

DOI: 10.56871/RBR.2024.84.99.009
УДК 617.713-001.3-092-003.93+577.218

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ РЕПАРАЦИИ ТКАНЕЙ РОГОВИЦЫ

© Александр Абрамович Стадников¹, Дмитрий Вячеславович Олейник²

¹ Оренбургский государственный медицинский университет. 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6

² Оренбургский филиал ФГАУ НМИЦ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова». 460047, г. Оренбург, ул. Салмышская, 17

Контактная информация: Дмитрий Вячеславович Олейник — врач-офтальмолог. E-mail: wedil@mail.ru
ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-3421-6602> SPIN: 4158-7760

Для цитирования: Стадников А.А., Олейник Д.В. Молекулярно-генетические аспекты репарации тканей роговицы // Российские биомедицинские исследования. 2024. Т. 9. № 2. С. 80–85. DOI: <https://doi.org/10.56871/RBR.2024.84.99.009>

Поступила: 15.02.2024

Одобрена: 11.04.2024

Принята к печати: 20.05.2024

Резюме. В статье приводится обзор научной литературы по вопросам репаративного гистогенеза и дифференцировки клеток в роговице на генетическом уровне. Наиболее уязвимой оболочкой при травмах глаза является роговица. Важное значение приобретает оценка процессов ее регенерации, в том числе на молекулярно-генетическом уровне. Знания о молекулярной биологии регенераторных генов далеки от полноты, и многие аспекты остаются недостаточно изученными. В регенерации тканей роговицы, в том числе после травмы, принимают участие гены *MKI67*, *TAB3*, *PAX6*. В данном обзоре делается акцент на этих трех генах. Белок Ki-67 — универсальный маркер пролиферации, необходим для поддержания клеточного цикла. Pax-6 — ранний маркер дифференцировки эпителиальных клеток роговицы. Экспрессия данного гена подавляется во многих тканях взрослого человека, но она сохраняется в роговице глаза, участвуя в нормальном ее функционировании. Ген *TAB3* как коррелят активации TGF- β способствует увеличению интенсивности пролиферации и миграции эпителиоцитов, содействует быстрому заживлению раневой поверхности. В настоящее время актуализируется изучение закономерностей цито- и гистогенезов, дифференцировки клеток и тканей органа зрения, их физиологической и репаративной регенерации и регуляции этих процессов на молекулярно-генетическом уровне в аспекте регенеративной медицины.

Ключевые слова: регенерация, роговица, экспрессия генов

MOLECULAR GENETIC ASPECTS OF CORNEAL TISSUE REPAIR

© Aleksandr A. Stadnikov¹, Dmitriy V. Oleynik²

¹ Orenburg State Medical University. 6 Sovetskaya str., Orenburg 460000 Russian Federation

² Orenburg branch of the S. Fyodorov Eye Microsurgery Federal State Institution. 17 Salmyshskaya str., Orenburg 460047 Russian Federation

Contact information: Dmitriy V. Oleynik — ophthalmologist. E-mail: wedil@mail.ru ORCID: <https://orcid.org/0009-0006-3421-6602> SPIN: 4158-7760

For citation: Stadnikov AA, Oleynik DV. Molecular genetic aspects of corneal tissue repair. Russian Biomedical Research. 2024;9(2):80-85. DOI: <https://doi.org/10.56871/RBR.2024.84.99.009>

Received: 15.02.2024

Revised: 11.04.2024

Accepted: 20.05.2024

Abstract. The article is devoted to a scientific literature review on the issues of reparative histogenesis and cell differentiation in the cornea at the genetic level. The most vulnerable membrane in case of eye injuries is the cornea. In this regard, the assessment of its regeneration processes, including at the molecular genetic level, becomes important. Knowledge of the molecular biology of regenerative genes is far from complete, and many aspects remain insufficiently studied. The genes *MKI67*, *TAB3*, *PAX6* are involved in the regeneration of corneal tissue, including after injury. This review focuses on these three genes. Ki-67 protein is a universal marker of proliferation and is necessary for maintaining the cell cycle. Pax-6 is an early marker of corneal epithelial cell differentiation. Expression of this gene is suppressed in many tissues of an adult, but it persists in eye cornea, participating in the normal functioning of the



cornea. *TAB3* gene, as a correlate of TGF- β activation, helps to increase the intensity of proliferation and migration of epithelial cells and promotes rapid healing of the wound surface. Currently, the study of the patterns of cyto- and histogenesis, differentiation of cells and tissues of the organ of vision, their physiological and reparative regeneration and the regulation of these processes at the molecular genetic level in the aspect of regenerative medicine is being updated.

