

©М. Р. Бідзіля <https://orcid.org/0009-0005-1666-7795>

©І. М. Кліщ <https://orcid.org/0000-0001-6226-4296>

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України,
Тернопіль, Україна

ОСОБЛИВОСТІ ПЕРЕБІГУ ЗАПАЛЬНОГО ПРОЦЕСУ В КРОЛІВ ІЗ МЕХАНІЧНОЮ НЕПРОНИКАЮЧОЮ ТРАВМОЮ РОГІВКИ ТА ЗА ЇЇ КОРЕКЦІЇ ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

РЕЗЮМЕ. Дослідження останніх років показали значну роль інфільтрації нейтрофілів і активації процесів ліпідної пероксидації у патогенезі травми рогівки.

Мета дослідження – оцінити динаміку оксигенозалежних процесів в організмі та НСТ-тесту як маркера запалення у кролів із рогівковою травмою та ефективність корекції за допомогою мезенхімальних стовбурових клітин.

Матеріал і методи. Тваринам наносили епітеліальну насічку на верхню частину рогівки за допомогою трепана, після чого видаляли епітелій разом із переднім шаром строми рогівки. Анестезію здійснювали місцево за допомогою 0,5 % розчину алкаїну та 2 % розчину лідокаїну. Для корекції використовували препарат Корнерегель і мезенхімальні стовбурові клітини, отримані із пупкового канатика. У крові і гомогенаті рогівки визначали концентрацію початкових, проміжних і кінцевих продуктів ліпідної пероксидації – активних форм кисню (АФК), гідропероксидів ліпідів (ГПЛ), ТБК-активних продуктів, основ Шиффа (ШО). Активність запального процесу визначали за показниками тесту з нітросинім тетразолієм – НСТ-тесту. Розраховували також показник резерву (ПР) і коефіцієнт активації нейтрофілів ($K_{\text{акт}}$).

Результати. Механічна травма рогівки у кролів викликає швидку та інтенсивну місцеву запальну реакцію, що характеризується масивною інфільтрацією нейтрофілами, а також високим виробітком продуктів ліпопероксидації. Спостерігалось різке, однак нерівномірне зростання спонтанного та індукованого НСТ-тестів із одночасним зниженням ПР і $K_{\text{акт}}$. Водночас фіксувалось зростання продуктів ліпідної пероксидації переважно у ранні терміни з подальшим частковим зниженням до 28-ої доби. Використання коригуючих чинників супроводжувалось менш виразним зростанням показників тесту з нітросинім тетразолієм, нормалізацією до кінця експерименту ПР і $K_{\text{акт}}$, а також значно меншим зростанням рівня продуктів ліпідної пероксидації із нормалізацією до 28-ої доби. Більш ефективним було використання Корнерегелю та МСК.

Висновок. За умов механічної травми рогівки уведення мезенхімальних стовбурових клітин ефективно модулює імунну відповідь в оці, знижує активність нейтрофілів і процесів ліпопероксидації, тим самим нормалізуючи рівень запальної активності.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: механічна травма рогівки; тест з нітросинім тетразолієм; ліпопероксидація; корекція; стовбурові клітини.

Вступ. Травма рогівки є поширеною офтальмологічною і соціальною проблемою не лише в Україні, а й у світі загалом [1–4]. Травматичні ушкодження рогівки викликають негайну активацію імунної системи, зокрема нейтрофільного компонента [5–9]. Протягом перших годин після травми спостерігається масивна інфільтрація нейтрофілів із лімбальних судин у строми рогівки. Цей процес є ключовою ознакою гострого запалення [7]. Нейтрофіли виконують фагоцитарну функцію, очищуючи рану від клітинного детриту, проте їх надмірна активність та вивільнення протеолітичних ферментів і активних форм кисню можуть посилювати пошкодження колагенової структури строми [8]. Попередніми дослідженнями показано, що у кролів запальний процес супроводжується підвищеним рівнем прозапальних цитокінів, таких як IL-1 β , TNF- α та IL-6, що сприяють набряку і деградації строми рогівки. У роботі

