

М. Р. Бідзіля, І. М. Кліщ
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО МОЗ УКРАЇНИ

ОСОБЛИВОСТІ ІМУННОЇ РЕАКЦІЇ ОКА КРОЛІВ З МЕХАНІЧНОЮ ТРАВМОЮ РОГІВКИ І ЗА ЇЇ КОРЕКЦІЇ СТОVBУРОВИМИ КЛІТИНАМИ

Вступ. Дослідження в області офтальмології показали значну роль цитокінів як ключових біорегуляторів запальних і репаративних процесів у патогенезі захворювань очей.

Мета дослідження – вивчення змін показників клітинного імунітету і цитокінового профілю у крові та водянистій волозі передньої камери ока кролів, яким моделювали механічну непроникаючу травму рогівки і проводили корекцію із застосуванням Корнерегель і мезенхімальних стовбурових клітин (МСК).

Методи дослідження. Тваринам наносили епітеліальну насічку на верхню частину рогівки за допомогою трепана, після чого видаляли епітелій разом із переднім шаром стромы рогівки. Анестезія здійснювалася місцево за допомогою 0,5 % розчину алкаїну та 2 % розчину лідокаїну. Для корекції використовували препарат Корнерегель і мезенхімальні стовбурові клітини, отримані із пулового канатика. Рівень CD4+ і CD8+ цитометричним методом. Концентрації фактора некрозу пухлини- α , інтерлейкіну-1 β , інтерлейкіну-6 та інтерлейкіну-10 визначали за допомогою імуноферментного аналізу. Розраховували також імунорегуляторний індекс (CD4+/CD8+) та індекс запальної активності ((TNF- α)+(IL-1 β)+(IL-6)/(IL-10)).

Результати й обговорення. Після моделювання механічної травми спостерігалось нерівномірне підвищення рівня Т-хелперів і Т-супресорів, що призвело до достовірного зниження імунорегуляторного індекса, а також значне зростання прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-1 β , IL-6). Концентрація проти-запального цитокіна (IL-10) зростала менш інтенсивно на початкових етапах і знизилася до 28-ї доби, що призвело до достовірного зростання індекса запальної активності, Використання коригуючих чинників супроводжувалось менш виразним зростанням показників клітинного імунітету і нормалізацією їх співвідношення, а також значно меншим зростанням рівня прозапальних і протизапального цитокінів із нормалізацією до 28-ої доби індекса запальної активності.

Висновки. За умов механічної травми рогівки введення мезенхімальних стовбурових клітин ефективно модулює імунну відповідь в оці, знижує рівні прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-1 β , IL-6) та підвищує рівень протизапального цитокіна IL-10, тим самим нормалізуючи рівень запальної активності.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: травма рогівки; корекція; Корнерегель; стовбурові клітини; імунна система; цитокіни.

ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ВСТУП. Офтальмологічні травми, що виникають як у мирний, так і у воєнний періоди, є значною медичною і соціальною проблемою, позаяк часто стають причиною зниження гостроти зору, амаврозу або евісцерації очного яблука [1]. Актуальність цієї патології в сучасній офтальмології зумовлена її високою епідеміологічною поширеністю, тяжкістю клінічного перебігу та поліморфізмом маніфестацій. У структурі загального травматизму питома вага уражень органу зору є суттєвою і варіює в межах 3–8 %. Аналіз захворюваності органу зору за останні десятиліття свідчить про домінування травматичних уражень як причини первинної інвалідності (22,8 % серед усіх первинних інвалідів та 30 % серед осіб працездатного віку) [2–4]. В Україні наслідки травм ока також посідають одне з провідних місць у структурі первинної очної інвалідності,

становлячи 25,5 % [5]. Серед різноманітних уражень переднього відділу ока захворювання та травми рогівки є одним із ключових етіологічних складників незворотної втрати зору, варіюючи від 6,6 % до 39,3 % у світовій статистиці сліпоти [4–6].

У патогенезі запальної реакції травмованого ока імунна система відіграє ключову роль, причому розвиток та динаміка клітинно-опосередкованих імунних відповідей тісно корелює з характером перебігу захворювання. Імунна привілейованість органу зору та його резистентність до екзогенних та ендогенних шкідливих факторів визначається особливостями його локальної організації та системними механізмами антиген-специфічної відповіді [76]. Наявні дані свідчать про те, що постконтузійний стрес може індукувати розвиток імунодефіцитних станів, що супроводжуються змінами місцевого імунітету у разі травми органу зору [7; 8].

Дефекти епітелію рогівки та надмірне загоєння ран можуть призвести до серйозних ускладнень [9]. Оскільки стовбурові клітини можуть нескінченно самовідновлюватися, вони є перспективним рішенням для стимулювання регенерації та лікування важких ушкоджень епітелію рогівки [10].

Стратегії відновлення рогівки на основі клітин зазвичай використовуються для регенерації епітелію та ендотелію рогівки [11]. Кілька досліджень показали, що різні стовбурові клітини рогівки та інші стовбурові клітини можна використовувати для регенерації епітелію рогівки. Терапевтичні методи на основі клітин є найбільш часто використовуваним методом заміни пошкоджених епітеліальних клітин рогівки та регенерації поверхні ока [12; 13].

Мезенхімальні стовбурові клітини (МСК) є плюрипотентними. МСК володіють чудовою здатністю відновлювати пошкоджені тканини, брати участь у самовідновленні та диференціюватися в різні типи клітин. Виділяючи протизапальні цитокіни, МСК регулюють імунну систему, що робить їх перспективним джерелом клітин для терапії на основі стовбурових клітин у регенерації рогівки. Потенціал дорослих МСК диференціюватися в епітеліальні клітини рогівки привернув значну увагу дослідників для їх застосування в інженерії епітеліальної тканини рогівки. Мезенхімальні стовбурові клітини пуповини (UC-MSC) є багатифункціональними стовбуровими клітинами, які знаходяться в неонатальній тканині пуповини. Вони безперервно проліферують і диференціюються в один або кілька типів клітин за певних умов [84]. Мезенхімальні стовбурові клітини пуповини людини (HUC-MSC) можна отримати за допомогою неінвазивних методів, вони мають низьку імуногенність. Таким чином, вони зручні для клінічного застосування [14–16].

Мета дослідження – вивчити особливості клітинної ланки імунної системи у кролів з механічною травмою рогівки та ефективність застосування очного гелю Корнерегель і мезенхімальних стовбурових клітин, отриманих із пуповини, для корекції викликаних порушень.

МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ. Досліди проведені на статевозрілих кролях породи «Шиншила» масою тіла 2,5–3 кг відповідно до вимог Женевської конвенції “International Guiding principles for Biochemical research involving animals” (Geneva, 1990) та згідно із Загальними принципами експериментів на тваринах, схваленими на Національному конгресі

з біоетики (Київ, Україна, 2001) [17; 18]. На час проведення експерименту тварини утримувались на стандартному раціоні віварію.

Розподіл тварин у групи відбувався методом випадкової вибірки. Піддослідні тварини були розділені на 4 групи: група № 1 – тварини без змодельованої патології (інтактні); група № 2 – тварини, яким моделювали непроникаючу механічну травму рогівки; група № 3 – тварини, яким моделювали непроникаючу травму рогівки і проводили корекцію з використанням препарату «Корнерегель»; група № 4 – тварини, яким моделювали проникаючу механічну травму рогівки і проводили корекцію препаратом «Крнерегель» і мезенхімальними стовбуровими клітинами. Дослідження проводили через 3, 7, 14 та 28 діб після нанесення травми.

Стовбурові клітини отримували із пуповини. В асептичних умовах тканина пуповини була поділена на менші фрагменти і піддана ферментації за допомогою 0,1 % колагенази I (Sigma-Aldrich, USA), розведеної в середовищі DMEM/F12 Advanced (Gibco, USA). Далі суспензію клітин піпетували і центрифугували 5 хв при 1610 g. Отриману пелету резуспензували у клітинному середовищі з додаванням 10 % ембріональної телячої сироватки (FBS) і розсаджували на культуральні флакони. Ізольовані МСК вирощували в інкубаторі при 37 °C і концентрації CO₂ 5 %. Отриману первинну культуру назвали пасажем 0. Пасажування проводили за допомогою трипсинізації ферментом TrypLE (Gibco, USA) при досягненні 90–100 % конфлюенту.

Отримані МСК імунофенотипували за допомогою проточної цитометрії BD Accuri™ C6 Plus Personal проточним цитометром (Becton Dickinson, USA) та мишачими моноклональними антитілами проти CD73, CD90, CD105, CD34 і CD45 (Invitrogen, USA). МСК були характеризовані як CD73+, CD90+, CD105+, CD34-, CD45-. МСК культивували з використанням середовища Advanced DMEM/F12 medium (Gibco, USA) із додаванням 10 % FBS, 1 % розчину L-глутаміну–пеніциліну–стрептоміцину (Sigma, USA) і гепарину (240 мкг/л) (Sigma, USA)). Клітини вирощували при температурі 37 °C і концентрації CO₂ 5 %. Для експерименту використовувалися МСК на пасажі 10. Готували суспензію з розрахунку 4,35 млн МСК в 1 мл фізіологічного розчину натрію хлориду на 1 г Корнерегелю.

Механічну травму моделювали шляхом нанесення концентричної епітеліальної насічки трепаном діаметром 7 мм у верхній половині рогівки, в межах якої одноразовим

офтальмологічним скальпелем видаляли епітелій разом із переднім шаром строми рогівки (викроювали клапоть товщиною до 0,2 мм) (рис. 1 А) [19].

Контроль відтворення ерозії здійснювали методом фарбування рогівки 0,5 % розчином флюоресцеїну (рис. 1 Б). Експериментальна модель пошкодження рогівки відтворювалась на обох очах кроля під місцевою епібульбарною анестезією 0,5 % розчином алкаїну та ретробульбарною анестезією 2 % розчином лідокаїну 1,0 мл.

Кров для дослідження забирали з крайової вени вуха. Водянисту вологу (humor aqueus) передньої камери отримували в асептичних умовах шляхом проколу лімбальної частини рогівки стерильною туберкуліновою голкою, приєднаною до інсулінового шприца у кількості 0,25–0,3 мл з одного ока [20].

Стан клітинного імунітету визначали методикою, що базується на взаємодії моноклональних антитіл, мічених флюоресцентною міткою, з поверхневими антигенами лімфоцитів. Зразки аналізували за допомогою проточної цитометрії BD Accuri™ C6 Plus Personal проточним цитометром (Becton Dickinson, USA).

Стан системного та місцевого запального процесу оцінювали за параметрами TNF- α , IL-1 β , IL-6 та IL-10. Концентрацію цитокінів вивчали методом твердофазового імуоферментного аналізу з використанням наборів реагентів «ELISA Kit for Rabbits Usen, Life Science Inc» (США) згідно з інструкціями фірми-виробника на імуоферментному аналізаторі Multiskan FC357. Концентрацію TNF- α , IL-1 β , IL-6 та IL-10 виражали у пг/мл. Розраховували індекс запальної активності (ІЗА) за формулою:

$$\text{ІЗА} = (\text{TNF-}\alpha) + (\text{IL-1}\beta) + (\text{IL-6}) / (\text{IL-10}).$$

Статистичну обробку цифрових даних здійснювали за допомогою програмного забезпечення «Excel» (Microsoft, США) та «STATISTICA» 10.0. («Statsoft», США) з використанням непараметричних методів оцінки одержаних даних. Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), її дисперсії і помилки середньої (m). Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали методом варіаційної статистики з використанням критерія Стюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ. Аналізуючи показники клітинного імунітету у досліджуваних групах кролів, ми виявили суттєві відмінності як між групами тварин, так і в динаміці змодельованого патологічного процесу (табл. 1). Нанесення піддослідним тваринам механічної травми рогівки спричинило виникнення різних за спрямованістю змін показників клітинного імунітету. Зокрема, на 3-тю добу від моменту травмування рогівки показник CD4+ склав 172,9 % від рівня здорових, а CD8+ – 259,8 %, що призвело до зменшення показника імунорегуляторного індекса на 34,6 % відносно аналогічного показника тварин без змодельованої патології. Достовірні зміни мали місце і на 7-му добу після нанесення травми: показник CD4+ склав 159,3 % від норми, CD8+ – 211,7 %. Такі зміни виражалися у зростанні імунорегуляторного індекса відносно попереднього терміну спостереження, однак стосовно тварин без змодельованої патології він склав 75,3 %. До 14-ої доби показники CD4+ і CD8+ знижувались і становили відповідно 146,5 % і 173,8 % від норми. Це супроводжувалось подальшим зростанням імунорегуляторного індекса, однак він не досягав рівня тварин без змодельованої патології (84,3 %). До 28-ої доби

