

Репаративная регенерация многослойного эпителия роговицы: биотехнологический потенциал

В.Г. Гололобов¹, И.В. Гайворонский¹, Р.В. Деев¹, А.С. Рудько¹,
В.Н. Эллиниди², Н.В. Аникеева², М.В. Сухинин¹

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

² Всероссийский центр экстренной и радиационной медицины им. А.М. Никифорова, Санкт-Петербург

Regenerative regeneration multilayered corneal epithelium: biotechnological potential

V.G. Gololobov¹, I.V. Gayvoronsky¹, R.V. Deev¹, A.S. Rud'ko¹, V.N. Ellinidi²,
N.V. Anikееva², M.V. Sukhinin¹

¹ Kirov Military Medical Academy, Saint Petersburg

² Nikiforov Russian Center of Emergency and Radiation Medicine, Saint Petersburg

В работе, на модели повреждения многослойного эпителия роговицы у кроликов выявлены закономерности его репаративной регенерации, которые должны учитываться при разработке новых методов восстановительного лечения. У всех животных эпителий был удален со всей поверхности роговицы; далее животных разделили на 4 группы: 1 группа (контроль) — ростковую зону лимба (РЗЛ) не повреждали; 2 группа — иссекали участок РЗЛ на 1/3 её окружности лимба; 3 группа — на 1/2 окружности лимба; 4 группа — на 2/3 окружности лимба. Результаты оценивали через 6 час, 1, 3, 6, и 15 сут. при помощи флуоресцентного окрашивания и исследования поверхности роговицы в щелевой лампе, а также гистологическим и иммуногистохимическим методами. Полученные данные являются основой для разработки новых биотехнологических методов лечения, направленных на качественное восстановление поверхности роговицы.

Ключевые слова: эпителий, роговица, повреждение, регенерация, Ki-67.

По данным ВОЗ, травмы глаза в мирное время составляют до трети от общего числа заболеваний глаза, большая часть из них носит характер эрозии — локального повреждения «переднего эпителия», не затрагивающего базальный слой клеток. Более глубокие повреждения роговицы возникают при воздействии на её поверхность термических факторов, в случае проникающих ранений, а также в связи с осложненным течением инфекционных поражений. Последние характеризуются развитием рубцовой ткани на месте повреждения, и как следствие, нарушения прозрачности. Проблема восстановления поврежденной поверхности роговицы, её целостности и прозрачности в офтальмологии является актуальной, поскольку в результате лечения не всегда удается сохранить её физиологические свойства. Требуется поиск новых способов, обеспечивающих гисто- и органотипическое восстановление в тканях роговицы. Одним из таких направлений является активное использование нативных регенераторных возможностей многослойного плоского эпителия роговицы. Долгое время в научной и учебной литературе имелось мнение о том, что клетки камбиального резерва для многослойного плоского эпителия локализованы в базальном слое — как и для остальных, единых в гистогенетическом отношении, многослойных эпителиев. Однако, последние исследования свидетельствуют о неверности такой точки зрения.

Цель исследования — уточнить расположение клеток камбиального резерва и их роль в репаративной

The regularities of reparative regeneration of corneal stratified epithelium to be taken into consideration when developing new remedial treatments have been revealed in a rabbit model damage. The epithelium was removed from the entire cornea surface in all the animals. Then the animals were divided into four groups. In the first (control) group the growth zone of the limb was not damaged. In the 2nd group the limb growth zone its was ablated/excised/dissected in one third of its circle, while in the 3rd and 4th groups the limb growth zone was dissected in 1/2 and 2/3 of the limbal circle respectively. The results were evaluated in 6 h, 1, 3, 6 and 15 days with fluorescent staining and visualization of the cornea surface through the slit lamp as well as histologic and immunohistochemical methods. The data received are the basis for developing new biotechnologic therapies for proper regeneration of the cornea surface.

Key words: epithelium, cornea, damage, regeneration, Ki-67.

регенерации многослойного эпителия роговицы; уточнить временную динамику этого процесса в зависимости от объема повреждения ростковой зоны лимба и выработать научно-обоснованные предложения по разработке биотехнологического подхода к лечению обширных повреждений роговицы.

