

ТРАНСПЛАНТАТ ЛИМБАЛЬНЫХ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК НА БИОРЕЗОРБИРУЕМОМ НОСИТЕЛЕ

DOI: 10.17691/stm2017.9.4.05

УДК 612.841.1–008.64:611.018.7:617.7:57.089

Поступила 23.08.2017 г.



А.П. Понятовская, инженер-исследователь отдела молекулярно-клеточных технологий Центральной научно-исследовательской лаборатории¹;

С.А. Коротченко, младший научный сотрудник отдела молекулярно-клеточных технологий Центральной научно-исследовательской лаборатории¹;

Д.В. Давыденко, научный сотрудник группы патологической анатомии патологоанатомического отделения²;

А.В. Юдинцев, старший преподаватель кафедры биофизики Института биологии и биомедицины³;

В.И. Михайлова, врач-офтальмолог⁴;

А.А. Шипунов, младший научный сотрудник⁴;

И.А. Николаев, врач-ординатор⁴;

Н.А. Поздеева, д.м.н., зам. директора по научной работе⁴;

Е.Н. Бат'ков, к.м.н., зам. директора по организационно-клинической работе⁴;

И.В. Мухина, д.б.н., профессор, зав. ЦНИЛ¹; зав. кафедрой нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова¹; профессор кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины³; руководитель Центра трансляционных технологий³

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Приволжский федеральный медицинский исследовательский центр Минздрава России, Н. Новгород, 603155, Верхне-Волжская набережная, 18;

³Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

⁴Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. академика С.Н. Федорова Министерства здравоохранения Российской Федерации, Чебоксарский филиал, Чебоксары, 428028, пр. Тракторостроителей, 10г

Цель исследования — разработать метод культивирования лимбальных эпителиальных стволовых клеток (ЛЭСК) с последующей их пересадкой на скаффолд на основе биорезорбируемого фибринового клея для аутотрансплантации на глаз реципиента с лимбальной недостаточностью.

Материалы и методы. Применялись два метода культивирования ткани лимба: 1) с ее предварительной ферментативной и механической диссоциацией; 2) высаживание на пластик цельного биоптата лимба. В качестве скаффолда использовался биорезорбируемый клей Ивисел (Johnson&Johnson, Россия). Иммуноцитохимическое фенотипирование проводилось на маркеры дифференцированных клеток роговицы, лимба и конъюнктивы и на маркеры стволовых клеток.

Результаты. Иммуноцитохимические исследования подтвердили наличие клеток, профиль маркеров которых характерен для ЛЭСК. Применяемый метод позволяет создать трансплантат культуры ЛЭСК на биорезорбируемом носителе.

Заключение. Культивирование биоптата лимба без предварительной диссоциации клеток позволяет сохранить клеточный состав, пролиферативный потенциал и значительно увеличить скорость наращивания клеточной массы лимбальных стволовых клеток.

Ключевые слова: лимбальные эпителиальные стволовые клетки; недостаточность лимбальных стволовых клеток; трансплантат; скаффолд.

Как цитировать: Ponyatovskaya A.P., Korotchenko S.A., Davydenko D.V., Yudinsev A.V., Mikhailova V.I., Shipunov A.A., Nikolaev I.A., Pozdeeva N.A., Bat'kov E.N., Mukhina I.V. Transplant of limbal epithelial stem cells on bioresorbable scaffold. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(4): 44–50, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.4.05>

Для контактов: Понятовская Анастасия Петровна, e-mail: ponyatovskaya@inbox.ru

Transplant of Limbal Epithelial Stem Cells on Bioresorbable Scaffold

A.P. Ponyatovskaya, Engineer-Researcher, Department of Molecular and Cell Technologies, Central Research Laboratory¹;
S.A. Korotchenko, Junior Researcher, Department of Molecular and Cell Technologies, Central Research Laboratory¹;
D.V. Davydenko, Researcher, Pathological Anatomy Group, Department of Pathological Anatomy²;
A.V. Yuditsev, Senior Lecturer, Department of Biophysics, Institute of Biology and Biomedicine³;
V.I. Mikhailova, Ophthalmologist⁴;
A.A. Shipunov, Junior Researcher⁴;
I.A. Nikolaev, Physician-in-Residency⁴;
N.A. Pozdeeva, MD, PhD, Deputy Director in Charge of Research⁴;
E.N. Bat'kov, PhD, Deputy Director in Charge of Clinics and Administration⁴;
I.V. Mukhina, DSc, Professor, Head of the Central Research Laboratory¹; Head of the Department of Normal Physiology named after N.Y. Belenkov¹; Professor, Neurotechnology Department, Institute of Biology and Biomedicine³; Head of the Center for Translational Technology³

