

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

УДК 617.713-089.843
© Коллектив авторов, 2021

Р.З. Кадыров¹, О.Р. Шангина^{1,2}, С.Р. Гатиятуллина¹, И.Р. Карачурина¹, Г.И. Гарипова¹

БИОИНЖЕНЕРНЫЕ ЭКВИВАЛЕНТЫ СТРОМЫ РОГОВИЦЫ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КОЛЛАГЕНА

¹ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии»

Минздрава России, г. Уфа

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Уфа

Цель исследования: поиск материалов для кератопластики, альтернативных донорской роговице.

Материал и методы. С этой целью были предложены следующие материалы: рекомбинантные фибриллярные коллагены (коллагеновые гидрогели), коллагеновые губки, коллагеновые пленки, модифицированные коллагеновые гели.

Результаты и обсуждение. В создании искусственной роговицы существует два основных направления в биоинженерии. Первый основан на создании искусственного внеклеточного матрикса, второй – на клеточных технологиях. При создании моделей чаще используются коллагеновые гидрогели, ранее применяли коллагеновые губки и пленки. Недостатками коллагеновых матриц являются слабые биомеханические свойства, что отражается на состоянии периферических швов при кератопластике и ускоренная ферментативная деградация после трансплантации. Поэтому дополнительно проводят химическую обработку кросслинкерами, что позволяет укрепить межколлагеновые связи и замедлить процесс дезорганизации трансплантата. Преимуществом коллагеновых губок является пористость, которая позволяет стромальным клеткам пенетрировать подложку, ускорять процессы деградации и ремоделирования стромы. Биоимпланты роговицы получают также с помощью использования метода 3D-биопечати на основе существующих 3D цифровых моделей роговицы человека.

Заключение. Предложенные материалы обладают как положительными свойствами (пористая структура, прозрачность), так и отрицательными (слабые биомеханические свойства). Несмотря на усилия многих исследователей создать трансплантационный материал, полностью заменяющий донорскую роговицу на настоящий момент это сделать не удастся.

Ключевые слова: кератопластика, искусственная роговица, биоимплантаты.

R.Z. Kadyrov, O.R. Shangina, S.R. Gatiyatullina, I.R. Karachurina, G.I. Garipova

BIOENGINEERING EQUIVALENTS OF THE CORNEAL STROMA BASED ON THE COLLAGEN USE

Purpose: search for keratoplasty materials alternative to donor cornea.

Material and methods. To realize this aim the following materials were proposed: recombinant fibrillary collagens (collagenic hydrogels), collagenic sponges, collagenic films, modified collagenic gels.

Results and discussion. There are two main directions of bioengineering in the creation of the artificial cornea. The first one is based on the creation of the artificial extracellular matrix and the second one is based on cellular technologies. When developing the models, collagenic hydrogels are more often implemented and earlier, collagenic sponges and films were used. The disadvantages of the collagenic matrices are their weak biomechanical properties which is reflected on the condition of the peripheral sutures in keratoplasty and accelerated enzymatic degradation after transplantation. Therefore, an additional chemical treatment is performed by cross-linkers which allows to strengthen the intercollagenic links and slow down the process of degradation and stromal remodeling. The corneal bioimplants are also obtained with the use of 3D bioprint method based on the existing 3D digital models of the human cornea.

Conclusions. The proposed materials possess both positive properties (porous structure, transparency) and negative ones (weak biomechanical properties). In spite of the efforts of many researchers to create a transplantational material, it is impossible so far to completely replace the donor cornea.

Key words: keratoplasty, artificial cornea, bioimplants.

По данным Всемирной организации здравоохранения во всем мире насчитывается от 5 до 10 млн. слепых, нуждающихся в пересадке роговицы [1]. Это связано с определенными трудностями получения донорских тканей, удовлетворяющих требованиям трансплантации. Ежегодно в мире проводится только около 100 тыс. трансплантаций роговицы. В последние два десятилетия разрабатывались методы создания искусственной роговицы основанные на принципах биоинженерии.