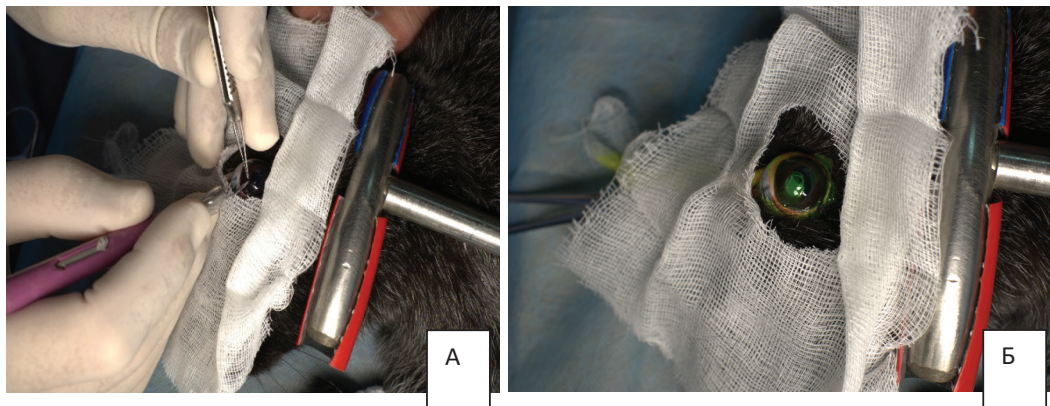


Рис. 1. Моделювання механічної травми рогівки (А) та контроль відтворення ерозії (Б)

Таблиця 1 – Показники клітинної ланки імунітету у крові тварин з механічною травмою рогівки та за її корекції, М±m

Група тварин / показник		CD4+, %	CD8+, %	CD4+/CD8+
Без змодельованої патології, (n = 8)		35,41 ± 0,38	21,32 ± 0,56	1,66 ± 0,06
Механічна травма рогівки, (n = 6)	3-я доба	61,24 ± 0,45*	55,38 ± 0,34*	1,16 ± 0,07*
	7-а доба	56,42 ± 0,71*	45,14 ± 0,42*	1,25 ± 0,06*
	14-а доба	51,87 ± 0,92*	37,05 ± 0,38*	1,40 ± 0,08*
	28-а доба	45,54 ± 0,69*	29,76 ± 0,42*	1,53 ± 0,05*
Механічна травма рогівки + Корнерегель, (n = 6)	3-я доба	56,23 ± 0,47 ^m	42,92 ± 0,24 ^{*#}	1,31 ± 0,05 ^{*#}
	7-а доба	51,35 ± 0,72 ^{*#}	36,16 ± 0,31 ^{*#}	1,42 ± 0,04 ^{*#}
	14-а доба	47,64 ± 0,71 ^{*#}	32,41 ± 0,22 ^{*#}	1,47 ± 0,05 ^{*#}
	28-а доба	41,52 ± 0,61 ^{*#}	26,78 ± 0,25 ^{*#}	1,55 ± 0,04 ^{*#}
Механічна травма рогівки + Корнерегель + МСК, (n = 6)	3-я доба	50,65 ± 0,38 ^{*#^}	33,54 ± 0,25 ^{*#^}	1,51 ± 0,06 ^{*#^}
	7-а доба	47,16 ± 0,41 ^{*#^}	30,23 ± 0,25 ^{*#^}	1,56 ± 0,06 ^{*#^}
	14-а доба	42,74 ± 0,68 ^{*#^}	26,38 ± 0,25 ^{*#^}	1,62 ± 0,06 ^{*#^}
	28-а доба	37,18 ± 0,54 ^{*#^}	22,13 ± 0,25 ^{*#^}	1,68 ± 0,06 ^{*#^}

Примітки: тут і у наступних таблицях

- * – різниця достовірна відносно тварин без змодельованої патології;
- # – різниця достовірна щодо тварин з механічною травмою рогівки і корекцією Корнерегелем відносно тварин з механічною травмою рогівки без корекції у відповідні терміни спостереження;
- ^ – різниця достовірна щодо тварин з механічною травмою рогівки і корекцією Корнерегелем і МСК відносно тварин з механічною травмою рогівки і корекції Корнерегелем у відповідні терміни спостереження.

ми зафіксували подальше зростання досліджуваних показників, а також співвідношення CD4+/CD8+, яке становило 92,2 % від норми. Отже, за умов нанесення механічної травми рогівки у крові досліджуваних тварин виявляється суттєве зростання основних показників клітинної ланки імунної системи, однак виникає порушення співвідношення основних субпопуляцій лімфоцитів (CD4+ і CD8+), що супроводжується достовірним зниженням імунорегуляторного індекса. Сьогодні рівень імунорегуляторного індекса оцінюють у зіставленні з фазою імунної відповіді. У період найвищої активності запального процесу імунорегуляторний індекс сягає високих значень за рахунок великого відсоткового вмісту Т-хелперів (CD4+ Т-клітин). У період реконвалесценції значення показника зменшується у зв'язку з наростанням рівня CD8+ Т-клітин (кілерів). Порушення цієї закономірності свідчить про неадекватність імунної реакції та про можливість хронізації процесу через неповну ерадикацію збудника.

Застосування Корнерегелю з метою корекції нанесеної механічної травми рогівки супроводжувалось менш виразним зростанням досліджуваних показників відносно тварин, яким корекцію не проводили. Зокрема, максимальна концентрація CD4+ склала 158,8 % від рівня тварин без змодельованої травми, а CD8+ – 202,2 %, що достовірно менше, ніж у тварин з травмою рогівки у цей же період. Імунорегуляторний індекс протягом усього експерименту був вищим, ніж у тварин з травмою рогівки, однак до кінця експерименту не досягнув рівня тварин без травми рогівки,

склавши 93,4 %. Отже, Корнерегель дещо зменшує ступінь запальної реакції при механічній травмі рогівки, однак не забезпечує ефективного впливу на ці процеси.

Більш ефективним виявилось застосування стовбурових клітин із Корнерегелем. Так, показник CD4+ на 3-тню добу спостереження зостав відносно тварин без патології на 43 %, однак був на 29,9 % меншим, ніж у тварин без патології, та на 11 % меншим, ніж у тварин з механічною травмою, яким проводили корекцію Корнерегелем. Концентрація CD8+ лімфоцитів також була вищою від норми на 57,3 %, проте порівняно з тваринами з механічною травмою рогівки вона була меншою на 28 %. Імунорегуляторний індекс при цьому склав 1,51, що становить 90,9 % від аналогічного показника тварин без змодельованої патології. У подальші терміни спостереження ми відмічали зниження Т-хелперів і Т-супресорів, а також відновлення співвідношення цих клітин. До 28-ої доби показник CD4+ склав 104,9, а CD8+ – 103, 8 % від тварин без патології, при цьому співвідношення CD4+/CD8+ також майже нормалізувалось і імунорегуляторний індекс становив 1,68. Отже, застосування стовбурових клітин було значно ефективнішим щодо відновлення нормального перебігу запальної реакції і нормалізації показників клітинної ланки імунітету.

