

Экспериментальные исследования

УДК 617.713–002.9:616–002.18–089.843(092.9)

Воспаление роговой оболочки и пролиферативная активность клеток переднего эпителия при моделировании бактериального кератита и использовании амниотической мембраны с различным типом ее фиксации

Е. В. Середя, В. В. Вит, д-р мед. наук, проф., Г. И. Дрожжина, д-р мед. наук, проф.,
Т. Б. Гайдамака, д-р мед. наук

ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины»; Одесса (Украина)

E-mail: evsereda08@gmail.com

Ключевые слова: бактериальный кератит, амниотическая мембрана, эксперимент, биологические маркеры, репарация.

Ключові слова: бактеріальний кератит, амніотична мембрана, експеримент, біологічні маркери, репарація.

Введение. Амниотическая мембрана (АМ) человека благодаря своим антибактериальным, антиангиогенным, противовоспалительным и антифибробластным свойствам заняла прочное место в реконструктивной хирургии глазной поверхности [10, 15, 19, 22]. Благодаря таким свойствам амниотическая мембрана человека может играть важную роль в лечении инфекционного кератита. Большинство экспериментальных и клинических исследований посвящено изучению влияния трансплантации амниотической мембраны (ТАМ) на течение герпетического и нейротрофического кератитов, а также ожогов глаз. А. Neilgenhaus и соавт. На модели язвенного герпетического кератита изучали процессы репарации и неоваскуляризации роговицы

после ТАМ с определением уровня экспрессии матриксных металлопротеиназ [11]. D. Bauer с соавт. изучив влияние ТАМ на иммунный ответ Т-клеток роговицы мышей на модели стромального герпетического кератита показали, что амниотическая мембрана индуцирует апоптоз Т-лимфоцитов [3]. В литературе имеются также единичные работы, посвященные изучению влияния ТАМ на воспалительные процессы в роговице при бактериальных кератитах [2, 9, 14].

Молекулярные механизмы влияния АМ на течение воспалительного процесса и регенерации

Вступ. Молекулярні механізми впливу амніотичної мембрани на перебіг запального процесу і регенерації рогівки в даний час інтенсивно вивчаються з використанням різних біологічних маркерів.

Мета дослідження. Визначити залежність між запаленням рогової оболонки і проліферативною активністю клітин переднього епітелію на підставі вивчення експресії Кі-67, CD-68, MMP-9 при моделюванні бактеріального кератиту і використанні амніотичної мембрани з різним типом її фіксації.

Матеріал і методи. Експериментальне дослідження проведено на 60 кроликах (60 очей) породи шиншила, у яких моделювали бактеріальний кератит середнього ступеня тяжкості. Через два тижні кроликам проводили трансплантацію амніотичної мембрани із застосуванням техніки inlay (1 шар) з фіксацією амніону вісьмома вузлуватими швами нейлон 10/00 до рогівки і техніки onlay (1 шар) з фіксацією мембрани вісьмома вузлуватими швами шовк 8/00 до епісклери.

Результати. У результаті проведеного дослідження відзначається наявність зворотного зв'язку між проліферативною активністю клітин переднього епітелію рогової оболонки і ступенем запальної інфільтрації стромы рогівки, що підтверджується на підставі вивчення експресії таких маркерів репарації рогівки як: Кі-67, CD 68 і MMP-9. При наявності запалення відзначається зниження проліферативної активності епітеліоцитів переднього епітелію, що істотно знижує швидкість епітелізації і подальшої диференціації клітин по шарах.

Висновок. Запальний процес і зниження швидкості епітелізації частіше відбуваються при фіксації амніотичної мембрани шовним матеріалом до поверхні рогівки, тобто в групі тварин, у яких застосовували inlay техніку трансплантації амніотичної мембрани.

роговицы в настоящее время интенсивно изучаются с использованием различных биологических маркеров, и в частности IL-6, IL-10, фактор роста опухоли (TNF- α), галектина-1, PCNA-белка, матриксных металлопротеиназ [4, 5, 11, 18].

Для изучения влияния ТАМ на течение воспалительного процесса в роговице при бактериальном кератите нами были выбраны следующие биологические маркеры: Ki-67, CD 68, MMP-9.

Известно, что Ki-67 является маркером пролиферации эпителиальных клеток. Экспрессия этого белка наступает во время фазы G1, нарастает в течение клеточного цикла и резко уменьшается в фазе митоза [6]. Таким образом, экспрессия Ki-67 дает возможность идентифицировать клетки, находящиеся во всех фазах клеточного цикла, кроме фазы покоя G0 [5, 12]. Количество и сроки появления Ki-67 позитивных клеток позволяют судить о процессах эпителизации роговой оболочки [7, 8].

