

С.А. Борзенко^{1, 2}, Б.Э. Малюгин^{1, 2}, М.Ю. Герасимов¹,
Д.С. Островский¹, А.В. Шацких¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова», Москва, Российская Федерация

² Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова, Москва, Российская Федерация

Безфидерная культура эпителия слизистой губы человека для тканевой инженерии и регенеративной медицины

Обоснование. Культивированный эпителий слизистой щеки (буккальный эпителий, БЭ) используется для создания аутологичных трансплантатов и тканевой инженерии. Альтернативным источником клеток для этих целей может являться слизистая губы, покрытая, как и БЭ, неороговевающим многослойным плоским эпителием, но имеющая некоторые гистологические отличия. **Цель исследования** — охарактеризовать эпителий слизистой губы человека как перспективный источник эпителиальных клеток для аутологичной трансплантации и тканевой инженерии. **Методы.** Цитофлуориметрия соскобов слизистой губы, щеки и десны была выполнена по оригинальному протоколу у 5 здоровых добровольцев для определения уровня десквамации поверхностных клеток и экспрессии цитокератинов (СК) 10 и 13. Слизистая губы от двух пациентов была охарактеризована с помощью рутинной гистологической окраски и флуоресцентной иммуногистохимии на СК 3, 4, 10, 13 и пролиферативный маркер p63. 35 образцов полнослойного лоскута слизистой губы от пациентов были использованы для постановки эксплантной ($n = 18$) и ферментативной ($n = 17$) техник выделения первичной культуры эпителия. Культуральные системы с 1,05 и 0,06 мМ кальция содержали 5% фетальной бычьей сыворотки, 5 мкг/мл инсулина растворимого человеческого, 5 мкг/мл гидрокортизона и 10 нг/мл человеческого эпидермального фактора роста. Стабильные культуры эпителия были окрашены на маркер p63, виментин, белок плотных межклеточных контактов (ZO-1) и СК 10, уровни экспрессии которых были определены программными средствами. **Результаты.** По данным цитофлуориметрии число клеток в соскобах с губы и десны было достоверно ниже, чем со щеки. Число СК13-позитивных клеток по медиане достоверно отличалось для соскобов с десны (6,4%) и со щеки (64,8%, $p = 0,0089$). Достоверных отличий по СК10-позитивным клеткам в соскобах не отмечали. Эпителий слизистой губы толщиной $72,1 \pm 3,6$ мкм был представлен неороговевающим многослойным плоским, без участков кератинизации и положительно окрашивался на маркеры СК 4 и 13 в отсутствие экспрессии СК 3 и 10. Первичная культура клеток эпителия, полученная путем культивирования эксплантов, была достоверно более результативна ($p = 0,001$) в сравнении с ферментативным способом. Стабильные культуры имели характерную морфологию в обеих культуральных системах. Уровень экспрессии виментина и ядерного транскрипционного фактора p63 в культуральных системах достоверно не отличался. Маркер ZO-1 был в 3,6 раза более выражен при культивировании в среде с 1,05 мМ Ca^{++} ($p = 0,0006$). **Заключение.** Культура клеток эпителия слизистой губы может быть получена путем культивирования эксплантов без фидерного слоя. Разработаны этапы контроля качества для культивированных клеток и участка биопсии.

Ключевые слова: эпителий слизистой губы, первичная культура клеток, тканевая инженерия, регенеративная медицина

Для цитирования: Борзенко С.А., Малюгин Б.Э., Герасимов М.Ю., Островский Д.С., Шацких А.В. Безфидерная культура эпителия слизистой губы человека для тканевой инженерии и регенеративной медицины. Вестник РАМН. 2020;75(5):561–570. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn1376>

Обоснование

Аутологичные культивированные эпителиальные клетки активно используются в регенеративной медицине для реконструкции эпителия в зависимости от гистологического типа. Для участков тканей, строение которых в норме соответствует неороговевающему многослойному эпителию, применяется трансплантат культуры эпителия слизистой губы (буккальный эпителий, БЭ). Он используется в офтальмологии для реконструкции эпителия роговицы [1], в хирургии и стоматологии при язвах пищевода [2, 3] и полости рта [4], в урологии для лечения стриктур уретры [5, 6] и гипоспадии [7]. Также культивированный БЭ применяется для создания гистоквивалентов тканей [8] и изучения патологических процессов [9, 10].

Как и в любой технологии трансплантации аутологичных культивированных клеток, ключевым является этап получения первичной культуры. Ранее для выделения клеток БЭ предлагалось поэтапно воздействовать ферментами на биопсийный материал, а именно диспазой II — для отделения собственной пластинки слизистой и затем трипсином — для выделения отдельных клеток

эпителия [11]. Далее для стимулирования роста эпителия использовались фидерный слой из мышинных фибробластов [11] и набор специфических добавок [11, 12]. Предлагались базовые культуральные среды с различной концентрацией ионов кальция, как, например, DMEM-F12 (1,05 мМ Ca^{++}) [11] и низкокальциевые (менее 0,1 мМ Ca^{++}) [12]. Однако на современном этапе развития регенеративной медицины при трансляции новых технологий в клинику к клеточным продуктам предъявляется ряд новых требований. Ключевым из них является необходимость создания такого технологического процесса, в котором не будут использоваться компоненты животного происхождения. Следовательно, при переходе от лабораторного этапа к клиническому в такой системе необходимо заменить животную сыворотку на аутологичную, использовать факторы роста, выпущенные по стандарту GMP, не использовать фидерный слой из животных клеток. В дополнение к новым требованиям при производстве среди исследователей отсутствует консенсус относительно числа добавок, необходимых для культивирования эпителия полости рта. Указывается, что в культуральной системе необходимо от 2 до 7 факторов роста. Также оста-

ется открытым вопрос об оптимальной концентрации ионов кальция в среде.

Другие немаловажные аспекты применения клеточных трансплантатов из культивированных клеток — этап контроля качества при их производстве и предварительная характеристика места биопсии. По данным литературы, оба аспекта мало изучены. Так, опубликованы единичные работы по анализу влияния состава трансплантата на клинические исходы, а анализ места биопсии только с недавнего времени предлагается включать в производственную цепочку. Известно несколько работ, посвященных изучению корреляции клинических результатов трансплантации культивированных клеток с экспрессией определенных маркеров. Так, при наблюдении в течение 10 лет за пациентами после пересадки трансплантатов лимбальных эпителиальных стволовых клеток было показано, что анатомический успех (регенерация эпителия роговицы) наблюдался в тех случаях, когда в культуре клеток содержалось более 3% клеток, положительных по пролиферативному маркеру p63 [13]. Для культур эпителия слизистой полости рта подобные корреляции по данным литературы изучены слабо [14].

Для контроля состояния слизистой перед забором ткани для культивирования используются различные методики. В первую очередь возможно выполнение как стандартного гистологического (рутинные окраски), так и иммунофлуоресцентного анализа биоптата. Однако, кроме инвазивности данных процедур, их выполнение сопряжено с высокими временными затратами на подготовку и окраску срезов. В попытке решения данных проблем Y. Kasai et al. было предложено выполнять соскоб поверхностных клеток эпителия полости рта и проводить иммуноблоттинг на цитокератин [15]. Однако как подготовка образцов и реагентов, так и проведение собственноручно иммуноблоттинга имеют высокую трудоемкость.