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, 10/1 Minin and Pozharsky Square, Nizhny Novgorod, 603005, Russian Federation;

²Privolzhsky Federal Medical Research Center of the Ministry of Health of the Russian Federation, 18 Verkhne-Volzhsкая Naberezhnaya St., Nizhny Novgorod, 603155, Russian Federation;

³Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation;

⁴The Academician S.N. Fyodorov Intersectoral Research and Technology Complex "Eye Microsurgery", Ministry of Health of the Russian Federation, Cheboksary branch, 10 g Traktostroyteley pr., Cheboksary, 428028, Russian Federation

The aim of the study was to develop a method to culture limbal epithelial stem cells (LESC) including their subsequent transplantation onto a scaffold based on bioresorbable fibrin glue for further autotransplantation into the eye of a recipient with limbal insufficiency.

Materials and Methods. Two methods of limbal tissue cultivation were used: 1) with preliminary enzymatic and mechanical tissue dissociation; 2) with planting the entire limbal specimen on a plastic base. Bioresorbable glue from Evicel (Johnson & Johnson, Russia) was used as a scaffold. Immunocytochemical phenotyping was performed using the markers of differentiated cells of the cornea, limbus and conjunctiva and the markers of stem cells.

Results. Immunocytochemical studies have confirmed the presence of cells whose marker profile was characteristic for LES. The developed method resulted in a transplant based on LES cultured on a bioresorbable scaffold.

Conclusion. Culturing a limbus biopsy specimen without preliminary dissociation allows one to preserve cell composition and proliferative potential; the method significantly increases the growth of limbal stem cells.

Key words: limbal epithelial stem cells; limbal stem cells deficiency; transplant; scaffold.

Заболевания, ведущим фактором развития которых является недостаточность лимбальных эпителиальных стволовых клеток (ЛЭСК), характеризуются помутнением роговицы различной степени интенсивности, хроническим воспалением поверхности глазного яблока, неоваскуляризацией, образованием конъюнктивального паннуса, рецидивирующими эрозиями, что в итоге ведет к значительному снижению остроты зрения [1]. К лимбальной недостаточности могут приводить ожоги, синдром Стивенса–Джонсона, рубцовый пемфигоид, трахома, ионизирующие излучения, ультрафиолетовое излучение, генетические заболевания, в том числе такое заболевание, как врожденная

аниридия, а также различные кератиты и кератопатии [2, 3].

Существует несколько вариантов патогенетического лечения лимбальной недостаточности с помощью стволовых клеток в зависимости от ее типа (полная или частичная, врожденная или приобретенная) [4–6]:

1) аутотрансплантаты лимба со здорового глаза или от близких родственников. Недостатком метода является вероятность развития лимбальной недостаточности на ранее интактном глазном яблоке, также данный метод невозможно использовать при двустороннем поражении и при наследственных генетических заболеваниях;

2) трансплантаты аллогенного лимба от доноров-трупов. Основным недостатком метода является длительная иммуносупрессивная терапия;

3) аутологичные лимбальные клетки, культивированные на различных носителях (амниотическая мембрана, коллагеновый скаффолд и др.). Применение данного способа ограничено технической сложностью и стоимостью.

Разработанные на сегодняшний день способы культивирования и трансплантации лимбальных клеток не обеспечивают стойкой регенерации роговичного эпителия и не позволяют добиться достаточно длительного поддержания регенераторных свойств роговичного эпителия для успешного выполнения пересадки роговицы.

