

©І. М. КЛИЩ<sup>1</sup>ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-6226-4296>©М. А. ШВЕД<sup>1,2</sup>ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4014-7704><sup>1</sup>Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна<sup>2</sup>Комунальне некомерційне підприємство «Чернігівська міська лікарня № 3» Чернігівської міської ради, Чернігів, Україна

## Реактивне запалення та неоваскуляризація – ключові механізми помутніння рогівки при хімічному опіку лугом

**Мета роботи:** дослідити основні механізми і динаміку реактивного запалення та їх вплив на ангіогенез у тканинах ока при хімічному опіку лугом рогівки кроля в експерименті.

**Матеріал і методи.** Для проведення дослідження у кролів моделювали хімічний опік рогівки лугом. Дослідних тварин поділили на 2 групи: контрольну (інтактні тварини) і дослідну зі змодельованим хімічним опіком рогівки. На 1, 7, 14 і 21 доби забирали кров із крайової вени вуха для проведення досліджень. Активність запального процесу оцінювали за динамікою показників клітинного та гуморального імунітету за загальноприйнятими методиками, а ступінь неоваскуляризації рогівки визначали офтальмоскопом за шкалою Ефрона.

**Результати.** У кролів з опіковою травмою рогівки лугом в гострому періоді розвиваються клінічні ознаки реактивного запального процесу з дистрофічно-некротичними змінами рогівки і в цей же період активуються репаративні процеси в ушкодженному оці з частковим відновленням епітеліального покриву, спаданням набряку строми, а також стимулюються процеси ангіогенезу в рогівці, що призводило до втрати її прозорості. Опік рогівки лугом супроводжувався інтенсифікацією клітинних та гуморальних факторів імунного захисту, надмірним продукуванням прозапальних цитокінів, які є потенціальними стимуляторами розвитку патологічного ангіогенезу – неоваскуляризації. Розвиток нових, розгалужених та крихких судин у тканинах рогівки супроводжується активним ремоделюванням тканин та фіброзом і в кінцевому результаті неоваскуляризація приводить до стійкого запалення, утворення рубців, що загрожує порушеннями прозорості рогівки.

**Висновки.** В гострому періоді хімічного опіку рогівки лугом розвиваються клінічні ознаки реактивного запального процесу з дистрофічно-некротичними змінами рогівки, що проявляються ушкодженням епітелію з утворенням персистуючих епітеліально-стромальних дефектів (ПЕСД) та початковими проявами неоваскуляризації. В цей же період спостерігається виражена постанційна активність запального процесу, суттєво зростає функціональна активність нейтрофілів у сНСТ-тесті та достовірно знижується показник резерву і коефіцієнт метаболічної активації нейтрофілів, а переважає зростання Т-хелперів над рівнем цитотоксичних Т-лімфоцитів і пригніченням секреції імуноглобулінів та значне зростання рівня ЦІК і концентрації прозапальних цитокінів стає тригером ангіогенезу в рогівці, її неоваскуляризації та втраті прозорості.

**Ключові слова:** експериментальний хімічний опік рогівки лугом; реактивне запалення; клітинний і гуморальний імунітет; неоваскуляризація.

**Постановка проблеми й аналіз останніх досліджень.** Всесвітня організація охорони здоров'я у своїх звітах показує, що серед загальної популяції понад 1,4 млн людей мають хвороби чи травми рогівки різної етіології [1]. Серед цих пацієнтів частка опіків очей складає 6–38 %, з яких 60–85 % становлять хімічні опіки [2–4]. Як правило, при опіках очей легкого й середнього ступенів ускладнення не виникають, і вони закінчуються повним одужанням зі збереженням прозорості рогівки. Проте при опіках тяжкого ступеня розвивається опікова хвороба та ускладнення (симблефарон, іридоцикліти, утворення більма, катаракти, глаукоми тощо), які у подальшому стають причиною сліпоти [5]. Як відомо, нормальне світлопропускання рогівки можливе за її аваскулярності, для

підтримання якої у здоровому оці існує баланс між про- та антиангіогенними регуляторами [6]. Саме порушення цієї рівноваги при патологічних станах рогівки призводить до неоваскуляризації передньої камери ока і сліпоти [7].

У гострій фазі хімічного опіку рогівки найбільш поширеними ускладнення є повільна епітелізація, торпідна виразка, перфорація рогівки та ангіогенез [8, 9]. Ці ускладнення тісно пов'язані між собою із запаленням, яке є важливим патогенетичним елементом загоєння ран після хімічних опіків [10–12]. Тому вивчення причин і особливостей динаміки активності цих патогенетичних факторів помутніння рогівки ока при хімічному опіку рогівки лугом дозволить розробити адекватні стратегії їх лікування.

**Мета роботи:** дослідити основні механізми і динаміку реактивного запалення та їх вплив на ангиогенез у тканинах ока при хімічному опіку лугом рогівки кроля в експерименті.

