

МЕТОДИЧЕСКИЕ ОСНОВЫ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АУТОЛОГИЧНОГО КУЛЬТИВИРОВАННОГО ЭПИТЕЛИЯ ПОЛОСТИ РТА

С.А. Борзенко^{1, 2}, Б.Э. Малюгин^{1, 2}, М.Ю. Герасимов¹, Д.С. Островский¹

¹ ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» имени академика С.Н. Федорова»

Минздрава России, Москва, Российская Федерация

² ФГБОУ ВО «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Минздрава России, Москва, Российская Федерация

По данным Всемирной организации здравоохранения, роговичная слепота является четвертой по частоте причиной слепоты и слабовидения в мире. В Российской Федерации до 18% слепоты обусловлено поражением роговицы. Синдром лимбальной недостаточности (СЛН) является одной из причин слепоты и слабовидения при патологии роговицы за счет замещения переднего эпителия фибро-вазкулярным pannusом. При таких заболеваниях, как аниридия, синдром Стивенса–Джонсона, при тяжелых ожогах роговицы обоих глаз может развиваться двусторонний СЛН, приводящий к выраженному снижению остроты зрения на оба глаза, и как следствие, инвалидности. В таких случаях для реконструкции переднего эпителия роговицы предлагается использовать клеточную терапию на основе аутологичной культуры эпителия полости рта как альтернативу аллогенным пересадкам лимба. Применение нового метода лечения способствует реэпителизации роговицы, увеличению остроты зрения, редукции основных неспецифических жалоб и повышению качества жизни пациентов. Эффективность и существенное повышение частоты прозрачного приживления донорской роговицы после клеточной терапии обуславливает повышенный интерес к данной теме во всем мире. В настоящем обзоре представлены литературные данные по особенностям гисто-топографии и методам получения аутологичной культуры эпителия полости рта, клеточным маркерам, позволяющим идентифицировать эпителиальные клетки, а также методам создания клеточных трансплантатов для последующей пересадки на поверхность роговицы у пациентов с СЛН.

Ключевые слова: эпителий полости рта, трансплантация стволовых клеток, роговица, роговичный эпителий, синдром лимбальной недостаточности.

CULTIVATED AUTOLOGOUS ORAL MUCOSAL EPITHELIAL TRANSPLANTATION

S.A. Borzenok^{1, 2}, B.E. Malyugin^{1, 2}, M.Yu. Gerasimov¹, D.S. Ostrovsky¹

¹ Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russian Federation

² Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

According to the World Health Organization, corneal blindness is the fourth most common cause of blindness and visual impairment worldwide. In Russia, up to 18% of blindness is caused by corneal damage. Limbal stem cell deficiency (LSCD) is one of the causes of corneal blindness and visual impairment due to anterior epithelial replacement with fibrovascular pannus. Bilateral LSCD may develop in patients with aniridia, Steven–Jones syndrome, and severe corneal burns of both eyes, leading to severe decrease in visual acuity in both eyes and, as a consequence, physical disability associated with blindness. In such cases, cell therapy, based on autologous oral epithelial culture as an alternative to allogeneic limbus transplants, is proposed for reconstruction of the anterior corneal epithelium. This new treatment method promotes corneal reepithelization, better visual acuity, reduced nonspecific ocular complaints and improved quality of life of patients. The effectiveness and significant increase in the frequency of transparent engraftment of donor corneas after cell therapy drives huge interest in this topic all

Для корреспонденции: Герасимов Максим Юрьевич. Адрес: 127486, Москва, Бескудниковский бульвар, 59а. Тел. (499) 488-85-58. E-mail: gerasimovmy@mntk.ru

Corresponding author: Maxim Gerasimov. Address: 59A, Beskudnikovsky Blvd., Moscow, 127486, Russian Federation. Phone: (499) 488-85-58. E-mail: gerasimovmy@mntk.ru

over the world. This review presents literature data on the features of histotopography and methods for obtaining a cultured autologous oral mucosal epithelium, on cell markers that are used to identify epithelial cells, and on methods for creating cell grafts for subsequent transplantation to the corneal surface in LSCD patients.

Keywords: oral mucosal epithelial cells, oral epithelium, stem cell transplantation, cornea, corneal epithelium, limbal stem cell deficiency.