Ми також дослідили стан клітинної ланки імунітету у водянистій волозі передньої камери ока. Ми зафіксували такі тенденції (табл. 2).

На 7-му добу після нанесення механічної травми рогівки показник CD4+ склав 278,7 % від рівня тварин, яким травму не завдавали.

При цьому показник CD8+ зріс у 4,2 раза, що спричинило зниження імунорегуляторного індексу у 1,5 раза відносно тварин без змодельованої патології. До 28-ої доби показники суттєво зменшились, причому рівень CD8+ знижувався більш виразно, ніж CD4+. Внаслідок цього імунорегуляторний індекс зріс відносно 7-ої доби на 37,9 %, проте залишався на 29,6 % меншим, ніж у тварин без патології.

Як зазначено в дослідженнях [7], око володіє так званим «іммунним привілеєм» – системою комплексних імунних реакцій, яка включає клітинні та гуморальні механізми, спрямовані на запобігання розвитку запальних і дистрофічних процесів в оболонках і внутрішньоочних середовищах. Це явище дістало назву «синдром імунного відхилення, асоційованого з передньою камерою ока» (ACAID, anterior chamber associated immune deviation). На відміну від загальної циркуляції, в тканинах ока відбувається цілеспрямована активація Т-кілерів за рахунок секреції трансформуючого фактора росту бета (TGF-β) фібробластоподібними клітинами, що, зокрема, локалізуються в рогівці. У разі механічного пошкодження рогівки індукція цього синдрому зумовлена «оголенням» антигенних детермінант рогівкової тканини, що призводить до надмірної продукції CD8+ Т-клітин та зниження регуляторного індексу.

Застосування Корнерегелю супроводжувалося частковими зниженням обох досліджуваних показників, однак навіть до 28-мої доби рівень CD-4 склав 214,4 а CD8+ – 220,4 % від показників тварин без змодельованої патології. Показник імунорегуляторного індекса також зростав, однак був на 9,8 % нижчим від норми.

Корекція з використанням Корнерегелю і стовбурових клітин була найбільш ефективною. Зокрема, до 28-ої доби концентрація CD4+ на 37,9 % перевищувала рівень тварин без патології і була на 55,7 % вищою від аналогічного показника тварин, яким проводили

корекцію Корнерегелем. Імунорегуляторний індекс при цьому склав 1,56 і достовірно не відрізнявся від аналогічного показника тварин без змодельованої патології.

Нами проведено також дослідження цитокінового профілю крові і внутрішньоочної рідини тварин з механічною травмою рогівки і за її корекції. Проведені дослідження показали, що порушення цілісності епітеліального шару рогівки супроводжується високою продукцією прозапальних цитокінів (табл. 3). Концентрація основних прозапальних цитокінів – TNF-α, IL-1β, IL-6 – на 3-тю добу після нанесення травми достовірно зростала відповідно у 3,2; 3,8, і 7 разів відносно тварин, яким травму не моделювали. Надалі рівні прозапальних цитокінів знижувались, однак навіть до 28-ої доби до норми не приходили і перевищували показник тварин без патології в 1,7; 1,9 і 3,8 раза відповідно. Застосування Корнерегелю дещо зменшувало активність продукування прозапальних цитокінів, однак в усі терміни спостереження їхня концентрація перевищувала аналогічні показники тварин, яким травму рогівки не моделювали. Зокрема, на 28-му добу спостереження рівень TNF-α перевищував показник тварин без травми рогівки на 36,8 %, IL-1β – на 92,1 %, IL-6 – у 3,9 раза.

Корекція із застосуванням стовбурових клітин та Корнерегелю більш ефективно зменшувала рівень продукування прозапальних цитокінів, ніж використання лише Корнерегелю. Так, концентрація TNF-α на 3-тю добу спостереження була на 31,6 %, IL-1β – на 38,9 %, IL-6 – на 85,9 % меншою, ніж у групі, в якій проводили корекцію Корнерегелем. Аналогічна тенденція спостерігалась і в наступні терміни спостереження: рівень прозапальних цитокінів був достовірно нижчим, ніж у тварин, яким корекції не проводили або ж застосовували лише Корнерегель. Визначення протизапального цитокіна IL-10 показує його

Таблиця 2 – Показники клітинної ланки імунітету у внутрішньоочній рідині передньої камери ока тварин з механічною травмою рогівки та за її корекції, M±m

Група тварин/показник		CD4+, %	CD8+, %	CD4+/CD8+
Без змодельованої патології, (n = 10)		35,26 ± 0,24	22,76 ± 0,28	1,59 ± 0,05
Механічна травма рогівки, (n = 6)	7-а доба	98,27 ± 0,49*	95,42 ± 0,34*	1,03 ± 0,04*
	28-а доба	82,66 ± 0,52*	58,21 ± 0,42*	1,42 ± 0,09*
Механічна травма рогівки + Корнерегель, (n = 6)	7-а доба	80,57 ± 0,38**	62,94 ± 0,24**	1,28 ± 0,011**
	28-а доба	75,72 ± 0,44**	51,52 ± 0,22**	1,47 ± 0,010**
Механічна травма рогівки + Корнерегель + МСК, (n = 6)	7-а доба	69,71 ± 0,56**^	48,41 ± 0,25**^	1,44 ± 0,009**^
	28-а доба	48,63 ± 0,42**^	31,17 ± 0,29**^	1,56 ± 0,008**^

Таблиця 3 – Концентрація цитокінів у сироватці крові кролів з механічною травмою рогівки і за її корекції ($M \pm m$)