Маркер CD68 представляет собой гликопротеин, который экспрессируется на поверхности моноцитов, макрофагов и используется в качестве маркера макрофагов. Известно, что ТАМ может существенно уменьшать воспалительный процесс в роговице и снижать риск таких осложнений, как десцеметоцеле и перфоративная язва [20, 21]. Именно поэтому определение уровня экспрессии CD68 в строме роговицы может быть показательным для оценки степени инфильтрации роговой оболочки [13] и противовоспалительного действия амниотической мембраны [16].

Матриксная металлопротеиназа MMP-9 является ферментом желатиназой, участвующим в ремоделировании внеклеточного матрикса. MMP секретируются разными клетками (трофобластами, остеокластами, нейтрофилами, макрофагами), однако наибольшее её количество секретируется полиморфно-ядерными лейкоцитами. Матриксные металлопротеиназы являются частью ответа роговицы на повреждение и инфекцию [17]. В эксперименте на модели *Candida albicans* кератита доказана роль повышенной экспрессии MMP-9 в потенцировании воспаления и деградации ткани роговицы [23]. Heiligenhaus A. et al. выявили прямую зависимость между уменьшением степени воспаления и неоваскуляризации роговицы и снижением экспрессии MMP-9 после ТАМ на модели язвенного герпетического кератита [11]. Таким образом, изучение уровня секреции MMP-9 на модели бактериального кератита после ТАМ представляет клинический и научный интерес.

Цель: определить связь между воспалением роговой оболочки и пролиферативной активностью клеток переднего эпителия на основании изучения экспрессии Ki-67, CD-68, MMP-9 при моделировании бактериального кератита и использовании амниотической мембраны с различным типом её фиксации.

Материал и методы исследования

Экспериментальное исследование проведено на 60 глазах (60 кроликов) породы шиншилла массой 2,5–3,0 кг, которых содержали при комнатной температуре на обычном лабораторном рационе. Оперативные вмешательства выполняли на базе вивария ГУ «Институт глазных болезней и тканевой терапии им. В. П. Филатова НАМН Украины» в условиях асептики и антисептики. Эксперимент проводили с выполнением этических норм, предусмотренных международными принципами Европейской конвенции «О защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов и в других научных целях» (Страсбург, 1986) и норм биомедицинской этики, одобренных первым национальным конгрессом Украины по биоэтике (2001 г.), а также закона Украины № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (Киев, 2006).

Моделирование бактериального кератита средней степени тяжести проводили по предложенному нами способу [1], который заключается в послойной трепанации роговой оболочки до 2/3 толщины стромы с инфицированием роговицы путем двукратной инстилляцией в конъюнктивальную полость 1 мл бактериальной суспензии патогенного штамма *Staphylococcus aureus* (10^9 клеток/мл), полученного от больного, и последующей субконъюнктивальной инъекции 0,1 мл дипроспана. Через две недели после моделирования кератита у 60 животных (60 глаз) проводили трансплантацию амниотической мембраны. Для размораживания мембраны криопробирку извлекали из сосуда Дюара с жидким азотом и погружали в водяную баню, нагретую до температуры +38–+40°C.

У 30 животных использовали технику inlay (1 слой) с фиксацией амниона восемью узловатыми швами нейлон 10/00 к роговице и технику onlay (1 слой) с фиксацией мембраны восемью узловатыми швами шелк 8/00 к эписклере. Веки животных сшивали двумя П-образными швами, оставляя в медиальном углу щель для осмотра. Срок наблюдения составил 1 месяц. Животных выводили из экспериментального исследования на 7, 14 и 30 сутки (по 10 животных на каждый срок) посредством введения в ушную вену 1,0 см³ воздуха с последующим забором роговой оболочки для морфологического исследования.

Иммуногистохимическое исследование. Использовался непрямой стрептавидин-пероксидазный метод выявления уровня экспрессии моноклональных антител (МКАТ) к CD68, Ki-67, MMP-9. Метод сводился к депарафинизации кусочков ткани, блокировке эндогенной пероксидазы 3 % раствором перекиси водорода, промыванию срезов, блокировке неспецифических протеиновых соединений двумя каплями 1 % BSA. Промывка в PBS-буфере, нанесение первичных антител к антигенам (фирма DAKO, Дания) на один час. Промывают в PBS-буфере и наносят вторичные антитела. Далее — промывка в PBS-буфере, нанесение двух капель комплекса стрептавидин-пероксидазы и инкубация в течение 30 мин., промывка и нанесение АЭС — хромоген — раствора — инкубация от 5 до 20 минут, до появления коричневого окраски.