Кроме того, данный способ носит качественный характер и не позволяет определять количественное соотношение клеток, экспрессирующих тот или иной маркер.

В большинстве трансляционных исследований, опубликованных ранее, трансплантат аутологичных культивированных клеток создавался на основе клеток БЭ [1, 16]. В нескольких более поздних работах, посвященных реконструкции эпителия роговицы, применялся ауто-трансплантат из клеток эпителия слизистой губы [17, 18], который, как и БЭ, является неороговевающим многослойным плоским [19]. Несмотря на то что для создания трансплантата использовались ферменты и фидерный слой из животных клеток, были отмечены положительные клинические результаты [17, 18]. В этих работах слизистая губы была охарактеризована неполно, хотя из литературы известно, что гистологически она отличается от буккального [20]. При этом с точки зрения простоты выделения биоптата для последующего культивирования слизистая губы технически удобнее.

Цель исследования — охарактеризовать эпителий слизистой губы человека как перспективный источник эпителиальных клеток для аутологичной трансплантации и тканевой инженерии.

Методы

Проточная цитофлуориметрия соскобов слизистой полости рта

У 5 здоровых добровольцев после подписания информированного согласия были выполнены соскобы стерильными одноразовыми зондами со слизистой щеки, губы и десны. Соскоб выполнялся спустя 2 ч после приема пищи, после трехкратного споласкивания полости рта теплой питьевой водой. Окрашивание получен-

562

S.A. Borzenok^{1,2}, B.E. Malyugin^{1,2}, M.Y. Gerasimov¹, D.S. Ostrovskiy¹, A.V. Shatskikh¹

¹ The S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Moscow, Russian Federation

² The A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow, Russian Federation

Feeder-Free Cell Culture of Labial Oral Mucosal Epithelium for Tissue-Engineering and Regenerative Medicine

Background. The cultured cheek mucosa epithelium (buccal epithelium, BE) is used for autologous transplants generation and tissue engineering. An alternative source of cells for these purposes may be the lip mucosa, covered, like BE, with non-keratinized stratified squamous epithelium, but with some histological distinctions. **Aims** — to characterize the human lip mucosa as a promising source of epithelial cells for autologous transplantation and tissue engineering. **Methods.** Scrapings of the lip, cheek, and gum mucosa from five healthy volunteers were analyzed by cytofluorimetry to determine the level of desquamation and cytokeratin (CK) 10 and 13 expression. The lip mucosa of two patients was characterized using routine histological staining and fluorescence immunohistochemistry for CK 3, 4, 10, 13, and p63 marker. 35 samples of full-thickness strips of the patient's lip mucosa were used to set the explant (n = 18) and enzymatic (n = 17) techniques for expansion epithelium. Culture systems with 1.05 and 0.06 mM Calcium contained 5% fetal bovine serum, 5 µg/ml human insulin, 5 µg/ml hydrocortisone, 10 ng/ml human epidermal growth factor. Stable cultures were stained for p63, vimentin, zonula occludens-1 (ZO-1), and CK10. Software tools determined levels of their expression. **Results.** The number of cells in the lip and gum samples was significantly lower than from the cheek. The median number of CK13 positive cells was significantly different for the gum (6.4%) and cheek (64.8%, p = 0.0089). Significant differences for CK10 positive cells were not observed. The epithelium of the lip mucosa was 72.1 ± 3.6 µm thick, relatively flat, and without keratinization sites. Samples were positively stained for CK 4 and 13, in the absence of expression of CK 3 and 10. The primary culture of epithelial cells obtained by explant technique was significantly more effective (p = 0.001) in comparison with the enzymatic method. Stable cultures had a “cobble-stone” morphology in both culture systems. The levels of vimentin and p63 expression in both culture systems was not significantly differ. ZO-1 expression was 3.6-fold higher for 1.05-mM Ca⁺⁺ medium (p = 0.0006). **Conclusions.** Epithelium cell culture from the lip mucosa can be obtained by culturing explants without a feeder layer. Quality control steps have been developed for cultured cells and biopsy site.

Keywords: mouth mucosa, lip, primary cell culture, tissue engineering, regenerative medicine

For citation: Borzenok SA, Malyugin BE, Gerasimov MY, Ostrovskiy DS, Shatskikh AV. Feeder-Free Cell Culture of Labial Oral Mucosal Epithelium for Tissue-Engineering and Regenerative Medicine. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 2020;75(5):561–570. doi: <https://doi.org/10.15690/vramn1376>

ной суспензии проводили по оригинальному протоколу. Для этого после выполнения соскоба зонд встряхивали при 600 г на микроцентрифуге в пробирке с 2,0 мл буфера (CellWASH, BD, США). Далее суспензию разделяли по пробиркам на четыре равные части, добавляли буфер до 2,0 мл и осаждали при 200 г в течение 5 мин. Полученный осадок окрашивали первичными антителами к цитокератинам (СК) 10 (1:100) и СК 13 (1:20) в течение 30 мин. В контрольную пробирку добавляли только буфер. После инкубации осадок ресуспендировали в 2,0 мл буфера и осаждали при 200 г в течение 5 мин. Затем осадок окрашивали двумя видами вторичных флуоресцирующих антител Alexa Fluor 488 и 594 в соответствии с антигенной принадлежностью первичного (кролик, мышь) в разведении 1:2000 в течение 30 мин в темноте. В контрольную пробирку добавляли оба вторичных антитела. После инкубации осадок ресуспендировали в 2,0 мл буфера и осаждали при 200 г в течение 5 мин. Далее осадок ресуспендировали в 500 мкл буфера и проводили анализ на проточном цитофлуориметре CytoFLEX® (Beckman Coulter, США). Использовали единый протокол регистрации событий для каждого донора по каждому из антител с учетом флуоресценции контролей.

Флуоресцентная иммуногистохимия образцов ткани слизистой губы

Образцы слизистой губы были получены у 2 пациентов после подписания информированного согласия. Подлежащую собственную пластику слизистой удаляли микрохирургическим инструментарием до появления белесой прослойки. Затем полученную ткань замораживали в криогеле Neg-50 (Thermo Fisher Scientific, США) и хранили при -80°C . Криосрезы толщиной 5 мкм выполняли на криотоме HM525 NX (Thermo Fisher Scientific, США) и окрашивали по следующему протоколу. Криосрезы отмывали трехкратно по 5 мин натрий-фосфатным буфером (PBS) (В-60201, «ПанЭко», Россия). Затем проводили пермеабиллизацию 0,3%-м раствором тритона X-100 (X100, Sigma Aldrich, США) в PBS в течение 15 мин. Далее срезы трехкратно отмывали в PBS по 5 мин. Затем добавляли блокирующий раствор (5% козьей сыворотки (GS500EU, BioClot, Великобритания) и 0,1% сапонина (84510, Sigma Aldrich, США) в PBS) и инкубировали в течение 1 ч. Затем на срезы добавляли разведенные в блокирующем растворе первичные антитела (табл. 1) к СК 3 (1:100), 4 (1:100), 10 (1:100), 13 (1:100), ядерному белку p63 (1:300). На контрольные срезы добавляли только блокирующий раствор, и все образцы инкубировали во влажной камере в течение

18 ч при $+4^{\circ}\text{C}$. После этого срезы отмывали в PBS трехкратно по 5 мин. Затем на все срезы добавляли вторичные флуоресцентные антитела Alexa Fluor 488 или 594 (1:250), разведенные в блокирующем растворе. Далее срезы инкубировали при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 1 ч в темноте. После инкубации срезы отмывали трехкратно по 5 мин в PBS. Затем окрашивали ядра красителем Hoechst 33258 (O150, «ПанЭко», Россия) в течение 1 мин. В конце проводили монтаж слайдов под покровное стекло средой для заключения гистологических препаратов (VitroGel, 12-001, BioVitrum). Фотодокументирование иммунофлуоресценции проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Fluoview FV10i (Olympus, Япония).