Материал и методы

Эксперимент выполнен на кроликах породы шиншилла, в возрасте 1 год (n = 25). У всех животных многослойный эпителий удаляли со всей поверхности роговицы каждого глаза до боуменовой мембраны по разработанной методике (рационализаторское предложение ВМА № 8173/8 от 15.11.2002 г.). Затем, животные были разделены на 4 группы. В 1 группе (контроль) ростковую зону лимба (РЗЛ) не повреждали. Во 2 группе одновременно с дезэпителизацией роговицы иссекали участок РЗЛ на 1/3 её окружности. В 3 группе — на 1/2 окружности лимба. В 4 — на 2/3 окружности лимба.

Дефект РЗЛ всегда наносили, начиная с меридиана на 12 часах условного циферблата в сторону верхнего носового квадранта. Полнота удаления эпителия и динамика последующего восстановления контролировалась методом витальной окраски при инстилляции 2% раствора флуоресцеината натрия в конъюнктивальный мешок и последующим равномерным распределением по всей поверхности роговицы, после чего проводилась биомикроскопия на щелевой лампе ЩЛ-56 со светофильтром кобальтовым синим. При этом наблюдали

ярко-синее окрашивание участков, лишенных эпителия. При изучении целостности эпителиальной выстилки роговицы, обращали внимание на наличие зон дезэпителизации, их форму, площадь. Количественную оценку эпителизации определяли при помощи вычисления коэффициента регенерации эпителия (КРЭ) — отношения эпителизированной поверхности к общей поверхности дефекта эпителия. КРЭ был определен с помощью наложения проекционной сетки на фотоснимок покрашенной флюоресцином роговицы.

Животные выводились из эксперимента через 6 час., 1, 3, 6, и 15 сут. передозировкой тиопентала натрия (внутрибрюшинно). Глазные яблоки удаляли из орбиты и фиксировали в 12% растворе нейтрального формалина не менее 24 час. Вырезали участки роговицы, включавшие поврежденные участки роговицы и РЗЛ. Гистологические препараты изготавливали по традиционной технологии; окрашивали гематоксилином и эозином.

Иммуногистохимическое исследование выполняли методом EnVision™/HRP (DakoCytomation, Дания) с целью выявления пула пролиферирующих клеток. Для демаскировки антигенов депарафинированные срезы подвергали высокотемпературной обработке (120°C) в цитратном буфере (pH = 6,0) в течение 3 мин. Далее срезы инкубировали с первичными антителами Ki-67 (клон MIB-1, RTU, DakoCytomation, Дания). Для визуализации продукта иммуногистохимической реакции использовали диаминобензидин DAB-kit (DakoCytomation, Дания). Результат положительной реакции — коричневое окрашивание ядер.

После проведения иммуногистохимической реакции на препаратах подсчитывали индекс пролиферации кератиноцитов, который вычисляли как отношение $Ki-67^+$ клеток к 100 кератиноцитам; осуществляли подсчеты не менее чем для 300 клеток. Полученные данные подвергали статистической обработке, оценивали статистическую значимость различий с использованием Т-критерия Стьюдента. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Все манипуляции с животными были выполнены со строгим соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Минздрава СССР № 755 «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных», 12 августа 1977 г.).

Результаты и обсуждение

У животных 1 группы (контрольная группа, дезэпителизация без повреждения РЗЛ) по данным изучения глаз в щелевой лампе, окрашенных флюоресцином, эпителизация роговицы определялась уже через 6 час после нанесения травмы. Через 24 час. дефект роговицы был замещен практически на 40%. Полное восстановление прозрачности и структуры роговицы завершалось к 3-м сут. наблюдения.

Аналогичная тенденция была подтверждена при изучении гистологических препаратов. Через 6 час. после повреждения в эпителии РЗЛ при сохранении общего числа слоёв, базальные клетки становились несколько ниже, ядра у большинства из них имели округлую форму, появлялись одиночные базальные эпителиоциты, вытянутые параллельно базальной мембране, содержащие удлиненные ядра. Своим длинником базальные эпителиоциты и лежащие над ним клетки были расположены в направлении роста регенерата (вектор: от лимба к центру роговицы). Цитоплазма поверхностных плоских элементов окрашена менее базофильно

чем у клеток нижних слоёв. В составе эпителиального регенерата весьма редко обнаруживались двуядерные клетки с измененными контурами ядра.