Результаты исследования

Седьмые сутки после начала эксперимента. В группе животных с биологическим покрытием (onlay техника) АМ у 16 кроликов из 30 характерным было наличие умеренно выраженного и у 4 кроли-

ков средней степени выраженности отёка стромы роговицы. В 10 случаях отек роговицы отсутствовал. У 12 животных наблюдали умеренно выраженный отёк окружающей стромы. У 18 животных окружающая строма роговицы была интактной. У 6 кроликов АМ была полностью лизирована и у 14 — частично. У 10 животных мембрана на поверхности роговицы оставалась сохранной.

В группе животных с послойной трансплантацией АМ (inlay техника) во всех случаях (30) отмечали отёк стромы роговицы от умеренно выраженного (24 кролика) до средней степени выраженности (6 кроликов). В 16 случаях характерным было наличие умеренно выраженного отёка и в 6 случаях — диффузного отёка окружающей стромы роговицы. У 8 животных отека окружающей стромы не наблюдалось. АМ была сохранной на поверхности роговицы у 14 животных, частично лизированной у 10 животных и полностью лизированной у 6.

Экспрессия Ki-67. На седьмые сутки различий между степенью экспрессии Ki-67 в обеих группах не наблюдалось. При патогистологическом исследовании роговых оболочек у всех животных отмечался отёк стромы роговицы, что сопровождалось диффузным или фокальным уменьшением количества кератоцитов. Наблюдалось также наличие мукоидного отёка коллагеновых стромальных пластин, расположенных в глубоких слоях.

Выраженных воспалительных изменений в центральных участках роговицы не обнаруживается. Воспалительные инфильтраты определяются вблизи лимба и вокруг шовного материала.

На данный срок отмечается покрытие раневой поверхности тонким эпителиальным слоем, состоящим из 2–3 слоёв уплощенных клеток эпителия без дифференциации по слоям. При этом отмечается экспрессия Ki-67 практически всеми уплощенными эпителиоцитами, что свидетельствует об их высокой пролиферативной активности (рис. 1). Наиболее выраженная пролиферативная активность характерна для базальных эпителиоцитов лимбальной области, являющихся источником клеточных элементов, покрывающих раневую поверхность роговицы (рис. 2).

Несмотря на отёк стромы роговицы, экспрессию Ki-67 проявляют также кератоциты, диффузно распределенные в строме (рис. 1, 2).

В этот промежуток времени у большинства животных можно обнаружить остатки амниотической мембраны (рис. 1).

Экспрессия CD68. Экспрессия CD68, являющегося маркером моноцитов, лимфоцитов и макрофагов, выявляется в поверхностных слоях стромы роговой оболочки, а также в виде муфт вокруг кровеносных сосудов различной степени дифференциации и эндотелиоцитах (рис. 3) в группе животных с послойной ТАМ. Положительная реакция обна-