**Матеріали і методи.** Експериментальне ушкодження рогівки моделювали на очах кролів, застосовуючи місцеву епібульбарну анестезію 0,5 % розчином алкаїну та ретробульбарну анестезію 2 % розчином лідокаїну. Хімічний опік індукували шляхом накладання на рогівку фільтрувального паперу діаметром 5 мм, просоченого 1 N розчином гідроксиду натрію (NaOH), протягом 30 с. Відтворення опікової ерозії контролювали за допомогою фарбування рогівки 0,5 % розчином флюоресцеїну. Утримання та використання тварин відповідали чинним нормативним вимогам, зокрема Директиві № 2010/63/ЄС та положенням Європейської конвенції (Страсбург, 1987) щодо захисту експериментальних тварин.

Кролів поділили на дві групи: I група (контрольна) – інтактні тварини (10 особин); II група – тварини з індукованим хімічним опіком рогівки (10 кролів). Забір крові з крайової вени вуха для біохімічних досліджень здійснювали на 1, 7, 14 та 21 доби після нанесення травми. Часові точки дослідження визначали відповідно до стадій перебігу опікового процесу: первинний некроз (1 доба), гострі судинні зміни та набряк (1–7 доби), вторинний некроз і гострий кератоувейт (7–14 доби), трофічні порушення та виразкування рогівки (14–21 доби), а також регенерація (після 21 доби). На 21 добу тварин виводили з експерименту під тіопентало-натрієвим наркозом (25 мг/кг) методом повітряної емболії.

Інтенсивність запального процесу оцінювали за змінами показників клітинного та гуморального імунітету. Імунофенотипування лімфоцитів здійснювали методом взаємодії моноклональних антитіл із флуоресцентною міткою до поверхневих антигенів клітин. У пробірки вносили по 20 мкл антитіл до CD4+, CD8+, CD22+ разом з EDTA; оптимальна кількість лейкоцитів становила 3,5–9,4 Г/л. Лізис еритроцитів проводили додаванням 500 мкл лізуючого розчину з подальшою інкубацією 10–15 хв, після чого додавали 500 мкл буфера. Аналіз виконували на проточному Ассурі С6.

Рівень імуноглобулінів класів А, М і G у сироватці крові визначали методом твердофазного імуноферментного аналізу з використанням наборів «GeneTex» (США) на аналізаторі Multiskan FC-357; результати виражали у г/л. Концентрацію циркулюючих імунних комплексів визначали методом преципітації поліетиленгліколем-6000 із

подальшою фотометрією при довжині хвилі 450 нм. Розрахунок проводили за формулою:

$$\text{ЦІК (ум. од.)} = (E_d - E_k) \times 1000,$$

де  $E_d$  – екстинкція у пробірці з поліетиленгліколем,  $E_k$  – екстинкція у боратній пробірці.

Системне запалення оцінювали за рівнем TNF- $\alpha$ , який визначали методом ІФА з використанням наборів «ELISA Kit for Rabbits Usca, Life Science Inc» (США) на аналізаторі Multiskan FC-357; концентрацію виражали у пг/мл.

Моноцити ізолювали методом ізокінетичного центрифугування на подвійному градієнті щільності (1,077 і 1,093) фікол-верографіну. Життєздатність клітин оцінювали у камері Горяєва за допомогою трипанового синього (незабарвлені клітини вважали життєздатними). Для аналізу використовували суспензії, у яких частка забарвлених клітин не перевищувала 25 %.

Бактерицидну активність фагоцитів визначали за тестом відновлення нітросинього тетразолію (НСТ-тест), що відображає інтенсивність оксигензалежного механізму. Результати оцінювали шляхом підрахунку 100 моноцитів із визначенням клітин, що містять гранули диформазау. Для оцінки резервних можливостей розраховували показник резерву (ПР):

$$\text{ПР} = \text{AB} / \text{CB}$$

та коефіцієнт метаболічної активації ( $K_{\text{акт.}}$ ):

$$K_{\text{акт.}} = (\text{AB} - \text{CB}) / \text{AB},$$

де АВ – відсоток позитивних клітин в активованому тесті, СВ – у спонтанному.

Ступінь неоваскуляризації рогівки оцінювали в моделі лужного опіку за шкалою Ефрона на 7, 14 та 21 доби після травми, враховуючи вираження бульбарної гіперемії (від 0 – норма до 4 – тяжкий ступінь) за допомогою офтальмоскопа.

Статистичний аналіз результатів здійснювали з використанням програм Statistica 10.0 та Microsoft Excel, застосовуючи параметричні й непараметричні методи (t-критерій Стьюдента та U-критерій Мана – Уїтні). Різницю вважали статистично значущою при  $p < 0,05$ .

**Результати.** У кролів із лужним опіком рогівки для оцінки перебігу патологічного процесу використовували такі клінічні показники: гіперемію кон'юнктиви, набряк рогівки, ураження її епітелію, а також наявність персистуючих епітеліально-стромальних дефектів (ПЕСД). Ступінь неоваскуляризації рогівки, який оцінювали за вираженням бульбарного почервоніння за шкалою Ефрона (від 0 = норма до 4 = тяжкий) медичним офтальмоскопом.