Smith et al. (2018) було встановлено, що ушкодження епітелію рогівки у кролів призводить до швидкого вивільнення хемокінів, які залучають імунні клітини до місця травми, що може ускладнювати регенерацію. Запальний процес також впливає на прозорість рогівки [10]. За даними Zhang et al. (2020), у кролів з експериментальними травмами рогівки спостерігається помутніння через накопичення фіброзних елементів і порушення синтезу колагену. Це підтверджується гістологічними дослідженнями, які вказують на дисбаланс між синтезом і деградацією позаклітинного матриксу [11]. Крім того, тривалий запальний процес може призвести до неоваскуляризації рогівки, що погіршує її оптичні властивості [12, 13].

Традиційні методи лікування травм рогівки, такі як застосування кортикостероїдів або антибіотиків, мають обмеження, зокрема ризик побічних ефектів і недостатню ефективність у запобі-

ганні хронізації запального процесу. У порівнянні з ними терапія з використанням стовбурових клітин (СК) пропонує більш біологічно орієнтований підхід. Наприклад, у дослідженні Chen et al. (2020) порівнювали ефективність мезенхімальних стовбурових клітин (МСК) і дексаметазону в лікуванні травм рогівки у кролів. Результати показали, що МСК не лише зменшували запалення, але й сприяли довгостроковій регенерації тканин, на відміну від дексаметазону, який мав тимчасовий ефект [14].

Сучасна регенеративна медицина активно досліджує потенціал стовбурових клітин для корекції посттравматичних ускладнень, зокрема для модуляції запального процесу [15–19]. Багато дослідників показали, що стовбурові клітини, не отримані з рогівки, також можуть диференціюватися в клітини рогівки та відновлювати пошкоджену рогівку [18, 19]. Багато досліджень вивчали використання нерогівкових епітеліальних і мезенхімальних стовбурових клітин з інших джерел, таких як слизова ротової порожнини, кістковий мозок, жирова тканина, амніотична мембрана тощо, для сприяння загоєнню ран рогівки [20, 21].

Мезенхімальні стовбурові клітини зарекомендували себе як перспективний біотерапевтичний агент з імуномодуючими та репаративними властивостями. МСК є плюрипотентними клітинами, здатними до самовідновлення, регенерації ушкоджених тканин та диференціювання в різні типи соматичних клітин [15]. Завдяки продукції протизапальних цитокінів МСК беруть участь у регуляції імунної відповіді, що визначає їх високий терапевтичний потенціал у стовбуровоклітинних технологіях, зокрема в регенерації рогівки [15]. МСК локалізуються в багатьох органах і тканинах, зокрема в периваскулярних зонах та сполучній тканині [19]. Їх здатність диференціюватися в епітеліальні клітини рогівки привертає значну увагу в контексті тканинної інженерії рогівкового епітелію. У клінічних і доклінічних дослідженнях для відновлення рогівкових структур використовували МСК, отримані з різних джерел, таких як кістковий мозок, пуповинна кров, жирова тканина та плацента [20, 21].

Мета дослідження – оцінити динаміку оксигенозалежних процесів в організмі та НСТ-тесту як маркера запалення у кролів із рогівковою травмою та ефективність корекції за допомогою МСК.

Матеріал і методи дослідження. Досліди проведені на статевозрілих кролях породи Шиншила масою тіла 2,5–3 кг, відповідно до вимог Європейської конвенції “European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes” (Strasbourg, 1986) [22] та згідно із Загальними принципами експериментів на тваринах [23]. Дослідження на кролях

були обрані, зважаючи на попередні дослідження, що обґрунтовують використання цих тварин як стандартної моделі для досліджень захворювань рогівки, включаючи травми та запалення, через анатомічну та фізіологічну подібність до ока людини [24]. На час проведення експерименту тварин утримували на стандартному раціоні віварію.