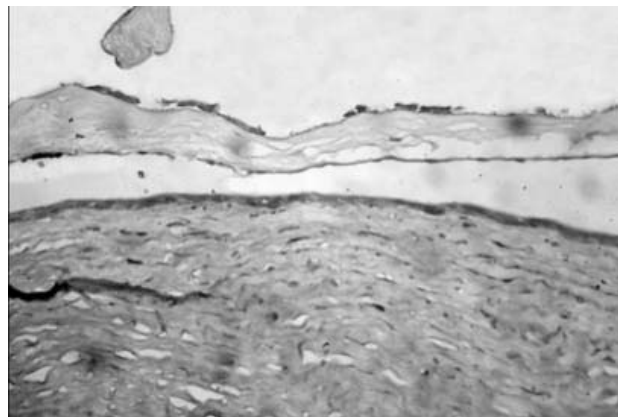


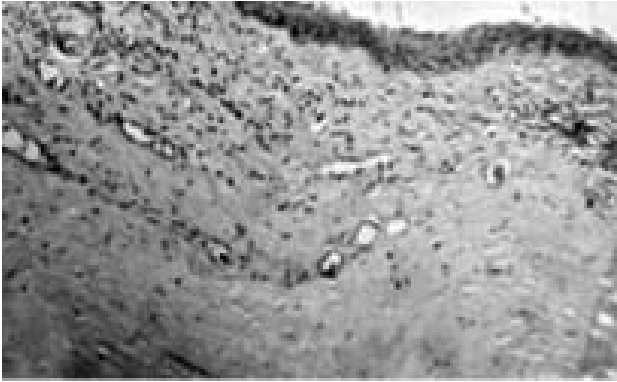
Рис. 1. Неделя после начала эксперимента. Роговая оболочка покрыта тонким слоем эпителия, состоящим из 3–4-х слоёв клеток, большая часть которых экспрессируют Ki-67. Амниотическая мембрана сохранена (стрелка). Воспалительная инфильтрация стромы отсутствует (Гематоксилин-эозин; x 70)



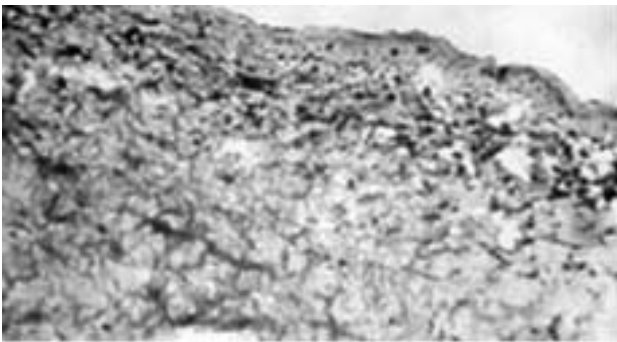
Рис. 2. Неделя после начала эксперимента. Выраженная экспрессия Ki-67 базальными клетками многослойного эпителия в области лимба и незначительное количество экспрессирующих клеток в эпителии роговицы. Начальная дифференциация клеток роговицы по слоям. Отёк стромы роговицы. Воспалительная инфильтрация стромы отсутствует (Гематоксилин-эозин; x 70).

руживается также в макрофагах, диффузно распределенных в строме роговой оболочки вблизи очагов неоваскуляризации. При этом пролиферативная активность клеток переднего эпителия роговицы снижена или отсутствует даже по краям эпителиального дефекта, о чём свидетельствует отсутствие экспрессии Ki-67.

Экспрессии CD68 не выявлялось ни в одном случае у животных с биологическим покрытием АМ поверхности роговице без использования шовного материала (рис. 4). Необходимо отметить, что поверхность роговицы была покрыта полностью дифференцированным эпителием, а в строме сохранялся отёк. Артефициальная реакция определялась только в некоторых кератоцитах и на поверхности коллагеновых стромальных пластин задних слоёв роговицы. При этом признаков вос-



а



б

Рис. 3. Неделя после начала эксперимента. Фиксация амниотической мембраны шовным материалом: **а** — диффузная воспалительная инфильтрация поверхностных слоёв роговицы лимфоцитами; неоваскуляризация стромы (Г-Э; $\times 70$); **б** — экспрессия CD68 лимфоцитами и макрофагами, диффузно распределёнными в поверхностных слоях стромы роговицы.

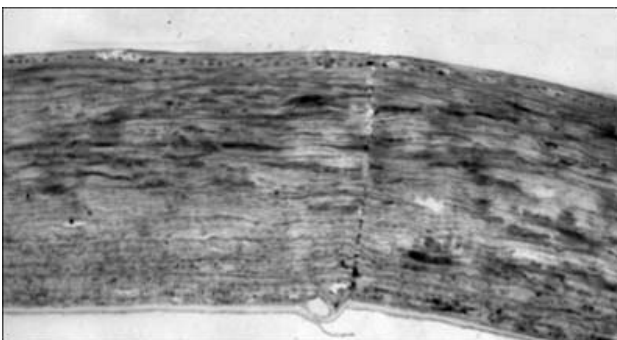


Рис. 4. Неделя после начала эксперимента. Фиксация амниотической мембраны без использования шовного материала. Отмечается эпителизация поверхности роговой оболочки. Отсутствие воспалительной инфильтрации стромы и экспрессии CD68.

палительной инфильтрации стромы роговой оболочки не выявляется.