Встановлено (табл. 1), що через 1 добу після опіку спостерігалась гіперемія кон'юнктиви та

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

**Таблиця 1.** Клінічні прояви опікового процесу в кролів з опіком рогівки лугом

Клінічний прояв опіку рогівки в різні терміни спостереження		Ступінь вираження симптому (n=10)		
		легкий	помірний	тяжкий
Гіперемія кон'юнктиви	1 доба	0	0	10
	7 доба	0	4	6
	14 доба	4	4	2
Неоваскуляризація (почервоніння) за шкалою Ефрона	1 доба	10	0	0
	7 доба	5	4	1
	14 доба	3	5	2
	21 доба	1	2	7
Набряк рогівки	1 доба	0	3	7
	7 доба	1	3	6
	14 доба	5	4	1
Ушкодження епітелію	1 доба	0	0	10
	7 доба	0	6	4
	14 доба	5	4	1
ПЕСД	1 доба	0		
	7 доба	1		
	14 доба	3		

ушкодження епітелію рогівки в усіх дослідних кролів, на що вказувало зафарбовування флуоресцеїном. ПЕСД у цей термін спостереження були відсутні.

На 7 добу опіку рогівки лугом у 60 % експериментальних тварин мала місце гіперемія кон'юнктиви тяжкого ступеня, а у 40 % – помірного ступеня. Також у цей період був суттєвим набряк рогівки, як прояв дистрофічних змін, який поступово зменшувався до 14 доби. Така динаміка процесу зумовлювала частоту ушкодження епітелію та утворення ПЕСД. Щодо проявів неоваскуляризації, то можна констатувати, що в фазі ушкодження рогівки (через 1 добу) вона була відсутньою, початкові її прояви з'являлись через 7–14 діб після опіку і максимально проявлялись через три тижні опікового процесу. В цілому можна підсумувати, що в гострому періоді у тварин із лужним опіком рогівки розвиваються клінічні ознаки реактивного запального процесу з дистрофічно-некротичними змінами рогівки. В цей же період активуються репаративні процеси в ушкодженому оці, відбувається часткове відновлення епітеліального покриття, спадає набряк строми. Однак ці процеси не випереджували розвиток ПЕСД та перфорацію рогівки. Більше того, протягом 2–3 тижнів опікового процесу в розпал реактивного запалення стимулювалися процеси ангіонеогенезу в рогівці, що призводило до втрати її прозорості.

Для оцінки стану неспецифічної резистентності організму та імунної системи у тварин з хімічним опіком рогівки здійснено порівняння із показниками в інтактних тварин. Дослідження функціональної активності нейтрофілів (табл. 2) виявило суттєве зростання показників сНСТ-тесту в кролів з опіком рогівки вже протягом 1 доби експерименту. Розвиток запалення у рогівці характеризувався збільшенням вмісту активних нейтрофілів у периферійній крові, при цьому на початку експерименту показники сНСТ-тесту були в 1,78 раза вищі ( $p < 0,001$ ) порівняно з контрольною групою. Менше, але достовірно, зростали показники індукованого НСТ-тесту (в 1,49 раза, тому показник резерву знизився в 1,22 раза, що достовірно менше, ніж у контрольній групі. Зменшення ПР вказує на зниження функціональних резервів нейтрофілів, що є характерним для запального процесу. Про це свідчить і достовірне зниження  $K_{\text{акт}}$  нейтрофілів (у 1,46 раза від показника здорових тварин).

Показники сНСТ-тесту та іНСТ-тесту на 7 добу з моменту моделювання хімічного опіку рогівки достовірно зменшились і становили відповідно 139 і 114 % від показника без змодельованого патологічного процесу. ПР в цей період опікової травми залишався нижчим від контрольних значень на 24 %, а  $K_{\text{акт}}$  зменшився на 66 % від норми. Впродовж наступного періоду (до 14–21 доби)

## ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

**Таблиця 2. Показники неспецифічної резистентності організму тварин з опіком рогівки лугом (M±m)**

Група тварин		сНСТ-тест, %	іНСТ-тест, %	ПР	К <sub>акт.</sub>
Інтактні (n=10)		15,51±0,92	25,88±0,79	1,70±0,06	0,41±0,02
Хімічний опік рогівки (n=10)	1 доба	27,63±0,89 p<0,001	38,59±0,61 p<0,001	1,40±0,06 p<0,05	0,28±0,03 p<0,01
	7 доба	21,72±0,74 p<0,001	29,71±0,72 p<0,01	1,37±0,08 p<0,001	0,27±0,03 p<0,001
	14 доба	22,94±0,37 p<0,001	27,92±0,62 p<0,05	1,22±0,04 p<0,001	0,18±0,03 p<0,001
	21 доба	20,69±0,39 p<0,001	32,66±0,76 p<0,001	1,58±0,06 p>0,05	0,37±0,03 p>0,05

показник спонтанного НСТ-тесту залишався підвищеним в 1,48–1,33 раза від норми. На тлі зниження індукованого НСТ-тесту до 14 доби опіку також спостерігалось подальше критичне зниження ПР (в 1,39 раза) і К<sub>акт.</sub> (у 2,28 раза), які відновлювались до 21 доби експерименту.