Расположенные в складках палисадов Фогта ЛЭСК составляют особый пул стволовых клеток в области базального эпителия лимба [7, 8], благодаря которым происходит восстановление роговицы при различных повреждениях. Деление ЛЭСК выполняется асимметричным способом, при котором одна дочерняя клетка позволяет поддерживать «стволовость» и сохранять пул стволовых клеток, а другая становится транзитной амплифицирующейся клеткой и далее может дифференцироваться в крыловидные клетки, а они затем в свою очередь трансформируются в терминально дифференцированные роговичные эпителиальные клетки [9]. ЛЭСК по сравнению с другими соматическими стволовыми клетками имеют свои особенности: небольшие размеры самой клетки, высокое ядерно-цитоплазматическое соотношение, отсутствие экспрессии маркеров дифференцировки. Кроме того, для этих клеток характерно наличие α -энолазы, рецепторов EGF, пигмента, присутствие виментина и цитокератина 14, 15, 19 [10, 11]. Основными положительными их маркерами являются фактор р63, субъединица G-2 белка ABCG2 [12, 13]. Среди наиболее используемых в качестве отрицательных маркеров — цитокератин 3 (СК3) и цитокератин 19 (СК19), а также белок коннексин 43, которые типичны для дифференцированных клеток. СК3 является маркером окончательной дифференцировки, он «окрашивает» все дифференцированные клетки роговичного и лимбального эпителия, но не «окрашивает» клетки конъюнктивального эпителия. СК19 присутствует во всех конъюнктивальных и лимбальных эпителиальных клетках, а также в периферических базальных клетках роговицы. К сожалению, до настоящего времени не найдено одного конкретного маркера ЛЭСК, поэтому комбинация положительных и отрицательных маркеров является наиболее надежным способом фенотипирования предполагаемых ЛЭСК в лимбальном эпителии.

Цель исследования — разработать метод культивирования лимбальных эпителиальных стволовых клеток для дальнейшей их пересадки на скаффолд из фибринового клея и последующей трансплантации реципиентам с недостаточностью лимбальных стволовых клеток.

Материалы и методы

Клеточная культура. Забор лимбальных клеток осуществляли у взрослого кролика в условиях операционной. Выкраивали участок лимба протяженностью 2–3 мм, толщиной 200 мкм, захватывая по 1,5 мм роговицы и конъюнктивы. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с нормативами, указанными в руководстве «Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (ILAR publication, 1996, the National Academy Press)»; с национальным стандартом РФ ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики»; с этическими принципами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принята в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом НижГМА.

Всю работу по обработке ткани и культивированию клеток выполняли в асептических условиях в ламинарном боксе. Ткань лимба предварительно несколько раз отмывали в растворе Хэнкса («ПанЭко», Россия) с антибиотиком — 100 мкг/мл гентамицина (КРКА, Словения).

При посадке культуры использовали два метода: 1) механическая и ферментативная диссоциация ткани лимба и высаживание на пластик суспензии клеток; 2) высаживание на пластик ткани лимба без предварительной диссоциации.

Метод 1. Выделенная ткань лимба механически и ферментативно дезагрегировалась: измельчалась при помощи двух скальпелей до размеров 1 мм³, затем обрабатывалась 0,25% раствором трипсина (Invitrogen, США) в течение 15 мин с экспозицией в термостате при 35,5°C. Для инактивирования трипсина к суспензии добавляли избыток среды Dulbecco's modified Eagle's medium и Ham's F12 — DMEM-F12 (Invitrogen, США) с 10% фетальной бычьей сыворотки («ПанЭко», Россия). Затем суспензию центрифугировали 5 мин при 1000 об./мин. Осадок ресуспендировали в ростовой среде: DMEM-F12 и 10% фетальной бычьей сыворотки. Суспензию клеток, полученную от одного биоптата, в 3 мл среды заливали в пластиковые чашки Петри диаметром 60 мм. Клетки прикреплялись к пластику и активно пролиферировали.

Метод 2. Ткань лимба механически при помощи двух скальпелей разобщали на части по 5–8 мм и помещали в пластиковые чашки Петри диаметром 60 мм в ростовой среде DMEM-F12 и 10% фетальной бычьей сыворотки.

Органотипические культуры (биоптаты) и диссоциированные клетки культивировали при 35,5°C и 5% CO₂ в инкубаторе для культур клеток MCO-18AIC (Sanyo, Япония) до достижения монослоя культуры 90–100% конфлюэнтности. Замену 1 мл среды производили каждые 3 дня.

Структуру и динамику развития культур оценивали с помощью инвертированного микроскопа DM1000 (Leica Microsystems, Германия). Для оценки скорости

развития культур использовали показатель времени достижения монослойной культурой 90–100% кон- флюэнтности.