Keywords: regeneration, cornea, gene expression

Определяющим моментом в развитии и функциональной специализации тканей являются их генетическая детерминация и последующая дифференцировка. При нормальном ходе развития в компетентном материале под воздействием того или иного индуктора происходит первоначально неустойчивая (лабильная) детерминация, а позднее — необратимая (стабильная) детерминация [5]. Только после этого возникает зачаток конкретной ткани. В основе тканевой детерминации роговицы лежит экспрессия тех или иных тканеспецифических генов, предопределяющих синтез нуклеиновых кислот и белков [4].

В ходе репаративного гистогенеза нередко приходится наблюдать координированную экспрессию генов, когда в клетках происходит синтез нескольких специфических для них белковых субстратов или когда какой-либо гуморальный фактор индуцирует экспрессию нескольких генетических локусов в клетках различного тканевого типа.

Изучая регенерацию роговицы, следует остановиться на некоторых генах, действие которых описано и играет ключевую роль в развитии и дифференцировке тканей переднего отрезка глаза.

Ki-67 первоначально был идентифицирован как антиген, распознаваемый моноклональным антителом, созданным путем иммунизации мышей ядрами, выделенными из клеточной линии лимфомы Ходжкина L428 [16]. Клонирование и секвенирование комплементарной дезоксирибонуклеиновой кислоты (кДНК) Ki-67 [15, 37] показали, что аминокислотная последовательность имеет мало сходства с другими известными белками, поэтому белок был назван в честь антитела, которое его идентифицировало. Ki происходит из Киля (Германия), где были разработаны антитела, причем 67 — это номер лунки на 96-луночном планшете. Весь локус гена *Ki-67* был секвенирован в 1996 году и было обнаружено, что он содержит приблизительно 30 000 оснований [41].

Ген *MKI67*, кодирующий белок Ki-67, является универсальным маркером пролиферации и выявляется в клетках во всех фазах митотического цикла, кроме G0 [1]. Белок Ki-67 необходим и для поддержания клеточного цикла.

Недостатком метода определения гена *MKI67* является то, что митоз — самая быстрая фаза клеточного цикла, что может привести к занижению реальных значений оценки его количества [12]. Период полураспада белка составляет около 90 минут [19], поэтому ингибирование синтеза белка в течение 60 минут приводит к значительному снижению уровня белка Ki-67 [6].

Средний уровень матричной рибонуклеиновой кислоты (мРНК) и белка Ki-67 в пролиферирующих клетках, по-видимому, не зависит от типа клетки. Аналогичные уровни рибонуклеиновой кислоты (РНК) и белка наблюдаются в нескольких линиях клеток человека [30].

Экспрессия белка Ki-67 является полезным маркером ранних предраковых поражений [7]. Подтверждением изменения экспрессии Ki-67 в глазу являются экспериментальные работы.

Так, при воздействии фемтосекундным лазером (системой, способной генерировать сверхкороткие импульсы лазерного излучения длительностью от 5 фемтосекунд и выше) на роговицу, экспрессия белка Ki-67 увеличивается на первые сутки и достигает максимума в клетках эпителия на третьи сутки [29].

В ранние сроки повреждения роговицы клетки с высокой экспрессией Ki-67 локализованы преимущественно в области ростковой зоны лимба [3].

При изучении птеригиума было выявлено, что экспрессия Ki-67 увеличивалась и зависела от длительности заболевания, но не зависела от степени распространения на роговицу и тяжести заболевания [22]. Обнаружено, что количество иммунопозитивных клеток к Ki-67 в эпителиальном слое птеригиума значительно выше, чем в нормальной конъюнктиве, граничащей с роговицей [26]. В нормальной конъюнктиве экспрессия Ki-67 составляет <5% [27].

В 1991 году у человека на коротком плече хромосомы 11 в регионе 11p13 был идентифицирован ген *PAX6* [40]. *Pax-6* — ранний маркер дифференцировки эпителиальных клеток роговицы [24]. Ген *PAX6* является критическим регуляторным геном, кодирует специфический ДНК-связывающий фактор транскрипции, способный инициировать развитие глаза в эмбриогенезе [20, 42].