При аналізі показників клітинного імунітету в кролів, яким моделювали опік рогівки лугом, ми відмітили їх активацію на всіх етапах дослідження (табл. 3). Вже протягом 1 доби опіку рогівки показник CD4<sup>+</sup> зростав на 26 %, порівняно з показником тварин без змодельованої патології, а CD8<sup>+</sup> – на 11 %. Це спричинило зростання імунорегуляторного індексу в 1,15 раза.

Суттєві зміни також зафіксовано на 7 добу: кількість CD4<sup>+</sup>-лімфоцитів збільшувалася на 31 % відносно норми, тоді як CD8<sup>+</sup> – зростала лише на 6 %, що супроводжувалося подальшим підвищенням співвідношення CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> до 1,87±0,05. На 14 добу відзначали поступове зниження рівня CD4<sup>+</sup> (на 21 % від норми) на тлі підвищення CD8<sup>+</sup> (на 11 %), що призводило до зменшення імунорегуляторного індексу до 1,64. До 21 доби спостерігалася фактична нормалізація показників клітин-

ного імунітету. Щодо змін кількості В-лімфоцитів (CD22<sup>+</sup>), то в гострій фазі опікового процесу їх рівень дещо підвищувався, а в період репарації тканин – достовірно знижувався порівняно з нормою. Загалом, у групі кролів із хімічним опіком рогівки відзначали типовий перебіг запалення з переважанням зростання Т-хелперів над цитотоксичними Т-лімфоцитами, що супроводжувалося підвищенням імунорегуляторного індексу.

Для оцінювання гуморальної ланки імунітету при моделюванні опіку рогівки лугом у кролів визначали рівні імуноглобулінів (IgG, IgM, IgA), циркулюючих імунних комплексів і фактора некрозу пухлин (TNF-α) у сироватці крові. Встановлено, що вже в першу добу після травми рівень IgA зростав на 37 %, порівняно зі здоровими тваринами, досягаючи максимальних значень на 7 добу (в 1,43 раза), і надалі залишався підвищеним (понад 1,3 раза) протягом усього періоду спостереження (3 тижні). Концентрація IgM через 24 год після ушкодження зростала в 1,6 раза від норми та продовжувала підвищуватися до 7 доби (у 2,1 раза). У подальшому її рівень знижувався, однак на 14- і 21 доби все ще перевищував норму на 36 і 25 %

**Таблиця 3. Показники клітинної ланки імунітету в тварин з опіком рогівки лугом (M±m)**

Група тварин		CD4 <sup>+</sup> , %	CD8 <sup>+</sup> , %	CD4 <sup>+</sup> /CD8 <sup>+</sup>	CD22 <sup>+</sup> , %
Інтактні (n=10)		39,31±0,63	25,89±0,74	1,51±0,06	12,18±0,23
Хімічний опік рогівки (n=10)	1 доба	49,48±0,54 p<0,001	28,52±0,66 p<0,05	1,73± 0,06 p<0,01	13,62±0,32 p<0,001
	7 доба	51,67±0,84 p<0,001	27,56±0,49 p>0,05	1,87± 0,05 p<0,001	14,33±0,43 p<0,001
	14 доба	47,76±0,93 p<0,001	29,14±0,53 p<0,05	1,64± 0,06 p>0,05	10,73±0,37 p<0,001
	21 доба	37,77±0,79 p<0,001	25,42±0,64 p>0,05	1,49± 0,05 p>0,05	10,32±0,38 p<0,001

відповідно. Подібну динаміку спостерігали і для IgG: його рівень досягав максимуму на 7 добу (підвищення на 68 %) із подальшим поступовим зниженням, хоча залишався достовірно вищим за норму (на 45 і 14 % відповідно). Отже, зміни показників гуморального імунітету при хімічному опіку рогівки свідчать про активну мобілізацію імуноглобулінів на ранніх етапах патологічного процесу з подальшим пригніченням їх системної секреції.

Одним із важливих індикаторів імунного стану організму та розвитку аутоімунних реакцій є вміст циркулюючих імунних комплексів (ЦІК) у крові. Їх тривале перебування в організмі навіть за незначного підвищення рівня сприяє накопиченню в тканинах, посиленню агрегації та адгезії тромбоцитів. Це, у свою чергу, призводить до порушення мікроциркуляції, облітерації судин гемомікроциркуляторного русла та ушкодження тканин.