После образования клетками монослоя лимбаль- ные стволовые клетки снимали с поверхности пласти- ка методом трипсинизации и пересаживали на био- резорбируемый носитель — скаффолд. Скаффолд формировали в виде полупрозрачной пленки из фи- бринового клея Ивисел (Johnson&Johnson, Россия) на дне лунки культурального планшета с диаметром 15,4 мм. Клетки на скаффолде культивировали при постоянных условиях 35,5°C, 5% CO₂ в увлажненном инкубаторе для культур клеток (МСО-18А1С).

Иммуноцитохимическое фенотипирование клеточных культур. Протокол окрашивания клеток в культуре включал в себя фиксацию 70% этанолом, инкубацию клеток с первичными антителами — моноклональными мышинными антителами к СК19, clon Ks19.1 (Lab Vision Corporation, США) и к СКпан, clon АЕ1/АЕ3 (Lab Vision Corporation, США). В случае им- мунофлюоресцентного окрашивания в раствор допол- нительно добавляли первичные кроличьи поликло- нальные антитела к белку SOX2 (Abcam, США) или белку виментину [EPR3776] — Cytoskeleton Marker (Abcam, США). Визуализацию комплекса с антителами проводили либо с использованием системы детекции UltraVision Quanto (Lab Vision Corporation, США) и ее протокола (без блокирования пероксидазной актив- ности и протеинового блока) — ядра клеток в этом случае докрашивали гематоксилином Майера, либо с

использованием вторичных козьих антимышиных ан- тител с флюоресцентными зондами Goat Anti-Mouse IgG H&L — Alexa Fluor® 488 (Thermo Fisher, США) и антикроличьих антител Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody — Alexa Fluor® 555 (Thermo Fisher, США) — ядра клеток в этом слу- чае докрашивали красителем Hoechst 33342 (BD Pharmingen, США).

Окрашенные флюоресцентными маркерами клетки просматривали с помощью конфокального флюорес- центного лазерного сканирующего микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия).

Результаты

Культивирование диссоциированных клеток лимба на пластике до пересадки на скаффолд. При культивировании диссоциированных клеток лим- ба и органотипической культуры лимбальной ткани на- блюдалась различная динамика роста монослоя ство- ловых лимбальных клеток.

При культивировании клеток лимба первым мето- дом в 1-е сутки первичная культура была представ- лена клеточной суспензией (рис. 1, а). Некоторые клетки начинали прикрепляться к пластику на 1–2-е сутки, на 5-е сутки культура диссоциированных кле- ток лимба состояла из фенотипически разнородных клеток, большинство из которых находилось в су- спензии, лишь единичные клетки были прикреплены к дну чашки Петри (рис. 1, б). В дальнейшем прикре- пившиеся клетки пролиферировали, образуя скопле- ния клеток в виде клонов на дне чашки Петри. Стадия