Экспрессия *PAX6* подавляется во многих тканях взрослого человека, но она сохраняется в роговице глаза взрослого [23], что свидетельствует о необходимости участия *PAX6* не только в процессах онтогенеза, но и в нормальном функционировании роговицы глаза [14], где роговая оболочка глаза участвует в поддержании и заживлении ран [10, 25].

PAX6 поддерживает процесс регенерации, обеспечивая цитодифференцировку эпителиальных клеток роговицы человека [22]. Вместе с тем ген *PAX6* играет ключевую роль в поддержании мультипотентного состояния нескольких видов клеток (радужки, пигментного эпителия сетчатки и нейрональной

сетчатки). Такое совмещение функций регуляции объясняется наличием в его структуре разных функциональных доменов [2].

Во взрослом организме белок PAX6 отвечает за поддержание пула стволовых клеток в эпителии хрусталика, лимбе роговицы, пигментном эпителии ресничного тела и радужки [28].

Транскриптомный анализ (RNA-seq) эпителия роговицы из эмбрионов мыши подтвердил, что PAX6 был относительно высоко экспрессирован в эпителии роговицы, что указывает на ключевую роль PAX6 в развитии этого клеточного слоя [36].

Идентифицирован PAX6 как ключевой молекулярный фактор, способный перепрограммировать эпителиальные клетки кожи кролика, чтобы дать начало эпителиальным клеткам и восстановить роговицу [34]. В исследованиях на кроликах PAX6 идентифицирован как клеточный молекулярный фактор, способный перепрограммировать эпителиальные клетки кожи кролика, трансдифференцировать их в роговичноподобный эпителий и восстановить дефекты поверхности роговицы.

Было показано, что изменение уровня экспрессии PAX6 как в меньшую, так и в большую сторону влияет на дифференцировку клеток, реакцию заживления эрозии и прозрачность роговицы [11].

Трансформирующий фактор роста бета (TGF- β) является широко исследуемым цитокином, который синтезируется практически во всех клетках и тканях организма.

Экспрессию гена *TAB3* рассматривали как коррелят активности TGF- β (трансформирующий ростовой фактор бета), который в условиях травмы роговицы способствует увеличению интенсивности пролиферации и миграции эпителиоцитов, что способствует быстрому заживлению раневой поверхности [32].

Цитокины TGF- β были впервые обнаружены в начале 1980-х годов, и три изоформы TGF- β были идентифицированы у млекопитающих (TGF- β 1, TGF- β 2 и TGF- β 3) [17].

TGF- β 1, 2 и 3 были обнаружены в водной среде и стекловидном теле человеческого глаза [4, 8]. Кроме того, эти лиганды также экспрессируются в роговице, цилиарном эпителии, хрусталике, сетчатке и кровеносных сосудах [9].

В зависимости от клеточного контекста члены семейства TGF- β могут либо ингибировать, либо стимулировать пролиферацию, контролировать оборот внеклеточного матрикса, а также участвовать в эпителиально-мезенхимальных взаимодействиях во время эмбриогенеза. Их активность также связана с восстановлением тканей и модуляцией иммунного ответа [18].

Интегрированный процесс клеточной пролиферации, миграции, дифференцировки, десквамации и апоптоза поддерживает гомеостаз взрослого эпителия роговицы, но изменение этих процессов приводит к стойкой аномалии роговицы и может привести к слепоте. TGF- β обычно ограничен здоровым интактным эпителием роговицы [39]. В поврежденной роговице слабо экспрессируется TGF- β 1, в то время как TGF- β 2 выражен. M.I. Nish и соавт. [21] сообщили о различиях в уровне TGF- β 3 после повреждения роговицы у кур. TGF- β RI и II также экспрессируются в поврежденной строме, участвуя, таким образом, в процессе заживления ран в ткани роговицы [43]. После повреждения роговицы сверхэкспрессия белка

TGF- β приводит к увеличению профибротических факторов и провоспалительных цитокинов.

Взятые вместе эти наблюдения подтверждают стимулирующую роль членов семейства TGF- β в процессе заживления ран роговицы, показывая, что они могут представлять собой терапевтические мишени для лечения повреждения роговицы.