За умов змодельованої патології встановлено достовірно підвищення концентрації ЦІК упродовж усього періоду спостереження у тварин із опіком рогівки лугом: вже в першу добу показник зростав у 1,1 раза, досягаючи максимуму на 7–14 доби (понад 1,5 раза від норми), після чого поступово знижувався до 21 доби, хоча й залишався вищим за норму приблизно на 30 %.

Ймовірною причиною такого вираженого зростання концентрації ЦІК є активація вільнорадикальних процесів і підвищення концентрації продуктів пероксидації ліпідів і білків в організмі, що було продемонстровано в попередніх дослідженнях [22].

Запальний процес контролюється різноманітними розчинними медіаторами, які зазвичай діють локально та нетривалий час. Серед них у дослідженні оцінювали рівень TNF-α (табл. 4). Виявлено, що у

здорових тварин його концентрація в сироватці крові становила (0,672±0,052) пг/мл. Уже через добу після моделювання хімічного опіку рогівки цей показник підвищувався у 1,4 раза, досягаючи на 7 добу зростання у 1,7 раза. Надалі, до 14 доби, рівень дещо знижувався (до 1,46 раза від норми), а до 21 доби повертався до нормальних значень.

Така динаміка концентрації TNF-α у сироватці крові свідчить про посилення деструктивних процесів у рогівці ока в гострий період опікового ушкодження.

**Обговорення.** Отже, опік рогівки лугом спричиняє активацію системної відповіді організму, інтенсифікацію зростання клітинних та гуморальних факторів імунного захисту, надмірне продукування прозапальних цитокінів, що суттєво впливає як на вираження деструктивних процесів в опіковій рані, так і на швидкість та якість регенерації рогівки. Встановлено, що при хімічному опіку рогівки клітини епітелію рогівки та інших ушкоджених тканин ока відразу ж після опіку виділяють велику кількість медіаторів, у т. ч. медіаторів запалення та хемотаксичних факторів, що стимулюють інвазію запальних клітин в ушкоджену зону [23, 24]. Як було показано, вже через 24 год після первинного ушкодження клітини вродженого імунітету (нейтрофіли та макрофаги) надходять в рогівку і вивільняють запальні медіатори, що сприяють розвитку порушень рогівки [25]. *In vitro* було показано, що макрофаги та імунокомпетентні клітини інфільтрують у зону опікової травми, стимулюють відновлення ушкодженої поверхні рогівки та експресують гемопоетичні та хемотаксичні маркери регенерації, але їх підвищена активність, що відмічено в нашому дослідженні, призводить до стресу ендоплазматичного ретикулу, набряку строми рогівки, її потовщенню та припиненню відновлення епітелію [25, 26].

Таблиця 4. Показники гуморальної ланки імунітету в сироватці крові тварин із хімічним опіком рогівки лугом (M±m)

Група тварин		IgA, г/л	IgM, г/л	IgG, г/л	ЦІК, ум. од.	TNF-α, пг/мл
Інтактні (n=10)		1,76±0,04	2,81±0,05	3,66±0,06	292,3±7,6	0,672±0,052
Лужний опік рогівки (n=10)	1 доба	2,41±0,07 p<0,001	4,49±0,12 p<0,001	5,92±0,12 p<0,001	316,8±5,9 p<0,001	0,924±0,043 p<0,001
	7 доба	2,51±0,06 p<0,001	5,78±0,12 p<0,001	6,16±0,11 p<0,001	432,7±5,4 p<0,001	1,144±0,064 p<0,001
	14 доба	2,27±0,06 p<0,001	3,83±0,09 p<0,001	5,32±0,09 p<0,001	532,2±6,6 p<0,001	0,983±0,057 p<0,001
	21 доба	2,29±0,08 p<0,001	3,52±0,12 p<0,001	4,17±0,11 p<0,001	379,1±5,4 p<0,001	0,722±0,044 p>0,05

Саме активатори саногенетичного запального процесу є потенціальними стимуляторами розвитку патологічного ангиогенезу – неоваскуляризації. Неоваскуляризація рогівки – це патологічний стан, що характеризується утворенням і розростанням нових судинних капілярів усередині аваскулярних за нормальних умов ділянок рогівки, що поширюються від лімба до поверхневих або глибоких ділянок цієї тканини [27]. Розвиток нових, розгалужених та крихких судин у тканинах рогівки тісно пов'язаний зі стійким та надмірним запальним процесом, активним ремоделюванням тканин та фіброзом і в кінцевому результаті неоваскуляризація приводить до значного негативного впливу на зір [28], оскільки незрілі нові кровеносні судини можуть призвести до ексудації ліпідів, стійкого запалення та утворення рубців, що загрожує порушенням прозорості рогівки та зниженням гостроти зору включно з подальшою його втратою.

**Висновки.** 1. У гострому періоді хімічного опіку рогівки лугом розвиваються клінічні ознаки реактивного запального процесу з дистрофічно-некротичними змінами рогівки, що проявляється гіперемією кон'юнктиви тяжкого ступеня, набряком строми рогівки, ушкодженням епітелію з утворенням ПЕСД та початковими проявами неоваскуляризації, які нарастають протягом наступних трьох тижнів після опікового процесу.

