

ISSN 1814-6023 (Print)
ISSN 2524-2350 (Online)
УДК 617.713-007.17-085
<https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-4-477-487>

Поступила в редакцию 28.06.2019
Received 28.06.2019

Г. Р. Семак, В. А. Захарова, С. К. Клецкий, Т. А. Летковская, И. Ю. Жерко

Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Республика Беларусь

ОСОБЕННОСТИ ЭКСПРЕССИИ БИОМОЛЕКУЛЯРНЫХ МАРКЕРОВ (CD44, MMP9, TGFβ1) В ОЦЕНКЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕЧЕНИЯ ЭНДОТЕЛИАЛЬНО-ЭПИТЕЛИАЛЬНОЙ ДИСТРОФИИ РОГОВИЦЫ

Аннотация. Цель работы – определить эффективность терапии эндотелиально-эпителиальной дистрофии с применением субконъюнктивального введения низкомолекулярной гиалуроновой кислоты путем комплексного анализа характера экспрессии биомолекулярных маркеров в материале эксплантов роговицы.

Изучен проспективный материал эксплантов роговиц 14 пациентов с приобретенными и врожденными формами эндотелиально-эпителиальной дистрофии (ЭЭД) роговицы. С целью анализа характера экспрессии биомолекулярных маркеров выполнено ИГХ-исследование с использованием первичных моноклональных антител к CD44, MMP9, TGFβ1. Для изучения морфологических особенностей кератопатий на фоне глаукомы были использованы окрашивания гистологических препаратов гематоксилином и эозином; гистохимическое окрашивание (PAS-реакция, MSB, по Массону, конго-красным; ИГХМ с использованием маркеров CD44, MMP9, TGFβ1).

Согласно полученным результатам, в группе пациентов с ЭЭД на фоне применения инъекционной формы гиалуроновой кислоты снижается активность воспаления за счет снижения эпителиальной и стромальной экспрессии CD44 и MMP9, уменьшается проапоптотическое и профибротическое действие TGFβ1.

Ключевые слова: гиалуроновая кислота, регенерация, дистрофия роговицы, иммуногистохимия, эндотелиально-эпителиальная дистрофия

Для цитирования: Особенности экспрессии биомолекулярных маркеров (CD44, MMP9, TGFβ1) в оценке эффективности лечения эндотелиально-эпителиальной дистрофии роговицы / Г. Р. Семак [и др.] // Вест. Нац. акад. наук Беларуси. Сер. мед. наук. – 2019. – Т. 16, № 4. – С. 477–487. <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-4-477-487>

G. R. Semak, V. A. Zakharova, S. K. Kletsy, T. A. Letkovskaya, I. Yu. Zherko

Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus

FEATURES OF THE EXPRESSION OF BIOMOLECULAR MARKERS (CD44, MMP9, TGFβ1) IN ASSESSING THE EFFECTIVENESS OF TREATMENT OF ENDOTHELIAL-EPITHELIAL CORNEAL DYSTROPHY

Abstract. The purpose was to determine the effectiveness of endothelial-epithelial dystrophy treatment with subconjunctival injection of low molecular weight hyaluronic acid.

Prospective material of 14 corneas with different epithelial- epithelial dystrophy forms were examined and treated. To study the morphological features of keratopathy with the background of glaucoma staining of histological preparations with hematoxylin and eosin; histochemical staining (PAS reaction, MSB, Masson, Congo red; IHC with CD44, MMP9, TGFβ1) were used.

According to the results obtained, in the group of patients with EED, with the background of the use of an injectable form of hyaluronic acid, the activity of inflammation decreases due to a decrease in the epithelial and stromal expression of CD44 and MMP9. The proapoptotic and profibrotic action of TGFβ1 decreases.

Keywords: hyaluronic acid, dry eye disease, regeneration, corneal dystrophy, immunohistochemistry, endothelial-epithelial dystrophy

For citation: Semak G. R., Zakharova V. A., Kletsy S. K., Letkovskaya T. A., Zherko I. Yu. Features of the expression of biomolecular markers (CD44, MMP9, TGFβ1) in assessing the effectiveness of treatment of endothelial-epithelial corneal dystrophy. *Vesti Natsyonal'noi akademii nauk Belarusi. Seriya meditsinskikh nauk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Medical series*, 2019, vol. 16, no. 4, pp. 477–487 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1814-6023-2019-16-4-477-487>

Введение. Эндотелиально-эпителиальная дистрофия (ЭЭД) роговицы – медленно прогрессирующее хроническое заболевание, которое трудно поддается лечению [1, 2]. Причиной развития ЭЭД роговицы могут быть первичные наследственно детерминированные поражения эндотелия роговицы или вторичные – после различных оперативных вмешательств, проникающих ранений глазного яблока и воспалительных процессов роговой оболочки [3].

Цель работы – определить эффективность терапии эндотелиально-эпителиальной дистрофии с применением субконъюнктивального введения низкомолекулярной гиалуроновой кислоты путем комплексного анализа характера экспрессии биомолекулярных маркеров в материале эксплантов роговиц.

Материалы и методы исследования. Исследование выполнено на базе кафедр офтальмологии и патологической анатомии УО «Белорусский государственный медицинский университет». Изучен проспективный материал эксплантов роговиц 14 пациентов с приобретенными и врожденными формами ЭЭД роговицы, обратившихся в 2017–2018 гг. для обследования и последующего лечения в УЗ «3-я городская клиническая больница им. Е. В. Клумова».

Материалом исследования служили экспланты роговиц пациентов с ЭЭД, которые были разделены на группу исследования и группу сравнения. Терапия пациентов включала дополнительное применение гиалуроновой кислоты (ГК) и использование стандартных протоколов соответственно (табл. 1). Перед началом обследования и лечения все пациенты подписали информированное согласие о включении в исследование.

Таблица 1. Структура материала для анализа морфологических и иммуногистохимических признаков дисков роговиц пациентов с ЭЭД

Table 1. The material structure for the analysis of morphological and immunohistochemical signs of the corneal disc of patients with endothelial-epithelial dystrophy

Нозологическая форма	Число случаев	Число полей зрения (×40)
Группа контроля	3	18
Эндотелиально-эпителиальная дистрофия (ГК+)	6	36
Эндотелиально-эпителиальная дистрофия (ГК-)	5	30
Всего	14	84

Пациенты исследуемых групп были сопоставимы по основным клинико-лабораторным и морфологическим показателям.

Критерием включения в исследование явилась неэффективность инстилляционной терапии болезни сухого глаза (БСГ); критериями исключения – наличие глаукомы или офтальмогипертензии, наличие острого воспалительного процесса переднего отрезка глазного яблока. Клинико-лабораторное обследование включало визометрию, биомикроскопию, тонометрию, тест Ширмера I, LIPCOF-тест, определение времени разрыва слезной пленки, оптическую когерентную томографию переднего отрезка глазного яблока.