Белки семейства TGF- β , передающие сигналы через путь SMAD, (белки SMAD — преобразователи сигналов и транскрипционные модуляторы, которые опосредуют несколько сигнальных путей), вероятно, необходимы для поддержания гомеостаза эпителия роговицы [35]. Таким образом, блокирование активности TGF- β на уровне передачи сигналов SMAD было предложено в качестве варианта лечения для ускорения заживления ран роговицы. Действительно, блокирование активности белка TGF- β путем переноса *in vivo* гена растворимого рецептора TGF- β типа RII ускоряет восстановление тканей поврежденной роговицы у крыс. Блокирование активности TGF- β путем аденовирусного переноса гена растворимого рецептора TGF- β типа RII приводит к ингибированию помутнения роговицы, отека и ангиогенеза [31]. Использование ингибитора рецептора TGF- β (SB431542) также поддерживает нормальные эндотелиальные фенотипы культивируемых эндотелиальных клеток роговицы [33].

Моноклональные антитела являются потенциальными средствами лечения рубцевания роговицы: было показано, что антагонисты TGF- β , такие как антитела к TGF- β 1 и - β 2, ингибируют образование кожных рубцов в ранах грызунов [38]. Использование траниласта, ингибитора TGF- β , уменьшало рецидивы фиброза роговицы или первичного птеригиума, дегенеративного заболевания поверхности глаза с фиброваскулярным ростом бульбарной конъюнктивы на роговицу [13].

Таким образом, к настоящему времени наблюдается тенденция к оптимизации процессов определения приоритетно фундаментальных исследований, в том числе в офтальмологии. Это касается изучения закономерностей цито- и гистогенеза, дифференцировки клеток и тканей органа зрения, их физиологической и репаративной регенерации и регуляции этих процессов на молекулярно-генетическом уровне. В этой связи приведенный, очевидно неполный, перечень генетических маркеров элементарных гистогенетических процессов структурных элементов роговицы будет объективной методологической основой доказательной офтальмологии.

ДОПОЛНИТЕЛЬНАЯ ИНФОРМАЦИЯ

Вклад авторов. Все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.



ADDITIONAL INFORMATION

Author contribution. Thereby, all authors made a substantial contribution to the conception of the study, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the article, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the study.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