АКТУАЛЬНОСТЬ

По данным Всемирной организации здравоохранения, роговичная слепота является четвертой (5,1%) по частоте причиной слепоты и слабовидения в мире [1]. Согласно литературным данным, в 2015 году в мире из-за патологии роговицы 23 миллиона человек были слепы на один глаз, а 4,9 миллиона – на оба [2]. В Российской Федерации до 18% слепоты обусловлено поражением роговицы [3]. Недостаточность донорского материала, а также патогенез ряда заболеваний роговицы, приводящий по той или иной причине к неэффективности кератопластики, обуславливает исключительно высокую потребность в разработке и внедрении в клиническую практику новых направлений лечения данных патологий.

Синдром лимбальной недостаточности (СЛН) является одной из причин слепоты и слабовидения при патологии роговицы. Известно, что передний эпителий роговицы в течение жизни обновляется за счет расположенных в зоне лимба локальных унипотентных прогениторов, именуемых «лимбальные эпителиальные стволовые клетки» (ЛЭСК) (limbal epithelial stem cells (LESC – англ.) [4]. При острой обширной альтерации или в случае хронического процесса повреждения ЛЭСК могут быть необратимыми. При этом недостаток функции и/или количества указанных клеток приводит к нарушению естественного процесса обновления эпителия и классифицируется как синдром лимбальной недостаточности (СЛН). При СЛН разрушается физиологический барьер с конъюнктивой, что приводит к миграции фибро-васкулярной ткани на поверхность стромы роговицы и вызывает выраженное стойкое снижение остроты зрения [5].

При прогрессировании СЛН приводит к развитию точечной эпителиопатии и нередко к появлению стойкого эпителиального дефекта, что значительно повышает риски изъязвления и перфорации роговицы [6]. При одностороннем поражении, в случае если парный глаз здоров, возможности социальной адаптации у такого пациента не считаются ограниченными. Однако в зависимости от выраженности симптомов качество жизни может существенно снижаться. При аниридии, синдроме Стивенса–Джонсона, ожогах роговицы обоих глаз развивается двусторонний СЛН, что приводит к выраженному снижению остроты зрения на оба глаза, и как следствие, инвалидности. За счет поверхностной и/или глубокой неоваскуляри-

зации кератопластика у любого пациента с СЛН относится к типу высокого риска в связи с неудовлетворительным прогнозом прозрачного приживления [7]. Согласно J.S. Friedenwald [8], СЛН рассматривается как пусковой механизм поверхностной неоваскуляризации роговицы. Следовательно, реконструкция эпителия при этом синдроме является патофизиологически обоснованной и оправданной процедурой.

В настоящее время единого подхода к лечению СЛН не выработано. Многие группы исследователей предлагают различные техники и оперативные приемы в зависимости от распространенности процесса (объем поражения лимбальной зоны роговицы по ее окружности), вовлеченности одного или обоих глаз, а также уровня слезопродукции [9, 10]. В ряде клинических работ при двустороннем СЛН изучалась эффективность хирургических методов аллогенной трансплантации лимба роговицы от донора-трупа [11] или от живого донора-родственника [12]. Однако протокол фармакологического сопровождения данной операции представляет собой длительную системную иммуносупрессию [13]. Для решения данной проблемы рядом научных групп предлагается использовать клеточную терапию на основе аутологичной культуры эпителия полости рта [14]. Культуру клеток для пересадки получают в условиях лаборатории из биоптата слизистой полости рта [15]. В первых работах по данной теме было предложено использовать аутологичный культивированный буккальный эпителий [16, 17]. Рациональность выбора данного типа клеток была обусловлена его морфологическими свойствами, схожими с передним эпителием роговицы [18]. Он является неороговевающим многослойным плоским и находится в контакте с воздухом. По данным литературы, успешная реэпителизация роговицы на основе этих клеток наблюдалась в 72% случаев, при сроках наблюдения от 1 до 7,5 года. [14]. Барьер между роговичным и конъюнктивальным эпителием восстанавливался, наблюдался регресс хронически протекающего воспаления, а острота зрения увеличивалась у 68% пациентов. В работе Y. Satake et al. было показано, что приживление такого трансплантата эпителия, согласно анализу по Каплану–Майеру, относительно стабильное во времени и составляет 64,8% в первый год, 59,0% – на второй и 53,1% – на третий [19]. A. Baradaran-Rafii et al. [20] после трансплантации аутологичных культивированных клеток буккального эпителия проводили сквозную кератопластику с оптической

целью. Согласно анализу по Каплану–Майеру, было отмечено, что роговичный трансплантат сохраняет прозрачность в 92,9% случаев после первого года наблюдений и в 69,2% на сроке 3,3 года.