В биоинженерии тканей и органов существует два основных направления. Первый подход основан на создании искусственного внеклеточного матрикса, который является субстратом для развития и пролиферации

специфичных для ткани клеток. Этот матрикс должен обладать биосовместимостью и способностью к биodeградации. С течением времени искусственный матрикс за счет активности клеточных элементов заменяется нативной межклеточной средой. Второй подход основан на клеточных технологиях и предполагает формирование внеклеточного матрикса за счет активности клеточных комплексов. Применение клеточного подхода для создания роговицы сопряжено с трудностями, поскольку одним из ключевых требований являются приемлемые биомеханические свойства, которые сложно реализовать при чисто клеточных технологиях. Кроме того, биоинженерная модель роговицы должна иметь хорошие оп-

тические свойства и адекватные характеристики для транспорта ионов и биомолекул. Матрикс должен обеспечивать миграцию, пролиферацию и адгезию клеток, низкую иммуногенность и антиангиогенные свойства, а также необходимые условия для иннервации.

Еще десятилетие назад по образному выражению J.W. Ruberti и J.D. Zieske [2] «ящик с инструментами для биоинженерии» не содержал достаточного количества методов для создания адекватных заменителей роговицы. Идеальным решением было бы создание условий, копирующих поэтапное эмбриональное развитие роговицы и требующих минимальных ремодулирующих воздействий на компоненты роговицы. Однако недостаточно было знаний о механизмах развития глаза и особенностях структурно-функциональной организации роговицы. Тем не менее за последние годы появилось достаточно много новых решений в этой области, в том числе с появлением методов 3-D биопечати, биореакторов, микрожидкостных канальных систем и др.

Среди наиболее перспективных методов большинство исследователей выделяют методы создания коллагеновой стромы и альтернативное применение в качестве стромы других материалов. При обоих подходах не исключаются методы клеточных технологий.

Коллагеновые гидрогели. Известным и ставшим уже классическим подходом в биоинженерии стромы роговицы является использование различных форм рекомбинантных фибриллярных коллагенов. В качестве моделей чаще всего используются коллагеновые гидрогели и в меньшей степени коллагеновые губки и пленки. Однако коллагеновые матриксы имеют неудовлетворительные биомеханические свойства и довольно быстро подвергаются ферментативной деградации при трансплантации. Для усиления биомеханических характеристик гидрогелей используются методы уплотнения гидрогелей химическими или физическими агентами. Распространенными методами формирования имплантата являются обработка химическими кросслинкерами с образованием пептидных связей между amino- и карбоксильными группами коллагеновых молекул и снижение гидрофильности с помощью механического сжатия.

В качестве кросслинкеров используют, например, такие соединения, как глутаральдегид (GA), 1-Этил-3-(3-диметил-аминопропил) карбодииимид (EDC), N-гидроксисукцинимид (NHS), а также дендритные полимеры. Недостатками химических кросслинкеров является

их токсичность. Исследования свойств различных кросслинкеров показало, что коллагеновые гидрогели, обработанные полипропилен-мины октааминовым дендримером (DAB-AM-8) имеют высокие значения модуля Юнга и лучшими по сравнению с EDC и GA оптическими свойствами. Кроме этого, судя по степени эпителизации, гели с дендримерами не обладают токсичностью.

Наиболее известны работы группы M. Griffith и Fagerholm P. по применению коллагеновых гидрогелей в качестве заменителей передней стромы роговицы. Эта группа, включающая европейских и североамериканских исследователей, одна из немногих, которой удалось довести экспериментальные исследования до успешных клинических испытаний.

Экспериментальные работы группы включали исследования свойств гидрогелей коллагенов 1 и 3 типов и конструирование имплантов, которые были испытаны на морских свинках и кроликах [3,4,5,6]. Для клинических исследований был использован гидрогель рекомбинантного коллагена 3-го типа с несколькими лучшими по сравнению с 1-м типом биомеханическими свойствами. До формирования имплантов гидрогель обрабатывали комплексом EDC/NHS с целью кросслинkingа. Импланты толщиной 500 мкм и диаметром 10 мм использовали для передней послойной кератопластики на 9 пациентах с кератоконусом и 1 пациенте с рубцом в центре роговицы. Для контроля 9 пациентам со сходной патологией (кератоконус, эндотелиальная декомпенсация, рубец роговицы) была проведена сквозная кератопластика донорской роговицы. По результатам четырехлетних наблюдений [7,8,9] не развилась реакция отторжения имплантата, и не было прорастания сосудов (в контрольной группе в одном случае – реакция отторжения). К концу сроков наблюдения толщина центральной роговицы с имплантатами составляла 358 ± 101 мкм, донорских роговиц – 576 ± 50 мкм и здоровых роговиц – 534 ± 30 мкм.