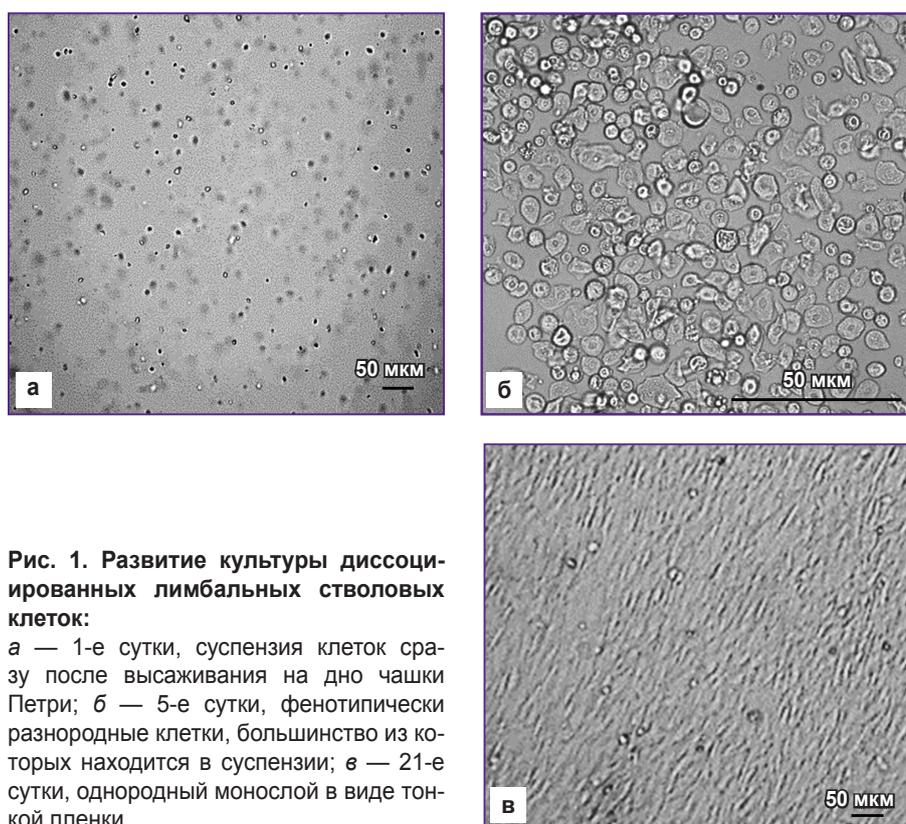


Рис. 1. Развитие культуры диссоци- рованных лимбальных стволовых клеток:

а — 1-е сутки, суспензия клеток сразу после высаживания на дно чашки Петри; б — 5-е сутки, фенотипически разнородные клетки, большинство из которых находится в суспензии; в — 21-е сутки, однородный монослой в виде тонкой пленки

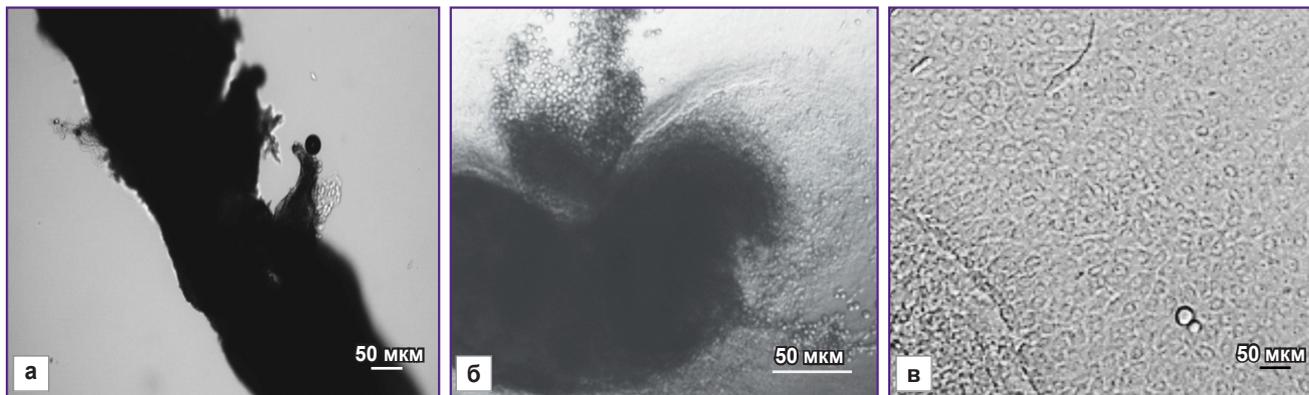


Рис. 2. Развитие тканевого биоптата лимба без предварительной диссоциации:

а — 1-е сутки, тканевой биоптат лимба сразу после помещения на субстрат; *б* — 3-и сутки, ткань лимба, прикрепленная к пластику, в нижней части образца разнородные по фенотипическому составу клетки активно пролиферируют; *в* — 5-е сутки, однородный монослой в виде тонкой пленки