ЛИТЕРАТУРА

- Бабиченко И.И., Ковязин В.А. Новые методы иммуногистохимической диагностики опухолевого роста. М.: РУДН; 2008.
- Васильева Т.А., Воскресенская А.А., Поздеева Н.А., Марахов А.В., Зинченко Р.А. Характеристика гена PAX6 и роль его мутаций в развитии наследственной патологии органа зрения. Генетика. М.: Наука. 2018;54(9):979–987.
- Гололобов В.Г., Гайворонский И.В., Деев Р.В. с соавт. Репаративная регенерация многослойного эпителия роговицы: биотехнологический потенциал. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2008;3(4):55–59.
- Канюков В.Н., Стадников А.А. Экспериментально-гистологические основы новых технологий в офтальмохирургии. Оренбург: Южный Урал; 2009.
- Кнорре А.Г. Эмбриональный гистогенез: морфологические очерки. Медицина, Ленинградское отделение; 1971.
- Bruno S., Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992;25:31–40. DOI:10.1111/j.1365-2184.1992.tb01435.x.
- Chui J., Coroneo M.T., Tat L.T., Crouch R., Wakefield D., Di Girolamo N. Ophthalmic pterygium: A stem cell disorder with premalignant features. *Am J Pathol.* 2011;178:817–27.
- Connor T.B., Jr., Roberts A.B., Sporn M.B., Danielpour D., Dart L.L., Michels R.G., de Bustros S., Enger C., Kato H., Lansing M. et al. Correlation of fibrosis and transforming growth factor- β type 2 levels in the eye. *J. Clin. Investig.* 1989;83:1661–1666.
- Darland D.C., Link B.A., Nishi R. Activin A and follistatin expression in developing targets of ciliary ganglion neurons suggests a role in regulating neurotransmitter phenotype. *Neuron.* 1995;15:857–866. DOI:10.1016/0896-6273(95)90176-0.
- Davis J., Duncan M.K., Robison W.G. Jr, Piatigorsky J. Requirement for Pax6 in corneal morphogenesis: a role in adhesion. *J Cell Sci.* 2003;116:2157–2167.
- Davis J., Piatigorsky J. Overexpression of Pax6 in mouse cornea directly alters corneal epithelial cells: changes in immune function, vascularization, and differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(7):4158–68. DOI: 10.1167/iov.10-6726.
- Duchrow M., Schluter C., Wohlenberg C., Flad H.D., Gerdes J. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif.* 1996;29:1–12. DOI:10.1111/j.1365-2184.1996.tb00090.x.
- Fukuda K., Chikama T., Takahashi M., Nishida T. Long-term follow-up after lamellar keratoplasty in a patient with bilateral idiopathic corneal keloid. *Cornea.* 2011;30:1491–1494. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31822018f2.
- García-Villegas R., Escamilla J., Sánchez-Guzmán E., et al. Pax-6 is expressed early in the differentiation of a corneal epithelial model system. *J. Cell. Physiol.* 2009;220:348–356.
- Gerdes J. et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am. J. Pathol.* 1991;138:867–873.
- Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* 1983;31:13–20. DOI:10.1002/ijc.2910310104.
- Govinden R., Bhoola K.D. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- β *Pharmacol. Ther.* 2003;98:257–265. DOI: 10.1016/S0163-7258(03)00035-4.
- Hachana S., Larrivé B. TGF- β Superfamily Signaling in the Eye: Implications for Ocular Pathologies. *Cells.* 2022;11(15):2336. DOI: 10.3390/cells11152336.
- Heidebrecht H.J., Buck F., Haas K., Wacker H.H., Parwaresch R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif.* 1996;29:413–425. DOI:10.1111/j.1365-2184.1996.tb00984.x
- Hill R.E., Favor J., Hogan B.L.M., Ton C.C.T., Saunders G.F, Hanson I.M., Prosser J., Jordan T., Hastie N.D., van Heyningen V. Mouse Small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature.* 1991;354:522–525.
- Huh M.I., Chang Y., Jung J.C. Temporal and spatial distribution of TGF- β isoforms and signaling intermediates in corneal regenerative wound repair. *Histol. Histopathol.* 2009;24:1405–1416. DOI: 10.14670/HH-24.1405.
- Kitazawa K., Hikichi T., Nakamura T., Sotozono C., Kinoshita S., Masui S. PAX6 regulates human corneal epithelium cell identity. *Exp Eye Res.* 2017;154:30–38. DOI: 10.1016/j.exer.2016.11.005.
- Koroma B.M., Yang J., Sundin O.H. The Pax-6 homeobox gene is expressed throughout the corneal and conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:108–120.
- Latta L., Stachon T., Seitz B., Szentmáry N. Response to: HCE-T cells express cornea-specific differentiation marker, PAX6 protein. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2022;260(12):4019–4020. DOI: 10.1007/s00417-022-05762-y.
- Leiper L.J., Walczysko P., Kucerova R., Ou J., Shanley L.J., Lawson D., Forrester J.V., McCraig C.D., Zhao M., Collinson J.M. The roles of calcium signaling and ERK1/2 phosphorylation in a Pax6+/- mouse model of epithelial wound-healing delay. *BMC Biol.* 2006;4:27.
- Liang K., Zhengxuan J., Ding B.Q., Cheng P., Huang D.K., Tao L.M. Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in pterygia and normal conjunctiva. *Molecular Vision.* 2011;17:1687–93.
- Mahesh M., Mittal S.K., Kishore S., Singh A., Gupta N., Rana R. Expression of p53 and Ki-67 proteins in patients with increa-