Показник/група		Без патології (n=8)	3-тя доба (n=6)	7-ма доба (n=6)	14-та доба (n=6)	28-ма доба (n=6)
TNF- α , пг/мл	Механічна травма рогівки	1,14 $\pm$ 0,06	3,65 $\pm$ 0,22*	2,62 $\pm$ 0,19*	2,09 $\pm$ 0,15*	1,95 $\pm$ 0,13*
	Механічна травма рогівки + корнерегель		2,87 $\pm$ 0,16*#	2,35 $\pm$ 0,13*#	1,84 $\pm$ 0,14*#	1,56 $\pm$ 0,11*#
	Механічна травма рогівки + корнерегель_МСК		2,18 $\pm$ 0,14*#^	1,83 $\pm$ 0,11*#^	1,56 $\pm$ 0,13*#^	1,32 $\pm$ 0,08*#^
IL-1 β , пг/мл	Механічна травма рогівки	1,39 $\pm$ 0,07	5,33 $\pm$ 0,14*	4,52 $\pm$ 0,12	3,17 $\pm$ 0,10*	2,58 $\pm$ 0,11*
	Механічна травма рогівки + корнерегель		4,50 $\pm$ 0,08*#	3,89 $\pm$ 0,07*#	3,41 $\pm$ 0,08*#	2,67 $\pm$ 0,07*#
	Механічна травма рогівки + корнерегель_МСК		3,24 $\pm$ 0,10*#^	2,46 $\pm$ 0,06*#^	2,21 $\pm$ 0,06*#^	1,64 $\pm$ 0,05*#^
IL-6, пг/мл	Механічна травма рогівки	0,56 $\pm$ 0,03	3,95 $\pm$ 0,11*	3,26 $\pm$ 0,09*	2,76 $\pm$ 0,08*	2,12 $\pm$ 0,05*
	Механічна травма рогівки + корнерегель		3,31 $\pm$ 0,08*#	2,86 $\pm$ 0,08*#	2,34 $\pm$ 0,06*#	2,17 $\pm$ 0,06#
	Механічна травма рогівки + корнерегель_МСК		1,78 $\pm$ 0,07*#^	1,22 $\pm$ 0,06*#^	1,55 $\pm$ 0,05*#^	1,48 $\pm$ 0,04*#^
IL-10, пг/мл	Механічна травма рогівки	1,56 $\pm$ 0,08	1,73 $\pm$ 0,11*	1,92 $\pm$ 0,14*	2,34 $\pm$ 0,08*	2,86 $\pm$ 0,13*
	Механічна травма рогівки + корнерегель		1,86 $\pm$ 0,12*#	2,32 $\pm$ 0,11*#	2,85 $\pm$ 0,14*#	2,24 $\pm$ 0,08*#
	Механічна травма рогівки + корнерегель_МСК		2,16 $\pm$ 0,07*#^	2,24 $\pm$ 0,08*#^	2,07 $\pm$ 0,06*#^	2,18 $\pm$ 0,07*#^
ІЗА	Механічна травма рогівки	1,98 $\pm$ 0,09	7,47 $\pm$ 0,12*	5,42 $\pm$ 0,11*	3,43 $\pm$ 0,09*	3,57 $\pm$ 0,10*
	Механічна травма рогівки + корнерегель		5,74 $\pm$ 0,14*#	4,05 $\pm$ 0,12*#	2,81 $\pm$ 0,11*#	2,16 $\pm$ 0,09*#
	Механічна травма рогівки + корнерегель_МСК		3,33 $\pm$ 0,11*#^	2,46 $\pm$ 0,10*#^	2,57 $\pm$ 0,12*#^	2,03 $\pm$ 0,06#^

незначне зростання після нанесення механічної травми рогівки з позитивною динамікою до 28-ої доби. Застосування Корнерегелю супроводжувалось більш виразним його зростанням у початкові терміни після нанесення механічної травми і зменшенням до 28-ої доби. Аналогічна, проте більш виразна тенденція спостерігалась і у разі застосування стовбурових клітин і Корнерегелю. На 3-тю добу експерименту концентрація IL-10 зросла на 16,1 % відносно тварин, яким застосовували лише Корнерегель, і була на 24,9 % вищою, ніж у тварин без корекції. Після незначного підвищення на 7-му добу, у подальші терміни спостереження рівень IL-10 зменшувався, однак до 28-ої доби складав 140,4 % від рівня тварин, яким травму не моделювали. Розрахований нами

індекс запальної активності вказує на значне зростання після нанесення механічної травми рогівки (у 3,8 раза на 3-тю добу спостереження) з подальшим зниженням до 28-ої доби. Застосування Корнерегелю дещо зменшувало цей показник, а введення стовбурових клітин із Корнерегелем було найбільш ефективним, і до 28-ої доби ІЗА достовірно не перевищував відповідний показник тварин без змодельованої патології.

Дослідження цитокінового профілю у внутрішньоочній рідині виявило значне зростання концентрації прозапальних цитокінів, особливо у ранні терміни після нанесення механічної травми рогівки (табл. 4). Зокрема, на 7-му добу рівень TNF- α зріс у 11,7 раза, IL-1 β – у 16,6 раза, IL-6 – у 12,1 раза відносно тварин,

Таблиця 4 – Вміст про- і протизапальних цитокінів у внутрішньоочній рідині тварин з механічною травмою рогівки та за її корекції, M±m

Група тварин		TNF- α , пг/мл	IL-1 β , пг/мл	IL-6, пг/мл	IL-10, пг/мл	I3A
Інтактні, (n = 8)		0,534 $\pm$ 0,048	0,483 $\pm$ 0,036	0,422 $\pm$ 0,028	0,488 $\pm$ 0,044	2,95 $\pm$ 0,06
Механічна травма рогівки, (n = 6)	7-а доба	6,242 $\pm$ 0,081*	8,042 $\pm$ 0,094*	5,084 $\pm$ 0,064*	2,208 $\pm$ 0,036*	8,77 $\pm$ 0,11*
	28-а доба	3,854 $\pm$ 0,074*	4,624 $\pm$ 0,066*	4,317 $\pm$ 0,053*	2,253 $\pm$ 0,061*	5,67 $\pm$ 0,09*
Механічна травма рогівки + Корнерегель, (n = 6)	7-а доба	4,658 $\pm$ 0,067*#	6,132 $\pm$ 0,108*#	4,195 $\pm$ 0,042*#	2,954 $\pm$ 0,052*#	5,07 $\pm$ 0,08*#
	28-а доба	2,564 $\pm$ 0,051*#	3,839 $\pm$ 0,096*#	2,244 $\pm$ 0,056*#	2,287 $\pm$ 0,061*	3,78 $\pm$ 0,07*#
Механічна травма рогівки + Корнерегель + МСК, (n = 6)	7-а доба	1,736 $\pm$ 0,057*#^	2,236 $\pm$ 0,086*#^	2,173 $\pm$ 0,052*#^	2,015 $\pm$ 0,067*#^	3,05 $\pm$ 0,06*#^
	28-а доба	1,154 $\pm$ 0,048*#^	1,178 $\pm$ 0,042*#^	1,326 $\pm$ 0,038*#^	1,217 $\pm$ 0,074*#^	3,01 $\pm$ 0,07*#^

яким травму не моделювали. До 28-ої доби показники суттєво зменшились, однак достовірно перевищували рівень тварин без патології.