В течение срока исследования в импланты активно мигрировали стромальные клетки и наблюдалось ремодулирование и деградация имплантата с формированием типичной ламеллярной структуры стромы. В донорских роговицах этот процесс развивался значительно медленнее. Светопропускание имплантов для белого света $95.1 \pm 0.05\%$ (для роговиц человека $>87\%$). К концу срока наблюдения острота зрения пациентов с имплантатами составляла 20/54, с донорскими роговицами – 20/36.

Несмотря на очевидные достоинства гидрогелей коллагена, используемых в качестве имплантов роговицы, их биомеханические свойства значительно хуже, чем у донорских роговиц, что осложняет наложение периферических швов и формирование удовлетворительной сферичности роговицы [10]. Авторы этих исследований предлагают модифицированную конструкцию имплантов, в частности комплекс гидрогеля коллагена 3-го типа с фосфорилхолином или комплекс коллаген – хитозан [11].

Kong B. с соавт. с целью усиления биомеханических характеристик искусственной роговицы использовали биосовместимый и биоразлагаемый полимер полилактидгликолид (PLGA) в качестве подложки [12]. Подложка из PLGA была сформирована методом электроспиннинга [13]. С быстрым развитием и совершенствованием методов 3D-биопечати в последние годы появились работы, в которых описаны технологии получения биоимплантов роговицы с применением коллагеновых гидрогелей.

Isaacson A. с соавт. [14] применили экструзионный метод 3D-биопечати роговицы на основе существующих цифровых 3D-моделей роговицы человека. В качестве биочернил использовали комплекс альгинат натрия – метакрированный коллаген 1-го типа с добавлением предварительно инкубированной культуры кератоцитов в количестве 2 млн. клеток/мл. Напечатанные импланты полностью сохраняли модельную геометрию. На 1- и 7-е сутки после биопечати выживаемость кератоцитов составляла 92 и 83% соответственно.

Gibney R. с соавт. [15] разработали метод 3D-печати, позволяющий создавать послойные подложки с толщиной слоев 2 мкм и разрешением в 20 мкм (как и в нативной роговице). В качестве биочернил использовали рекомбинантный человеческий коллаген 3-го типа. В эксперименте формировали 2, 10 или 29 слоев, достигая толщины 90 мкм. После формирования подложек они подвергались кросслинкингу с помощью EDS и NHS. Затем подложки засеивали стромальными стволовыми клетками, полученными из донорских роговиц. Количество засеянных клеток составляло 100 клеток на подложку. На 23-й день наблюдения методами иммуноцитохимии была отмечена миграция и пролиферация клеток вдоль волокон всех образцов подложек.

В исследовании Wu с соавт. [16] в качестве биочернил был использован комплекс гидрогеля коллагена 1-го типа с желатином и

альгинатом натрия с добавлением клеток эпителия роговицы человека. Полученные гибридные матрицы продемонстрировали высокую выживаемость клеток эпителия на уровне $94.6 \pm 2.5\%$. Поскольку компоненты матрицы – желатин и альгинат – биоинертны, для их деградации использовали обработку конструкций цитратом натрия. Такая обработка позволяла добиться управляемой деградации альгината в зависимости от соотношения цитрата и альгината. Интересно, что эта обработка усиливала пролиферацию клеток эпителия и формировала сферические кластеры эпителиальных клеток.

Коллагеновые губки. В результате своих исследований ученые под руководством А. Hubel в качестве заменителя роговицы предлагали использовать коллаген в виде губок. [17,18,19]. Существенным преимуществом коллагеновых губок является их пористость, позволяющая стромальным клеткам пенетрировать в подложку лучше, чем в коллагеновых гидрогелях и ускорять процессы деградации и ремоделирования стромы.