- sing severity and duration of pterygium. *Indian J Ophthalmol.* 2021;69(4):847–850. DOI: 10.4103/ijo.IJO_1034_20.
28. Manuel M.N., Mi D., Mason J.O., Price D.J. Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:70. DOI:10.3389/fncel.2015.00070.
 29. Medeiros C.S., Saikia P., de Oliveira R.C., Lassance L., Santhiago M.R., Wilson S.E. Descemet's Membrane Modulation of Posterior Corneal Fibrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60(4):1010–1020. DOI: 10.1167/iov.18-26451.
 30. Miller I., Min M., Yang C., Tian C., Gookin S., Carter D., Spencer S.L. Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence. *Cell Rep.* 2018;24:1105–1112. DOI:10.1016/j.celrep.2018.06.110.
 31. Mohan R.R., Sharma A., Netto M.V., Sinha S., Wilson S.E. Gene therapy in the cornea. *Prog. Retin. Eye Res.* 2005;24:537–559. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2005.04.001.
 32. Nam S.M., Maeng Y.S., Kim E.K., Seo K.Y., Lew H. Ex Vivo Expansion of Human Limbal Epithelial Cells Using Human Placenta-Derived and Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2017;2017:4206187. DOI: 10.1155/2017/4206187.
 33. Okumura N., Kay E.P., Nakahara M., Hamuro J., Kinoshita S., Koizumi N. Inhibition of TGF- β signaling enables human corneal endothelial cell expansion in vitro for use in regenerative medicine. *PLoS ONE.* 2013;8:e58000. DOI: 10.1371/journal.pone.0058000.
 34. Ouyang H., Xue Y., Lin Y. et al. WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis. *Nature.* 2014;511(7509):358–361.
 35. Saika S. TGF- β signal transduction in corneal wound healing as a therapeutic target. *Cornea.* 2004;23:S25–S30. DOI: 10.1097/01.icc.0000136668.41000.73.
 36. Sasamoto Y., Hayashi R., Park S.J., Saito-Adachi M., Suzuki Y., Kawasaki S., Quantock A.J., Nakai K., Tsujikawa M., Nishida K. PAX6 Isoforms, along with Reprogramming Factors, Differentially Regulate the Induction of Cornea-specific Genes. *Sci Rep.* 2016;6:20807. DOI: 10.1038/srep20807.
 37. Schluter C., Duchrow M., Wohlenberg C., Becker M.H., Key G., Flad H.D., Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J. Cell Biol.* 1993;123:513–522. DOI:10.1083/jcb.123.3.513.
 38. Shah M., Foreman D.M., Ferguson M.W. Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor β . *Lancet.* 1992;339:213–214. DOI: 10.1016/0140-6736(92)90009-R.
 39. Tandon A., Tovey J.C., Sharma A., Gupta R., Mohan R.R. Role of transforming growth factor B in corneal function, biology and pathology. *Curr. Mol. Med.* 2010;10:565–578. DOI: 10.2174/1566524011009060565.
 40. Ton C.C., Hirvonen H., Miwa H. et al. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeo-box-containing gene from the aniridia region. *Cell.* 1991;67(6):1059–1074.
 41. van Diest P.J., Brugal G., Baak J.P. Proliferation markers in tumours: Interpretation and clinical value. *J Clin Pathol.* 1998;51:716–24.
 42. Zhang W., Cveklova K., Oppermann B., Kantorow M., Cvekl A. Quantitation of PAX6 and PAX6(5a) transcript levels in adult human lens, cornea, and monkey retina. *Mol Vis.* 2001;7:1–5.
 43. Zieske J.D., Hutcheon A.E., Guo X., Chung E.H., Joyce N.C. TGF- β receptor types I and II are differentially expressed during corneal epithelial wound repair. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001;42:1465–1471.

REFERENCES

1. Babichenko I.I., Kovyazin V.A. Novye metody immunogistohimicheskoj diagnostiki opuholevogo rosta. [New methods of immunohistochemical diagnostic of tumor grows]. Moskva: RUDN Publ.; 2008. (in Russian).
2. Vasil'eva T.A., Voskresenskaya A.A., Pozdeeva N.A., Marahonov A.V., Zinchenko R.A. Harakteristika gena RAH6 i rol' ego mutacij v razvitii nasledstvennoj patologii organa zreniya. [PAX6 gene characteristic and causative role of PAX6 mutations in inherited eye pathologies]. *Genetika.* Moskva: Nauka Publ. 2018;54(9):979–987. (in Russian).
3. Gololobov V.G., Gajvoronskij I.V., Deev R.V. et al. Reparativnaya regeneraciya mnogoslojnogo epiteliya rogovicy: biotekhnologicheskij potencial. [Regenerative regeneration of multilayered corneal epithelium: biotechnological potential]. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya.* 2008;3(4):55–59. (in Russian).
4. Kanyukov V.N., Stadnikov A.A. Eksperimental'no-gistologicheskije osnovy novyh tekhnologij v oftal'mohirurgii. [Experimental and histological foundations of new technologies in ophthalmic surgery]. Orenburg: Yuzhnyj Ural Publ.; 2009. (in Russian).
5. Knorre A.G. Embrional'nyj gistogenez: morfologicheskie ocherki. [Embryonic histogenesis: morphological sketches]. *Medicina, Leningradskoe otdelenie Publ.*; 1971. (in Russian).
6. Bruno S., Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992;25:31–40. DOI:10.1111/j.1365-2184.1992.tb01435.x.
7. Chui J., Coroneo M.T., Tat L.T., Crouch R., Wakefield D., Di Girolamo N. Ophthalmic pterygium: A stem cell disorder with premalignant features. *Am J Pathol.* 2011;178:817–27.
8. Connor T.B., Jr., Roberts A.B., Sporn M.B., Danielpour D., Dart L.L., Michels R.G., de Bustros S., Enger C., Kato H., Lansing M. et al. Correlation of fibrosis and transforming growth factor- β type 2 levels in the eye. *J. Clin. Investig.* 1989;83:1661–1666.
9. Darland D.C., Link B.A., Nishi R. Activin A and follistatin expression in developing targets of ciliary ganglion neurons suggests a role in regulating neurotransmitter phenotype. *Neuron.* 1995;15:857–866. DOI:10.1016/0896-6273(95)90176-0.
10. Davis J., Duncan M.K., Robison W.G. Jr, Piatigorsky J. Requirement for Pax6 in corneal morphogenesis: a role in adhesion. *J Cell Sci.* 2003;116:2157–2167.
11. Davis J., Piatigorsky J. Overexpression of Pax6 in mouse cornea directly alters corneal epithelial cells: changes in immune function, vascularization, and differentiation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011;52(7):4158–68. DOI: 10.1167/iov.10-6726.
12. Duchrow M., Schluter C., Wohlenberg C., Flad H.D., Gerdes J. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif.* 1996;29:1–12. DOI:10.1111/j.1365-2184.1996.tb00090.x.