Экспрессия ММР-9. В большинстве случаев экспрессия металлопротеиназы, характеризующей интенсивность воспалительного процесса и перестройки стромы роговой оболочки, выявлялась в

эпителиоцитах переднего эпителия вне зависимости от степени его дифференциации, а также в стромальных кератоцитах (рис. 5, 6) в обеих группах. Обращает на себя внимание наличие выраженной реакции в клетках амниотической мембраны (рис. 5). По всей видимости, экспрессия ММР-9 определялась как клетками переднего эпителия роговицы, так и диффузией фермента из амниотической мембраны.

Наиболее выраженная экспрессия обнаруживается в местах неоваскуляризации стромы роговой оболочки при использовании для фиксации амниотической оболочки шовного материала (группа с послойной ТАМ), что характеризуют сохранение воспалительной реакции и перестройка соединительнотканых элементов вблизи вновь сформированных кровеносных сосудов (рис. 7).

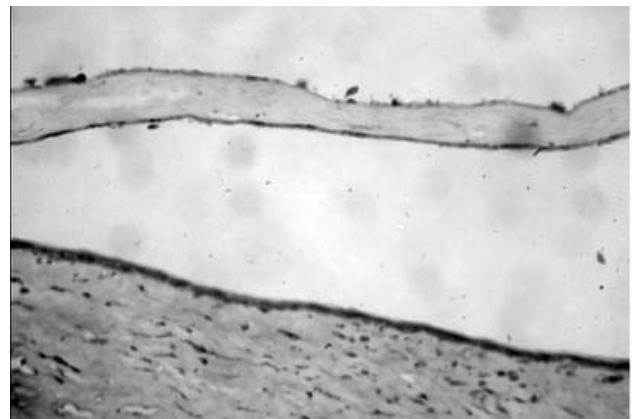


Рис. 5. Неделя после начала эксперимента. Экспрессия металлопротеиназы, выявляемая в не полностью дифференцированном переднем эпителии роговой оболочки и кератоцитах. Выявляется экспрессия и на поверхности амниотической мембраны.

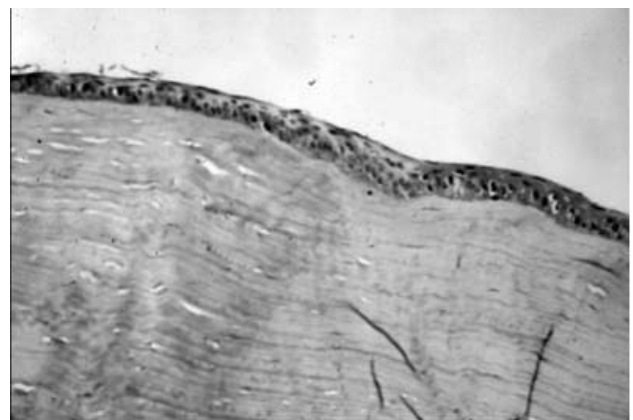


Рис. 6. Неделя после начала эксперимента. Экспрессия металлопротеиназы преимущественно в базальных слоях дифференцированного по слоям переднего эпителия роговицы. Экспрессия не выявляется в строме роговицы.



Рис. 7. Неделя после начала эксперимента. Фиксация амниотической мембраны шовным материалом Экспрессия металлопротеиназы в строме роговицы вокруг вновь образованных кровеносных сосудов.

Четырнадцатые сутки после начала эксперимента. В группе животных с биологическим покрытием АМ у 12 из 20 животных отмечали умеренно выраженный отёк стромы и у 4 животных — умеренно выраженный отёк окружающей стромы роговицы. В 2 случаях характерным было наличие точечных инфильтратов роговицы с окрашиванием их поверхности флюоресцеином. У 2 кроликов АМ была сохранна на поверхности роговицы, у 10 — частично лизирована и у 8 — полностью лизирована.

В группе животных с послойной трансплантацией АМ у 6 из 20 кроликов отмечали умеренно выраженный и у 4 кроликов — средней степени выраженности отёк стромы роговицы. Строма окружающей роговицы была умеренно отечной у 8 кроликов. В 6 случаях характерным было наличие точечных инфильтратов роговицы с окрашиванием их поверхности флюоресцеином. У 4 кроликов АМ была сохранна на поверхности роговицы, у 12 — частично и у 4 — полностью лизирована.

Экспрессия Ki-67. На данный срок поверхность роговой оболочки полностью покрыта слоем эпителиальных клеток, состоящим из 5–6 слоев эпителиоцитов. Отмечается дифференциация эпителиальных клеток по слоям. При этом уменьшается количество эпителиоцитов, экспрессирующих Ki-67, или экспрессия полностью отсутствует (рис. 8, 9).