Культивирование клеток эпителия слизистой губы

35 образцов полнослойного лоскута слизистой губы были получены после подписания информированного согласия от пациентов в ходе операций по реконструкции сводов конъюнктивы. Полученная ткань транспортировалась и хранилась в среде для консервации роговицы (среда Борзенка–Мороз) при $+4^{\circ}\text{C}$ не более 2 ч. Для постановки эксплантной культуры были использованы полоски слизистой от 18 пациентов. Перед посевом слой собственной пластинки слизистой удалялся микрохирургическим инструментарием. Обработанную таким образом ткань разрезали на сегменты размером 1×1 мм и укладывали на культуральную поверхность эпителиальной стороной вверх. Для выделения клеток с помощью ферментативной техники необработанная слизистая от 17 пациентов была поэтапно инкубирована в растворах энзимов, следуя известным протоколам. А именно на первом этапе ткань инкубировалась в растворе диспазы II (D4693, Sigma Aldrich, США) с активностью в конечном растворе 2,4 U/мл и 1% коллагеназы II типа (260 U/мг, 17101-015, Gibco, США) в культуральной среде DMEM (D6046, Sigma Aldrich, США) при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 16 ч. Далее слой эпителия отделялся от подлежащей ткани и инкубировался в 0,25%-м растворе трипсина-ЭДТА (П080, «ПанЭко», Россия) при $+37^{\circ}\text{C}$ на термощейкере TS-100 (Biosan, Латвия) на 800 об/мин в течение 10 мин. Клетки, полученные после обработки эпителия ферментами, рассевали в концентрации 5×10^5 клеток на 1 см^2 . Экспланты или суспензия клеток культивировались в средах DMEM-F12 с 1,05 мМ Ca^{++} (D6421, Sigma Aldrich, США) и EpiLife с 0,06 мМ Ca^{++} (MEPICPRF500, Gibco, США). Использовались следующие добавки: антибиотик-антимикотик (A5955, Sigma Aldrich, США): 100 U/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 0,25 мкг/мл

563

Таблица 1. Список первичных и вторичных антител, использованных для окраски клеток и тканей

Антитело	Каталожный номер	Видовая принадлежность и тип	Характеристика
СК 3	ab68260	Мышиное моноклональное	Неороговевающий роговичный эпителий
СК 4	ab51599	Кроличье моноклональное	Неороговевающий эпителий полости рта
СК 10	ab9026	Мышиное моноклональное	Ороговевающий эпителий
СК 13	ab92551	Кроличье моноклональное	Неороговевающий эпителий полости рта
p63	ab124762	Кроличье моноклональное	Пролиферация
Виментин	ab8978	Мышиное моноклональное	Промежуточные филаменты
ZO-1	ab216880	Кроличье поликлональное	Белок плотных межклеточных контактов
Alexa Fluor 488	ab150077	Козье против кролика	Вторичное антитело с флуоресцентной меткой
Alexa Fluor 594	ab150116	Козье против мыши	Вторичное антитело с флуоресцентной меткой

Примечание. СК — cytokeratin; ZO-1 — Zonula occludens-1. Все антитела производства Abcam, Великобритания.

амфотерицина В; фетальная бычья сыворотка — 5% (SH30109.03, HyClone Laboratories, США); инсулин растворимый человеческий генно-инженерный короткого действия — 5 мкг/мл (Хумулин Регуляр, «Эли Лилли энд Компани», США); гидрокортизон — 5 мкг/мл («Фармак», Украина), человеческий рекомбинантный эпидермальный фактор роста (чЭФР) — 10 нг/мл (ФР-08000, «ПанЭко», Россия). Для культивирования использовали чашки Петри 35 мм (культуральный пластик) (430165, Corning, США) и 4-луночные слайд-флаконы (культуральное стекло) (30104, SPL Life Sciences, Корея). Культивирование проводили при +37 °С, 100%-й влажности и 5%-й концентрации CO₂. Смену полной культуральной среды осуществляли каждые 2 дня. Окраску клеточ нулевого пассажа проводили при достижении 70–80% кон-флуэнтности. Мониторинг культур осуществляли на фазово-контрастном микроскопе IX81 (Olympus, Япония). Культуры со стабильным ростом клеток эпителия были иммунофенотипированы на этапе первичной культуры.

Флуоресцентная иммуноцитохимия культивированного эпителия слизистой губы

Окраску клеточ первичной культуры и первого пассажа проводили в 4- и 8-луночных слайд-флаконах по следующему протоколу. Клетки отмывали трехкратно в PBS по 5 мин. Затем фиксировали в 10%-м нейтральном растворе формалина в течение 10 мин. Далее отмывали трехкратно по 5 мин в PBS. Затем проводили пермеабиллизацию 0,3%-м раствором тритона X-100 в PBS в течение 15 мин. Далее лунки отмывали трехкратно по 5 мин в PBS. Затем добавляли блокирующий раствор (5% фетальной бычьей сыворотки (SH30109.03, HyClone Laboratories) и 0,1% сапонина в PBS) и инкубировали в течение 1 ч. Далее добавляли разведенные в блокирующем растворе первичные антитела. Для окраски первичной культуры в 4-луночных слайд-флаконах использовали разведенные в блокирующем растворе первичные антитела к ядерному белку р63 (1:300), виментину (1:250), белку ZO-1 (1:100), СК 10 (1:100). В контрольные лунки первичные анти-тела не добавляли, а использовали тот же объем блокирующего раствора. Затем слайд-флаконы инкубировали при +4 °С 18 ч. По завершении инкубации лунки отмывали трехкратно по 5 мин в PBS. Затем во все лунки добавляли вторичные флуоресцентные антитела Alexa Fluor 488 или 594 в соответствии с антигенной принадлежностью первичного (кролик, мышь), разведенные в блокирующем растворе. Далее слайды инкубировали в течение 1 ч в темноте при +4 °С. По завершении инкубации лунки отмывали трехкратно по 5 мин в PBS. Затем окрашивали

ядра красителем Hoechst 33258 в течение 1 мин во всех слайдах. В конце проводили монтаж слайдов под покровное стекло средой для заключения гистологических препаратов. Фотодокументирование иммунофлуоресценции проводили на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе Fluoview FV10i. При этом использовали единые параметры лазерного луча для каждого из вторичных антител с учетом флуоресценции контрольных лунок.