Таким образом, исходя из результатов клинических исследований, аутологичный культивированный эпителий полости рта может рассматриваться как основной способ восстановления эпителия роговицы при двустороннем СЛН, а также как альтернативный вариант лечения при одностороннем СЛН. Перспектива эпителизации *de novo* при тяжелых заболеваниях роговицы путем трансплантации аутологичной культуры эпителия полости рта обуславливает повышенный интерес к данной теме во всем мире.

Цель: проанализировать литературные данные по экспериментальным методам получения аутологичного культивированного эпителия слизистой полости рта и выявить наиболее актуальные направления развития технологии трансплантации данных клеток.

ОСОБЕННОСТИ СТРОЕНИЯ ЭПИТЕЛИЯ ПОЛОСТИ РТА

По эмбриогенезу, эпителиальные ткани полости рта имеют гетерогенное происхождение, что отражается на их строении и физиологических свойствах [21]. На основе данных гистологических исследований с окраской на специфические маркеры в полости рта можно обнаружить участки как ороговевающего, так и неороговевающего многослойного эпителия [22]. А именно эпителий жевательных поверхностей, таких как твердое небо и десна, относят к ороговевающему типу. Эпителий, выстилающий нижнюю поверхность языка, мягкого неба и дна полости рта, а также слизистую губ и щек (буккальный) – к неороговевающему [22]. По данным литературы, буккальный эпителий может содержать участки паракератинизации, а по линии смыкания зубов может быть представлен ороговевающим [23]. Слизистая поверхность губы, напротив, выстлана гистологически более гомогенным неороговевающим эпителием, который имеет меньше стратифицированных слоев [23]. Общеизвестно, что эпителий роговицы является неороговевающим многослойным плоским [24], следовательно, трансплантация культивированных клеток со свойствами ороговевания и/или паракератинизации для его реконструкции неоптимальна.

МЕТОДЫ ПОЛУЧЕНИЯ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ ПОЛОСТИ РТА

Одним из ключевых вопросов применения клеточных технологий в клинической практике является стандартизация среды и условий культивирования. Важно отметить, что для применения в клинике рекомендуется использовать культуральные среды без

животных компонентов [25], а добавки для стимуляции роста определенного типа клеток (инсулин, гидрокортизон и другие) должны иметь сертификат GMP (англ., Good Manufacturing Practice, Надлежащая производственная практика) [26]. Также было показано, что в качестве общего митогена в процессе производства клеточного трансплантата может быть использована аутологичная сыворотка пациента [27].

Среди культуральных сред, использованных в клинике как базовые для получения культуры буккального эпителия, применялись следующие: среда DMEM/F12 (1:1–1:3) содержащая 1,05–1,425 mM кальция, и среда для роста кератиноцитов с низким содержанием кальция: 0,06–0,07 mM [28]. Низкое содержание кальция в среде является способом культуральной селекции эпителия за счет морфофункциональной трансформации и элиминации фибробластоподобных клеток [29]. Высокое содержание кальция, в свою очередь, вызывает стратификацию эпителиальных клеток [30] и может снижать общий регенераторный потенциал будущего клеточного препарата.

По данным литературы, наиболее распространенная группа добавок в культуральную среду, используемая для стимуляции роста эпителия полости рта, включает такие факторы, как инсулин, гидрокортизон, человеческий эпидермальный фактор роста (hEGF), трийодтиронин и холерный токсин [31]. По нашим данным, последние два фактора поставляются как реагент для исследований и не имеют сертификата GMP.