Таким образом, эпителиальный регенерат, образовавшийся к этому сроку, брал начало от РЗЛ и являлся её продолжением. Он состоял из 4–5 слоев клеток. Вертикальная анизоморфия в регенерирующем эпителии не выражена. Объективным подтверждением происхождения регенерата из клеток РЗЛ служит наличие в цитоплазме эпителиоцитов растущего пласта пигментных включений аналогичных гранулам пигмента в клетках эпителия лимба.

Можно утверждать, что, кроме пролиферации клеточных элементов образующегося регенерата из клеток РЗЛ, последние мигрируют на раневую поверхность и распластаются по ней, что способствует эпителизации повреждения. Происходит так называемая «мобилизация» многослойного пласта, когда высокие призматические эпителиоциты при миграции и росте по поврежденной поверхности распластаются по ней, друг по другу, суммарно увеличивая свою кроющую площадь. На этом сроке опыта не исключается возможность опережения миграции клеток их пролиферации. С последующим сочетанием этих процессов.

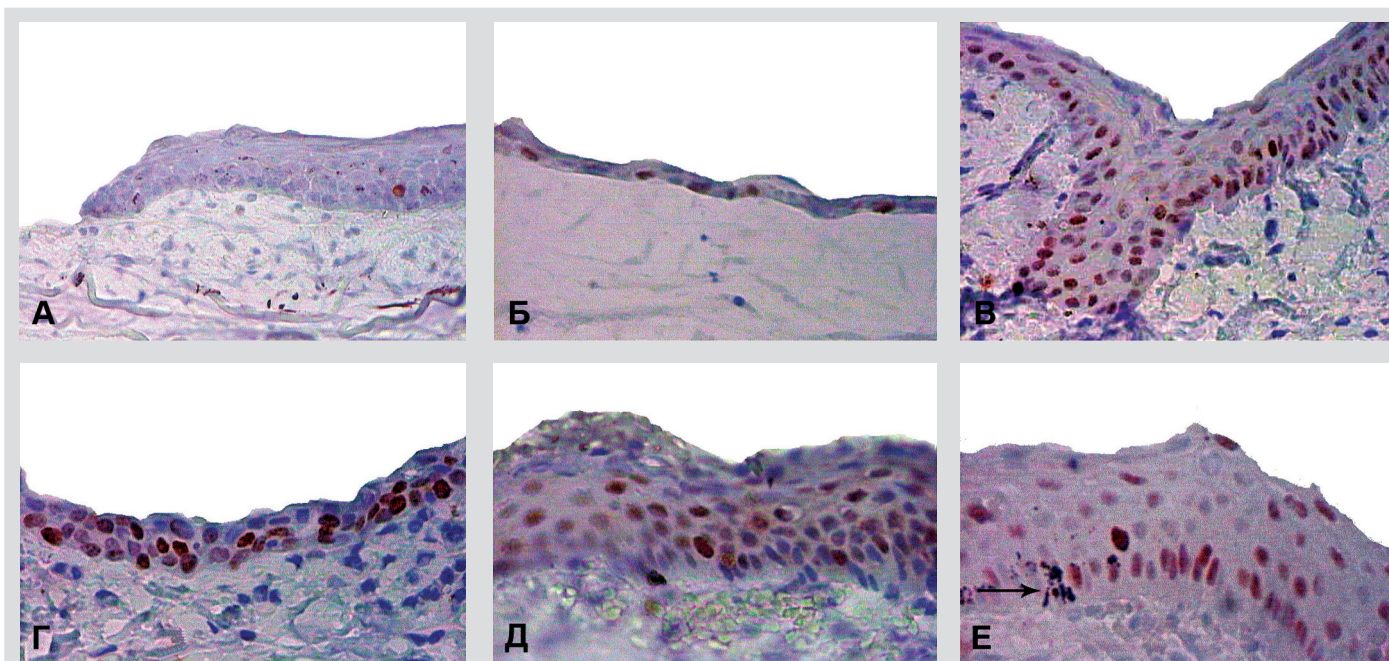
При изучении серийных гистологических срезов выявлено, что край регенерирующего эпителия имеет вид длинного узкого клина, образованного по высоте минимум двумя вытянутыми веретенообразными или плоскими клетками. Митотические фигуры у края эпителиального регенерата не встречались.