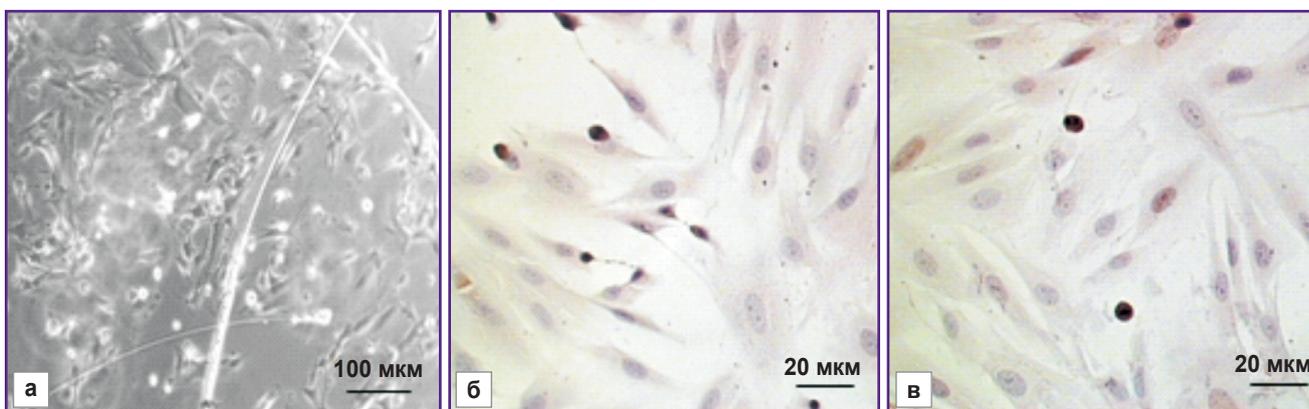


Рис. 3. Культура лимбальных стволовых клеток на фибриновом клее:

а — живая культура клеток на субстрате; *б* — иммуноцитохимическое маркирование клеток лимба на цитокератин PAN; *в* — окрашивание лимбальных клеток иммуноцитохимическим методом на цитокератин 19

90–100% конфлюэнтности наблюдалась через 3 нед ($22,0 \pm 2,6$ сут) после посадки диссоциированных клеток (рис. 1, *в*).

При культивировании клеток лимба вторым методом в 1-е сутки первичная культура была представлена тканевым биоптатом лимба размером 5–8 мм (рис. 2, *а*). На 2-е сутки культивирования ткань лимба прикреплялась к пластику и в нижней части биоптата; клетки, разнородные по фенотипическому составу, активно пролиферировали (рис. 2, *б*). Разрастаясь, культура закрывала большую часть дна чашки Петри однородным монослоем в виде тонкой пленки, видной невооруженным глазом. Скорость пролиферации клеток и образования монослоя была значительно выше, чем при культивировании диссоциированных клеток (рис. 2, *в*). Стадия 90–100% конфлюэнтности наблюдалась через $7,5 \pm 0,5$ сут.

Таким образом, оба метода культивирования обеспечивали рост культуры стволовых клеток лимба, достаточный для пересадки на скаффолд из фибрино-

вого клея, но скорость роста культуры была выше при культивировании без проведения предварительной диссоциации ткани лимба.

Пересадка лимбальных эпителиальных стволовых клеток на скаффолд. Клеточная культура после ферментативного снятия с пластика и посадки на скаффолд прикреплялась к фибриновому клею и пролиферировала на нем (рис. 3, *а*), образуя монослой в течение 15–17 сут после получения клеток первым способом и в течение 5–6 сут после получения клеток вторым способом.

Фенотипирование культуры лимбальных стволовых клеток. Иммуноцитохимическое и иммунофлуоресцентное маркирование выявило наличие в культуре единичных дифференцированных клеток с небольшим количеством цитокератинов (рис. 3, *б*, *в*). В образце присутствовали мелкие округлые клетки, цитоплазма которых четко окрашена антителами с флуоресцентным красителем к белкам СК19 и СК19 (рис. 4). Также присутствовало небольшое количест-