Первичная культура клеток эпителия полости рта может быть получена путем культивирования эксплантатов или с помощью обработки ткани ферментами [26]. Первый способ актуален, если биоптат слизистой имеет небольшие (2–4 мм) размеры, а ферментативная обработка может привести к гибели прогениторных клеток эпителия. Недостатком этого способа является медленный рост и потенциальная возможность контаминации культуры фибробластоподобными клетками из подслизистого слоя биоптата. Для более крупных образцов ткани применима техника обработки ферментами, которая осуществляется в два этапа [26]. На первом используется раствор диспазы в среде DMEM (1,8 mM кальция) для расщепления базальной мембраны. Для этого ткань слизистой помещается в раствор с концентрацией диспазы 2,4 U/мл на 18 часов при +4 °C (холодовой вариант) или при +37 °C на 2 часа (ускоренный вариант). На втором этапе отщепленный эпителий обрабатывается трипсином-версеном (0,25–0,02%) для получения суспензии клеток для посева. По мнению ряда авторов, наиболее оптимальной для посева клеток буккального эпителия является концентрация $4\text{--}5 \times 10^5$ клеток на см^2 [32]. Первичную культуру и ее пассирование проводят в стандартных условиях

под контролем световой фазово-контрастной микроскопии со сменой среды через 1 сутки. Культуру клеток буккального эпителия отличает высокий пролиферативный потенциал и способность сохранять популяцию при субкультивировании [31].

ИДЕНТИФИКАЦИЯ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ ПОЛОСТИ РТА В КУЛЬТУРЕ И ТКАНИ

Для идентификации клеток эпителия полости рта в культуре наиболее распространена методика иммунофлуоресцентной окраски культивируемых клеток. Одними из важнейших являются маркеры пролиферации, так как позволяют выявлять прогениторные клетки как по общему маркеру делящихся клеток Ki67 [33], так и по более специфичным для эпителия полости рта p75 [33] и p63 [34]. Фенотип клеток подтверждают окраской на характерные для эпителия интегрин $\beta 1$ (базальный эпителий) [35], виментин (промежуточные филаменты) [36], ZO-1 (англ., Zonula occludens-1) (белок плотных межклеточных контактов, тип 1) [33], коннексин-43 (белок щелевых межклеточных контактов) [36]. При окраске на маркеры цитокератинов детектируют ороговевающий (СК 1 и 10) и неороговевающий (СК 4 и 13) эпителий [37, 36]. Для выявления клеток, экспрессирующих маркеры, характерные для лейкоплакии и плоскоклеточной карциномы *in situ*, может быть применено окрашивание на цитокератины 8 и 18 [38]. Дополнительная окраска на маркеры CD 44 и 73 позволяет идентифицировать фибробластоподобные клетки в культуре [28]. Эпителий слизистой полости рта в биоптате может быть рутинно определен на поперечных срезах с помощью окраски парафиновых срезов на гематоксилин-эозин. Для более подробной характеристики эпителия в ткани используется иммуногистохимическая окраска на вышеуказанные маркеры на криосрезах.

МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ НА ОСНОВЕ КУЛЬТИВИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЭПИТЕЛИЯ ПОЛОСТИ РТА

Клеточная терапия в контексте реконструкции поверхности роговицы не может быть осуществлена путем простого закапывания суспензии культивированных клеток. Поэтому для закрепления культивированных клеток и создания плотного контакта трансплантата с роговицей необходимы носители или матриксы [39]. Исходя из свойств роговицы в целом и ее эпителия в частности, следует понимать, что они должны быть прозрачными, простыми при манипуляции как во время культивирования, так и в процессе пересадки. Необходимо, чтобы матрикс поддерживал пролиферацию культивируемых клеток и сохранял их высокую жизнеспособность [31].

В экспериментальных клинических работах для пересадок аутологичного культивированного буккального эпителия использовались амниотическая мембрана (амнион), фибриновый гель, а также технология создания клеточных слоев [31].

Амнион – это плоская мембрана, имитирующая базальную, при культивировании на которой клетки буккального эпителия распространяются горизонтально, формируя плоскостную конструкцию [40]. При его использовании в качестве подложки для роста и переноса культивированных клеток их количество и качество (иммунофенотип) перед трансплантацией оценить чрезвычайно трудно.