В части случаев эпителизация в местах расположения шовного материала отсутствует, а вокруг шовного материала образуется воспалительный инфильтрат, состоящий преимущественно из лимфоцитов, экспрессирующих Ki-67. На фоне снижения отёка стромы роговицы отмечается нормализация пластинчатого строения стромы.

При выявлении экспрессии CD68 и MMP-9 на 14 сутки положительная реакция стромы роговой оболочки отсутствует, за исключением участков

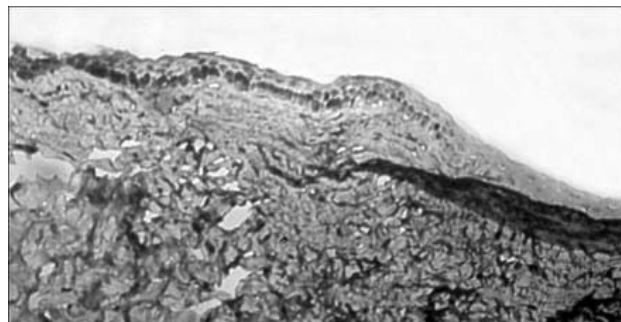


Рис. 8. Две недели после начала эксперимента. Выраженная экспрессия Ki-67 базальными эпителиоцитами роговицы и клетками средних слоёв в месте начальной дифференциации эпителиоцитов по слоям (левая часть снимка) и снижение экспрессии клетками Ki-67 в местах дифференциации. Воспалительная инфильтрация стромы отсутствует.



Рис. 9. Две недели после начала эксперимента. Неравномерная незначительная экспрессия Ki-67 эпителиоцитами на различных стадиях дифференциации клеток по слоям. Отмечается экспрессия Ki-67 воспалительными клетками стромы и части кератоцитов.

вблизи шовного материала при использовании его для фиксации амниотической мембраны в группе с послойной ТАМ.

Тридцатые сутки после начала эксперимента. В группе животных с биологическим покрытием АМ у 4 животных из 10 отмечали наличие умеренно выраженного отёка роговицы. Во всех случаях инфильтрации роговицы не отмечалось и флюоресцеиновый тест был отрицательным. У 4 животных АМ была частично лизирована и у 6 — полностью лизирована. У 6 кроликов отмечали формирование нежного облачковидного помутнения роговицы.

При послойной трансплантации АМ у 4 кроликов отмечали наличие точечной инфильтрации с прокрашиванием роговицы флюоресцеином. Сохранную АМ на поверхности роговицы наблюдали в 4 случаях. У 4 кроликов АМ была частично лизирована и у 2 — полностью. В 2 случаях наблюдали формирование облачковидного и в 4 интенсивного помутнения роговицы. Васкуляризация роговицы была отмечена у 4 животных.

Экспрессия Ki-67. На данный срок гистологически отмечается полная дифференциация эпи-



Рис. 10. Месяц после проведения оперативного вмешательства. Выраженная экспрессия Ki-67 в местах гиперплазии эпителия роговицы и практически полностью отсутствуют экспрессирующие Ki-67 клетки в местах нормальной дифференциации клеток по слоям.

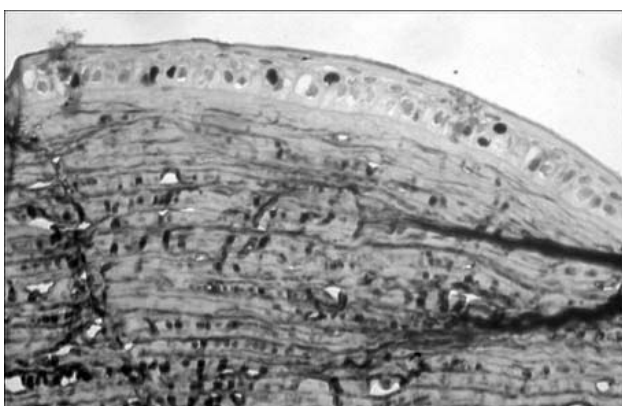


Рис. 11. Месяц после проведения оперативного вмешательства. Экспрессия Ki-67 определяется в единичных клетках базального слоя при дифференциации по слоям, приближающейся к норме.

телиальных клеток по слоям в обеих группах. При этом количество слоев клеток и степень их дифференциации по слоям в различных местах различаются. В подобных случаях отмечается отсутствие экспрессии Ki-67. В местах дифференциации эпителиоцитов, приближающейся к норме, число пролиферирующих клеток уменьшается. В то же время, в местах фокальной гиперплазии эпителия выявляется большое количество клеток особенно поверх-

ностных слоёв эпителия, экспрессирующих Ki-67 (рис. 10, 11).