Формирование регенерата на поверхности сохранившегося, но уменьшенного дефекта не одновременно и не равномерно на протяжении регенерирующего эпителиального пласта. В участках вновь образованного эпителия вблизи РЗЛ отмечалось восстановление количества слоев клеток. В ряде случаев это количество превосходило на 2–3 слоя по сравнению с интактным эпителием. Следует отметить, что восстановление числа слоев клеток в пласте и его общей толщины, процесса дифференцировки эпителиоцитов к крайнему сроку наблюдений не были завершены, выделение типичных слоев не представлялось возможным. Базальные клетки не имели вертикальной ориентации, вышележащие элементы сходны с ними по расположению в пласте, по тинкториальным свойствам цитоплазмы и ядер (выраженная базофилия).

У животных 2 группы выявлено, что при удалении РЗЛ на 1/3 её окружности, эпителизация роговицы так же регистрируется через 6 час., и также как и в контроле и происходит за счет волнообразного покрытия дефекта эпителием РЗЛ. Полная эпителизация наступала через 4 сут., когда при окраске флюоресцином на поверхности роговицы дефекты не выявляли, а вся роговица стала прозрачной.

В процессе эпителизации поверхности роговицы, как и в первой группе, сохранялось общее количество слоев, принимающих участие в формировании эпителиального покрытия. Однако, они в первую очередь появляются у края сохранной части лимба (рис. 1А). Около отсутствующей РЗЛ на поверхности роговицы параллельно ее радиусам появлялись эпителиоциты с удлиненными ядрами (рис. 1Б).

На 3 сут. эпителиальный регенерат, начинающийся от РЗЛ, являлся ее продолжением, и состоял из 4–5 слоев клеток. Базальные клетки оказывались полиморфными: часть из них — полигональные, большая доля — веретеновидные и плоские. Появление клеток такой формы обеспечивало их покровную функцию.



Эпителиальный регенерат в области повреждения «переднего» эпителия роговицы:
 А – «наползающий» край регенерата, II группа, 3 сут.; Б – уплощенные клетки в истонченном участке регенерата, II группа, 3 сут.;
 В – пролиферация клеток ростковой зоны лимба, IV группа, 6 сут.; Г – пролиферация клеток, предположительно, конъюнктивального эпителия, покрывающих зону дефекта, IV группа, 6 сут.; Д – многослойный эпителиальный пласт с подлежащими гемокапиллярами, заполненными эритроцитами, IV группа, 15 сут.; Е – восстановленный многослойный пласт эпителиоцитов, стрелкой указаны эпителиоциты с пигментными включениями, IV группа, 15 сут.
 Иммуногистохимическая окраска: Ki-67-антиген, докраска гематоксилином. Ув. $\times 400$

Как и у животных первой группы, базальные эпителиоциты и лежащие под ними клетки своим максимальным (удлиненным) размером располагались в направлении роста регенерата – от лимба к центру роговицы (к краю эпителизирующей поверхности). Их овальные ядра ориентированы по длиннику клеток. Базофильная окраска цитоплазмы клеток нарастала к глубже лежащим слоям: чем поверхностнее расположены клетки регенерата, тем меньше их базофильность. В регенерирующем эпителии вертикальная анизоморфия не выражена и регистрируется только в паралимбальной зоне сохраненной РЗЛ при полной эпителизации (к концу регенерации).

Как и в первой группе, подтверждением происхождения регенерата из клеток РЗЛ служило наличие в цитоплазме эпителиоцитов растущего пласта пигментных включений аналогичных гранулам в клетках эпителия лимба. В этой серии они находились, прежде всего, в том секторе роговицы, где не была нарушена РЗЛ. Это доказывает, что, кроме пролиферации клеточных элементов образующегося регенерата и клеток РЗЛ, последние мигрируют на раневую поверхность, распластываются по ней, тем самым способствуя росту регенерата и эпителизации зоны повреждения.

В 3 группе эксперимента при дефекте 1/2 окружности РЗЛ наблюдали резкое замедление эпителизации в процессе регенерации. Видимое макроскопически частичное замещение дефекта регистрировалось только в конце первых суток. Если в первой группе эпителизация полностью завершается к 3 сут., то в данной группе к этому времени дефект уменьшается только на 60%. Роговица переставала прокрашиваться флуоресцеином лишь на 7 сут. В некоторых случаях после заживления осталось поверхностное облачкоидное помутнение роговицы.