Авторы в опытах *in vitro* провели сравнительные исследования биомеханических и оптических свойств коллагеновых губок и коллагеновых гелей, а также особенностей миграции, пролиферации и выживаемости клеток роговицы. Исследователи показали, что механические и оптические свойства губок превышают гидрогели. Модуль Юнга в компрессионных тестах составлял в зависимости от времени инкубации от 90 до 366 Па и от 10 до 11 Па, для губок и гидрогелей соответственно. В начале инкубации модуль для губок составлял в среднем 364 ± 41 Па и на 21-й день инкубации – 177 ± 75 Па. Для гидрогелей модуль был меньше на порядок и составлял от 10.3 ± 12.9 Па на 7-й день и 11.6 ± 14.7 Па на 14-й день инкубации.

Кроме этого, в ходе инкубации наблюдалось сжатие матриц губок и гидрогелей. Объем гелевых матриц на 15-й день инкубации составлял только $7 \pm 2\%$ первоначального объема, для губок эта величина составила $63 \pm 9\%$. Добавление хондроитин сульфата в коллагеновые губки уменьшало эффект уплотнения – объем матриц составлял $73 \pm 7\%$ от исходного. Эти изменения модуля и плотности матриц авторы объясняют взаимодействием между матриксом и клетками, приводящим к деградации структуры матрикса под действием синтезируемых клетками соединений. Коэффициент пропускания света длиной волны 700 нм составлял для губок 0,337 и увеличивался до 0,57 при добавлении хондро-

итин сульфата. Хотя эти величины значительно меньше контрольных измерений роговицы кролика (0,997), но значительно больше, чем для гелевых матриц при инкубации длительностью 7 дней. В первые дни инкубации пропускание для гелей составляло 0,6, но резко снижалось после 7 суток до 0,056.

Коллагеновые пленки. Рядом авторов предлагалось также использование коллагеновых подложек в виде пленок толщиной менее 100 мкм как потенциальных заменителей роговицы [20,21,22]. В своих работах авторы исследовали ультраструктуру коллагеновых волокон, биомеханические и оптические свойства и активность фибробластов в коллагеновых пленках толщиной 60 мкм при культивировании матриц до 5 недель. Проводилось сравнение свойств матриц при использовании различных способов кросслинкинга. Матрицы засеивали фибробластами, полученными из стромы донорских роговиц. Коэффициент пропускания пленок составлял от 0,9 до 0,98 для длин волн 400 и 700 нм, т.е. коэффициент был близок к величинам для нативной роговицы.

Предел прочности при растяжении также был ниже или на уровне соответствующей характеристики для роговицы и составлял от 0,7 до 4,1 МПа. Диаметр коллагеновых фибрилл для пленок равнялся в среднем 233 ± 30 нм, для губок – 201 ± 54 нм. Через неделю инкубации фибробласты мигрировали по всей поверхности пленки, но не проникали внутрь матрикса. Авторы уже в первые часы инкубации наблюдали синтез фибробластами тонких волокон коллагена диаметром 35-75 нм. Количество и плотность таких волокон существенно возрастала к первой неделе инкубации. Судя по продукции актина, фибробласты изменялись фенотипически, приобретая свойства миофибробластов. Этот процесс был более выражен для губок, чем для пленок.

Коллагеновые пленки были применены также для интрастромальной кератопластики на роговице кроликов [23]. Для этого авторы использовали высокоочищенный концентрированный (18%) коллаген 1-го типа, экстрагированный из дермы свиней, который значительно дешевле рекомбинантного человеческого коллагена. Для кросслинкинга применяли 1-[3-(Диметиламино) пропил]-3-этилкарбодиимид метиодид (EDCM) и NHS. С помощью фемтосекундного лазера в средней части роговицы делали надрез с последующим удалением части стромы. При этом не затрагивались эпителий и эндотелий роговицы. В образованный карман имплантировали

подложки диаметром 3 мм и толщиной 100 мкм без наложения швов.