В рамках морфологического исследования дисков роговиц пациентов с ЭЭД для оценки эффективности проводимой терапии были использованы следующие модификации морфологического метода:

- 1) окрашивание гистологических препаратов гематоксилином и эозином;
- 2) гистохимическое окрашивание: PAS-реакция (окрашивание реактивом Шиффа), MSB, по Массону, конго-красным.
- 3) иммуногистохимический (ИГХ) метод.

С целью анализа характера экспрессии биомолекулярных маркеров выполнено ИГХ-исследование с использованием первичных моноклональных антител к CD44, MMP9, TGFβ1. В качестве визуализирующей системы использовали комплекс вторичных антител EnVision фирмы DAKO, в качестве хромогена – диаминобензидин. Позитивный контроль – ткани и органы, рекомендованные производителем, негативный – исключение первичного антитела. Характер экспрессии ИГХ-маркеров представлен в табл. 2.

Для морфометрического исследования микропрепараты фотографировали в 6 полях зрения (×40) с разрешением 2048×1536 пикселей при помощи микроскопа Leica с цифровой камерой Levenhuk C-Series.

ИГХ-реакцию с CD44, MMP9, TGFβ1 в материале оценивали отдельно в эпителии, кератоцитах и эндотелии роговицы, используя программное обеспечение для морфометрии WCIF ImageJ и Aperio Image Scope v.8.0.39.1059.

Таблица 2. Характер экспрессии основных иммуногистохимических маркеров

Table 2. The expression pattern of the main immunohistochemical markers

ИГХ-маркер	Характер экспрессии
CD44	Гомогенное окрашивание мембран и/или цитоплазмы эпителиальных клеток (преимущественно базальных слоев) и/или стромальных клеток в коричневый цвет различной интенсивности (от светло- до темно-коричневого)
MMP9	Цитоплазматическое окрашивание эпителия роговицы, лейкоцитов, стромальных клеток в коричневый цвет различной интенсивности
TGFβ1	Гомогенное окрашивание ядер и/или цитоплазмы эпителиальных клеток (преимущественно базальных слоев) и/или кератоцитов и/или эндотелия в коричневый цвет различной интенсивности

Статистический анализ данных проводили с помощью программного обеспечения STATISTICA 10.0. Полученные результаты обрабатывали статистически с вычислением медианы (Me), межквартильного размаха (МКР – 25-го и 75-го перцентилей) и 95 %-ного доверительного интервала (ДИ) (его максимального и минимального значений).

Для оценки характера распределения полученных данных использовали критерий Шапиро–Уилка (W). Статистически значимыми считали различия при $p < 0,05$. Сравнение независимых выборок по количественным признакам проводили с помощью дисперсионного анализа непараметрических данных ANOVA и определения критериев Краскела–Уоллиса (H -критерий) для трех и более выборок и Манна–Уитни (U -критерий) с целью парного их сравнения.

Результаты и их обсуждение. В клинических исследованиях нами была доказана эффективность субконъюнктивального введения низкомолекулярного натрия гиалуроната [4, 5]. Установлено, что гиалуроновая кислота молекулярной массой 500–700 кДа положительно влияет на течение как БСГ, так и самой кератопатии. Увеличивается слезопродукция, повышается стабильность слезной пленки, уменьшается толщина роговицы, разрешаются помутнения, уменьшается количество конъюнктивальных сосудов (рис. 1, 2).

Анализ экспрессии CD44. CD44 является наиболее распространенным рецептором гиалуроновой кислоты. Его внутрицитоплазматический домен способен транслоцироваться в ядро и самостоятельно модулировать функции клеток. CD44 также является молекулой клеточной адгезии, экспрессия которой увеличивается при воспалении [6–8].

Экспрессия CD44 выявлялась в ткани роговицы во всех исследованных случаях, имела мембранный паттерн с преобладанием слабой и умеренной экспрессии в базальном и парабазальном слоях эпителия и очагово – в кератоцитах под Боуеновой мембраной и в эндотелии сосудов в очагах неоваскуляризации.

Экспланты роговиц в группе контроля характеризовались негативным окрашиванием или базальной слабо выраженной экспрессией CD44 в эпителии роговицы и негативным окрашиванием в кератоцитах и эндотелии.

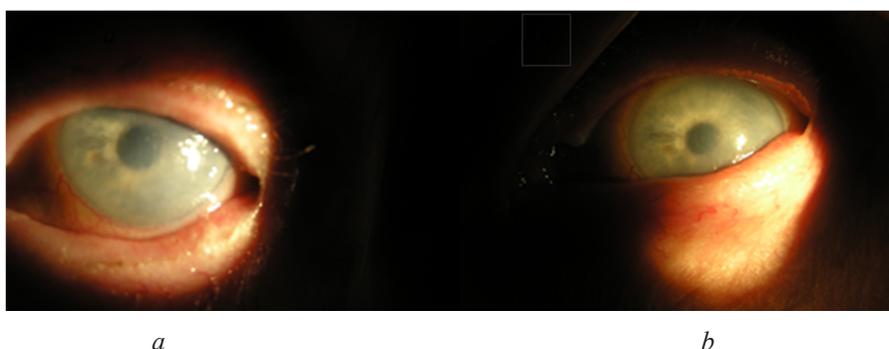


Рис. 1. Биомикроскопия переднего отрезка глазного яблока до (а) и после (б) терапии с применением гиалуроновой кислоты

Fig. 1. Biomicroscopy of the anterior segment of the eyeball before (a) and after (b) therapy with hyaluronic acid

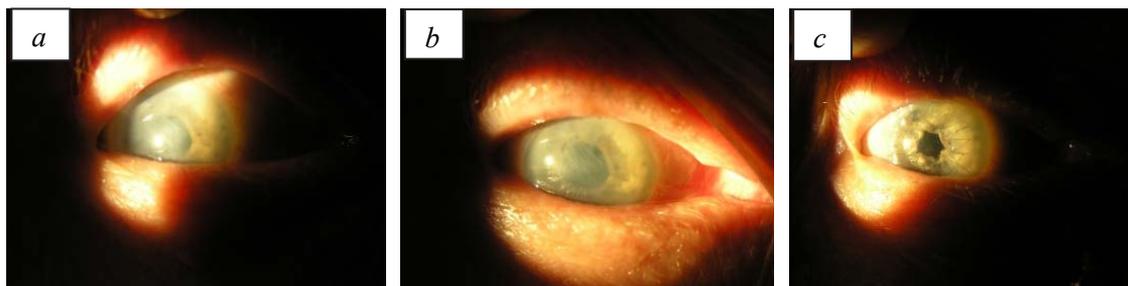


Рис. 2. Биомикроскопия переднего отрезка глазного яблока до (a), после (b) консервативного лечения и на 3-и сутки после оперативного вмешательства (c)

Fig. 2. Biomicroscopy of the anterior segment of the eyeball before (a), after (b) conservative treatment and on the 3rd day after surgery (c)

В группе пациентов с ЭЭД слабо выраженное базальное окрашивание эпителия и очаговое – кератоцитов наблюдалось в группах пациентов с врожденными формами ЭЭД (дистрофия Фукса и решетчатая дистрофия роговицы), а значительно более выраженная экспрессия CD44 как по интенсивности, так и количеству позитивных слоев отмечалась в группе пациентов с приобретенными формами ЭЭД.