На 30 сутки, как и на 14-е, характерно отсутствие положительной реакции стромы роговой оболочки при выявлении экспрессии CD68 и MMP-9, за исключением участков вблизи шовного материала при использовании его для фиксации амниотической мембраны в группе с послойной ТАМ.

Заключение. Таким образом, на 14 и 30 сутки полная эпителизация роговицы с дифференциацией клеток по слоям сопровождается снижением или полным отсутствием пролиферативной активности эпителиоцитов в обеих группах. При этом отсутствуют признаки воспаления, за исключением участков вблизи шовного материала при использовании его для фиксации амниотической мембраны в группе с послойной трансплантацией амниотической мембраны. Об этом свидетельствует отсутствие положительной реакции стромы роговой оболочки при выявлении экспрессии CD68 и MMP-9.

В результате проведенного исследования отмечается наличие обратной связи между пролиферативной активностью клеток переднего эпителия роговой оболочки и степенью воспалительной инфильтрации стромы роговицы, что подтверждается данными изучения экспрессии таких маркеров репарации роговицы, как: Ki-67, CD 68 и MMP-9. При наличии воспаления отмечается снижение пролиферативной активности эпителиоцитов переднего эпителия, что существенно снижает скорость эпителизации и последующей дифференциации клеток по слоям.

Необходимо отметить, что особенности экспрессии исследуемых иммуногистохимических маркеров в роговице сходны в обеих группах. Принципиальные отличия наблюдаются лишь в местах расположения шовного материала

Воспалительный процесс и снижение скорости эпителизации чаще происходят при фиксации амниотической мембраны шовным материалом к поверхности роговицы, то есть в группе животных, у которых применяли послойную технику трансплантации амниотической мембраны.

Литература

1. Серeda E. B., Дрожжина Г. И., Гайдамака Т. Б. Экспериментальная модель бактериального кератита средней степени тяжести // Офтальмология. Восточная Европа. — 2015. — № 2(25). — С.41–48.
2. Varequet Irina S. Effect of Amniotic Membrane Transplantation on the Healing of Bacterial Keratitis / Irina S. Varequet, Z. Habot-Wilner, N. Keller, G. Smollan, H. Ziv, M. Belkin, M. Rosner // IOVS. — 2007. — Vol. 23. — P.124–130.
3. Bauer D. Amniotic membrane transplantation induces apoptosis in T lymphocytes in murine corneas with experimental herpetic stromal keratitis / D. Bauer, S. Wasmuth, M. Hennig, H. Baehler, K. P. Steuhl, A. Heiligenhaus // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 2009. — V.50. — № 7. — P.3188–3198.
4. Bauer D. Amniotic membrane induces peroxisome proliferator-activated receptor- γ positive alternatively activated macrophages. / D. Bauer, M. Hennig, S. Wasmuth, H. Baehler, M. Busch, K. P. Steuhl, S. Thanos, A. Heiligenhaus // Invest Ophthalmol Vis Sci. — 2012. — № 53 (2). — P. 799–810.
5. Bromley M. A comparison of proliferation markers (BrdUrd, Ki-67, PCNA) determined at each cell position in