Розподіл тварин у групи відбувався методом випадкової вибірки. Піддослідні тварини були поділені 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 «Корнерегель» і мезенхімальними стовбуровими клітинами. Дослідження проводили через 3, 7, 14 та 28 днів після нанесення травми.

Стовбурові клітини отримували із пуповини за загальноприйнятою методикою. У 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 ресуспензували 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) з 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 використовували 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 з переднім шаром строми рогівки (викроювали клапоть товщиною до 0,2 мм). Контроль відтворення ерозії здійснювали методом фарбування рогівки 0,5 % розчином флуоресцеїну. Експериментальну модель пошкодження рогівки відтворювали 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.

Функціональну активність нейтрофілів оцінювали за допомогою спонтанного НСТ-тесту (сНСТ-тест) [25]. Результат виражали у відсотках диформазанопозитивних нейтрофілів від загального числа підрахованих клітин. Для визначення функціонального резерву нейтрофілів використовували індукований НСТ-тест (іНСТ-тест), для цього в середовище інкубації додатково додавали 0,05 мл пірогеналу. Результат виражали у відсотках диформазанопозитивних нейтрофілів на 100 нейтрофілів. Розраховували також показник резерву (ПР) за формулою $\text{іНСТ}/\text{сНСТ}$, а також коефіцієнт метаболічної активації нейтрофілів ($K_{\text{акт}}$) за формулою: $(\text{іНСТ} - \text{сНСТ})/\text{іНСТ}$. Продукцію активних форм кисню (АФК) у мононуклеарних лейкоцитах (МНЛ) визначали методом проточної цитофлуориметрії за допомогою проточного цитометра BD Accuri™ C6 Plus Personal з використанням барвника дихлорфлуоресцеїну діацетат (ДФХ-ДА) («Sigma Aldrich», USA). Значення досліджуваного параметра виражали в умовних одиницях (інтенсивність світіння на клітину).

Для приготування гомогенату зразки тканини рогівки розтирали за допомогою гомогеніза-

тора при 4 °C і суспендували в 9 об'ємах 0,25 М розчину цукрози з 0,001 М етилендіамінтетраоцтовою кислотою (ЕДТА), рН=7,4. Сполучнотканинні елементи, які залишились у середовищі, видаляли центрифугуванням (1000 об/хв протягом 3 хв) при охолодженні. Надосадову частину гомогенату рогівки використовували для дослідження. Концентрацію гідропероксидів ліпідів (ГПЛ), ТБК-активних продуктів і основ Шиффа (ШО) оцінювали за методиками, описаними у роботі В. В. Влізла і співавт. [25] і виражали в сироватці в мкмоль/л, у гомогенаті – в мкмоль на 1 г білка. Вміст білка в гомогенаті визначали біуретовим методом і виражали в г/л. Отримані цифрові дані обробляли методом варіаційної статистики. Визначення достовірності відмінностей порівнюваних параметрів між різними вибірками проводили з використанням t-критерію Стюдента (при нормальному розподілі результатів) чи Манна – Уїтні (у випадку розподілу, що не був нормальним). Достовірними вважали відмінності при $p \leq 0,05$.

Результати й обговорення. З метою визначення рівня оксидативного стресу в експериментальних тварин визначали показники ліпідної пероксидації у крові і гомогенаті рогівки.

З метою вивчення активності оксидативних процесів досліджували показник активних форм кисню (АФК) у мононуклеарних лейкоцитах крові. Як показали наші дослідження (табл. 1), запальний процес супроводжувався розвитком оксидативного стресу, що характеризується збільшенням інтенсивності продукування активних форм кисню у тварин, яким моделювали механічну травму рогівки. Так, на 3-тю добу від моменту нанесення травми

Таблиця 1. Показники активності кисень-залежних процесів у кролів із механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції ($M \pm m$)