Наблюдение в течение 8 недель после имплантации показало сохранение прозрачности роговицы в области импланта с отсутствием воспалительной реакции. По краям импланта слои роговицы, эпителий, кератоциты и эндотелий сохраняли нормальную структуру в течение периода наблюдения. В конце исследования в области импланта не было отмечено стромальных клеток, хотя и наблюдались единичные клетки на поверхности и внутри импланта в периферических зонах. Авторы считают, что коллагеновые пленки и предложенная процедура кератопластики поможет в хирургическом лечении кератоконуса и дистрофических поражений стромы роговицы.

Модифицированные коллагеновые гели. Рядом исследователей было предложено добавлять в коллагеновые подложки протеогликаны, полисахариды и фосфолипиды с целью приблизить их свойства к внеклеточному матриксу роговицы. Chen J. с соавт. [24] исследовали биосовместимость комплекса, составленного из 20% коллагена, 10% хитозана и 0,5% гиалуроната натрия, и роговицы. В опытах *in vitro* подложки были засеяны взятыми из лимба роговицы кроликов клетками эпителия, кератоцитами и клетками эндотелия. При этом наблюдались пролиферация и формирование монослоев клеток на 9-й день инкубации. Пленки диаметром 6 мм, сформированные из такого комплекса, имплантировали в роговицу кроликов и наблюдали в течение 5 месяцев. В течение всего периода наблюдения роговицы сохраняли прозрачность и отсутствие отека и других нежелательных реакций. К концу наблюдения отмечались заметная деградация и рассасывание подложек.

Thurber A.E. с соавт. [25] в опытах *in vitro* также показали, что добавление протеогликанов (ПГ) значительно увеличивает прозрачность коллагеновых подложек. В этом исследовании были созданы трехслойные подложки с помощью ротации магнитного поля с ортогональным расположением слоев коллагеновых фибрилл. Добавление ПГ, которые содержали 35% хондроитин сульфата и 65% кератансульфата значительно уменьшало диаметр фибрилл и увеличивало прозрачность подложки. Диаметр фибрилл составлял в среднем $62 \pm 17,9$ нм при 0% ПГ, $57 \pm 1,6$ нм при 5% ПГ и $46 \pm 7,4$ нм при 10% ПГ.

Поверхность подложек засеивалась кератоцитами роговицы человека. В ходе инкубации в течение 60 дней пролиферирующие кератоциты мигрировали между слоями под-

ложки и ориентировались в направлении коллагеновых фибрилл. Группа исследователей в эксперименте на кроликах провела переднюю послойную кератопластику с использованием аналогичных подложек [26]. Однако только в одном случае из пяти удалось добиться интеграции подложки в строму и наблюдать реэпителизацию с сохранением прозрачности роговицы. У остальных 4 кроликов произошло отторжение имплантов через несколько дней после кератопластики.

Hackett J.M. с группой ученых использовали для формирования подложек стромы коллаген 3-го типа с 2-метакрилоилоксиэтил фосфорилхолином (МРС). Мономер сходен по структуре с фосфолипидами клеточных мембран и обладает свойством предотвращать неоваскуляризацию. Это было продемонстрировано в экспериментах с имплантацией подложек кроликам с ожогами роговицы [27]. Подложки диаметром 6.25 мм и толщиной 350 мкм имплантировали с помощью послойной кератопластики 12 кроликам с наложением матрасных швов. В группе 1 кератопластика

проводилась с аллогенной роговицей, в группе 2 с подложкой из коллагена 3 и в группе 3 – коллаген 3+МРС. По результатам обследования в течение 9 месяцев в 6 случаях из 12 наблюдалась неоваскуляризация, вызванная наложенными швами. При этом в 1- и 2-й группах было 5 случаев, а в 3-й группе – 1 случай неоваскуляризации имплантов.

Таким образом, разработка искусственной роговицы на основе коллагена обладает рядом положительных преимуществ: наличие пористой структуры (для коллагеновых губок), что позволяло кератоцитам проникать в подложку и ускорять процессы деградации и ремоделирования стромы. Модифицированные коллагеновые гели с добавлением протеогликанов, фосфолипидов и полисахаридов позволяют создать более прозрачные биоматериалы и препятствуют прорастанию новых сосудов. Недостатком коллагеновых матриц являются их слабые биомеханические свойства, что мешает фиксации трансплантата. В связи с этим данное направление требует дальнейших разработок.