Гистологически эпителиальный регенерат, как и в первых двух группах формировался от сохранившейся РЗЛ и с некоторым запаздыванием – на периферии роговицы поврежденной половины РЗЛ, что создает эксцентричность в картине эпителизации. На стороне поврежденной РЗЛ роговицы первым и наиболее активно растущим является базальный слой, создающий «первичное» покрытие, на который «наползают» поверхностные эпителиоциты, содержащие тонкие, палочковидные ядра, ориентированные вдоль поверхности пласта. Эксцентричность эпителизации заключается не только в снижении ее темпов в области травмы лимба, но и в неравномерности формирования многослойности регенерата: она раньше возникала на той половине роговицы, где была сохранена РЗЛ. Базофильность цитоплазмы клеток была более выражена в нижележащих слоях «молодого» пласта. Вблизи формирующегося эпителия травмированной части лимба определялось межклеточное вещество с проходящими в нем, вблизи от эпителия расширенными кровеносными сосудами кровяного русла.

У животных 4 группы при дефекте РЗЛ более чем на 2/3 восстановление поверхности роговицы происходило, в основном, за счет нарастания конъюнктивального эпителия при одновременной активации камбиальных клеточных элементов РЗЛ. Развивалась поверхностная неоваскуляризация. Уже на 3 сут. в местах прорастания сосудов от конъюнктивы к центру роговицы на 1–3 мм кнутри от РЗЛ наблюдали частичное замещение «переднего» эпителия соединительной тканью. Макроскопически данные изменения соответствовали росту птеригиума.

При помощи гистологического исследования установлено, что роль источника эпителиального регенерата выполняли камбиальные элементы оставшейся РЗЛ

(рис. 1В), а также конъюнктивный эпителий, близкий по своему гистогенетическому происхождению к «передним» эпителием роговицы (рис. 1Г). Вместе с тем, растущий эпителий конъюнктивы сопровождался реактивно измененной рыхлой соединительной тканью с большим количеством гемокапилляров (рис. 1Д), что приводило к формированию полноценного птеригиума на 14 сут., который лишил роговицу прозрачности.

Цитоархитектоника эпителиального регенерата соответствует картине предыдущих групп, но дефицит камбиальных клеток вследствие обширной травмы РЗЛ приводил к тому, что пласт эпителиоцитов, растущих от сохранившейся части РЗЛ был тонким. В связи с этим обстоятельством клетки конъюнктивы, вытягиваясь по длине, нарастали на дезэпителизованную роговицу по ходу старых, но расширенных, или вновь образовавшихся гемокапилляров. В отличие от эпителиоцитов роговицы цитоплазма клеток конъюнктивы была слабо базофильна или даже оксифильна. При этом, в составе регенерата также имелись клетки мигрировавшие из РЗЛ, имевшие пигментные включения; преимущественно они находились в базальных слоях пласта (рис. 1Е).

Динамика коэффициента эпителизации роговицы (КЭР) в экспериментальных группах, выявляемого макроскопически (табл. 1), в полной мере отражает скоростные характеристики репаративного процесса.

При изучении пролиферативной активности эпителиальных клеток в области регенерации установлено, что в ранние сроки опыта Ki-67-положительные клетки локализованы преимущественно в области РЗЛ, в дальнейшем они обнаруживаются и в отдаленных участках регенерата. Первые пролиферирующие кератиноциты обнаружены через 6 час. от повреждения в эпителии у животных 1 группы (индекс пролиферации 1,3). Наиболее показательны в сравнительном аспекте данные, полученные на 3 сут. эксперимента (таб. 2). Следует отметить, что пролиферативная активность эпителиоцитов роговицы более выражена у животных 2 и 3 экспериментальных групп, что видимо, связано с небольшим объемом повреждения при дезэпителизации, и значительной травмой у животных 4 группы. В первом случае репаративный процесс идет без избыточного напряжения клеток камбиального резерва.

Таблица 1. Коэффициент эпителизации роговицы у животных экспериментальных групп

Срок	Экспериментальные группы животных			
	1	2	3	4
6 ч.	0,29±0,05*	0,26±0,04	0,21±0,02	0,17±0,04*
1 сут.	0,42±0,02*	0,35±0,01*	0,30±0,05	0,21±0,02*
3 сут.	1,00±0,00*	0,81±0,04*	0,59±0,03*	0,31±0,01*
4 сут.		1,00±0,00	0,76±0,06*	0,22±0,04*
6 сут.			0,91±0,07*	0,40±0,05
7 сут.			1,00±0,00	0,63±0,05 (0,15±0,03)
15 сут.				0,72±0,04 (0,28±0,03)

Примечание: * – статистически значимые отличия от показателей разных серий в пределах одного срока ($P \leq 0,05$). В 4 серии на 7 и 15 сут. в скобках указана доля птеригиума, оставшаяся доля площади приходилась на дефект.