Полученные данные подтверждаются результатами проведенного дисперсионного анализа, согласно которому в ткани роговиц при различных формах ЭЭД имеет место значимо большая экспрессия CD44, чем в группе контроля ($U = 4,65; p = 0,03$), преимущественно за счет приобретенных форм ЭЭД ($H = 33,94; p < 0,001$). Анализ характера экспрессии CD44 в материале роговиц

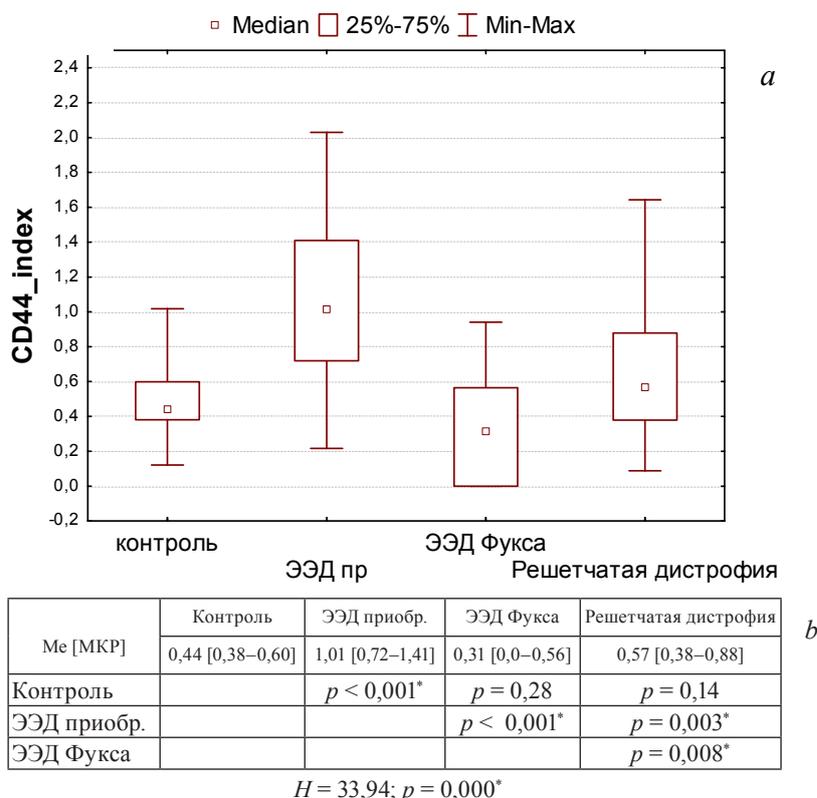


Рис. 3. Дисперсионный анализ экспрессии CD44 в эпителии эксплантов роговиц пациентов с различными нозологическими формами ЭЭД (a – критерий Краскела–Уоллиса, b – критерий Манна–Уитни). * – различия достоверны при $p < 0,05$

Fig. 3. Dispersion analysis of CD44 expression in the epithelium of the corneal explants of patients with various nosological forms of endothelial-epithelial dystrophy (a – Kruskel–Wallis test, b – Mann–Whitney test). * – differences are significant at $p < 0.05$

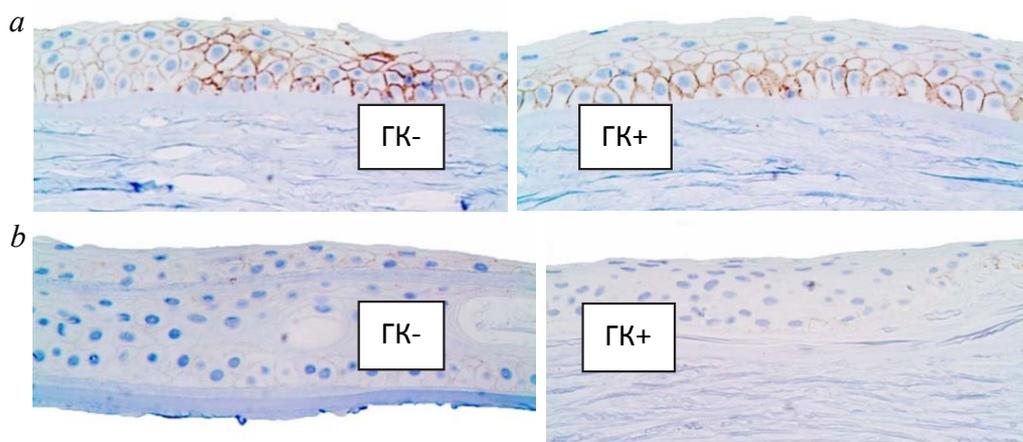


Рис. 4. Характер экспрессии CD44 в ткани эксплантов роговиц пациентов с приобретенными формами ЭЭД (а), дистрофией Фукса (b) в зависимости от протокола терапии (стандартный протокол – слева, протокол с применением ГК – справа). ИГХМ. Хромоген – диаминобензидин. Контрастное окрашивание – гематоксилином Майера. $\times 40$

Fig. 4. CD44 expression in the tissue of corneal explants in the groups of the acquired forms of endothelial-epithelial dystrophy (a), Fuchs dystrophy (b) depending on the treatment protocol (standard protocol on the left, protocol using GC on the right). Chromogen – diaminobenzidine. Contrasting with Mayer hematoxylin. $\times 40$

в зависимости от нозологической формы ЭЭД выявил отсутствие значимых различий между пациентами с врожденными формами ЭЭД и лицами группы контроля (рис. 3). Одновременно экспрессия CD44 при решетчатой дистрофии была более выраженной, чем при дистрофии Фукса.

В рамках анализа эффективности проводимой терапии (рис. 4) значимое снижение экспрессии CD44 на фоне предшествующего применения препаратов ГК имело место в группе пациентов с дистрофией Фукса ($U = 4,16$; $p < 0,001$). Тенденция к некоторому снижению экспрессии CD44 при применении ГК наблюдалась также у пациентов с приобретенной ЭЭД ($U = 241$; $p = 0,16$).

