 2001. – Vol.14, №2. – P. 96–99.
- Umemoto T., Yamato M., Nishida K. et al. Limbal epithelial side-population cells have stem cell-like properties, including quiescent state // *Stem Cells.* – 2006. – №24 (1). – P. 86–94.

Представлено: С.Є.Іващенко / Presented by: S.Ye.Ivashchenko

Рецензент: Є.Е.Перський / Reviewer: Ye.E.Persky

Подано до редакції / Received: 12.10.2014