Застосування Корнерегелю частково знижувало ступінь зростання прозапальних цитокінів, однак навіть до 28-ої доби їх нормалізації не спостерігалось. Використання стовбурових клітин з Корнерегелем мало найбільш виразний ефект. Зокрема, на 7-му добу зростання TNF- α , IL-1 β , IL-6 було відповідно у 3,6, 1,9 та 1,6 раза меншими, ніж у тварин без корекції, а також достовірно меншими, ніж у групі з корекцією Корнерегелем.

Рівень протизапального цитокіна IL-10 у тварин з механічною травмою рогівки також достовірно зростає, однак ступінь збільшення рівня прозапальних цитокінів буз значно вищим, що призвело до достовірного підвищення I3A у 2,9 раза. Застосування коригуючих чинників сприяло суттєвому зростанню концентрації IL-10, а показник I3A знижувався і до 28-ої доби за корекції Корнерегелем перевищував аналогічний показник тварин без корекції на 28 %, а за використання стовбурових клітин із Корнерегелем достовірно не відрізнявся від нього.

Отримані результати демонструють, що механічна травма рогівки у кролів викликає швидко та інтенсивну місцеву запальну реакцію, що характеризується масивною інфільтрацією нейтрофілами та макрофагами, а також високою продукцією прозапальних цитокінів TNF- α та IL-1 β . Ці дані узгоджуються з попередніми дослідженнями, які показують ключову роль цих клітин та медіаторів у патогенезі посттравматичного запалення

та рубцювання рогівки [22–24]. Тривале збереження прозапального мікросередовища в групі контролю травми може призвести до ускладнень, зокрема помутніння рогівки та розвитку неоваскуляризації, що є несприятливими наслідками для зорової функції.

Застосування алогенних МСК мало виражений позитивний вплив на перебіг запального процесу та загоєння рогівки. Значне зниження рівнів прозапальних цитокінів TNF- α та IL-1 β свідчать про потужну протизапальну дію МСК. Важливим є спостереження про підвищення рівня протизапального цитокіну IL-10 у групі, що отримувала МСК. IL-10 відомий своєю здатністю пригнічувати продукцію прозапальних цитокінів, обмежувати активацію макрофагів та сприяти поляризації макрофагів у протизапальний M2 фенотип [23]. Цей зсув цитокінового балансу в бік протизапальної відповіді, ймовірно, є одним із ключових механізмів терапевтичної дії МСК. Паракринна активність МСК, що включає секрецію факторів росту та інших біоактивних молекул, ймовірно, також відіграє важливу роль у стимуляції відновлювальних процесів [25]. Механізми, за допомогою яких МСК модулюють імунну відповідь в оці, є комплексними. Вони можуть включати пряму взаємодію з імунними клітинами, секрецію розчинних факторів, що впливають на міграцію, активацію та функцію імуніцитів, а також індукцію утворення регуляторних клітин [14–16]. Наші дані про зниження кількості лімфоцитів, а також зміну профілю цитокінів підтверджують імуномодулюючий потенціал МСК в умовах травми рогівки.

Отже, механічна травма рогівки запускає складний і багатоетапний процес клітинної

імунної відповіді. Хоча ця відповідь спрямована на захист та відновлення тканини, її надмірна або неконтрольована активація може призвести до значних ускладнень, таких як хронічне запалення, рубцювання та втрата прозорості рогівки. Розуміння тонких механізмів взаємодії різних імунних клітин та медіаторів є ключовим для розробки нових терапевтичних підходів, спрямованих на збереження зору після травматичних ушкоджень рогівки.

ВИСНОВКИ. 1. Механічна травма рогівки у кролів індукує розвиток вираженої місцевої

запальної реакції, що характеризується інтенсивною інфільтрацією нейтрофілами та макрофагами, підвищеною продукцією прозапальних цитокінів TNF- α та IL-1 β , що може призводити до тривалого помутніння та неоваскуляризації рогівки.

2. Уведення аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин одразу після травми ефективно модулює імунну відповідь в оці: значно зменшує інфільтрацію рогівки запальними клітинами, знижує рівні прозапальних цитокінів (TNF- α , IL-1 β) та підвищує рівень протизапального IL-10.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Domingo E., Moshirfar M., Zeppieri M. та ін. Corneal Abrasion. *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL) : StatPearls Publishing, 2025 Jan [оновлено 2024 Jan 8]. URL: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532960/>.
2. Aalam W., Barry M., Alharbi M., Tamur S., Wazzan A., Edward D.P. Diagnosis and Management of Corneal Abrasion Perception of (Primary Health Care Physicians and Emergency Physicians) and its Determinants in Saudi Arabia – A Survey. *Middle East Afr J Ophthalmol*. 2021 Jul-Sep. Т. 28, № 3. С. 151–158.
3. Wipperman J. L., Dorsch J. N. Evaluation and management of corneal abrasions. *Am Fam Physician*. 2013 Jan 15. Т. 87, № 2. С. 114–120.
4. Smith D., Keith W., Stack L. The Epidemiology and Diagnosis of Penetrating Eye Injuries. *Acad. Emerg. Med*. 2002. Т. 9, № 3. С. 209–213.
5. Gavrylyak I., Zhaboiedov D., Greben N., Tykhomyrov A. Tear lactoferrin and ceruloplasmin levels in patients with traumatic and recurrent corneal erosions. *J. ophthalmol.* (Ukraine) [Internet]. 2024 Feb 29 [цит. 2024 Apr 10]. № 1. С. 8–14.
6. Wilson S. E. Corneal wound healing. *Exp Eye Res*. 2020. Т. 197. С. 108089. DOI: 10.1016/j.exer.2020.108089.
7. Streilein J. Immune regulation and the eye: a dangerous compromise. *FASEB J*. 1987. Т. 1, № 3. С. 199–208.
8. Нестерук С., Кліщ І. Особливості змін показників гуморального та клітинного імунітету в крові кролів за умов механічної непроникаючої травми рогівки. *Експерим. клін. мед*. 2020. Т. 78, № 1. С. 46–51.
9. Sharif Z., Sharif W. Corneal neovascularization: updates on pathophysiology, investigations & management. *Rom J Ophthalmol*. 2019. Т. 63, № 1. С. 15–22.
10. Lopez-Paniagua M., Mesia R., Khandhadia S. Immunologic response of the rabbit cornea to xenogenic and allogeneic mesenchymal stem cells. *Investig. Ophthalmol. Vis. Sci*. 2009. Т. 50, № 6. С. 2872. DOI: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2364193>.
11. Mohan R. R., Kempuraj D., D'Souza S., Ghosh A. Corneal stromal repair and regeneration. *Prog*

Retin Eye Res. 2022. Т. 91. С. 101090 DOI: 10.1016/j.preteyeres.2022.101090.