Полученные результаты можно объяснить улучшением способности роговицы к регенерации на фоне терапии с применением препарата ГК, что подтверждается литературными данными об уменьшении экспрессии CD44 по мере уменьшения альтеративных изменений роговицы после повреждения.

Анализ экспрессии MMP9. Основным звеном патогенеза БСГ является гиперосмолярность слезы, приводящая к активации провоспалительных цитокинов в эпителии роговицы, в том числе и MMP9 [9]. Важно оценить изменение уровня экспрессии данного маркера еще и потому, что экзогенное введение некоторых полисахаридов может увеличивать продукцию данного цитокина в эпителии, участвуя в дальнейшем потенцировании воспаления [10].

Экспрессия MMP9 выявлялась в ткани роговицы в виде цитоплазматического окрашивания эпителия (с преобладанием в базальных и парабазальных слоях) и стромы (с преобладанием в кератоцитах и лейкоцитах с выраженной экспрессией в очагах неоваскуляризации). Экспланты роговиц в группе контроля характеризовались негативным окрашиванием к MMP9 (рис. 5).

В группах пациентов с различными нозологическими формами ЭЭД экспрессия MMP9 в эпителии соответствовала таковой или была менее выраженной, чем в группе контроля, в то время как стромальная экспрессия MMP9 была более выраженной в группах пациентов с ЭЭД (рис. 5).

На фоне применения препаратов ГК анализ площади экспрессии MMP9 в ткани роговиц выявил значимое снижение показателя эпителиальной и стромальной позитивности в группе пациентов с приобретенными формами ЭЭД, а также уменьшение позитивности эпителиальной экспрессии MMP9 в группе лиц с дистрофией Фукса (рис. 6). В то же время в группе пациентов с решетчатой дистрофией роговицы, тип I, различия в эпителиальной и стромальной экспрессии MMP9 в зависимости от проводимой терапии отсутствовали.

Интенсивность ИГХ-реакции с моноклональными антителами к MMP9 в иммунопозитивных участках также уменьшалась на фоне применения инъекционных препаратов ГК: при при-

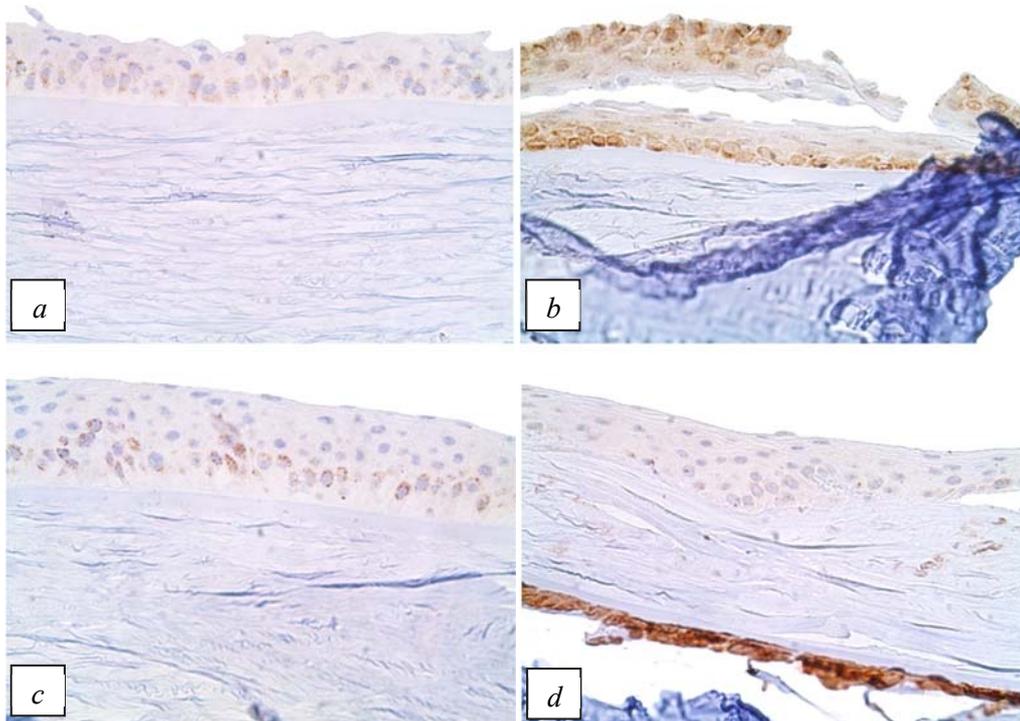


Рис. 5. Экспрессия MMP9 в ткани эксплантов роговицы в группе контроля (а), у пациентов с приобретенными формами ЭЭД (b), дистрофией Фукса (c) и решетчатой дистрофией роговицы, тип I (d) ИГХМ. Хромоген – диаминобензидин. Контрастное окрашивание – гематоксилином Майера. $\times 40$

Fig. 5. MMP9 expression in the tissue of corneal explants in the control group (a), in patients with the acquired forms of endothelial-epithelial dystrophy (b), Fuchs dystrophy (c) and ethmoid corneal dystrophy, type I (d) IHM. Chromogen – diaminobenzidine. Contrasting with Mayer hematoxylin. $\times 40$

обретенных формах ЭЭД как в эпителиальном, так и в стромальном компоненте роговицы, а при дистрофии Фукса – в эпителиальном компоненте (рис. 7). Одновременно в группе пациентов с решетчатой дистрофией роговицы, тип I, интенсивность экспрессии MMP9 на фоне ГК⁺-терапии значительно увеличивалась как в эпителии, так и в строме роговицы. При этом наиболее интенсивные отложения локализовались в зоне расположения амилоида.

Таким образом, согласно результатам проведенного дисперсионного анализа, на фоне предлагаемого варианта терапии ЭЭД с применением инъекционной формы ГК имело место значимое уменьшение как площади, так и интенсивности экспрессии MMP9 в группах пациентов с приобретенными формами ЭЭД и дистрофией Фукса, что свидетельствует об уменьшении интенсивности воспаления в эпителии роговицы. К тому же на фоне терапии уменьшалась степень дезорганизации компонентов экстрацеллюлярного матрикса роговицы, что объясняет полученный клинический эффект.

В случае решетчатой дистрофии на фоне включения в протокол терапии низкомолекулярной ГК наблюдалась противоположная картина – увеличение экспрессии CD44 в эпителии и MMP9 в эпителии и строме. Такие результаты объясняются тем, что субстратом решетчатой дистрофии является не воспаление, а амилоидоз. Изменение экспрессии потенцируется непосредственно экзогенным введением полисахарида. Вследствие необратимости изменений в тканях роговицы при решетчатой дистрофии инъекционная форма низкомолекулярной ГК применяется только с целью купирования проявлений БСГ и предоперационной подготовки. Восстановление зрительных функций возможно только оперативным путем.