Анализ изображений

Анализ изображений проводили с помощью свобод-но распространяемых программ для ПК Fiji (ImageJ) и CellProfiler 2.0. Экспрессия маркера р63 рассчитывалась как соотношение числа ядер, окрашенных в зеленый цвет, к ядрам клеток, контрастированным Hoechst 33258. Уровень флуоресценции виментина вычисляли, исклю-чая зону ядра, с помощью программного протокола, стан-дартизированного по уровню фоновой флуоресценции. Экспрессию белка ZO-1 определяли как длину линейной экспрессии флуоресцентного красителя по отношению к количеству ядер на фотографии.

Этическая экспертиза

Проведение исследование было одобрено локальным этическим комитетом ФГАУ «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова» Минздрава России (от 11 октября 2018 г. № 88.5).

Статистический анализ

Принципы расчета размера выборки. Размер выборки предварительно не рассчитывался.

Методы статистического анализа данных. Для сбора первичных данных использовался пакет MS Office. Ана-лиз данных и построение графиков проводили в про-грамме GraphPad Prism 7.0 (USA, 2018). Для сравнения нескольких независимых выборок использовался кри-терий Краскела-Уоллиса. Достоверными признавались различия при $p \leq 0,05$.

Результаты

Неинвазивная биопсия эпителия слизистой полости рта

В ходе анализа соскобов со слизистой щеки, губы и десны частота событий, регистрируемых на цитофлу-ориметре в зоне соответствия размерам клеток, соста-вила по медиане 52,8%; 28,7% и 11,6% соответственно (рис. 1, А). При этом число клеток в соскобах с губы ($p = 0,0026$) и десны ($p < 0,0001$) было достоверно ниже, чем

564

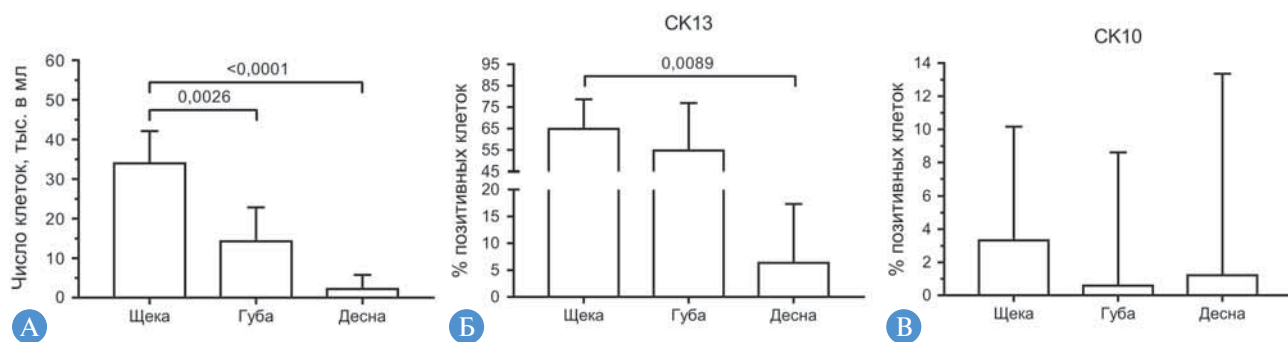


Рис. 1. Результаты цитофлуориметрии соскобов из трех зон слизистой полости рта: А — концентрация клеток в образце соскоба, рас-считанная по числу событий в зоне соответствия размерам клеток; Б — относительное количество клеток, экспрессирующих цитоке-ратин 13; В — относительное количество клеток, экспрессирующих цитокератин 10. Данные представлены в виде медианы и 95%-го доверительного интервала. Критерий Краскела–Уоллиса

со щеки. Медианное значение СК13-позитивных клеток достоверно отличалось только в соскобах с десны (6,4%) в сравнении с образцами со щеки (64,8%; $p = 0,0089$) (рис. 1, Б). Достоверных отличий по медианному числу СК10-позитивных клеток в соскобах со щеки (3,3%), губы (0,6%) и десны (1,2%) не отмечали ($p > 0,05$) (рис. 1, В).

Экспрессия основных маркеров эпителия в ткани слизистой губы

По данным обзорной гистологии на срезе были представлены слой многослойного плоского эпителия

и подлежащая фиброзная ткань. Участков кератинизации не отмечали. Толщина слоя эпителия составила $72,1 \pm 3,6$ мкм (среднее \pm стандартное отклонение). Было отмечено отсутствие выраженных папиллярных инвагинаций в подлежащую ткань (рис. 2, А), в отличие от таковых, свойственных эпителию щеки и слизистой кишечника. При окраске на маркеры, характерные для эпителия слизистой полости рта, в эпителиальном слое была выявлена положительная экспрессия СК 4 и 13 (рис. 2, Б, Д), возрастающая от базальных к наружным слоям. Подлежащая фиброзная ткань име-