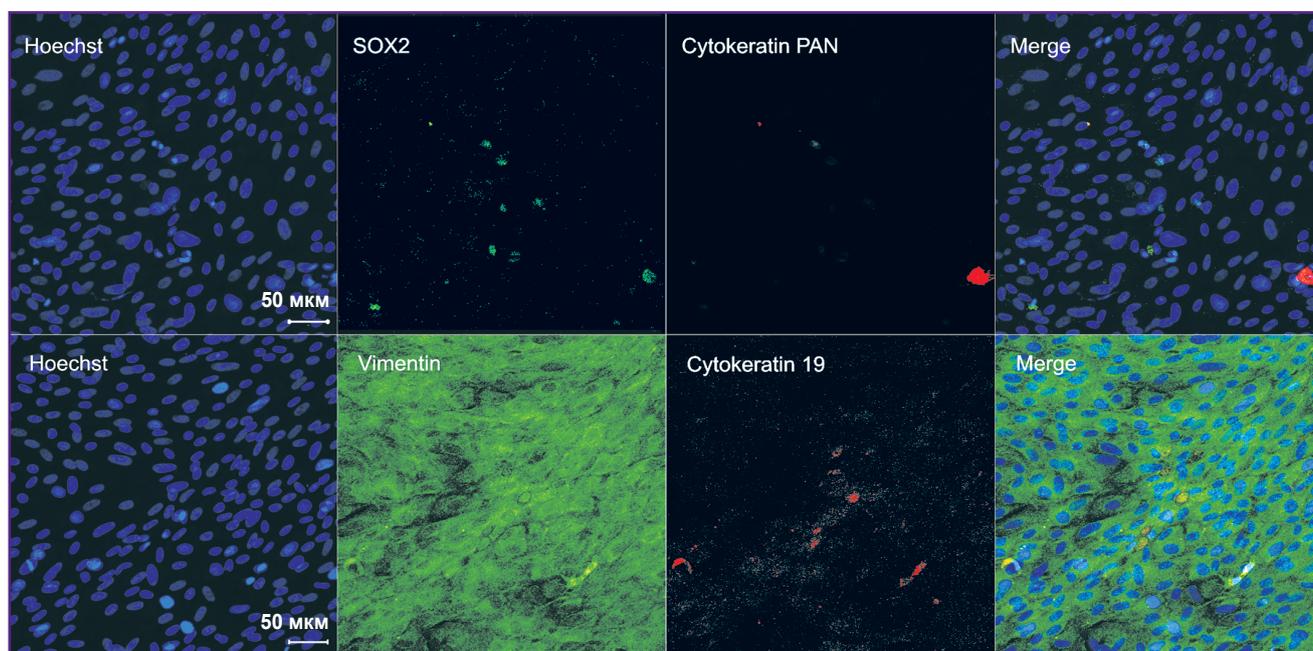


Рис. 4. Экспрессия маркеров лимбальных стволовых клеток в образце:

верхний ряд — наблюдается небольшое количество клеток с SOX2-положительными ядрами (зеленый цвет), также присутствует округлая клетка с положительным маркированием на цитокератин PAN (красный цвет), ядра клеток окрашены Hoechst 33342 (синий цвет); *нижний ряд* — положительное маркирование большей части культуры клеток на виментин (зеленый цвет), в нескольких клетках наблюдается его коэкспрессия с цитокератином 19 (красный цвет). Ядра клеток окрашены Hoechst 33342 (синий цвет)

во SOX2-положительных ядер (рис. 4, *верхний ряд*). Большую часть культуры (>95%) составляли виментин-положительные клетки (рис. 4, *нижний ряд*).

Результаты иммуноцитохимического и иммунофлуоресцентного анализа показали, что в большей части культурального образца присутствовали виментин-положительные клетки с незначительным количеством SOX2-, СКрап- и СК19-позитивных клеток. Отсутствие в большинстве культивируемых клеток экспрессии маркеров дифференцировки (СКрап и СК19) при наличии виментина как маркера «стволовости» свидетельствовало о том, что образец состоял из лимбальных стволовых клеток.

Таким образом, культивирование биоптата лимба без предварительной диссоциации клеток позволяет сохранить клеточный состав, пролиферативный потенциал и значительно увеличить скорость наращивания клеточной массы лимбальных стволовых клеток (стадия 90–100% конfluence наблюдается через неделю при культивировании биоптата и через 3 нед — при культивировании диссоциированных клеток).

Заключение. Разработанный способ культивирования монослойного трансплантата лимбальных эпителиальных стволовых клеток на основе биорезорбируемого фибринового клея Ивисел может быть использован для разработки метода лечения лимбальной недостаточности с помощью клеточных технологий.

Финансирование исследования. Исследование не финансировалось никакими источниками.

Конфликт интересов не заявляется.

Литература/References

1. Поздеева Н.А., Тонаева Х.Д., Борзенко С.А. Алло-лимбальная трансплантация в лечении пациентов с недостаточностью лимбальных стволовых клеток при врожденной аниридии. *Медицинский альманах* 2014; 1(31): 74–77. Pozdeeva N.A., Tonaeva H.D., Borzenok S.A. Allolimb transplantation in the treatment of patients with insufficiency of limbal stem cells in case of congenital aniridia. *Meditsinskiy al'manakh* 2014; 1(31): 74–77.
2. Кузьменко В.В., Ступникова Т.В., Хейфец Ю.Б., Вавилова Л.М. Применение стволовых клеток в офтальмологии. *Разработка и регистрация лекарственных средств* 2015; 4(13): 128–133. Kuzmenko V.V., Stupnikova T.V., Kheyfets Yu.B., Vavilova L.M. Application of stem cells in ophthalmology. *Razrabotka i registratsiya lekarstvennykh sredstv* 2015; 4(13): 128–133.
3. Фримен Д.М. Ассоциированная с аниридией кератопатия. *Практическая медицина* 2015; 1–2(87): 62–69. Freeman J.M. Associated with aniridia keratopathy. *Prakticheskaya meditsina* 2015; 1–2(87): 62–69.
4. Пасечникова Н.В., Гринь В.К., Дрожжина Г.И., Попандупуло А.Г., Иванова О.Н., Кавелина А.С. Получение трехмерного трансплантата лимбальных клеток роговицы. *Вестник неотложной и восстановительной медицины* 2012;