Сведения об авторах статьи:

Кадыров Радик Завилович – д.м.н., врач-офтальмолог, генеральный директор ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. Р. Зорге, 67/1. E-mail: radkad@yandex.ru.

Шангина Ольга Ратмировна – д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией консервации тканей, зам. генерального директора ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России, профессор кафедры анатомии человека ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. Р. Зорге, 67/1. E-mail: alloolga@mail.ru.

Гатиятуллина Светлана Рамилевна – врач-офтальмолог ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. Р. Зорге, 67/1. E-mail: gatiyatullina.s@yandex.ru.

Карачурина Ирина Рависовна – врач-офтальмолог ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. Р. Зорге, 67/1. E-mail: 79273361909@yandex.ru.

Гарипова Гузель Ильясовна – врач-офтальмолог ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. Р. Зорге, 67/1. E-mail: guzelka-garipova@rumbler.ru.

ЛИТЕРАТУРА

- Global survey of corneal transplantation and eye banking / P. Gain [et al.] // JAMA Ophthalmol. – 2016. – Vol. 134, № 2. – P. 167-173.
- Ruberti, J.W. Prelude to corneal tissue engineering – gaining control of collagen organization / J.W. Ruberti, J.D. Zieske // Prog. Retin Eye Res. – 2008. – Vol. 27, № 5. – P. 549-577.
- A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation / Y. Liu [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2006. – Vol. 47, № 5. – P. 1869-1875.
- Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes / W. Liu [et al.] // Biomaterials. – 2008. – Vol. 29, № 9. – P. 1147-1158.
- Innervation of tissue-engineered recombinant human collagen-based corneal substitutes: a comparative in vivo confocal microscopy study / N. Lagali [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2008. – Vol. 49, № 9. – P. 3895-3902.
- Innervation of tissue-engineered corneal implants in a porcine model: a 1-year in vivo confocal microscopy study / N.S. Lagali [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2007. – Vol. 48, № 8. – P. 3537-3544.
- A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study / P. Fagerholm [et al.] // Sci. Transl. Med. – 2010. – Vol. 2, № 46. – P. 46-61.
- Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold / P. Fagerholm [et al.] // Biomaterials. – 2014. – Vol. 35, № 8. – P. 2420-2427.
- 3D corneal shape after implantation of a biosynthetic corneal stromal substitute / J.A. Ong [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2016. – Vol. 57, № 6. – P. 2355-2365.
- Biosynthetic corneal implants for replacement of pathologic corneal tissue: performance in a controlled rabbit alkali burn model / J.M. Hackett [et al.] // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2011. – Vol. 52, № 2. – P. 651-657.
- Tissue-engineered cornea constructed with compressed collagen and laser-perforated electrospun mat / B. Kong [et al.] // Sci. Rep. – 2017. – Vol. 7, № 1. – P. 970.
- Electrospun Fibrous Scaffolds for Tissue Engineering: Viewpoints on Architecture and Fabrication / I. Jun [et al.] // Int. J. Mol. Sci. – 2018. – Vol. 19, № 3. – P. 745.
- Isaacson, A. 3D bioprinting of a corneal stroma equivalent / A. Isaacson, S. Swioklo, C.G. Connon // Exp. Eye Res. – 2018. – № 173. – P. 188-193.
- The human cornea as a model tissue for additive biomanufacturing: a review / R. Gibney [et al.] // Proc. CIRP. – 2017. – № 65. – P. 56-63.
- Bioprinting three-dimensional cell-laden tissue constructs with controllable degradation / Z. Wu [et al.] // Scientific Reports. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 24474.