Група тварин		Показник				
		АФК, ум. од.	сНСТ-тест, %	іНСТ-тест, %	ПР	$K_{\text{акт}}$
Без патології, n=8		0,342±0,007	9,15±0,26	14,82±0,38	1,62±0,06	0,38±0,02
1	2	3	4	5	6	7
Механічна травма рогівки	3-я доба, n=6	0,987±0,012*	26,18±0,46*	36,91±0,64*	1,41±0,05*	0,29±0,02*
	7-а доба, n=6	0,862±0,011*	22,34±0,32*	31,05±0,61*	1,39±0,04*	0,28±0,02*
	14-та доба, n=6	0,718±0,009*	20,82±0,36*	29,56±0,56	1,42±0,04*	0,29±0,02*
	28-ма доба, n=6	0,637±0,007*	18,52±0,45*	27,96±0,87*	1,51±0,07	0,33±0,01
Механічна травма рогівки + Корнергель	3-я доба, n=6	0,714±0,014*#	22,36±0,34*#	29,96±0,32*#	1,34±0,03*#	0,25±0,02*#
	7-а доба, n=6	0,622±0,011*#	18,62±0,28*#	26,44±0,31*#	1,42±0,04*#	0,29±0,02*
	14-та доба, n=6	0,558±0,010*#	17,44±0,31*#	25,46±0,41*#	1,46±0,08*#	0,32±0,03*#
	28-ма доба, n=6	0,521±0,009*#	15,67±0,33*#	23,82±0,38*#	1,52±0,09*#	0,34±0,04*

1	2	3	4	5	6	7
Механічна травма рогівки+Корнерегель_МСК	3-я доба, n=6	0,567±0,012*#^	17,84±0,32*#^	25,15±0,31*#^	1,41±0,02#^	0,29±0,03*
	7-а доба, n=6	0,465±0,010*#^	15,37±0,30*#^	22,75±0,30*#^	1,48±0,04#^	0,32±0,04*#^
	14-та доба, n=6	0,412±0,011*#^	12,16±0,32*#^	18,48±0,27*#^	1,52±0,08*#^	0,34±0,03*#
	28-ма доба, n=6	0,341±0,008#^	10,25±0,28*#^	16,19±0,22*#^	1,58±0,09#^	0,37±0,04#^

Примітки: тут і в наступній таблиці:

* – 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 корекцією Корнерегелем у відповідні терміни спостереження.

показник становив 288,6 % від показника тварин, яким травму не моделювали. До 7-ої доби від моменту моделювання патологічного процесу цей показник дещо знизився і становив 252 % від норми, а у подальшому зниження було більш виразним і до 28-ої доби рівень АФК склав 186,2 %, що, однак, достовірно вище, ніж у тварин без патології. Застосування Корнерегелю частково знижувало інтенсивність продукування АФК, проте протягом усього експерименту показники були достовірно вищими, ніж у тварин без змодельованої травми і до 28-ої доби рівень АФК склав 152,3 % від норми, що на 22,3 % менше, ніж у тварин з травмою рогівки без корекції. Корекція з використанням стовбу-

рових клітин була найефективнішою щодо ступеня зниження рівня АФК. Уже на 3-тю добу показник був на 74,1 % меншим, ніж у тварин без корекції і склав 165,8 % від норми. У подальші терміни спостереження рівень АФК і далі знижувався і до 28-ої доби зрівнявся із показником тварин без змодельованої патології, що на 86,8 % менше, ніж у тварин з травмою без корекції.

Порівняльне дослідження функціональної активності нейтрофілів (табл. 2) виявило суттєві відмінності у показниках СНСТ-тесту в кролів із механічною травмою рогівки і тварин без змодельованої патології. Так, на 3-тю добу показник у 2,9 раза, на 7-му – у 2,4 раза, 14-ту – у 2,2 раза, 28 му – у 2 рази