- the crypts of normal human colonic mucosa / M. Bromley, D. Rew, A. Becciolini et al. // *Eur. J. Histochem.* — 1996. — Vol.40. — P. 89–100.
6. **Bruno S.** Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein by Ki-67 antibody in HL-60 cells / S. Bruno, Z. Darynkiewich // *Cell. Prolif.* — 1992. — Vol. 25 — P. 31–40.
 7. **Dong Z.** Small incision lenticule extraction (SMILE) and femtosecond laser LASIK: comparison of corneal wound healing and inflammation. / Z. Dong, X. Zhou, J. Wu, Z. Zhang et al. // *Br J Ophthalmol.* — 2014. — № 98(2). — P. 263–269.
 8. **Fabiani C.** Corneal Epithelial Proliferation and Thickness in a Mouse Model of Dry Eye. /C. Fabiani, S. Barabino, S. Rashid, M. Reza Dana // *Exp Eye Res.* — 2009. — № 89(2). — P. 166–1171.
 9. **Gicquel J. J.** Amniotic membrane transplantation in severe bacterial keratitis. / J. Gicquel, R. A. Bejjani, P. Ellies, M. Mercie, P. Dighiero // *Cornea.* — 2007. — Vol. 26. — P. 27–33.
 10. **Hao Y.** Identification of antiangiogenic and antiinflammatory proteins in human amniotic membrane / Y. Hao, D. H. Ma, D. G. Hwang, W. S. Kim, F. Zhang // *Cornea.* — 2000. — Vol. 19. — P. 348–352.
 11. **Heiligenhaus A.** Amniotic membrane transplantation improves experimental herpetic keratitis. Modulation of matrix metalloproteinase-9 / A. Heiligenhaus, H. Li, Y. Yang, S. Wasmuth, D. Bauer, K. P. Steuhl // *Ophthalmologie.* — 2004. — № 101(1). — P. 59–65.
 12. **Holt P. R.** Is Ki-67 a better proliferative marker in the colon than proliferating cell nuclear antigen? / P. R. Holt, S. F. Moss, A. M. Kapetanakis // *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* — 1997. — № 6. — P. 131–135.
 13. **Kenney M. C.** Identification of cell types in human diseased corneas. / MC Kenney, M. Chwa, B. Lin, G. H. Huang, A. V. Ljubimov, D. J. Brown // *Cornea.* — 2001. — № 20(3). — P. 309–316.
 14. **Kim J. S.** Amniotic membrane transplantation in infectious corneal ulcer / J. C. Kim, T. W. Hahn, W. C. Park // *Cornea.* — 2001. — Vol. 20. — P. 720–726.
 15. **Kjaergaard N.** Antibacterial properties of human amnion and chorion in vitro / N. Kjaergaard, M. Hein, L. Hyttel, et al // *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* — 2001. — Vol. 94. — P. 224–229.
 16. **Liu T.** Amniotic membrane traps and induces apoptosis of inflammatory cells in ocular surface chemical burn / T. Liu, H. Zhai, Y. Xu, Y. Dong, Y. Sun, X. Zang, J. Zhao // *Mol Vis.* — 2012. — № 18 (2). — P. 137–146.
 17. **Ollivier F. J.** Proteinases of the cornea and preocular tear film. / F. J. Ollivier, B. C. Gilger, K. P. Barrie, et al. // *Vet Ophthalmol.* — 2007. — Vol. — P. 199–206.
 18. **Smorodinova N.** Regulatory Impact of Amniotic Membrane Transplantation on Presence of Adhesion/Growth-Regulatory Galectins-1 and -7 in Corneal Explants from Acanthamoeba Keratitis Patients: Clinical Note / N. Smorodinova, H. Kaltner, K. Jirsová, E. Hrdličková-Cela, S. André, T. Kučera, K. Jr. Smetana, H. J. Gabis // *Curr Eye Res.* — 2015. — Vol. 4 — P. 1–7.
 19. **Talmi W. P.** Antibacterial properties of human amniotic membranes / W. P. Talmi, L. Sigler, E. Inge, Y. Finkelstein, Y. Zohar // *Placenta.* — 1991. — Vol. 12. — P. 285–288.
 20. **Tandon R.** Amniotic membrane transplantation as an adjunct to medical therapy in acute ocular burns / R. Tandon, N. Gupta, M. Kalaivani, N. Sharma, J. S. Titiyal, R. B. Vajpayee. // *Br J Ophthalmol.* — 2011. — Vol. 95. — P. 199–204.
 21. **Tseng S. C.** Intraoperative mitomycin C and amniotic membrane transplantation for fornix reconstruction in severe cicatricial ocular surface diseases / S. C. Tseng, M. A. Di Pascuale, D. T. Liu, Y. Y. Gao, A. Baradaran-Rafii // *Ophthalmology.* — 2005. — Vol. 112. — P. 896–903.
 22. **Tseng S. C.** Suppression of transforming growth factor-beta isoforms, TGF-beta receptor type II, and myofibroblast differentiation in cultured human corneal and limbal fibroblasts by amniotic membrane matrix / S. C. Tseng, D. Q. Li, X. Ma // *J. Cell Physiol.* — 1999. — Vol.179. — P.325–335.
 23. **Xiaoyong Yuan.** Expression of Matrix Metalloproteinases during Experimental *Candida albicans* Keratitis / Y. Xiaoyong, B. M. Mitchell, K. R. Wilhelmus. // *Invest Ophthalmol Vis Sci.* — 2009. — № 50(2). — P. 737–742.

Посмунула 17.11.2015