16. Orwin, E.J. In vitro culture characteristics of corneal epithelial endothelial and keratocyte cells in a native collagen matrix / E.J. Orwin, A. Hubel // *Tissue Eng.* – 2000. – Vol. 6, № 4. – P. 307-319.
17. Orwin, E.J., Biomechanical and optical characteristics of a corneal stromal equivalent / E.J. Orwin, M.L. Borene, A. Hubel // *J. Biomech. Eng.* – 2003. – Vol. 125, № 4. – P. 439-444.
18. Borene, M.L. Mechanical and cellular changes during compaction of a collagen-sponge-based corneal stromal equivalent / M.L. Borene, V.H. Barocas, A. Hubel // *Ann. Biomed. Eng.* – 2004. – Vol. 32, № 2. – P. 274-283.
19. Microstructural characteristics of extracellular matrix produced by stromal fibroblasts / R.A. Crabb [et al.] // *Ann. Biomed. Eng.* – 2006. – Vol. 34, № 10. – P. 1615-1627.
20. Biomechanical and microstructural characteristics of a collagen film-based corneal stroma equivalent / R.A.B. Crabb [et al.] // *Tissue Eng.* – 2006. – Vol. 12, № 6. – P. 1565-1575.
21. Crabb, R.A.B. Influence of matrix processing on the optical and biomechanical properties of a corneal stroma equivalent / R.A.B. Crabb, A. Hubel // *Tissue Eng. Part A.* – 2008. – Vol. 14, № 1. – P. 173-182.
22. Enhanced regeneration of corneal tissue via a bioengineered collagen construct implanted by a nondisruptive surgical technique / M. Koulikovska [et al.] // *Tissue Eng. Part A.* – 2015. – Vol. 21, № 5-6. – P. 1116-1130.
23. Study on biocompatibility of complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea / J. Chen [et al.] // *Artif. Organs.* – 2005. – Vol. 29, № 2. – P. 104-113.
24. Thurber, A.E. In vivo bioresponses to silk proteins / A.E. Thurber, F.G. Omenetto, D.L. Kaplan // *Biomaterials.* – 2015. – № 71. – P. 145-157.
25. Use of magnetically oriented orthogonal collagen scaffolds for hemi-corneal reconstruction and regeneration / N. Builles [et al.] // *Biomaterials.* – 2010. – Vol. 31, № 32. – P. 8313-8322.