Экспрессия $TGF\beta 1$ выявлялась в ткани роговицы в виде цитоплазматического окрашивания базальных и парабазальных слоев эпителия и ядерного окрашивания эпителия поверхностных слоев, преимущественно цитоплазматического окрашивания стромальных элементов и эндотелия роговицы.

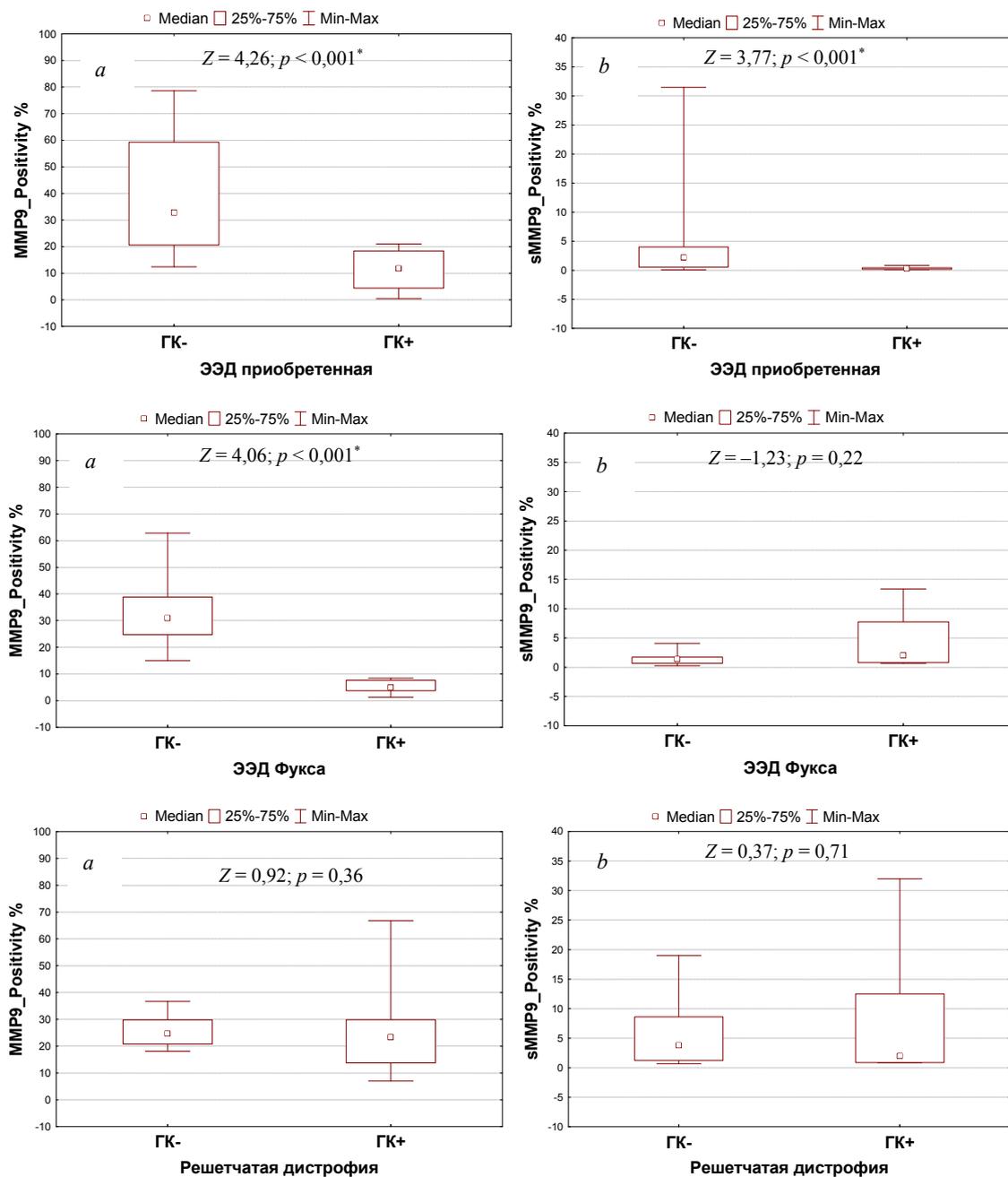


Рис. 6. Дисперсионный анализ позитивности экспрессии MMP9 в эпителии (a) и строме (b) эксплантов роговиц

Рис. 6. Дисперсионный анализ позитивности экспрессии MMP9 в эпителии (a) и строме (b) эксплантов роговиц при различных нозологических формах ЭЭД в зависимости от типа терапии. * – различия достоверны при $p < 0,05$

Fig. 6. Dispersion analysis of the MMP9 expression positivity in the epithelium (a) and stroma (b) of corneal explants in various nosological forms of endothelial-epithelial dystrophy depending on the therapy type.

* – differences are significant at $p < 0.05$

Экспланты роговиц в группе контроля характеризовались негативным или слабо выраженным окрашиванием к TGFβ1 эпителия, кератоцитов стромы и эндотелия роговицы. В группах же пациентов с различными нозологическими формами ЭЭД экспрессия TGFβ1 была более выраженной, чем в группе контроля.

Дисперсионный анализ экспрессии TGFβ1 в зависимости от нозологических форм ЭЭД выявил у пациентов с врожденными и приобретенными формами ЭЭД всех исследуемых групп значимо большие показатели экспрессии TGFβ1 в строме, чем у лиц группы контроля.