Фибриновый клей позволяет заключить клетки в состав объемной тканеинженерной конструкции путем последовательного смешивания суспензии культивированных клеток и компонентов клея [41]. Фибриновый клей, имеющий регистрационное удостоверение в России (Ивисел®, Джонсон & Джонсон), ранее никогда не изучался как носитель клеток эпителия полости рта. В отличие от аналога (Tisseel®, Baxter) данный клей имеет более короткий срок биodeградации за счет отсутствия в его рецептуре антипротеолитического фермента апротинина. Оба клея не являются аутологичными продуктами, хотя и имеют высокий профиль безопасности. Ограничение их широкого применения обусловлено сложностью доставки и хранения, которые осуществляются при температуре ниже -20°C .

Технология получения клеточных слоев была предложена в том числе и для создания клеточного трансплантата буккального эпителия [16]. Для этого использовалась специальная лабораторная посуда, на культуральную поверхность которой нанесен термочувствительный полимер [42]. При переносе из инкубатора ($t + 37^{\circ}\text{C}$) в комнатную температуру ($+20...24^{\circ}\text{C}$) полимер изменяет свои свойства на гидрофобные и позволяет отделять пласт культивированных клеток в виде тонкой пленки без использования ферментов. Полученный клеточный пласт, однако, является непрочным объектом и также требует фиксации к роговице во время пересадки.

Таким образом, на сегодня имеется многообразие методов культивирования эпителия слизистой полости рта и способов получения трансплантата. Вариабельным является практически каждый этап от выбора места биопсии до определения субстрата для культивирования. Для удобства читателей представлена уточняющая характеристика методов (табл.).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В связи с инвалидизирующим характером заболеваний, вызывающих синдромом лимбальной недостаточности, в течение многих десятилетий реконструкция частично или полностью утраченного эпителиального покрова роговицы представляет

собой актуальную проблему в офтальмологии. Опубликованные результаты исследований по клеточной терапии на основе аутологичной культуры эпителия полости рта у пациентов с двусторонним СЛН свидетельствуют о ее высокой эффективности. Применение нового метода способствует реэпителизации роговицы, увеличению остроты зрения, редукции основных неспецифических жалоб и повышению качества жизни пациентов, большинство из которых являются инвалидами вследствие роговичной слепоты. Однако в литературе имеются разнообразные и нередко противоречивые данные по методи-

кам выделения и культивирования клеток эпителия полости рта, а также по способам конструирования клеточного трансплантата. Это может быть причиной получения гетерогенных популяций клеток, и как следствие, несопоставимых результатов. Остается открытым вопрос и о том, что определяет лучший результат реэпителизации роговицы – способ трансплантации клеток в зависимости от типа тканеинженерной конструкции или же качество получаемых клеток по соотношению маркеров. Наконец, за счет гетерогенности слизистой полости рта свойства ау-

Таблица

Методические подходы, используемые для получения культуры и трансплантата клеток эпителия полости рта

Methodological approaches used to obtain oral mucosal epithelial cell culture and graft

| Методика | Виды | Краткая характеристика |
|---|---|--|
| Источник неороговевающего эпителия в полости рта [22, 23] | Слизистая губ и щек Нижняя поверхность языка Мягкое небо Дно полости рта | Наиболее доступным для биопсии являются поверхности слизистой губы и щеки |
| Способ получения первичной культуры эпителия [26] | Ферменты (диспаза, коллагеназа, трипсин) | Применение энзимов обеспечивает быстрое получение клеток с пониженной жизнеспособностью и, как правило, используется в сочетании с фидерным слоем |
| | Культивирование эксплантатов | Более медленный выход клеток, сохраняется ниша локальных стволовых клеток и окружающий их матрикс |
| Субстрат (подложка) для клеток [40–42] | Амниотическая мембрана | Используется в многих протоколах как подложка для культивирования эпителиальных клеток, представляет собой прозрачную мембрану, преимущественно из коллагена IV типа |
| | Фибриновый гель | Прозрачный гидрогель, получаемый из коммерческого фибринового геля (Tisseel®, Baxter; Evicel®, Jonson & Jonson) |
| | Без субстрата | Клетки культивируются на поверхности культуральной посуды |
| | Термочувствительный полимер | При понижении температуры до +20...24 °C становится гидрофобным и отделяет клетки от культуральной поверхности |
| Фидерный слой [15, 32] | 3Т3 мышинные фибробласты | Конфлюентный монослой фибробластов, инактивированный цитостатиком или облучением, обогащает культуральную среду факторами роста |
| | Без фидерного слоя | Культивирование без данного слоя требует добавления стимуляторов митогенеза клеток эпителия |
| Культуральная среда [28–30] | «Высокий кальций» ($\geq 1,0$ mM) | Активирует созревание эпителиальных клеток, способствует активной миграции и прикреплению фибробластов |
| | «Низкий кальций» ($\leq 0,1$ mM) | Удерживает незрелое состояние популяции клеток эпителия, препятствует миграции и прикреплению фибробластов, основа для селективных культуральных сред |
| Сыворотка [27, 28] | Ксеногенная | Имеется риск передачи известных и неизвестных патогенов, вариативные свойства от партии к партии |
| | Аутогенная | Исключены недостатки ксеногенной сыворотки, может быть создан запас для хранения в криобанке |
| Специфические факторы роста эпителия [31] | GMP: инсулин, гидрокортизон, человеческий эпидермальный фактор роста (hEGF) | Указанные три фактора роста производятся в виде продуктов с сертификатом GMP |
| | Non GMP: трийодтиронин и холерный токсин | Не выпускаются с сертификатом GMP, требуется дополнительное разрешение регулирующих органов |