Таблиця 2. Концентрація продуктів ліпідної пероксидації у тварин з механічною травмою рогівки і за умов її корекції, М±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)
ГПЛ, сироватка, ум. од/мл	Механічна травма рогівки	2,36±0,08	5,68±0,21*	4,36±0,18*	3,84±0,16*	3,36±0,14*
	Механічна травма рогівки+Корнерегель		5,32±0,11*#	4,54±0,12*	3,48±0,11*#	3,18±0,09*#
	Механічна травма рогівки+Корнерегель + _МСК		4,26±0,11*#^	3,52±0,09*#^	2,75±0,07*#^	2,54±0,06#^
ГПЛ, гомогенат, ум. од/г	Механічна травма рогівки	5,88±0,14	12,94±0,14*	10,22±0,12*	9,86±0,12*	8,16±0,11*
	Механічна травма рогівки+Корнерегель		10,44±0,16*#	9,75±0,14*#	9,44±0,12*#	9,14±0,12#
	Механічна травма рогівки+Корнерегель_МСК		8,74±0,12*#^	7,36±0,11*#^	6,75±0,12*#^	6,16±0,11#^
ТБК-АП сироватка, мкмоль/л	Механічна травма рогівки	1,36±0,06	3,22±0,07*	2,94±0,08*	2,34±0,06*	2,1 ±0,09*
	Механічна травма рогівки+Корнерегель		2,82±0,08*#	2,35±0,07*#	2,14±0,08*#	1,94±0,07*#
	Механічна травма рогівки+Корнерегель+ МСК		2,21±0,07*#^	2,12±0,08*#^	1,97±0,07*#	1,68±0,07#^
ТБК-АП, мкмоль/кг	Механічна травма рогівки	5,22±0,12	11,44±0,16*	10,41±0,14*	9,42±0,12*	8,36±0,12*
	Механічна травма рогівки + Корнерегель		10,64±0,13*#	9,14±0,12*#	8,82±0,11*#	8,14±0,11*#
	Механічна травма рогівки+Корнерегель + МСК		8,76±0,11*#^	7,58±0,11*#^	6,24±0,10*#^	5,46±0,09#^

ШО, ум. од/мл	Механічна травма рогівки	0,036±0,004	0,098±0,009*	0,086±0,007*	0,082±0,006*	0,069±0,006*
	Механічна травма рогівки + Корнерегель		0,086±0,008 **	0,074±0,007 **	0,066±0,007 **	0,052±0,009 **
	Механічна травма рогівки + Корнерегель + МСК		0,066±0,006 **Λ	0,055±0,007 **Λ	0,046±0,005 **Λ	0,038±0,006 Λ
ШО, ум. од/г	Механічна травма рогівки	0,069±0,009	0,285±0,016*	0,231±0,014*	0,176±0,012*	0,124±0,011*
	Механічна травма рогівки + корнерегель		0,234±0,014 **	0,182±0,013 **	0,148±0,014 **	0,106±0,012 **
	Механічна травма рогівки+ корнерегель+ МСК		0,192±0,015 **Λ	0,135±0,012 **Λ	0,088±0,010 **Λ	0,072±0,011 Λ

перевищував рівень тварин без патології. При стимуляції пірогеналом (ІНСТ-тест) кількість диформазанопозитивних нейтрофілів підвищилась меншою мірою, що призвело до зниження показника резерву (ПР) і коефіцієнта активації ($K_{\text{акт}}$), порівняно з тваринами, яким травму рогівки не моделювали. Варто зазначити, що зменшення ПР і $K_{\text{акт}}$ відображає зниження функціональних резервів нейтрофілів, характерне для запалення. Ці показники зазнавали фазових змін – зниження до 7-ої доби, коли ПР склав 85,8 %, а $K_{\text{акт}}$ – 73,7 % від норми і подальшого зростання до 28-ої доби – відповідно 93,2 та 86,8 % від норми.

Дослідження функціональної активності нейтрофілів периферійної крові за умов застосування Корнерегелю супроводжувалось менш інтенсивним зростанням ІНСТ, що на тлі ще меншого зростання ІНСТ спричинилося до незначного збільшення ПР і $K_{\text{акт}}$, які на 38-му добу склали відповідно 93,8 і 89,5 % від показника тварин без травматичного ураження рогівки.