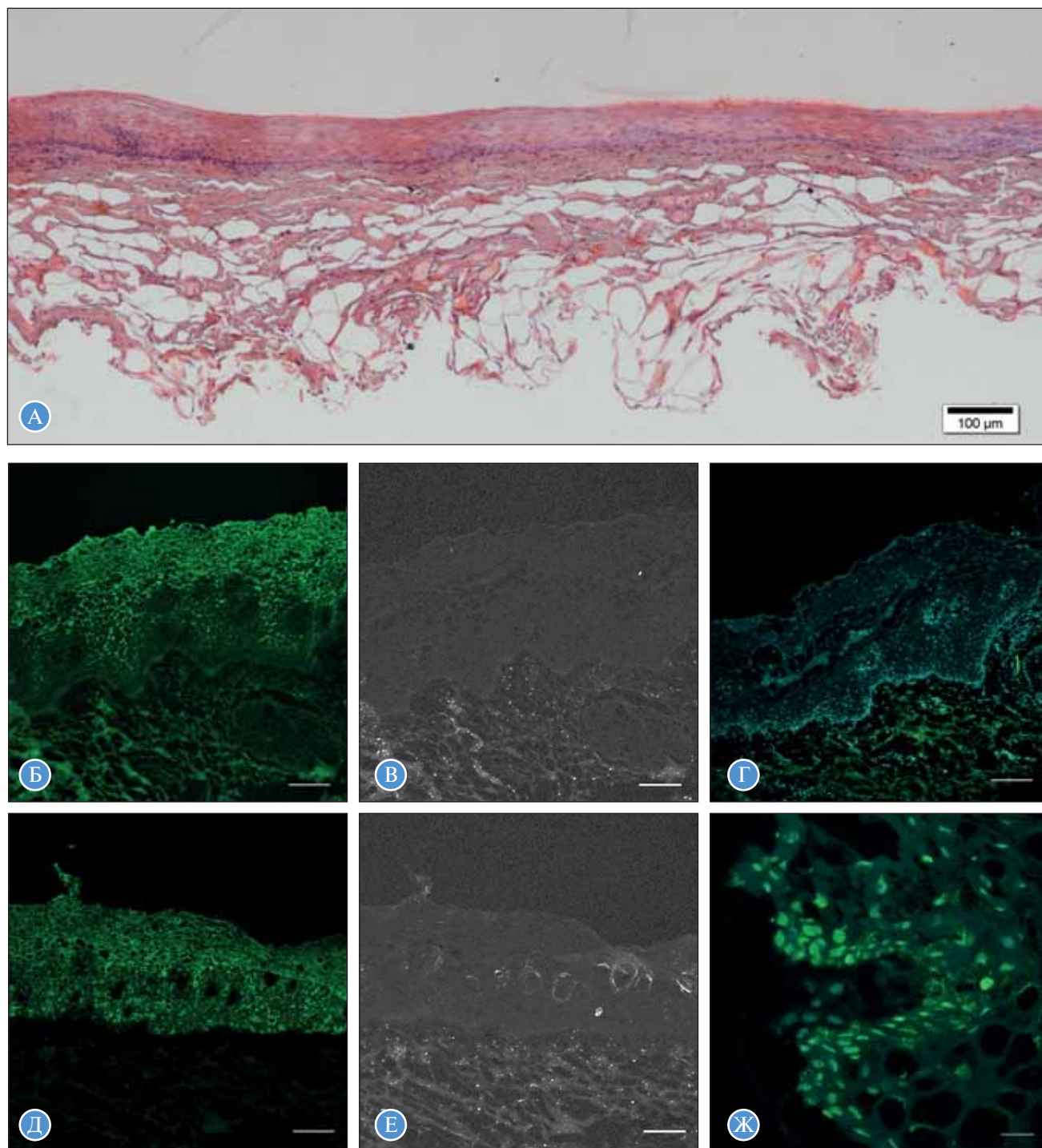


Рис. 2. Гистологическая характеристика эпителия слизистой губы: поперечный срез (А), окраска гематоксилин-эозин, световая микроскопия; иммунофлуоресцентная окраска поперечного среза слизистой губы на цитokerатины 4 (Б), 3 (В), 13 (Д) и 10 (Е); ядерный транскрипционный фактор р63 (Ж); отрицательный контроль (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594). Ядра контрастированы Hoechst. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Масштабная линейка, мкм: А — 100, Б–Е — 150, Ж — 20

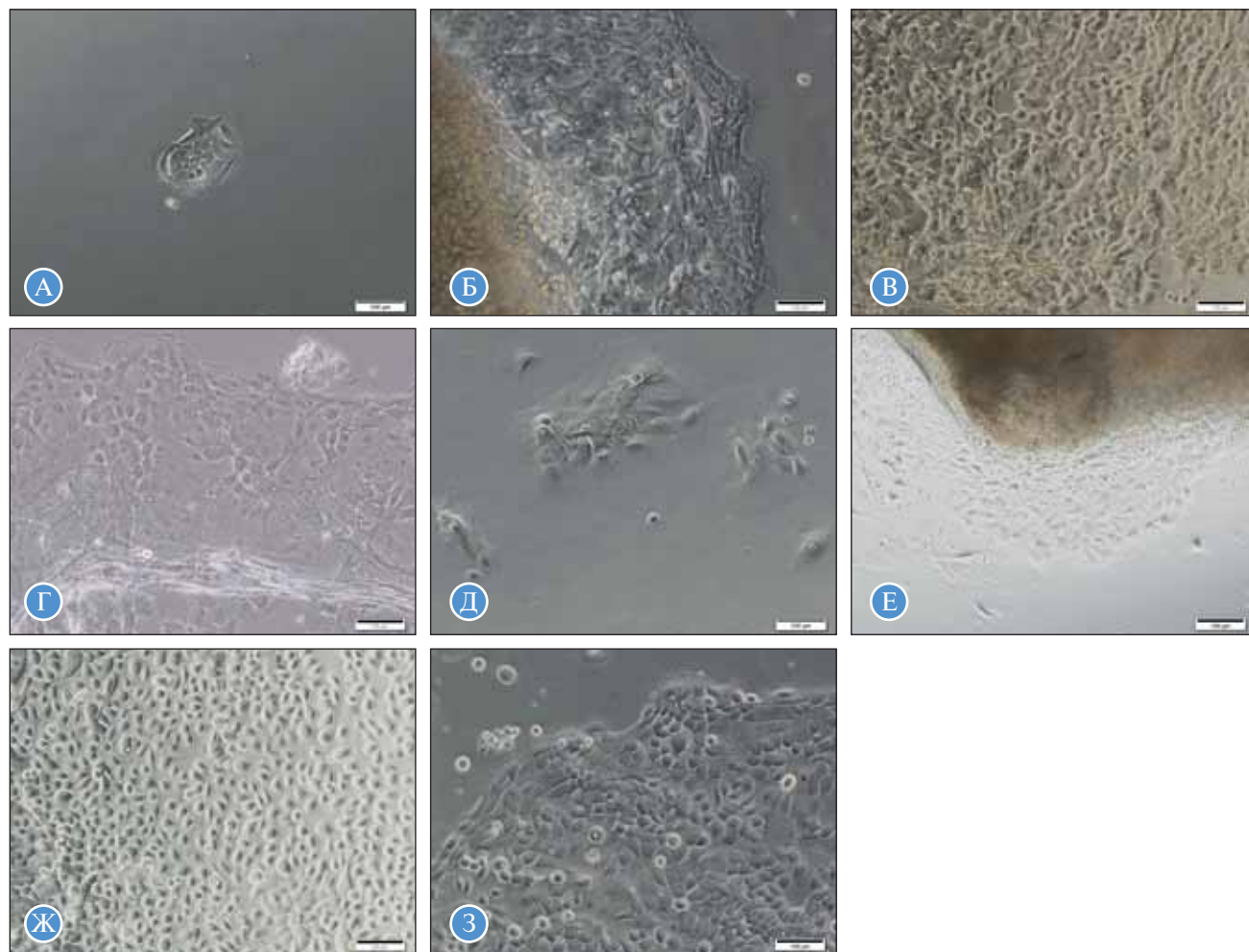


Рис. 3. Морфология культуры клеток эпителия губы в культуральных системах: А, Д — колонии клеток после ферментативной обработки биоптата слизистой губы; Б, Е — миграция клеток из экспланта; В, Ж — растущая культура клеток; Г, З — край растущей популяции клеток. Световая фазово-контрастная микроскопия. Масштабная линейка — 100 мкм

566

ла фоновое окрашивание. Экспрессия СК 3 и 10 в слое эпителия отсутствовала во всех образцах (рис. 2, В, Е). В некоторых срезах отмечалась нерегулярная окраска на СК10 вне эпителиального слоя, что было расценено как артефакты (см. рис. 2, Е). На части срезов были выявлены мелкие папиллярные структуры (крипты), в базальном эпителии которых отмечалось окрашивание на ядерный маркер р63 (рис. 2, Ж).