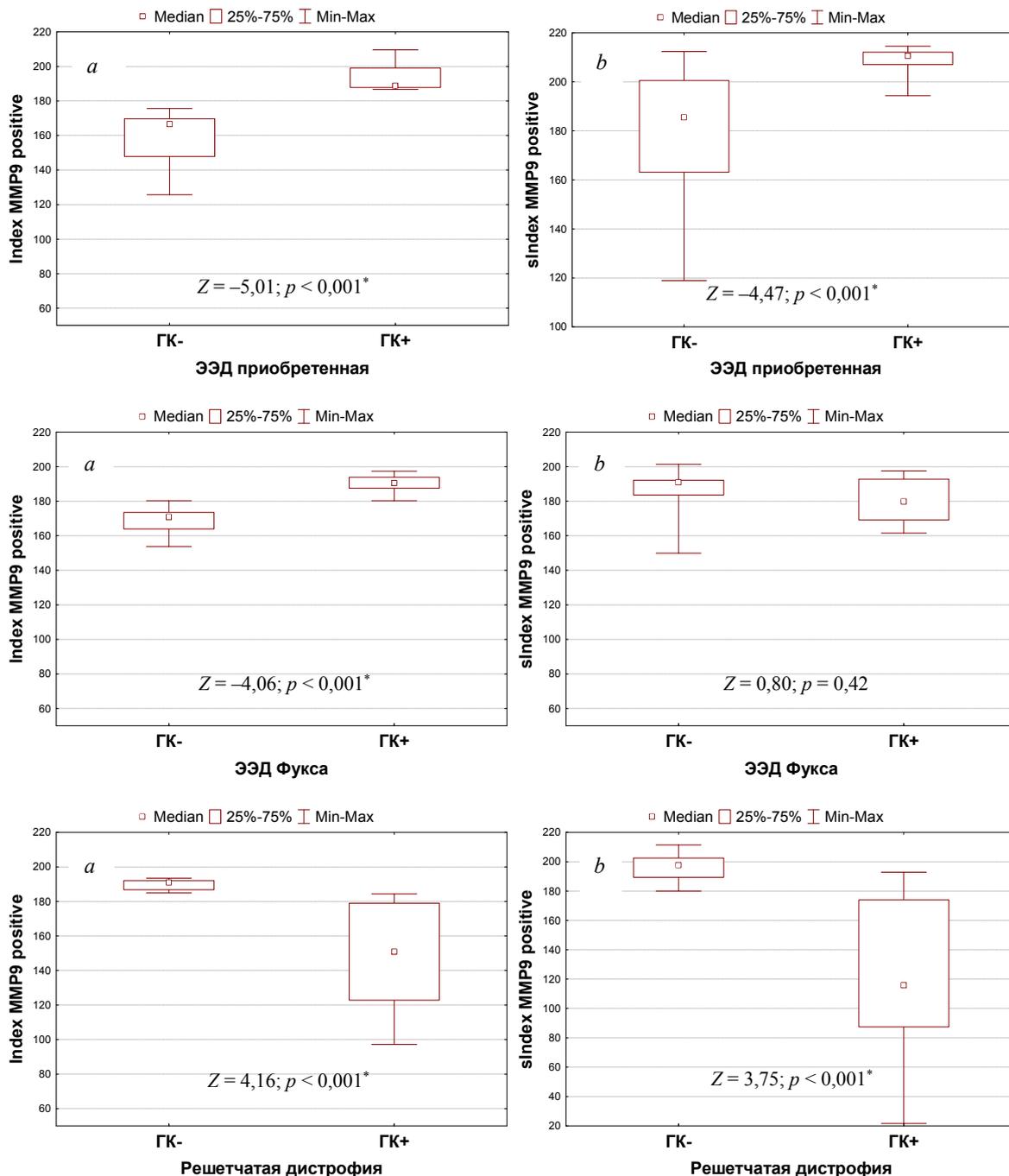


Рис. 7. Дисперсионный анализ индекса интенсивности MMP9 в иммунопозитивных участках эпителия (а) и стромы (б) эксплантов роговиц при различных нозологических формах ЭЭД в зависимости от типа терапии. * – различия достоверны при $p < 0,05$

Fig. 7. Dispersion analysis of the MMP9 intensity index in the immunopositive areas of epithelium (a) and stroma (b) of corneal explants in various nosological forms of endothelial-epithelial dystrophy depending on the therapy type. * – differences are significant at $p < 0.05$

Анализ характера экспрессии TGFβ1 в ткани роговиц на фоне применения препаратов ГК показал значимое снижение показателя позитивности стромальной экспрессии в группе пациентов с приобретенными формами ЭЭД (рис. 8).

Интенсивность ИГХ-реакции с моноклональными антителами к TGFβ1 в иммунопозитивных участках также уменьшалась на фоне применения инъекционных препаратов ГК при приобретенных формах ЭЭД, а также в стромальном компоненте в группе пациентов с решетчатой

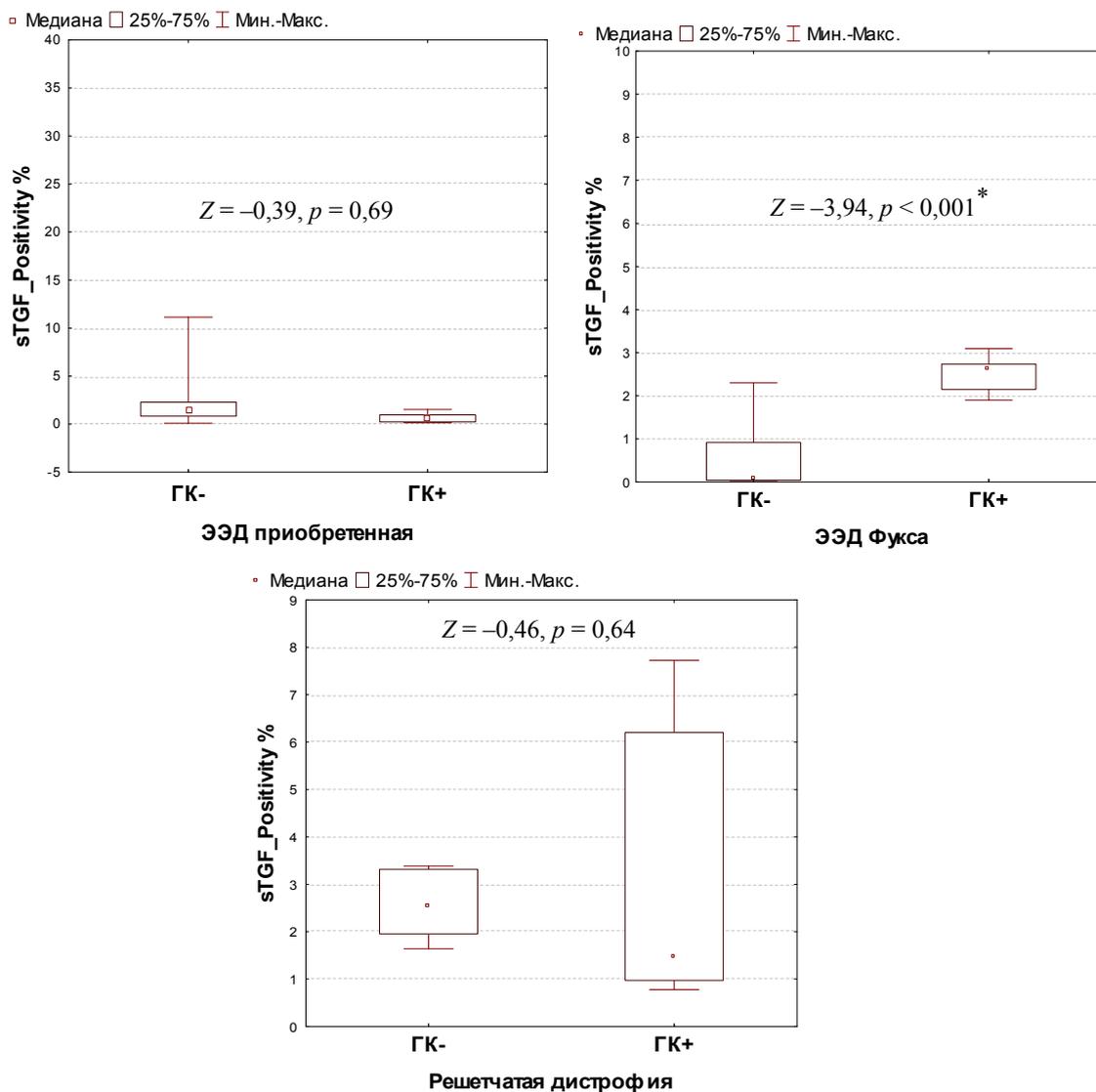


Рис. 8. Дисперсионный анализ позитивности экспрессии TGFβ1 в строме эксплантов роговиц при различных нозологических формах ЭЭД в зависимости от типа терапии