тологического трансплантата эпителиальных клеток могут различаться.

Таким образом, критический анализ научных публикаций по проблеме терапии культивированными клетками эпителия полости рта при синдроме лимбальной недостаточности позволил прийти к заключению о том, что на сегодня существует ряд общих правил и рекомендаций, лежащих в основе данного экспериментального подхода. Но при этом кардинальное различие точек зрения по ряду ключевых вопросов требует дальнейших исследований в данном направлении.

Работа выполнена при поддержке Министерства здравоохранения Российской Федерации по программе НИОКРТ, № АААА-А18-118082290065-4.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

The authors declare no conflict of interest.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. www.who.int [Internet]. World Health Organization. Prevention of Blindness and Visual Impairment. Available from: Доступно по ссылке: <http://www.who.int/blindness/causes/priority/en/index8.html> от 26/02-2019 г.
2. Avadhanam VS, Liu CS. A brief review of Boston type-1 and osteo-odontokeratoprotheses. *Br J Ophthalmol*. 2015; 99: 878–887. doi: 10.1136/bjophthalmol-2014-305359.
3. Либман ЕС, Калеева ЭВ, Рязанов ДП. Комплексная характеристика инвалидности вследствие офтальмопатологии в Российской Федерации. *Российская офтальмология*. 2012; 5: 24–26. Libman ES, Kaleeva EV, Ryazanov DP. Kompleksnaya kharakteristika invalidnosti vsledstvie oftal'mopatologii v Rossijskoj Federatsii. *Rossijskaya oftal'mologiya*. 2012; 5: 24–26. [In Russ.].
4. Dua HS, Azuara-Blanco A. Limbal Stem Cells of the Corneal Epithelium. *Surv Ophthalmol*. 2000; 44: 415–425. PMID: 10734241.
5. Dua HS, Saini JS, Azuara-Blanco A, Gupta P. Limbal stem cell deficiency: concept, etiology, clinical presentation, diagnosis and management. *Indian J Ophthalmol*. 2000; 48: 83–92. PMID: 11116520.
6. Lim P, Fuchsluga TA, Jurkunas UV. Limbal stem cell deficiency and corneal neovascularization. *Semin Ophthalmol*. 2009; 24: 139–148. doi: 10.1080/08820530902801478.
7. Roshandel D, Eslani M, Baradaran-Rafii A, Cheung AY, Kurji K, Jabbehdari S et al. Current and emerging therapies for corneal neovascularization. *Ocul Surf*. 2018; 16: 398–414. doi: 10.1016/j.jtos.2018.06.004.
8. Friedenwald JS. Growth pressure and metaplasia of conjunctival and corneal epithelium. *Doc Ophthalmol*. 1951; 5–6: 184–192. PMID: 14896877.
9. Vazirani J, Mariappan I, Ramamurthy S, Fatima S, Basu S, Sangwan VS. Surgical Management of Bilateral Limbal Stem Cell Deficiency. *Ocul Surf*. 2016; 14: 350–364. doi: 10.1016/j.jtos.2016.02.00.
10. Holland EJ. Management of Limbal Stem Cell Deficiency: A Historical Perspective, Past, Present, and Future. *Cornea*. 2015; 34: 9–15. doi: 10.1097/ICO.0000000000000534.