Первичная культура клеток эпителия слизистой губы

Первичная культура клеток эпителия, полученная с помощью поэтапной ферментативной обработки биоптатов слизистой губы, была успешна только в двух случаях из 17 (11,8%). Прикрепившиеся клетки формировали мелкие колонии, которые не образовывали конфлуентного слоя в культуральных средах ни с «высоким» (1,05 мМ), ни с «низким» (0,06 мМ) кальцием (рис. 3). Первичная культура клеток эпителия, полученная методом культивирования эксплантов, была успешна в 14 случаях из 18 (77,8%; $p = 0,001$, точный тест Фишера). Клетки начинали мигрировать из эксплантов на 4–6-й день (рис. 3, Б, Е), имели характерную морфологию («бульжная мостовая») и образовывали конфлуентный слой в культуральных средах как с «высоким», так и с «низким» кальцием (рис. 3, В, Ж). Также в первые дни отмечали наличие некоторого количество фибро-

бластов, которые элиминировались по мере роста популяции эпителиальных клеток. В культуральной среде с «высоким» кальцием были отмечены следующие культуральные особенности, которые не наблюдались в среде с «низким», а именно обилие дебриса и открепившихся клеток. Также по мере увеличения площади колонии появлялись зоны, свободные от клеток, которые повторно клетками уже не заполнялись. В дополнение в среде с 1,05 мМ Ca^{++} наблюдали тяжи клеток от экспланта к периферии колонии, а на границе роста в большинстве случаев имелся тяж, который окружал всю колонию и распространялся вместе с ее ростом (рис. 3, Г).

Экспрессия основных характеристических маркеров эпителия слизистой губы в культуре

Данные по уровню экспрессии маркеров в клетках первичной культуры были получены только для образцов с активным ростом клеток, а именно для эксплантов, культивированных в слайд-флаконах. Маркер пролиферации р63 экспрессировался в ядре (рис. 4, А и Б, Ж и З) и был обнаружен в $40,9 \pm 14,0\%$ клеток в среде с 1,05 мМ Ca^{++} и в $43,8 \pm 13,4\%$ клеток в среде с 0,06 мМ Ca^{++} (среднее \pm стандартное отклонение, $p = 0,61$) (рис. 5, А). Согласно анализу флуоресценции цитоплазмы, уровень экспрессии виментина (рис. 4, Г, К) составил $0,04 \pm 0,01$ отн.ед. и $0,07 \pm 0,02$ отн.ед. для клеток, культивированных в средах с 1,05 и 0,06 мМ Ca^{++}

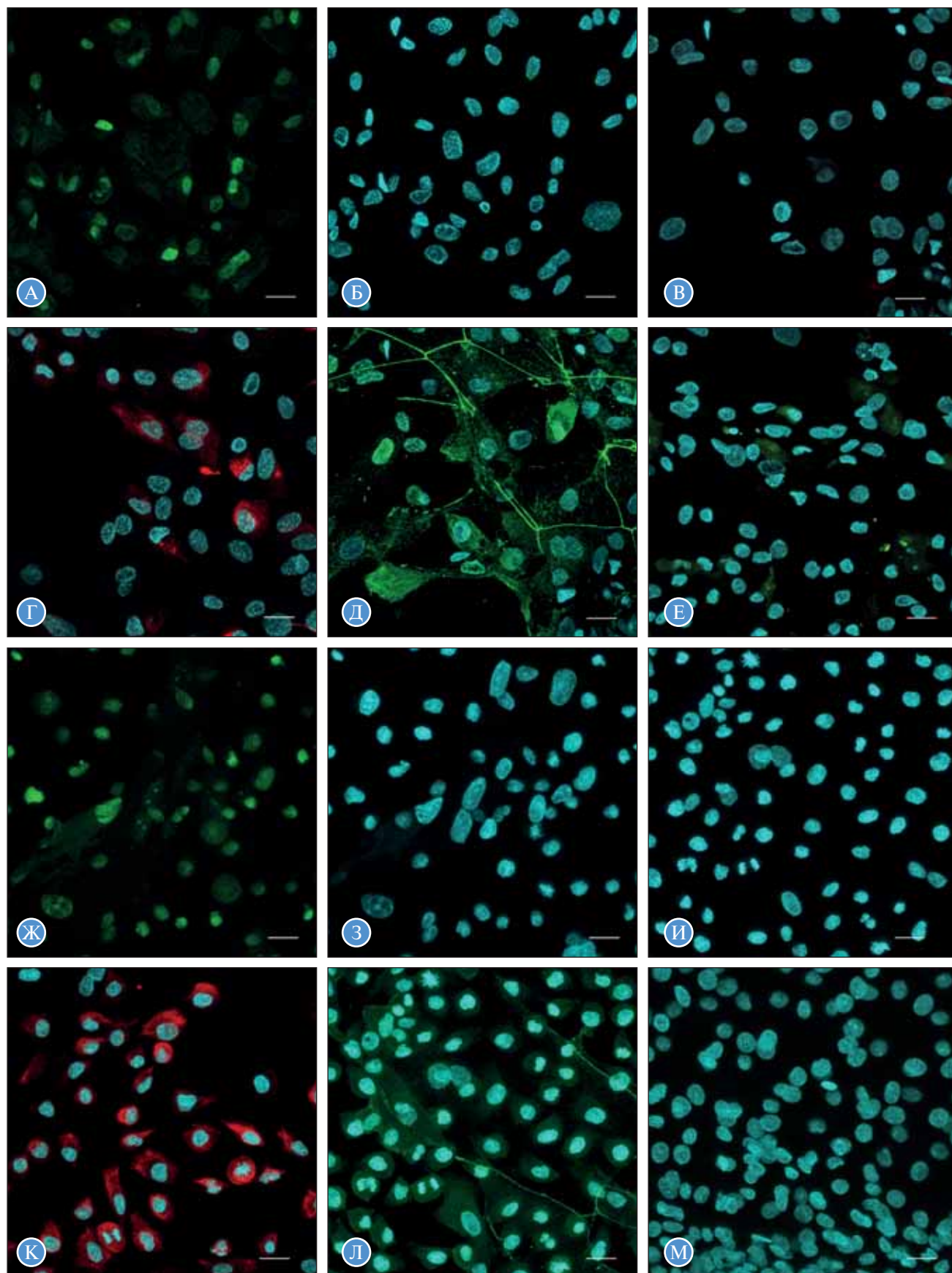


Рис. 4. Иммунофенотип первичной культуры эпителия слизистой губы: А, Ж — ядерный транскрипционный фактор p63; Б, З — контрольная окраска ядер для маркера p63 (А, Ж); В, И — цитокератин 10; Г, К — виментин; Д, Л — белок плотных межклеточных контактов ZO-1; отрицательный контроль (Alexa Fluor 488, Alexa Fluor 594). Ядра контрастированы Hoechst. Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия. Масштабная линейка — 20 мкм

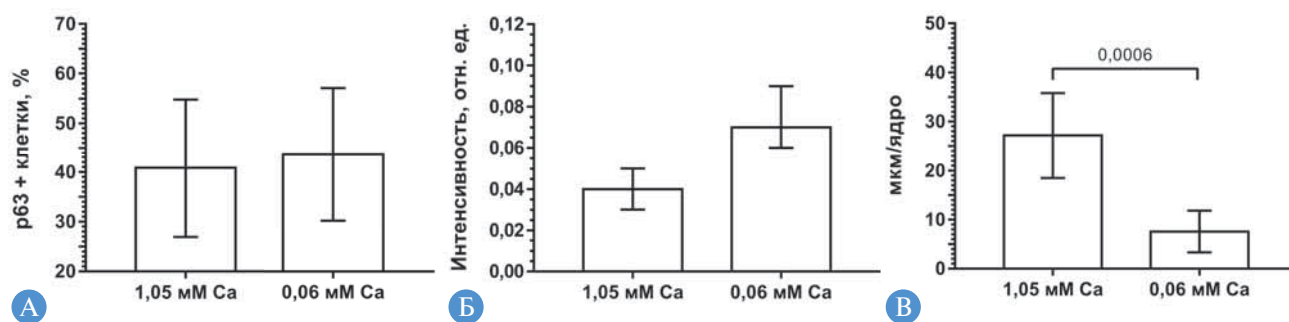


Рис. 5. Уровень экспрессии маркеров по данным флуоресцентной иммуноцитохимии в культуральных системах: А — относительное количество клеток, экспрессирующих транскрипционный фактор r63; Б — интенсивность флуоресценции виментина в цитоплазме культивированных клеток; В — экспрессия белка плотных межклеточных контактов (ZO-1). Данные представлены в виде медианы и 95%-го доверительного интервала; *U*-критерий Манна–Уитни