2. В цей же період активуються репаративні процеси в ушкодженному оці, відбувається часткове відновлення епітеліального покриву, спадає набряк строми, що однак не попереджувало розвитку ПЕСД та перфорації рогівки, а в розпал

реактивного запалення стимулювалися процеси ангиогенезу в рогівці, що приводило до її неоваскуляризації та втрати прозорості.

3. У групі експериментальних кролів з опіком рогівки лугом спостерігається виражена поетапна активність запального процесу: суттєве зростання функціональної активності нейтрофілів у сНСТ-тесті, достовірне зниження показника резерву і коефіцієнта метаболічної активації нейтрофілів, а також переважне зростання Т-хелперів порівняно з цитотоксичними Т-лімфоцитами і відповідним зростанням імунорегуляторного індексу відносно тварин без змодельованої патології.

4. Опікова травма рогівки на початковій і ранній стадіях супроводжується помірною активацією гуморальної ланки імунної системи з подальшим зниженням адаптаційних можливостей організму, що проявляється пригніченням секреції імуноглобулінів (IgG, IgM, Ig A), значним зростанням рівня циркулюючих імунних комплексів і концентрації прозапальних цитокінів (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ ) протягом усього терміну спостереження, що асоціюється з несприятливим перебігом опікового патологічного процесу.

**Конфлікт інтересів.** Автори декларують відсутність конфлікту інтересів.

**Джерела фінансування.** Не було використано зовнішніх джерел фінансування.

**Внесок авторів.** Кліщ І. М. – аналіз та інтерпретація, редагування. Швед М. А. – концептуалізація, дослідження, аналіз та інтерпретація, написання, редагування.

### REFERENCES

1. Tidke SC, Tidke P. A Review of corneal blindness: causes and management. *Cureus*. 2022; 14(10):e30097. DOI: 10.7759/cureus.30097.
2. Pasyechnikova NV, Rykov SO, Vitovska OP, Stepaniuk GI, Martoplyas KV, Myrnenko VV. Analysis of the state of ophthalmological care for the population of Ukraine in 2006-2011. *Ophthalmological Journal*. 2012; 6:131-40. Available from: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ofzh\\_2012\\_6\\_30](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Ofzh_2012_6_30).
3. Asaria J, Kobusingye OC, Khingi BA, Balikuddembe R, Gomez M, Beveridge M. Acid burns from personal assault in Uganda. *Burns*. 2004 Feb.; 30(1):78-81. DOI: 10.1016/j.burns.2003.08.009. PMID: 14693090.
4. Gupta, N, Kalaivani M, Tandon R. Comparison of prognostic value of Roper Hall and Dua classification systems in acute ocular burns. *Br J Ophthalmol*. 2011 Feb.; 95(2):194-8. DOI: 10.1136/bjo.2009.173724. Epub 2010 Aug. 30. PMID: 20805137.
5. Hodge C, Lawless M. Ocular emergencies. *Aust Fam Physician*. 2008 Jul.; 37(7):506-9. PMID: 18592066.
6. Di Zazzo A, Gaudenzi D, Yin J, Coassin M, Fernandes M, Dana R, Bonini S. Corneal angiogenic privilege and its failure. *Experimental Eye Research*. 2021; 204:108457. DOI: 10.1016/j.exer.2021.108457.
7. Feizi S, Azari AA, Safapour S. Therapeutic approaches for corneal neovascularization. *Eye and Vision*. 2017; 4:28. DOI: 10.1186/s40662-017-0094-6.
8. Rajarajan M, et al. *Chemical Injuries Classification and Management – Current Perspectives. Sem in Ophthalmol*. 2026; 41(2):235-49. DOI: 10.1080/08820538.2025.2535588.
9. Brodovsky SC, McCarty CA, Snibson G, Loughnan M, Sullivan L. Management of alkali burns: An 11-year retrospective review. *Ophthalmology*. 2000; 107(10), 1829-35. DOI: 10.1016/S0161-6420(00)00289-X.
10. Kuo IC. Corneal wound healing. *Current Opinion in Ophthalmology*. 2004; 15(4):311-15. DOI: 10.1097/00055735-200408000-00006.
11. Banerjee M, Moharana S, Padhy SK. Systemic Effects of Intravitreal Anti-VEGF Therapy: A Review of Safety across Organ Systems. *Ophthalmol Ther*. 2025; 14: 1661-84. DOI: 10.1007/s40123-025-01157-4.
12. He J, Bazan NG, Bazan HEP. Alkali-induced corneal stromal melting prevention by a novel platelet-activating factor receptor antagonist. *Archives of Ophthalmology*. 2006; 124(1):70-8. DOI: 10.1001/archophth.124.1.70