Fig. 8. Dispersion analysis of the TGFβ1 expression positivity in the stroma of corneal explants in various nosological forms of endothelial-epithelial dystrophy depending on the therapy type

дистрофией. В то же время в группе пациентов с дистрофией Фукса интенсивность экспрессии TGFβ1 на фоне ГК+-терапии значимо не изменялась (рис. 9).

Согласно результатам проведенного анализа, на фоне предлагаемого варианта терапии ЭЭД с применением инъекционной формы ГК отмечалось снижение профибротического действия TGFβ1 в группе пациентов с приобретенными формами ЭЭД.

Заключение. Субконъюнктивальное введение натрия гиалуроната является дешевым и эффективным методом лечения коморбидной БСГ. Низкомолекулярный гиалуронат способен не только обеспечить необходимую гидратацию, но и активировать процессы регенерации в эпителии роговицы, что благоприятно влияет на течение хронических дистрофических заболеваний роговицы.

Экзогенно введенная ГК подавляет воспаление в эпителии. При этом молекула ГК в 500–700 кДа достаточно мала для того, чтобы не индуцировать синтез и активацию провоспалительной MMP9 в эпителии роговицы. Низкомолекулярная ГК при ЭЭД в строме тормозит процессы фиброгенеза, подавляя экспрессию матриксной металлопротеазы.

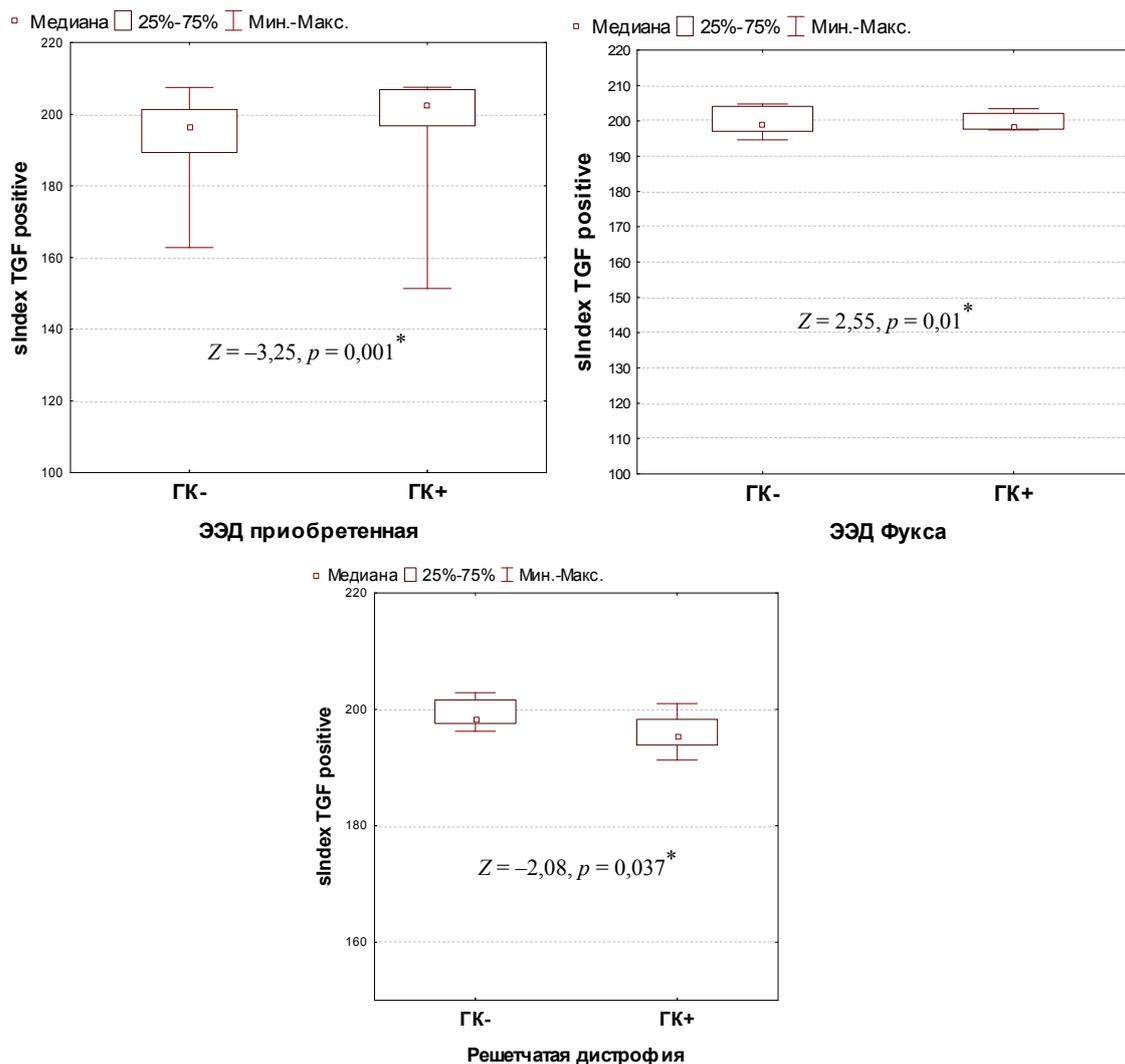


Рис. 9. Дисперсионный анализ индекса интенсивности TGFβ1 в иммунопозитивных участках и стромы эксплантов роговиц при различных нозологических формах ЭЭД в зависимости от типа терапии
 Fig. 9. Dispersion analysis of the TGFβ1 intensity index in the immunopositive areas and stroma of corneal explants in various nosological forms of endothelial-epithelial dystrophy depending on the type of therapy

Терапия с применением инъекционной формы низкомолекулярного натрия гиалуроната стабилизирует водный, муциновый и липидный слои слезной пленки, способствуя тем самым разрешению проявлений БСГ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список использованных источников