соответственно (среднее ± стандартное отклонение, $p = 0,10$) (рис. 5, Б). Экспрессия белка плотных межклеточных контактов (рис. 4, Д, Л) (маркер ZO-1) для клеток, культивированных в среде с «высоким» кальцием, составила в среднем $27,2 \pm 8,7$ мкм на ядро. При этом в клетках, культивированных в среде с «низким» кальцием, экспрессия данного маркера составила $7,6 \pm 4,2$ мкм на ядро (среднее ± стандартное отклонение, $p = 0,0006$) (рис. 5, В). Экспрессия СК 10 была сравнима с контрольными лунками, где использовались только вторичные антитела (рис. 4, В, И).

Обсуждение

Резюме основного результата исследования

В настоящей работе был охарактеризован ранее мало изученный эпителий слизистой губы человека. Представлены оригинальный протокол для неинвазивной биопсии слизистой полости рта, гистологическая структура слизистой губы, способ выделения и культуральная система получения культуры клеток эпителия, а также морфологическая и иммунофенотипическая характеристики клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что, следуя представленным протоколам, из слизистой губы можно получать устойчивую культуру аутологичных клеток эпителия для трансплантации и тканевой инженерии.

Обсуждение основного результата исследования

В настоящей работе было продемонстрировано, что из слизистой губы можно получать устойчивую популяцию клеток эпителия на стандартном культуральном пластике, используя эксплантный метод, без фидерную культуральную систему и три специфических фактора роста в составе среды. При этом представленный протокол — наиболее приближенная к современным требованиям производства клеточных продуктов концепция, поскольку: 1) инсулин, гидрокортизон и ЭФР выпускаются с сертификатом GMP; 2) эксплантный метод эффективен без фидерных клеток; 3) ксеногенная сыворотка в культуральной системе может быть замена как на аутологичную, так и на стандартизированную донорскую (для трансплантации клеток пациентам с системными заболеваниями, при которых имеет место иммуноопосредованное воспаление). Полученные в исследовании данные согласуются с другими работами по выделению культуры эпителия полости рта. Так, было показано, что: комбинация инсулина, гидрокортизона и ЭФР обладает наиболее выраженным стимулирующим

эффектом на пролиферацию клеток эпителия [21]; получение эпителия эксплантным методом результативно в отсутствие фидерного слоя из мышечных фибробластов [22]; культивирование эпителия без участия ферментов не менее эффективно, чем при воздействии диспазы II и трипсина [23].

В исследовании было выявлено, что выделение первичной культуры клеток эпителия слизистой губы с помощью ферментов нерезультативно. Нами не было получено ни одной стабильной культуры, которую можно было бы охарактеризовать иммуногистохимически. В противоположность этому эксплантный метод был достоверно более эффективным. Стоит отметить, что на начальных этапах он давал некоторый нестабильный результат, но при переходе к манипулированию слизистой под увеличением микроскопа выход клеток эпителия стал высокоэффективным за счет точного позиционирования кусочка ткани на культуральную поверхность эпителиальной стороной вверх.

В настоящей работе культуральные системы на средах с 1,05 и 0,06 mM Ca⁺⁺ не показали достоверных различий по уровням экспрессии транскрипционного фактора r63 и виментина. Дополнительно было отмечено, что в среде с 1,05 mM Ca⁺⁺ достоверно преобладают процессы образования плотных межклеточных контактов. Таким образом, имея возможность охарактеризовать культуру клеток эпителия слизистой губы по указанным маркерам, возможно проведение корреляционного анализа при клинических исследованиях в будущем.

В исследовании были учтены недостатки работы по постановке системы анализа места биопсии, для чего был разработан оригинальный протокол цитофлуориметрии соскобов слизистой полости рта. Он позволяет в течение 3 ч получить качественные и количественные данные о поверхностных клетках слизистой полости рта. Было впервые показано, что эпителий на поверхности слизистой губы имеет в 1,8 раза меньше десквамирующих клеток в сравнении с буккальным. Результаты цитофлуориметрии соответствовали результатам иммуногистохимической окраски срезов биоптатов, где было выявлено преобладание свечения СК 13 в поверхностных слоях эпителия.

Ограничения исследования

Исследование имеет ограничения в связи с невозможностью выполнения прямого сравнения рецептов сред, содержащих холерный токсин, и культуральных систем с фидерным слоем, так как данные компоненты в период выполнения работы не были доступны в России.

Заключение

Ранее проведенные исследования по культивированию и трансплантации эпителия полости рта показали клиническую эффективность в реконструкции различных тканей и органов. Для этого в большинстве работ использовали эпителий слизистой щеки, несмотря на то что в полости рта есть и другие участки, подходящие для данной цели. Также в условиях безфидерного культивирования необходимо оптимизировать методы получения первичной культуры клеток. К нерешенным аспектам технологий трансплантации аутологичного культивированного эпителия полости рта относят недостаточную эффективность как технологий культуральных систем без ксеногенных компонентов, так и системы контроля качества культур клеток и участка биопсии, которые необходимы для отслеживания эффективности и безопасности при проведении трансплантации клеточных конструкций.

Описанная в исследовании безфидерная культуральная система представляется наиболее приближенной к современным требованиям, предъявляемым к производству клеточных продуктов. Метод культивирования эксплантов для получения первичной культуры эпителия губы показал достоверно более высокую результативность в сравнении с ферментативным. В предложенной культуральной системе выполнимы этапы контроля качества клеточного продукта по маркерам пролиферации (p63 и виментин), а также места биопсии слизистой полости рта на основе оригинального протокола цитофлуориметрии соскобов. Последний характеризуется меньшими временными и трудовыми затратами и имеет высокую информативность.

По нашему мнению, результаты настоящего исследования имеют высокий потенциал трансляции в клинику для разработки новых протоколов реконструкции тканей в разных областях медицины.

Дополнительная информация

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

Участие авторов. Все авторы внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Конфликт интересов. Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

Выражение признательности. Авторский коллектив выражает благодарность заведующему отделом реконструктивно-восстановительной и пластической хирургии «НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова», д.м.н., профессору Катаеву Михаилу Германовичу и научному сотруднику отдела, к.м.н. Захаровой Марии Андреевне за организацию и выполнение биопсии у пациентов, участвовавших в исследовании.