13. Bashkaran K, Zunaina E, Bakiah S, Sulaiman SA, Sirajudeen K, Naik V. Anti-inflammatory and antioxidant effects of Tualang honey in alkali injury on the eyes of rabbits: experimental animal study. *BMC Complement Altern Med.* 2011 Oct. 9; 11:90. DOI: 10.1186/1472-6882-11-90. PMID: 21982267. PMCID: PMC3198758.
14. Villabona-Martinez V, Sampaio LP, Shiju TM, Wilson SE. Standardization of corneal alkali burn methodology in rabbits. *Experim. Eye Research.* 2023; 230:109443. DOI: 10.1016/j.exer.2023.109443.
15. Yakymenko SA, Hladush TY. Zastosuvannya elektroeliminatsiyi dlya diahnozyky tyazhkosti opikov ochey i dynamiky yikhno'oho perebihu [Application of electroelimination for the diagnosis of the severity of eye burns and the dynamics of their course]. *Odes'kyy Med. Zhurnal – Odessa Medical Journal.* 2003; 6:80-4. Available from: <https://journals.onmedu.od.ua/index.php/med/issue/view/2/2>. Ukrainian.
16. Bunders M, Cortina-Borja M, Newell ML. Age-related standards for total lymphocyte, CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell counts in children born in Europe. *The Pediatric Infectious Disease Journal.* 2005; 24(7):595-600. DOI: 10.1097/01.inf.0000168835.01233.64.
17. Stanilova SA, Slavov ES. Comparative study of circulating immune complexes quantity detection by three assays – CIF-ELISA, C1q-ELISA and anti-C3 ELISA. *J Immunol Methods.* 2001; 253(1-2):13-21. DOI: 10.1016/S0022-1759(01)00370-2.
18. Neyko YeM, Herych PR, Ostrovs'kyy MM, Tomashchuk LM. Kysen'zalezni funktsiyi fahotsytiv u khvorykh na khronichne obstruktyvne zakhvoryuvannya lehen' [Oxygen-independent functions of phagocytes in patients with chronic obstructive pulmonary disease]. *Zdobutky klinichnoyi i eksperymental'noyi medytsyny – Achievements of clinical and experimental medicine.* 2010; 1:100-04. Available from: [http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zkem\\_2010\\_1\\_27](http://nbuv.gov.ua/UJRN/Zkem_2010_1_27).
19. Lapovets' LYe, Lutsyk BD, Lebed' HB. Klinichna laboratorna diahnozyka [Clinical laboratory diagnostics]. *Praktykum. L'viv.* 2011; 3:252. Ukrainian.
20. Yusof N, et al. Comparison of neutrophil respiratory oxidative burst activity between flow cytometry using dihydrorhodamine (DHR) 123 and conventional nitroblue tetrazolium test (NBT). *Bangladesh Journal of Medical Science.* 2022. DOI: 10.3329/bjms.v21i3.59577.
21. Gordienko GI, Borodina TM, Dudina TA, Samsygina GA. Issledovanie poglotitel'noi i metabolicheskoi aktivnosti neutrofilov perifericheskoi krovi u detei rannego vozrasta [Study of the phagocytic and metabolic activity of peripheral blood neutrophils in young children]. *Pediatrics – Pediatr.* 2003; (5):1-11. Available from: [https://pediatricsjournal.ru/files/upload/mags/274/2003\\_5\\_1587.pdf](https://pediatricsjournal.ru/files/upload/mags/274/2003_5_1587.pdf).
22. Efron N. Efron Grading Scales for Contact Lens Complications (Millennium Edition). Butterworth-Heinemann. 2000. Available from: [https://dfzljdn9uc3pi.cloudfront.net/2024/18482/1/Efron\\_Scale.pdf](https://dfzljdn9uc3pi.cloudfront.net/2024/18482/1/Efron_Scale.pdf).
23. Klishch IM, Shved MA. Osoblyvosti zmin aktyvnosti redoks-systemy pry khimichnomu luzhnomu opiku rohivky [Peculiarities of changes in the activity of the redox system during chemical alkaline burn of the cornea]. *Med. ta Klin. Khimiya – Medical and clinical chemistry.* 2025; 1:37-42. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2025.i1. Ukrainian.
24. Caban M, Owczarek K, Lewandowska U. The role of metalloproteinases and their tissue inhibitors on ocular diseases: focusing on potential mechanisms. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022; 23(8): 4256. DOI: 10.3390/ijms23084256.
25. Peral A, Mateo J, Domínguez-Godínez CO, Carracedo G, Gómez A, Crooke A, Pintor J. Therapeutic potential of topical administration of siRNAs against HIF-1 $\alpha$  for corneal neovascularization. *Experimental Eye Research.* 2022; 219:109036. DOI: 10.1016/j.exer.2021.109036.
26. Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrósio RJr, Hong J. The corneal wound healing response: Cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2001; 20(5): 625-37. DOI: 10.1016/S1350-9462(01)00008-8.
27. Guindolet D, Woodward AM, Gabison EE, Argüeso P. Alleviation of Endoplasmic Reticulum Stress Enhances Human Corneal Epithelial Cell Viability under Hyperosmotic Conditions. *International Journal of Molecular Sciences.* 2022; 23(9):4528. DOI: 10.3390/ijms23094528.
28. Wang W, Deng M, Li M, Liu L, Zou J, Qian Y. Exploring Corneal Neovascularization: An Integrated Approach Using Transcriptomics and Proteomics in an Alkali Burn Mouse Model. *Investigative Ophthalmology & Visual Science.* 2024; 65(1):21. DOI: 10.1167/iovs.65.1.21.
29. Sharif Z, Sharif W. Corneal neovascularization: Updates on pathophysiology, investigations & management. *Romanian Journal of Ophthalmology.* 2019; 63(1):15-22. DOI: 10.22336/rjo.2019.4.