Таблица 2. Доля Ki-67 клеток эпителия лимба (%) на третьи сутки эксперимента

Группы экспериментальных животных			
1	2	3	4
4,7	9,6	8,8	33,3

В дальнейшем, наблюдалось некоторое «плато» в динамике данного показателя и постепенное снижение к 15-м сут.

Регенерация «переднего» эпителия роговицы давно привлекает исследователей, что обусловлено как важностью самой экспериментальной модели для выяснения фундаментальных закономерностей репаративного процесса в тканях эктодермального происхождения, так и высокой практической актуальностью [1].

Положение о том, что эпителий роговицы устроен более сложно, чем представлялось ранее высказывались давно. Так, еще в 1953 г. предлагалось выделить в его составе два компонента: рабочий – выполняющий опорно-защитную функцию и камбиальный [2]. Более того, высказывалось суждение о том, что эпителиоциты неравнозначны по дифференцированному потенциалу. Однако топографическое распределение камбиальных (стволовых) клеточных элементов достоверно выявить не удавалось, а первые эксперименты свидетельствовали о равномерном их распределении по всей поверхности роговицы в базальных слоях [3]. Только в 70-е годы окончательно утвердилась концепция об обособлении камбиального резерва в вынесенной области – РЗЛ, это стало возможно после применения новых методов исследований. Было отмечено, что митозы все же локализуются в периферической зоне роговицы, что было подтверждено автордиографическим методом исследования, причем количество пролиферирующих клеток уменьшалось к центру роговицы. Опыты с фиксацией роговиц через определенные сроки после инъекций радиофармпрепарата показали перемещение меченых клеток в центростремительном направлении [4], что вполне согласуется и с данными полученными нами.

В своей концепции клеточного обновления роговичного эпителия A.Thofr в начале 80-х годов обосновал роль клеток РЗЛ в физиологической регенерации многослойного эпителия [5] в виде пролиферации и центростремительной миграции клеток-предшественниц с последующей их дифференцировкой и послойным продвижением к десквамирующему слою. Обоснованно можно считать, что аналогичным образом этот процесс протекает и при регенерации репаративной.

Особый интерес представляет регуляция активности стволовых клеток роговичного эпителия в столь ограниченной нише – зоне лимба. Считается, что уникальное сочетание микрорельефа, образованного волокнистым матриксом и сосудами обеспечивают необходимую палитру условий для поддержания свойств этих клеток [6, 7]. Клетки этой зоны отличаются от остальных эпителиоцитов роговицы экспрессией особых видов кератинов [8], белков p63 и ABCG2 (ATP binding cassette transporter), а также одного из белков, характерных для нескольких типов стволовых клеток – гемопозитических, нейтральных и др. – notch-1 [9].

Немаловажно, что повреждение клеток роговицы и РЗЛ влияет на процессы пролиферации и дифференцировки камбиального резерва. Установлено, что высвобождающийся при развитии воспалительной реакции

фактор некроза опухолей α блокирует пролиферацию этих клеток, вместе с тем, индуцирует их миграцию к поврежденному участку [10], что вероятно, следует рассматривать как выработанную защитную реакцию, направленную на скорейшее восстановление целостности роговицы.

В настоящее время считается, что именно повреждение РЗЛ, с локализованными в ней т. н. стволовыми клетками роговичного эпителия является тем критическим обстоятельством, которое определяет функциональный исход репаративного процесса в эпителии роговицы [11]. В связи с этим и на основании и проведенного экспериментального исследования в клиническую практику введен способ аутогенной или близкородственной пересадки РЗЛ [12].

Кроме того, разработаны способы менее инвазивной коррекции обширных повреждений роговицы. Предложено сохранять эпителий роговицы для последующих трансплантаций и полученный в результате микробиопсий РЗЛ, что может сделать неактуальным различные заменители роговичного эпителия при дефиците стволовых клеток РЗЛ [7, 13, 14].