13. Fukuda K., Chikama T., Takahashi M., Nishida T. Long-term follow-up after lamellar keratoplasty in a patient with bilateral idiopathic corneal keloid. *Cornea*. 2011;30:1491–1494. DOI: 10.1097/ICO.0b013e31822018f2.
14. García-Villegas R., Escamilla J., Sánchez-Guzmán E., et al. Pax-6 is expressed early in the differentiation of a corneal epithelial model system. *J. Cell. Physiol.* 2009;220:348–356.
15. Gerdes J. et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am. J. Pathol.* 1991;138:867–873.
16. Gerdes J., Schwab U., Lemke H., Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. J. Cancer* 1983;31:13–20. DOI:10.1002/ijc.2910310104.
17. Govinden R., Bhoola K.D. Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor- β Pharmacol. Ther. 2003;98:257–265. DOI: 10.1016/S0163-7258(03)00035-4.
18. Hachana S., Larrivée B. TGF- β Superfamily Signaling in the Eye: Implications for Ocular Pathologies. *Cells*. 2022;11(15):2336. DOI: 10.3390/cells11152336.
19. Heidebrecht H.J., Buck F., Haas K., Wacker H.H., Parwaresch R. Monoclonal antibodies Ki-S3 and Ki-S5 yield new data on the 'Ki-67' proteins. *Cell Prolif.* 1996;29:413–425. DOI:10.1111/j.1365-2184.1996.tb00984.x
20. Hill R.E., Favor J., Hogan B.L.M., Ton C.C.T., Saunders G.F., Hanson I.M., Prosser J., Jordan T., Hastie N.D., van Heyningen V. Mouse Small eye results from mutations in a paired-like homeobox-containing gene. *Nature*. 1991;354:522–525.
21. Huh M.I., Chang Y., Jung J.C. Temporal and spatial distribution of TGF- β isoforms and signaling intermediates in corneal regenerative wound repair. *Histol. Histopathol.* 2009;24:1405–1416. DOI: 10.14670/HH-24.1405.
22. Kitazawa K., Hikichi T., Nakamura T., Sotozono C., Kinoshita S., Masui S. PAX6 regulates human corneal epithelium cell identity. *Exp Eye Res.* 2017;154:30–38. DOI: 10.1016/j.exer.2016.11.005.
23. Koroma B.M., Yang J., Sundin O.H. The Pax-6 homeobox gene is expressed throughout the corneal and conjunctival epithelia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1997;38:108–120.
24. Latta L., Stachon T., Seitz B., Szentmáry N. Response to: HCE-T cells express cornea-specific differentiation marker, PAX6 protein. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol.* 2022;260(12):4019–4020. DOI: 10.1007/s00417-022-05762-y.
25. Leiper L.J., Walczysko P., Kucerova R., Ou J., Shanley L.J., Lawson D., Forrester J.V., McCraig C.D., Zhao M., Collinson J.M. The roles of calcium signaling and ERK1/2 phosphorylation in a Pax6 \pm mouse model of epithelial wound-healing delay. *BMC Biol.* 2006;4:27.
26. Liang K., Zhengxuan J., Ding B.Q., Cheng P., Huang D.K., Tao L.M. Expression of cell proliferation and apoptosis biomarkers in pterygia and normal conjunctiva. *Molecular Vision.* 2011;17:1687–93.
27. Mahesh M., Mittal S.K., Kishore S., Singh A., Gupta N., Rana R. Expression of p53 and Ki-67 proteins in patients with increasing severity and duration of pterygium. *Indian J Ophthalmol.* 2021;69(4):847–850. DOI: 10.4103/ijo.IJO_1034_20.
28. Manuel M.N., Mi D., Mason J.O., Price D.J. Regulation of cerebral cortical neurogenesis by the Pax6 transcription factor. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:70. DOI:10.3389/fncel.2015.00070.