569

ЛИТЕРАТУРА

- Oliva J, Bardag-Gorce F, Niihara Y. Clinical Trials of Limbal Stem Cell Deficiency Treated with Oral Mucosal Epithelial Cells. *Int J Mol Sci.* 2020;21(2):411. doi: <https://doi.org/10.3390/ijms21020411>
- Takagi R, Yamato M, Kanai N, et al. Cell sheet technology for regeneration of esophageal mucosa. *World J Gastroenterol.* 2012;18(37):5145–5150. doi: <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i37.5145>
- Yamaguchi N, Isomoto H, Kobayashi S, et al. Oral epithelial cell sheets engraftment for esophageal strictures after endoscopic submucosal dissection of squamous cell carcinoma and airplane transportation. *Sci Rep.* 2017;7(1):1–12. doi: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-17663-w>
- Amemiya T, Nakamura T, Yamamoto T, et al. Autologous transplantation of oral mucosal epithelial cell sheets cultured on an amniotic membrane substrate for intra-oral mucosal defects. *PLoS One.* 2015;10(4):1–13. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125391>
- Ram-Liebig G, Barbagli G, Heidenreich A, et al. Results of Use of Tissue-Engineered Autologous Oral Mucosa Graft for Urethral Reconstruction: A Multicenter, Prospective, Observational Trial. *EBioMedicine.* 2017;23:185–192. doi: <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.08.014>
- De Kemp V, De Graaf P, Fledderus JO, et al. Tissue engineering for human urethral reconstruction: Systematic review of recent literature. *PLoS One.* 2015;10(2):1–14. doi: [10.1371/journal.pone.0118653](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0118653)
- Seeberras V, Attico E, Bianchi E, et al. Preclinical study for treatment of hypospadias by advanced therapy medicinal products. *World J Urol.* 2019. doi: <https://doi.org/10.1007/s00345-019-02864-x>
- Юдинцева Н.М., Нашекина Ю.А., Шевцов М.А., и др. Использование тканеинженерной конструкции, заселенной клетками буккального эпителия, для заместительной уретропластики // *Цитология.* — 2020. — Т. 62. — № 4. — С. 266–277. [Yudintseva NM, Nashchekina YA, Shevtsov MA, et al. Application of the tissue-engineering construction seeded with buccal cells for substitute urethroplasty. *Tsitologiya.* 2020;64(7):266–277. (In Russ.)] doi: <https://doi.org/10.31857/S0041377120040082>
- Yadev NP, Murdoch C, Saville SP, Thornhill MH. Evaluation of tissue engineered models of the oral mucosa to investigate oral candidiasis. *Microb Pathog.* 2011;50(6):278–285. doi: <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2010.11.009>
- Jennings LR, Colley HE, Ong J, et al. Development and Characterization of In Vitro Human Oral Mucosal Equivalents Derived from Immortalized Oral Keratinocytes. *Tissue Eng Part C Methods.* 2016;22(12):1108–1117. doi: <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2016.0310>
- Dobrowolski D, Orzechowska-Wylegala B, Wowra B, et al. Cultivated Oral Mucosa Epithelium in Ocular Surface Reconstruction in Aniridia Patients. *Biomed Res Int.* 2015;2015:1–7. doi: <https://doi.org/10.1155/2015/281870>
- Nakamura T, Takeda K, Inatomi T, et al. Long-term results of autologous cultivated oral mucosal epithelial transplantation in the scar phase of severe ocular surface disorders. *Br J Ophthalmol.* 2011;95(7):942–946. doi: <https://doi.org/10.1136/bjo.2010.188714>
- Rama P, Matuska S, Paganoni G, et al. Limbal Stem-Cell Therapy and Long-Term Corneal Regeneration. *N Engl J Med.* 2010;363(2):147–155. doi: <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0905955>
- Paaske Utheim T, Aass Utheim Ø, Khan Q-E-S, Sehic A. Culture of Oral Mucosal Epithelial Cells for the Purpose of Treating Limbal Stem Cell Deficiency. *J Funct Biomater.* 2016;7(1):5. doi: <https://doi.org/10.3390/jfb7010005>
- Kasai Y, Sugiyama H, Takagi R, 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. *Regen Ther.* 2016;4:71–77. doi: <https://doi.org/10.1016/j.reth.2016.02.008>

16. 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(6):1685–1695. doi: <https://doi.org/10.1002/stem.1999>
17. Baradaran-Rafii A, Delfazayebaher S, Aghdami N, et al. Midterm outcomes of penetrating keratoplasty after cultivated oral mucosal epithelial transplantation in chemical burn. *Ocul Surf*. 2017;15(4):789–794. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jtos.2017.08.006>
18. Kim YJ, Lee HJ, Ryu JS, et al. Prospective Clinical Trial of Corneal Reconstruction With Biomaterial-Free Cultured Oral Mucosal Epithelial Cell Sheets. *Cornea*. 2018;37(1):76–83. doi: <https://doi.org/10.1097/ICO.0000000000001409>
19. Squier C, Brogden KA. *Human Oral Mucosa: Development, Structure, and Function*. John Wiley & Sons, Inc.; 2011. P. 23.
20. Eroschenko VP. *Di Fiore's atlas of histology with functional correlations. 11th ed.* Lippincott Williams & Wilkins; 2005. P. 235–261.
21. Formanek M, Millesi W, Willheim M, et al. Optimized growth medium for primary culture of human oral keratinocytes. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1996;25(2):157–160. doi: [https://doi.org/10.1016/s0901-5027\(96\)80064-6](https://doi.org/10.1016/s0901-5027(96)80064-6)
22. Murakami D, Yamato M, Nishida K, et al. Fabrication of transplantable human oral mucosal epithelial cell sheets using temperature-responsive culture inserts without feeder layer cells. *J Artif Organs*. 2006;9(3):185–191. doi: <https://doi.org/10.1007/s10047-006-0342-3>
23. Bauer H-K, Flesch D, Walenta S, et al. Primary Mucosal Epithelial Cell Cultivation: A Reliable and Accelerated Isolation. *Tissue Eng Part C Methods*. 2019;25(2):82–92. doi: <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2018.0327>

КОНТАКТНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Герасимов Максим Юрьевич, врач-окулист [*Maxim Y. Gerasimov*, MD]; адрес: 127486, Москва, Бескудниковский б-р, д. 59а [address: 59a Beskudnikovsky Blv., 127486, Moscow, Russia]; e-mail: gerasimovmy@mntk.ru, SPIN-код: 7539-1262, ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3433-8352>

Борзенко Сергей Анатольевич, д.м.н., профессор [*Sergey A. Borzenok*, MD, PhD, Professor]; e-mail: mdborzenok@yandex.ru, SPIN-код: 1054-0164, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9160-6240>

Малюгин Борис Эдуардович, д.м.н., профессор [*Boris E. Malyugin*, MD, PhD, Professor]; e-mail: boris.malyugin@gmail.com, SPIN-код: 8906-2787, ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5666-3493>

Островский Дмитрий Сергеевич, к.б.н. [*Dmitriy S. Ostrovskiy*, PhD in Biology]; e-mail: dmitriy.ostrovskiy@gmail.com, SPIN-код: 9947-6481, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2817-7102>

Шацких Анна Викторовна, к.м.н. [*Anna V. Shatskikh*, MD, PhD]; e-mail: avsatik07@yandex.ru, SPIN-код: 1751-9815, ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3437-8162>