Таким образом, в ходе проведенного исследования удалось существенно уточнить временную динамику процесса восстановления «переднего» эпителия в зависимости от объема повреждения. Подтверждены данные

о том, что полноценность и сроки регенерации эпителия роговицы зависят от сохранности камбиальных (стволовых) клеточных элементов ростковой зоны лимба. Мало дифференцированные клетки базального слоя многослойного эпителиального пласта принимают участие в регенерации, однако их вклад нельзя признать ключевым. Эпителизация поврежденного участка роговицы происходит по определенной схеме: в первую очередь производится замещение дефекта, путём снижения количества слоёв сохранившейся части эпителиоцитов — «сползания» и изменения их формы. Во вторую — за счет миграции и в третью — пролиферации клеток РЗЛ. Таким образом, непрерывный клеточный трафик из РЗЛ обеспечивает постепенную эпителизацию раневой поверхности.

Восстановление эпителия роговицы без её помутнения, то есть без развития соединительной ткани и птеригиума, возможно при повреждении РЗЛ менее 1/2 её окружности. При субтотальном дефекте ростковой зоны лимба эпителизация роговицы происходит в течение длительного периода времени (более 10 сут.), при этом пролиферация эпителия конъюнктивы и развитие соединительной ткани опережают клетки «переднего» эпителия.

Полученные данные о морфо-функциональной организации РЗЛ лежат в основе биотехнологических методов лечения.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Васильева В.А. Гистогенез и реактивность эпителия роговицы в эмбриогенезе. Архив анат., гистол., эмбриол, 1962, т. 52, №6, 64–70.
2. Щелкунов С.И. О некоторых закономерностях роста эпителия в условиях эксперимента. Труды Ленинградского санитарно-гигиенического медицинского института. Т. 16. Реактивность и пластичность тканей. Государственное из-во медицинской литературы, 1953. Л.: 75–115.
3. Васильева В.А. О реактивности эпителия роговицы при поверхностном повреждении. Труды Ленинградского санитарно-гигиенического медицинского института. Т. 16. Реактивность и пластичность тканей. Государственное из-во медицинской литературы, 1953. Л.: 115–129.
4. Димент А.В., Лебедева Г.С. Особенности обновления клеток эпителия роговицы у крыс. Архив анат., гистол., эмбриол, 1973, том. Эликсве, №7: 51–55.
5. Thofr R.A. The X, Y, Z Hypothesis of Corneal Epithelial Maintenance. Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 1983; 24: 1442–3.
6. Li W., Hayashida Y., Chen Y.-T., Tseng S. Niche regulation of corneal epithelial stem cells at the limbus. Cell Research 2007; 17: 26–36.
7. Shortt A.J., Secker G.A., Munro P.M. et al. Characterization of the Limbal Epithelial Stem Cell Niche: Novel Imaging Techniques Permit In

Vivo Observation and Targeted Biopsy of Limbal Epithelial Stem Cells. Stem Cells 2007; 25(6): 1402–9.

8. Wiley L., SundarRoj N., Sun T.-T., Thofr R.A. Regional Heterogeneity in Human Corneal and Limbal Epithelia: An Immunohistochemical Evaluation. Invest. Ophthalm. Vis. Sci. 1991; 32: 594–602.

9. Thomas P.B., Liu Y.-H., Zhuang F.F. Identification of Notch-1 expression in the limbal basal epithelium. Mol. Vis. 2007; 13: 337–44.

10. Okada Y., Ikeda K., Yamanaka O. et al. TNF α suppression of corneal epithelium migration. Mol. Vis. 2007; 13: 1428–35.

11. Fernandez A., Moreno J., Prysper F. et al. Regeneration of the ocular surface: stem cells and reconstructive techniques. An. Sist. Sanit. Navar. 2008; 31(1): 53–69.

12. Черныш В.Ф. Ожоги глаз — состояние проблемы и новые подходы. СПб: ВМедА, 2008. — 135.

13. Dhaz-Valle D., Santos-Bueso E., Benitez-Del-Castillo J. et al. Sectorial conjunctival epitheliectomy and amniotic membrane transplantation for partial limbal stem cells deficiency. Arch. Soc. Esp. Ophthalmol. 2007; 82: 769–72.

14. Tsai R.J.-F., Li L.-M., Chen J.-K. Reconstruction of Damaged Corneas by Transplantation of Autologous Limbal Epithelial Cells. N. Engl. J. Med. 2000; 343(2): 86–93.

Поступила 07.11.2008