- 13(1): 99–102. Pasechnikova N.V., Grin V.K., Drozhzhina G.I., Popandopulo A.G., Ivanova O.N., Kavelina A.S. Three-dimensional graft of limbal cornea cells. *Vestnik neotlozhnoy i vosstanovitel'noy meditsiny* 2012; 13(1): 99–102.
5. Попандопуло А.С., Кавелина О.Н., Иванова Г.И., Дрожжина А.Г. Роль лимбальных клеток в регенерации роговицы. *Таврический медико-биологический вестник* 2013; 1–2(61): 158–160. Popandopulo A.S., Kavelina O.N., Ivanova G.I., Drozhzhina A.G. The role of limbal cells in regeneration of cornea. *Tavrisheskiy mediko-biologicheskiy vestnik* 2013; 1–2(61): 158–160.
6. Гундорова Р.А., Макаров П.В., Терских В.В., Васильев А.В., Ходжабекян Г.В. Перспективы применения новых биотехнологических методов в регуляции регенерации роговицы. *Вестник офтальмологии* 2004; 120(6): 49–52. Gundorova R.A., Makarov P.V., Terskikh V.V., Vasil'ev A.V., Khodzhabekyan G.V. Prospects of application of new biotechnology methods in regulation of corneal regeneration. *Vestnik oftal'mologii* 2004; 120(6): 49–52.
7. Yoon J.J., Ismail S., Sherwin T. Limbal stem cells: central concepts of corneal epithelial homeostasis. *World J Stem Cells* 2014; 6(4): 391–403, <https://doi.org/10.4252/wjsc.v6.i4.391>.
8. Joseph A., Powell-Richards A.O., Shanmuganathan V.A., Dua H.S. Epithelial cell characteristics of cultured human limbal explants. *Br J Ophthalmol* 2004; 88(3): 393–398, <https://doi.org/10.1136/bjo.2003.018481>.
9. Nieto-Miguel T., Calonge M., de la Mata A., López-Paniagua M., Galindo S., de la Paz M.F., Corrales R.M. A comparison of stem cell-related gene expression in the progenitor-rich limbal epithelium and the differentiating central corneal epithelium. *Mol Vis* 2011; 17: 2102–2117.
10. Kurpakus M.A., Maniaci M.T., Esco M. Expression of keratins K12, K4 and K14 during development of ocular surface epithelium. *Curr Eye Res* 1994; 13(11): 805–814, <https://doi.org/10.3109/02713689409025135>.
11. Yoshida S., Shimmura S., Kawakita T., Miyashita H., Den S., Shimazaki J., Tsubota K. Cytokeratin 15 can be used to identify the limbal phenotype in normal and diseased ocular surfaces. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006; 47(11): 4780–4786, <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0574>.
12. Ksander B.R., Kolovou P.E., Wilson B.J., Saab K.R., Guo Q., Ma J., McGuire S.P., Gregory M.S., Vincent W.J., Perez V.L., Cruz-Guilloty F., Kao W.W., Call M.K., Tucker B.A., Zhan Q., Murphy G.F., Lathrop K.L., Alt C., Mortensen L.J., Lin C.P., Zieske J.D., Frank M.H., Frank N.Y. ABCB5 is a limbal stem cell gene required for corneal development and repair. *Nature* 2014; 511(7509): 353–357, <https://doi.org/10.1038/nature13426>.
13. De Paiva C.S., Chen Z., Corrales R.M., Pflugfelder S.C., Li D.Q. ABCG2 transporter identifies a population of clonogenic human limbal epithelial cells. *Stem Cells* 2005; 23(1): 63–73, <https://doi.org/10.1634/stemcells.2004-0093>.