REFERENCES

1. Gain P. [et al.]. Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA Ophthalmol.* 2016;134(2):167–173 (in Eng). doi: 10.1001/jamaophthalmol.2015.4776.
2. Ruberti J.W., Zieske J.D. Prelude to corneal tissue engineering – gaining control of collagen organization. *Prog. Retin Eye Res.* 2008;27(5):549–577 (in Engl.). doi: 10.1016/j.preteyeres.2008.08.001.
3. Liu Y. [et al.]. A simple, cross-linked collagen tissue substitute for corneal implantation. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006;47(5):1869–1875 (in Engl.). doi: 10.1167/iovs.05-1339.
4. Liu W. [et al.]. Recombinant human collagen for tissue engineered corneal substitutes. *Biomaterials.* 2008;29(9):1147-1158 (in Engl.). doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.11.011.
5. Lagali N. [et al.]. Innervation of tissue-engineered recombinant human collagen-based corneal substitutes: a comparative in vivo confocal microscopy study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2008;49(9):3895-3902 (in Engl.). doi: 10.1167/iovs.07-1354.
6. Lagali N.S. [et al.]. Innervation of tissue-engineered corneal implants in a porcine model: a 1-year in vivo confocal microscopy study. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2007;48(8):3537-3544 (in Engl.). doi: 10.1167/iovs.06-1483.
7. Fagerholm P. [et al.]. A biosynthetic alternative to human donor tissue for inducing corneal regeneration: 24-month follow-up of a phase 1 clinical study. *Sci. Transl. Med.* 2010;2(46):46-61 (in Engl.). doi: 10.1126/scitranslmed.3001022.
8. Fagerholm P. [et al.]. Stable corneal regeneration four years after implantation of a cell-free recombinant human collagen scaffold. *Biomaterials.* 2014;35(8):2420-2427 (in Engl.). doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.11.079.
9. Ong J.A. [et al.]. 3D corneal shape after implantation of a biosynthetic corneal stromal substitute. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2016;57(6):2355–2365 (in Engl.). doi: 10.1167/iovs.15-18271.
10. Hackett J.M. [et al.]. Biosynthetic corneal implants for replacement of pathologic corneal tissue: performance in a controlled rabbit alkali burn model. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011;52(2):651–657 (in Engl.). doi: 10.1167/iovs.10-5224.
11. Kong B. [et al.]. Tissue-engineered cornea constructed with compressed collagen and laser-perforated electrospun mat. *Sci. Rep.* 2017;7(1):970 (in Engl.). doi: 10.1038/s41598-017-01072-0.
12. Jun I. [et al.]. Electrospun fibrous scaffolds for tissue engineering: viewpoints on architecture and fabrication. *Int. J. Mol. Sci.* 2018;19(3):745 (in Engl.). doi: 10.3390/ijms19030745.
13. Isaacson A., Swioklo S., Cannon C.G. 3D bioprinting of a corneal stroma equivalent. *Exp. Eye Res.* 2018;(173):188–193 (in Engl.). doi: 10.1016/j.exer.2018.05.010.
14. Gibney R. [et al.]. The human cornea as a model tissue for additive biomanufacturing: a review. *Proc. CIRP.* 2017;(65):56–63 (in Engl.). doi: 10.1016/j.procir.2017.04.040.
15. Wu Z. [et al.]. Bioprinting three-dimensional cell-laden tissue constructs with controllable degradation. *Scientific Reports.* 2016;6(1):24474 (in Engl.). doi: 10.1038/srep24474
16. Orwin E.J., Hubel A. In vitro culture characteristics of corneal epithelial endothelial and keratocyte cells in a native collagen matrix. *Tissue Eng.* 2000;6(4):307-319 (in Engl.) doi: 10.1089/107632700418038.
17. Orwin E.J., Borene M.L., Hubel A. Biomechanical and optical characteristics of a corneal stromal equivalent. *J. Biomech. Eng.* 2003;125(4):439-444 (in Engl.). doi: 10.1115/1.1589773.
18. Borene M.L., Barocas V.H., Hubel A. Mechanical and cellular changes during compaction of a collagen-sponge-based corneal stromal equivalent. *Ann. Biomed. Eng.* 2004;32(2):274-283 (in Engl.). doi: 10.1023/b:abme.0000012747.97620.3a.
19. Crabb R.A. [et al.]. Microstructural characteristics of extracellular matrix produced by stromal fibroblasts. *Ann. Biomed. Eng.* 2006;34(10):1615–1627 (in Engl.). doi: 10.1007/s10439-006-9181-x.
20. Crabb R.A.B. [et al.]. Biomechanical and microstructural characteristics of a collagen film-based corneal stroma equivalent. *Tissue Eng.* 2006;12(6):1565–1575 (in Engl.). doi: 10.1089/ten.2006.12.1565.
21. Crabb R.A.B., Hubel A. Influence of matrix processing on the optical and biomechanical properties of a corneal stroma equivalent. *Tissue Eng. Part A.* 2008;14(1):173-182 (in Engl.). doi: 10.1089/ten.a.2007.0139.
22. Koulikovska M. [et al.]. Enhanced regeneration of corneal tissue via a bioengineered collagen construct implanted by a nondisruptive surgical technique. *Tissue Eng. Part A.* 2015;21(5-6):1116-1130 (in Engl.). doi: 10.1089/ten.TEA.2014.0562.
23. Chen J. [et al.]. Study on biocompatibility of complexes of collagen-chitosan-sodium hyaluronate and cornea. *Artif. Organs.* 2005;29(2):104-113 (in Engl.). doi: 10.1111/j.1525-1594.2005.29021.x.
24. Thurber A.E., Omenetto F.G., Kaplan, D.L. In vivo bioresponses to silk proteins. *Biomaterials.* 2015;71:145–157 (in Engl.). doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.08.039.
25. Builles N. [et al.]. Use of magnetically oriented orthogonal collagen scaffolds for hemi-corneal reconstruction and regeneration. *Biomaterials.* 2010;31(32):8313-8322 (in Engl.). doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.07.066.