12. Dong C., He M., Hu Y., Liang Y. Ex vivo cultivated retinal pigment epithelial cell transplantation for the treatment of rabbit corneal endothelial dysfunction. *Eye Vis*. 2023. Вип. 10. С. 17. DOI: 10.1186/s40662-023-00351-4.

13. Arnalich-Montiel F., Pastor S., Blázquez-Martínez A., Fernández-Delgado J., Nistal M., Aliy J.L. Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem Cells*. 2008. Т. 26, № 2. С. 570–579. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0552.

14. Nicula C., Szabo I., Ivan O. Stem cells treatment in the ocular surface regeneration. *Rom J Ophthalmol*. 2017. Т. 61, № 4. С. 239–243.

15. Call M., Elzarka M., Kunesh M., Hura N., Birk D. E., Kao W. W. Therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells for the treatment of congenital and acquired corneal opacity. *Mol Vis*. 2019. № 25. С. 415–426.

16. Yao L., Li Z. R., Su W. R., Li Y. P., Lin M. L., Zhang W. X., Liu Y., Wan Q., Liang D. Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS One*. 2012. Т. 7, № 2. С. e30842. DOI: 10.1371/journal.pone.0030842.

17. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes / Council of Europe. *Strasbourg: Council of Europe*, 1986. № 123. С. 52.

18. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Кожем'якін Ю. М., Хромов О. С., Філоненко М. А., Сайфетдінова Г. А. Київ : Авіцена, 2002. 156 с.

19. Шмир С. М., Кліщ І. М. Цитокіновий статус сироватки крові кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та корекція з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. *Med. Clin. Chem*. 2023. № 2. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2023.i2.13968.

20. Rihawi S., Frentz M., Schrage N. F. Emergency treatment of eye burns: which rinsing solution should we choose? *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*. 2006. Т. 244, № 7. С. 845–854.

21. Турчин М. В., Кліщ І. М. Особливості імунологічної реактивності за умови експери-

ментальної механічної непроникаючої травми рогівки при консервативному і хірургічному лікуванні. *Journal of Health Sciences*. 2014. Т. 4, № 11. С. 397–402.

22. Torres P., Kijlstra A. The role of cytokines in corneal immunopathology. *Ocular Immunol. Inflamm.* 2009. С. 9–24.

23. Boehm N. Proinflammatory cytokine profiling of tears from dry eye patients by means of antibody microarrays. *Investig. Ophthalmol.* 2011. Т. 52. С. 7725–7730.

REFERENCES

1. Domingo, E., Moshirfar, M., & Zeppieri, M. (2024). Corneal abrasion. In *StatPearls*. StatPearls Publishing. Retrieved from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK532960/>

2. Aalam, W., Barry, M., Alharbi, M., Tamur, S., Wazzan, A., & Edward, D. P. (2021). Diagnosis and Management of Corneal Abrasion Perception of (Primary Health Care Physicians and Emergency Physicians) and its Determinants in Saudi Arabia – A Survey. *Middle East African Journal of Ophthalmology*, 28(3), 151–158. DOI: https://doi.org/10.4103/meajo.meajo_33_21

3. Wipperman, J. L., & Dorsch, J. N. (2013). Evaluation and management of corneal abrasions. *American Family Physician*, 87(2), 114–120.

4. Smith, D., Keith, W., & Stack, L. (2002). The epidemiology and diagnosis of penetrating eye injuries. *Academic Emergency Medicine*, 9(3), 209–213.

5. Gavrylyak, I., Zhaboiedov, D., Greben, N., & Tykhomyrov, A. (2024). Tear lactoferrin and ceruloplasmin levels in patients with traumatic and recurrent corneal erosions. *Journal of Ophthalmology (Ukraine)*, 1, 8–14. DOI: <https://doi.org/10.31288/oftalmolzh20241814>

6. Wilson, S. E. (2020). Corneal wound healing. *Experimental Eye Research*, 197, 108089. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.exer.2020.108089>

7. Streilein, J. W. (1987). Immune regulation and the eye: a dangerous compromise. *The FASEB Journal*, 1(3), 199–208.

8. Nesteruk, S., & Klishch, I. (2020). Osoblyvosti zmin pokaznykiv humoral'noho ta klitynnoho imunitetu v krovi kroliv za umov mekhanichnoyi nepronyknoyi travmy rohivky [Features of changes in indicators of humoral and cellular immunity in the blood of rabbits under conditions of mechanical non-penetrating corneal injury]. *Експериментальна і клінічна медицина*, 78(1), 46–51. DOI: <https://doi.org/10.33464/exp-clin-med-2020-01-08> [in Ukrainian].

9. Sharif, Z., & Sharif, W. (2019). Corneal neovascularization: updates on pathophysiology, investigations & management. *Romanian Journal of Ophthalmology*, 63(1), 15–22.

10. Lopez-Paniagua, M., Mesia, R., & Khandhadia, S. (2009). Immunologic response of the rabbit cornea to xenogenic and allogeneic mesenchymal stem cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 50(6), 2872. Retrieved from: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2364193>

24. Шмир С., Кліщ І. Показники прозапальних цитокінів у водянистій волозі передньої камери ока кролів з механічною травмою рогівки та використанні строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації для корекції. *Grail of Science*. 2023. Т. 32. С. 390–391. DOI: [10.36074/grail-of-science.13.10.2023.074](https://doi.org/10.36074/grail-of-science.13.10.2023.074).

25. Kumar A., Yun H., Funderburgh M. L., Du Y. Regenerative therapy for the Cornea. *Prog Retin Eye Res*. 2022. Т. 87. С. 101011. DOI: [10.1016/j.preteyeres.2021.101011](https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.101011).