11. Tsai RJ, Tseng SC. Human allograft limbal transplantation for corneal surface reconstruction. *Cornea*. 1994; 13: 389–400. PMID: 7995060.
12. Tsubota K, Toda I, Saito H, Shinozaki N, Shimazaki J. Reconstruction of the corneal epithelium by limbal allograft transplantation for severe ocular surface disorders. *Ophthalmology*. 1995; 102: 1486–1496. PMID: 9097796.
13. Holland EJ, Mogilishetty G, Skeens HM, Hair DB, Neff KD, Biber JM et al. Systemic immunosuppression in ocular surface stem cell transplantation: results of a 10-year experience. *Cornea*. 2012; 31: 655–661. doi: 10.1097/ICO.0b013e31823f8b0c.
14. Utheim TP. Concise review: transplantation of cultured oral mucosal epithelial cells for treating limbal stem cell deficiency-current status and future perspectives. *Stem Cells*. 2015; 33: 1685–1695. doi: 10.1002/stem.1999.
15. Inatomi T, Nakamura T, Koizumi N, Sotozono C, Yokoi N, Kinoshita S. Midterm results on ocular surface reconstruction using cultivated autologous oral mucosal epithelial transplantation. *Am J Ophthalmol*. 2006; 141: 267–275. doi: 10.1016/j.ajo.2005.09.003.
16. Nishida K, Yamato M, Hayashida Y, Watanabe K, Yamamoto K, Adachi E et al. Corneal reconstruction with tissue engineered cell sheets composed of autologous oral mucosal epithelium. *New Engl J Med*. 2004; 351: 1187–1196. doi: 10.1056/NEJMoa040455.
17. Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Amemiya T, Kanamura N, Kinoshita S. Transplantation of cultivated autologous oral mucosal epithelial cells in patients with severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol*. 2004; 88: 1280–1284. doi: 10.1136/bjo.2003.038497.
18. Squier C., Brogden KA. Human Oral Mucosa: Development, Structure, and Function. John Wiley & Sons, Inc., 2011. – P. 23.
19. Satake Y, Higa K, Tsubota K, Shimazaki J. Long-term outcome of cultivated oral mucosal epithelial sheet transplantation in treatment of total limbal stem cell deficiency. *Ophthalmology*. 2011; 118: 1524–1530. doi: 10.1016/j.ophtha.2011.01.039.
20. Baradaran-Rafii A, Delfazayebaher S, Aghdami N, Taghiabadi E, Bamdad S, Roshandel D. Midterm outcomes of penetrating keratoplasty after cultivated oral mucosal epithelial transplantation in chemical burn. *Ocul Surf*. 2017; 15: 789–794. doi: 10.1016/j.jtos.2017.08.006.
21. Быков ВЛ. Гистология и эмбриональное развитие органов полости рта человека. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2014: 391–393. B'ykov VL. Gistologiya i ehmbriional'noe razvitie organov polosti rta cheloveka. M.: GEOTAR-Media, 2014: 391–393. [In Russ.].
22. Squier C, Brogden KA. Human Oral Mucosa: Development, Structure, and Function. John Wiley & Sons, Inc.; 2011, 23.