1. McCarey, B. E. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive procedures, surgical devices and new intraocular drugs and solutions / B. E. McCarey, H. F. Edelhauser, M. J. Lynn // *Cornea*. – 2008. – Vol. 27, N 1. – P. 1–16. <https://doi.org/10.1097/ico.0b013e31815892da>
2. McCarey, B. E. Noncontact specular microscopy: a macrophotography technique and some endothelial cell findings / B. E. McCarey // *Ophthalmology*. – 1979. – Vol. 86, N 10. – P. 1848–1860. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(79\)35337-4](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(79)35337-4)
3. Changes in the normal corneal endothelia cellular pattern as a function of age / R. W. Yee [et al.] // *Curr. Eye Res.* – 1985. – Vol. 4, N 6. – P. 671–678. <https://doi.org/10.3109/02713688509017661>
4. Семак, Г. Р. Клинические результаты комплексного лечения кератопатий в исходе воспалительных заболеваний переднего отрезка глазного яблока с использованием инъекционной формы гиалуроновой кислоты / Г. Р. Семак, И. Ю. Жерко // *Мед. журн.* – 2019. – № 1. – С. 97–100.
5. Семак, Г. Р. Новый подход к лечению хронических дистрофических заболеваний роговицы / Г. Р. Семак, А. В. Людчик, И. Ю. Жерко // *Докл. Нац. акад. наук Беларуси*. – 2018. – Т. 62, № 6. – С. 719–724.

6. Hyaluronan enhances contraction of collagen by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts: role of CD44 and implications for constrictive remodeling / J. A. Travis [et al.] // *Circ. Res.* – 2001. – Vol. 88, N 1. – P. 77–83. <https://doi.org/10.1161/01.res.88.1.77>
7. Hyaluronan enhances bone marrow cell therapy for myocardial repair after infarction / C.-H. Chen [et al.] // *Mol. Ther.* – 2013. – Vol. 21, N 3. – P. 670–679. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.268>
8. Selective matrix (hyaluronan) interaction with CD44 and RhoGTPase signaling promotes keratinocyte functions and overcomes age-related epidermal dysfunction / L. Y. W. Bourguignon [et al.] // *J. Dermatol. Sci.* – 2013. – Vol. 72, N 1. – P. 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.05.003>
9. Hyaluronan, heterogeneity, and healing: the effects of ultrapure hyaluronan of defined molecular size on the repair of full-thickness pig skin wounds / F. Arnold [et al.] // *Wound Repair Regen.* – 1995. – Vol. 3, N 3. – P. 299–310. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475x.1995.30310.x>
10. The corneal basement membranes and stromal fibrosis / C. S. Medeiros [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* – 2018. – Vol. 59, N 10. – P. 4044–4053. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-24428>

References

1. McCarey B. E., Edelhauser H. F., Lynn M. J. Review of corneal endothelial specular microscopy for FDA clinical trials of refractive procedures, surgical devices and new intraocular drugs and solutions. *Cornea*, 2008, vol. 27, no. 1, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1097/ico.0b013e31815892da>
2. McCarey B. E. Noncontact specular microscopy: a macrophotography technique and some endothelial cell findings. *Ophthalmology*, 1979, vol. 86, no. 10, pp. 1848–1860. [https://doi.org/10.1016/s0161-6420\(79\)35337-4](https://doi.org/10.1016/s0161-6420(79)35337-4)
3. Yee R. W., Matsuda M., Schultz R. O., Edelhauser H. F. Changes in the normal corneal endothelial cellular pattern as a function of age. *Current Eye Research*, 1985, vol. 4, no. 6, pp. 671–678. <https://doi.org/10.3109/02713688509017661>
4. Semak G. R., Zherko I. Yu. Clinical results of complex treatment of keratopathies in the outcome of inflammatory diseases of the anterior segment of the eyeball using an injectable form of hyaluronic acid. *Meditsinskii zhurnal* [Medical journal], 2019, no. 1, pp. 97–100 (in Russian).
5. Semak G. R., Lyudchik A. V., Zherko I. Yu. A new approach to the treatment of chronic dystrophic diseases of the cornea. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2018, vol. 62, no. 6, pp. 719–724 (in Russian).
6. Travis J. A., Hughes M. G., Wong J. M., Wagner W. D., Geary R. L. Hyaluronan enhances contraction of collagen by smooth muscle cells and adventitial fibroblasts: role of CD44 and implications for constrictive remodeling. *Circulation Research*, 2001, vol. 88, no. 1, pp. 77–83. <https://doi.org/10.1161/01.res.88.1.77>
7. Chen C.-H., Wang S.-S., Wei E. I., Chu T.-Y., Hsieh P. C. H. Hyaluronan enhances bone marrow cell therapy for myocardial repair after infarction. *Molecular Therapy*, 2013, vol. 21, no. 3, pp. 670–679. <https://doi.org/10.1038/mt.2012.268>
8. Bourguignon L. Y. W., Wong G., Xia W., Man M.-Q., Holleran W. M., Elias P. M. Selective matrix (hyaluronan) interaction with CD44 and RhoGTPase signaling promotes keratinocyte functions and overcomes age-related epidermal dysfunction. *Journal of Dermatological Science*, 2013, vol. 72, no. 1, pp. 32–44. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2013.05.003>
9. Arnold F., Jia C., He C., Cherry G. W., Carbow B., Meyer-Ingold W., Bader D., West D. C. Hyaluronan, heterogeneity, and healing: the effects of ultrapure hyaluronan of defined molecular size on the repair of full-thickness pig skin wounds. *Wound Repair and Regeneration*, 1995, vol. 3, no. 3, pp. 299–310. <https://doi.org/10.1046/j.1524-475x.1995.30310.x>
10. Medeiros C. S., Marino G. K., Santhiago M. R., Wilson S. E. The corneal basement membranes and stromal fibrosis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 2018, vol. 59, no. 10, pp. 4044–4053. <https://doi.org/10.1167/iovs.18-24428>

Информация об авторах

Семак Галина Романовна – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: semakgalina@mail.ru

Захарова Виктория Алексеевна. – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zakharava.vikt@gmail.ru

Клецкий Семен Кивович – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: s.kletski@mail.ru

Летковская Татьяна Анатольевна – канд. мед. наук, доцент. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: taletkovskaya@mail.ru

Жерко Ирина Юрьевна – мл. науч. сотрудник. Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116, г. Минск, Республика Беларусь). E-mail: zherko.irina@mail.ru

Information about the authors

Galina R. Semak – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: semakgalina@mail.ru

Viktoria A. Zakharova – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zakharava.vikt@gmail.ru

Semion K. Kletskiy – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: s.kletski@mail.ru

Tatiana A. Letkovskaya – Ph. D. (Med.), Assistant Professor. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: taletkovskaya@mail.ru

Iryna Yu. Zherko – Junior researcher. Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinski Ave., 220116, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: zherko.irina@mail.ru