11. Mohan, R. R., Kempuraj, D., D'Souza, S., & Ghosh, A. (2022). Corneal stromal repair and regeneration. *Progress in Retinal and Eye Research*, 91, 101090. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2022.101090>

12. Dong, C., He, M., Hu, Y., & Liang, Y. (2023). Ex vivo cultivated retinal pigment epithelial cell transplantation for the treatment of rabbit corneal endothelial dysfunction. *Eye and Vision*, 10, Article 17. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40662-023-00351-4>

13. Arnalich-Montiel, F., Pastor, S., Blázquez-Martínez, A., Fernández-Delgado, J., Nistal, M., & Aliy, J. L. (2008). Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem Cells*, 26(2), 570–579. DOI: <https://doi.org/10.1634/stemcells.2007-0552>

14. Nicula, C., Szabo, I., & Ivan, O. (2017). Stem cells treatment in the ocular surface regeneration. *Romanian Journal of Ophthalmology*, 61(4), 239–243. DOI: <https://doi.org/10.22336/rjo.2017.43>

15. Call, M., Elzarka, M., Kunesch, M., Hura, N., Birk, D. E., & Kao, W. W. (2019). Therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells for the treatment of congenital and acquired corneal opacity. *Molecular Vision*, 25, 415–426.

16. Yao, L., Li, Z. R., Su, W. R., Li, Y. P., Lin, M. L., Zhang, W. X., Liu, Y., Wan, Q., & Liang, D. (2012). Role of mesenchymal stem cells on cornea wound healing induced by acute alkali burn. *PLoS One*, 7(2), e30842. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030842>

17. Council of Europe. (1986). *European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes*. European Treaty Series, 123.

18. Kozhemyakin, Yu. M., Khromov, O. S., Filonenko, M. A., & Sayfedinova, G. A. (2002). *Naukovo-praktychni rekomendatsiyi z utrymannya laboratornykh tvaryn ta roboty z nymy* [Scientific and practical recommendations for keeping laboratory animals and working with them]. Avicenna. [in Ukrainian].

19. Shmyr, S. M., & Klishch, I. M. (2023). Tsytokinovyy status syrovatky krovi kroliv z mekhanichnoyu nepronyknoyu travmoyu rohivky ta korektsiya z vykorystannyam stromy ksenorohivky, otrymanoyi metodom detselyulyaryzatsiyi. [Cytokine status of blood serum of rabbits with mechanical non-penetrating corneal trauma and correction using xenocorneal stroma obtained by decellularization method]. *Medical and Clinical*

Chemistry, 25(2), 79-85. DOI: <https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2023.i2.13968> [in Ukrainian].

20. Rihawi, S., Frentz, M., & Schrage, N. F. (2006). Emergency treatment of eye burns: which rinsing solution should we choose? *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*, 244(7), 845–854. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00417-005-0186-8>

21. Turchyn, M. V., & Klishch, I. M. (2014). Osoblyvosti umov imunolohichnoyi reaktyvnosti dlya eksperymental'no-mekhanichnoyi nepronyknoyi travmy rohivky pry konservatyvnomu ta khirurhichnomu likuvanni. [Features of immunological reactivity under experimental mechanical non-penetrating corneal trauma with conservative and surgical treatment]. *Journal of Health Sciences*, 4(11), 397–402. [in Ukrainian].

22. Torres, P. F., & Kijlstra, A. (2009). The role of cytokines in corneal immunopathology. *Ocular Immunology and Inflammation*, 9(1), 9–24. DOI: <https://doi.org/10.1076/ocii.9.1.9.13969>

23. Boehm, N., Tappeiner, C., Breit, S., & Enk, A. (2011). Proinflammatory cytokine profiling of tears from dry eye patients by means of antibody microarrays. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*, 52(10), 7725–7730. DOI: <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7521>

24. Shmyr, S. M., & Klishch, I. M. (2023). Pokaznyky prozapal'nykh tsytokiniv u vodyanystiy volozhnyy peredn'oyi kamery oka kroliv z mekhanichnoyu travmoyu rohivky ta vykorystannya stromy ksenorohivky svyni, otrymanoї metodom detselyulyaryzatsiyi dlya korektsiyi. [Indicators of proinflammatory cytokines in the aqueous humor of the anterior chamber of the eye of rabbits with mechanical corneal injury and the use of porcine xenocorneal stroma obtained by the decellularization method for correction]. *Grail of Science*, (32), 390–391. DOI: <https://doi.org/10.36074/grail-of-science.13.10.2023.074> [in Ukrainian].

25. Kumar, A., Yun, H., Funderburgh, M. L., & Du, Y. (2022). Regenerative therapy for the Cornea. *Progress in Retinal and Eye Research*, 87, 101011. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.preteyeres.2021.101011>

Адреса для листування: bidzilya.mr@gmail.com

M. R. Bidzilya, I. M. Klishch

IVAN HORBACHEVSKY TERNOPIL NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY
OF THE MINISTRY OF HEALTH OF UKRAINE

FEATURES OF THE OCULAR IMMUNE RESPONSE IN RABBITS WITH MECHANICAL CORNEAL INJURY AND ITS CORRECTION WITH STEM CELLS

Summary

Introduction. Research in ophthalmology has shown the significant role of cytokines as key bioregulators of inflammatory and reparative processes in the pathogenesis of eye diseases.

Aim of the Study. The aim of our study was to investigate the changes in cellular immunity indicators and the cytokine profile in the blood and aqueous humor of the anterior chamber of rabbits' eyes following a simulated mechanical non-penetrating corneal injury and treatment with Corneregel and mesenchymal stem cells (MSCs).

Methods. An epithelial incision was made on the superior part of the cornea using a trephine, after which the epithelium was removed along with the anterior layer of the corneal stroma. Anesthesia was administered locally using a 0.5 % Alcaine solution and a 2 % lidocaine solution. For treatment, the preparation Corneregel and mesenchymal stem cells derived from the umbilical cord were used. The levels of CD4 and CD8 were determined by flow cytometry. The concentrations of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-1 β (IL-1 β), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-10 (IL-10) were determined using an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The immunoregulatory index (CD4/CD8) and the inflammatory activity index ((TNF- α) + (IL-1 β) + (IL-6) / (IL-10)) were also calculated.

Results and Discussion. After simulating the mechanical injury, a disproportionate increase in the levels of T-helper and T-suppressor cells was observed, leading to a significant decrease in the immunoregulatory index, as well as a significant increase in pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6). The concentration of the anti-inflammatory cytokine (IL-10) increased less intensively in the initial stages and had decreased by day 28, which resulted in a significant increase in the inflammatory activity index. The use of corrective agents was accompanied by a less pronounced increase in cellular immunity indicators and the normalization of their ratio, as well as a significantly smaller increase in the levels of pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, with the inflammatory activity index normalizing by day 28.

Conclusion. In the context of mechanical corneal injury, the administration of mesenchymal stem cells effectively modulates the immune response in the eye, reduces the levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6), and increases the level of the anti-inflammatory cytokine IL-10, thereby normalizing the level of inflammatory activity.

KEY WORDS: corneal injury; correction; Corneregel; stem cells; immune system; cytokines.