23. Eroschenko VP. Di Fiore's atlas of histology with functional correlations. – 11th ed. – Lippincott Williams & Wilkins; 2005: 235–261.
24. Афанасьева ЮИ, Юрина НА. Гистология. М.: Медицина, 2002. 146. Afanasieva YI, Yurina NA. Gistologia. M.: Medicina, 2002. 146.
25. Food and Drug Administration, HHS. Current good tissue practice for human cell, tissue, and cellular and tissue-based product establishments; inspection and enforcement. Final rule. *Fed Regist.* 2004; 69: 68611–68688. PMID: 15562555.
26. Takagi R, Yamato M, Murakami D, Kondo M, Yang J, Ohki T et al. Preparation of keratinocyte culture medium for the clinical applications of regenerative medicine. *J Tissue Eng Regen Med.* 2011; 5: 63–73. doi: 10.1002/term.337.
27. Ang LP, Nakamura T, Inatomi T, Sotozono C, Koizumi N, Yokoi N, et al. Autologous serum derived cultivated oral epithelial transplants for severe ocular surface disease. *Arch Ophthalmol.* 2006; 124: 1543–1551. doi: 10.1001/archophth.124.11.1543.
28. Nakamura T, Takeda K, Inatomi T, Sotozono C, Kinoshita S. Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 2011; 95: 942–946. doi: 10.1136/bjo.2010.188714.
29. Фрешни РЯ. Культура животных клеток. Практическое руководство. М.: Бином 2011. 427. Freshney IR. Animal cell culture : a practical approach. M.: Binom, 2011. 427. [In Russ.].
30. Boyce ST, Ham RG. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. *J Invest Dermatol.* 1983; 81 (1 Suppl): 33s–40s. doi: 10.1111/1523-1747.ep12540422.
31. Utheim TP, Utheim OA, Khan QE, Sehic A. Culture of Oral Mucosal Epithelial Cells for the Purpose of Treating Limbal Stem Cell Deficiency. *J Funct Biomater.* 2016; 7: 123. doi: 10.3390/jfb7010005.
32. Murakami D, Yamato M, Nishida K, Ohki T, Takagi R, Yang J et al. Fabrication of transplantable human oral mucosal epithelial cells-sheets using temperature-responsive culture inserts without feeder layer cells. *J Artif Organs.* 2006; 9: 185–191. doi: 10.1007/s10047-006-0342-3.
33. Nakamura T, Endo K, Kinoshita S. Identification of human oral keratinocytes stem/progenitor cells by neurotrophin receptor p75 and the role of neurotrophin/p75 signaling. *Stem cells.* 2007; 25: 628–638. doi: 10.1634/stemcells.2006-0494.
34. Wang JS, Xie HT, Zhang MC. Characterization of *ex vivo* Expanded Oral Mucosal Epithelium Cells on Acellular Porcine Corneal Stroma for Ocular Surface Reconstruction. *J Ophthalmol.* 2017; 67: 614–617. doi: 10.1155/2017/676171.
35. Calenic B, Ishkitiev N, Yaegaki K, Imai T, Costache M, Tovu M et al. Characterization of oral keratinocyte stem cells and prospects of its differentiation to oral epithelial equivalents. *Rom J Morphol Embryol.* 2010; 51: 641–645. PMID: 21103620.
36. Santibanez N. Immuno expression of E-cadherin and Vimentin in Normal Oral Mucosa, Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Int J Morphol.* 2017; 35: 596–602. PMID: 26045832.
37. Kasai Y, Sugiyama H, Takagi R, Kondo M, Owaki T, Namiki H et al. Brush biopsy of human oral mucosal epithelial cells as a quality control of the cell source for fabrication of transplantable epithelial cell sheets for regenerative medicine. *Regenerative Therapy.* 2016; 4: 71–77. doi: 10.1016/j.reth.2016.02.008.
38. Nanda KDS, Ranganathan K, Devi U, Joshua E. Increased expression of CK8 and CK18 in leukoplakia, oral submucous fibrosis, and oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemistry study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012; 113: 245–253. doi: 10.1016/j.tripleo.2011.05.034.
39. Haagdorens M, Van Acker SI, Van Gerwen V, Ni Dhubbhghaill S, Koppen C, Tassignon MJ et al. Limbal Stem Cell Deficiency: Current Treatment Options and Emerging Therapies. *Stem Cells Int.* 2016; 2016: 9798374. doi: 10.1155/2016/9798374.
40. Ma DH, Kuo MT, Tsai YJ, Chen HC, Chen XL, Wang SF et al. Transplantation of cultivated oral mucosal epithelial cells for severe corneal burn. *Eye.* 2009; 23: 1442–1450. doi: 10.1038/eye.2009.60.
41. Hirayama M, Satake Y, Higa K, Yamaguchi T, Shimazaki J. Transplantation of cultivated oral mucosal epithelium prepared in fibrin-coated culture dishes. *IOVS.* 2012; 53: 1602–1609. doi: 10.1167/iovs.11-7847.
42. Tang Z, Okano T. Recent development of temperature-responsive surfaces and their application for cell sheet engineering. *Regenerative Biomaterials.* 2014; 1: 91–102. doi: 10.1093/rb/rbu011.

Статья поступила в редакцию 28.02.2019 г.
The article was submitted to the journal on 28.02.2019