Надійшла стаття до редакції / Received for editorial office on: 09.01.2026

Прийнята після рецензування / Accepted after review on: 03.02.2026

Подана до друку / Submitted for printing on: 23.02.2026

Електронна адреса для листування: [koliacanada8@gmail.com](mailto:koliacanada8@gmail.com)

I. M. KLISHCH<sup>1</sup>, M. A. SHVED<sup>2</sup>

<sup>1</sup>I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine

<sup>2</sup>Communal non-profit enterprize "Chernihiv City Hospital No. 3" of Chernihiv City Council, Chernihiv, Ukraine

## REACTIVE INFLAMMATION AND NEOVASCULARIZATION – KEY MECHANISMS OF CORNEAL OPACITY IN CHEMICAL ALKALINE BURNS

**The aim of the work:** to investigate the main mechanisms and dynamics of reactive inflammation and their effect on angiogenesis in eye tissue during chemical alkali burns of the rabbit cornea in experiment.

**Materials and Methods.** The corneal damage model was reproduced in two rabbits groups: control – 10 intact animals and experimental – 10 animals, with simulated chemical burn of the cornea with alkali. The material was collected on the 1st, 7th, 14th and 21st days, which was based on the stages of the burn process in the corneal tissue. The activity of the inflammatory process was assessed by the dynamic of indicators of cellular and humoral immunity using generally accepted methods. The degree of corneal neovascularization was determined with an ophthalmoscope using the Efron scale.

**Results.** Clinical signs of the reactive inflammatory process with dystrophic-necrotic changes of the cornea in rabbits with corneal burn injury by alkali develop in the acute period. At the same time, reparative processes were activated in the damaged eye, which led to partial restoration of the epithelial cover, subsidence of stromal edema, and stimulation of angiogenic processes in the cornea and loss of its transparency. Alkaline burn of the cornea was accompanied by intensification of cellular and humoral factors of immune defense, excessive production of pro-inflammatory cytokines, which are potential stimulators of the development of pathological angiogenesis - neovascularization. The development of new branched and fragile vessels in the corneal tissues is accompanied by active tissue remodeling and fibrosis. Neovascularization leads to persistent inflammation, scar formation, which threatens corneal transparency disorders.

**Conclusions.** Clinical signs of the reactive inflammatory process develop with dystrophic-necrotic changes of the cornea in acute period of experimental chemical burn of the cornea with alkali. It is manifested by damage to the epithelium with the formation of persistent epithelial-stromal defects (PESD) and initial manifestations of neovascularization. A pronounced staged activity of the inflammatory process was observed at the same time. The functional activity of neutrophils in the stimulated nitroblue tetrazolium test (sNST) significantly increased, the reserve index and the coefficient of metabolic activation of neutrophils were significantly decreased. The predominance of the T-helpers growth over the level of cytotoxic T-lymphocytes, suppression of immunoglobulin secretion, a significant increase in the level of Circulating Immune Complexes and the concentration of pro-inflammatory cytokines became a trigger for angiogenesis in the cornea, its neovascularization and loss of transparency.

**Key words:** alkaline corneal burn in an experiment; reactive inflammation; cellular and humoral immunity; neovascularization.

### Відомості про авторів

**Клишч І. М.** – заслужений діяч науки і техніки України, доктор біологічних наук, професор кафедри функціональної та лабораторної діагностики закладу вищої освіти, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна, e-mail: [klishch@tdmu.edu.ua](mailto:klishch@tdmu.edu.ua).

**Швед М. А.** – аспірант кафедри функціональної і лабораторної діагностики закладу вищої освіти, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, Україна, e-mail: [shved\\_asp@tdmu.edu.ua](mailto:shved_asp@tdmu.edu.ua).

### Information about the authors

**Klishch I. M.** – Honored Worker of Science and Technology of Ukraine, Doctor of Biological Sciences, Professor, Department of Functional and Laboratory Diagnostics, I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine, e-mail: [klishch@tdmu.edu.ua](mailto:klishch@tdmu.edu.ua).

**Shved M. A.** – Graduate student (PhD candidate) of the Department of Functional and Laboratory Diagnostics, I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil, Ukraine, e-mail: [shved\\_asp@tdmu.edu.ua](mailto:shved_asp@tdmu.edu.ua).