29. Medeiros C.S., Saikia P., de Oliveira R.C., Lassance L., Santhiago M.R., Wilson S.E. Descemet's Membrane Modulation of Posterior Corneal Fibrosis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2019;60(4):1010–1020. DOI: 10.1167/iops.18-26451.
30. Miller I., Min M., Yang C., Tian C., Gookin S., Carter D., Spencer S.L. Ki67 is a graded rather than a binary marker of proliferation versus quiescence. *Cell Rep.* 2018;24:1105–1112. DOI:10.1016/j.celrep.2018.06.110.
31. Mohan R.R., Sharma A., Netto M.V., Sinha S., Wilson S.E. Gene therapy in the cornea. *Prog. Retin. Eye Res.* 2005;24:537–559. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2005.04.001.
32. Nam S.M., Maeng Y.S., Kim E.K., Seo K.Y., Lew H. Ex Vivo Expansion of Human Limbal Epithelial Cells Using Human Placenta-Derived and Umbilical Cord-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells Int.* 2017;2017:4206187. DOI: 10.1155/2017/4206187.
33. Okumura N., Kay E.P., Nakahara M., Hamuro J., Kinoshita S., Koizumi N. Inhibition of TGF- β signaling enables human corneal endothelial cell expansion in vitro for use in regenerative medicine. *PLoS ONE.* 2013;8:e58000. DOI: 10.1371/journal.pone.0058000.
34. Ouyang H., Xue Y., Lin Y. et al. WNT7A and PAX6 define corneal epithelium homeostasis and pathogenesis. *Nature.* 2014;511(7509):358–361.
35. Saika S. TGF- β signal transduction in corneal wound healing as a therapeutic target. *Cornea.* 2004;23:S25–S30. DOI: 10.1097/01.ico.0000136668.41000.73.
36. Sasamoto Y., Hayashi R., Park S.J., Saito-Adachi M., Suzuki Y., Kawasaki S., Quantock A.J., Nakai K., Tsujikawa M., Nishida K. PAX6 Isoforms, along with Reprogramming Factors, Differentially Regulate the Induction of Cornea-specific Genes. *Sci Rep.* 2016;6:20807. DOI: 10.1038/srep20807.
37. Schluter C., Duchrow M., Wohlenberg C., Becker M.H., Key G., Flad H.D., Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J. Cell Biol.* 1993;123:513–522. DOI:10.1083/jcb.123.3.513.
38. Shah M., Foreman D.M., Ferguson M.W. Control of scarring in adult wounds by neutralising antibody to transforming growth factor β *Lancet.* 1992;339:213–214. DOI: 10.1016/0140-6736(92)90009-R.
39. Tandon A., Tovey J.C., Sharma A., Gupta R., Mohan R.R. Role of transforming growth factor B in corneal function, biology and pathology. *Curr. Mol. Med.* 2010;10:565–578. DOI: 10.2174/1566524011009060565.
40. Ton C.C., Hirvonen H., Miwa H. et al. Positional cloning and characterization of a paired box- and homeo-box-containing gene from the aniridia region. *Cell.* 1991;67(6):1059–1074.
41. van Diest P.J., Brugal G., Baak J.P. Proliferation markers in tumours: Interpretation and clinical value. *J Clin Pathol.* 1998;51:716–24.
42. Zhang W., Cveklova K., Oppermann B., Kantorow M., Cvekl A. Quantitation of PAX6 and PAX6(5a) transcript levels in adult human lens, cornea, and monkey retina. *Mol Vis.* 2001;7:1–5.
43. Zieske J.D., Hutcheon A.E., Guo X., Chung E.H., Joyce N.C. TGF- β receptor types I and II are differentially expressed during corneal epithelial wound repair. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001;42:1465–1471.