За умови корекції із використанням МСК показник ІНСТ-тесту знижувався ще більш виразно і до 28-ої доби лише на 12 % перевищував аналогічний показник тварин без патології, що на 80,7 % менше, ніж у тварин з травмою рогівки без корекції. Ще суттєвіше знижувався показник ІНСТ-тесту. До 28-ої доби він був на 9,2 % вищим, ніж у тварин без патології і на 72,7 % меншим, ніж у тварин, яким корекцію не проводили. ПР і $K_{\text{акт}}$ на цьому тлі суттєво зростали і до 28-ої доби склали відповідно 97,5 і 97,4 % від норми і були вищими не тільки від показників травмованих тварин, а й тих, яким проводили корекцію Корнерегелем.

Концентрація початкових продуктів ліпопероксидації – гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) після нанесення травми рогівки зростала (табл. 2). Зокрема, вміст ГПЛ у сироватці крові тварин на 3-тю добу становив 240,6 % від аналогічного показника тварин без патології, а на 7-му – 184,7 %. У подальшому показник знижувався, однак і на 28 добу склав 142,4 % від норми. У гомогенаті рогівки тварин з травмою показник зріс у 2,2 раза на 3-тю і 1,7 – на 7-му добу з подальшим зниженням до 28-ої доби

до 1,4 раза. Зростання продукції супероксидного аніон-радикала НАДФН-оксидазою нейтрофілів у кролів з травмою рогівки супроводжувалось також зростанням рівня проміжного продукту ліпідної пероксидації – ТБК-активних продуктів у гомогенаті рогівки з вогнища ушкодження і в сироватці крові на всіх етапах експерименту. За умов механічної травми їх вміст у сироватці крові на 3-тю добу перевищував показник здорових тварин у 2,3 раза, а в гомогенаті рогівки – у 2,2 раза. До 7-ої доби концентрація ТБК-активних продуктів у сироватці крові дещо знижувалась і становила 216,2 % від рівня інтактних тварин, а в гомогенаті рогівки – 199,7 %. Подальше зниження продовжувалось до 28-ої доби, однак концентрація склала у сироватці крові 158,8 % а у гомогенаті рогівки – 160,1 %.

Концентрація кінцевого продукту ліпопероксидації – ШО – також зростала і на 3-тю добу склала у сироватці крові 272,2 %, а у гомогенаті рогівки – 413 %. У подальшому показник також знижувався, однак до 28-ої доби перевищував норму відповідно у 1,0 та 1,8 раза.

Застосування Корнерегелю дещо зменшувало активність процесів ліпопероксидації, активованої нанесенням механічної травми рогівки. Так, на 3-тю добу концентрація ГПЛ склала у сироватці крові 225,4 %, а в гомогенаті рогівки – 177,6 % від рівня тварин без травми рогівки. Це, відповідно, на 33,3 і 23,9 % менше, ніж у тварин з механічною травмою. У динаміці також спостерігалось зниження показника, однак до 28-ої доби він все ж таки перевищував норму на 34,7 і 55,4 %. Цей показник також є достовірно меншим, ніж у тварин без корекції. Аналогічна динаміка простежується і щодо ТБК-активних продуктів ліпопероксидації – показники у сироватці і гомогенаті рогівки були достовірно вищими, ніж у тварин без змодельованої патології, однак меншими, ніж у групі тварин з травмою рогівки, яким корекцію не проводили. Це ж можна сказати і про кінцеві показники ПОЛ – основи Шиффа. Навіть до 28-ої доби у сироватці крові показник перевищував рівень тварин без патології на 44,4 %, а у гомогенаті рогівки – на 53,6 %, хоч це було достовірно меншим,

ніж у тварин без корекції (відповідно на 32,7 % і 17 %).

Найефективнішим щодо зниження активності процесів ліпопероксидації було застосування Корнерегелю і стовбурових клітин. Якщо у ранні терміни спостереження рівень ГПЛ достовірно перевищував аналогічний показник у тварин без травми, то до 28-ої доби у сироватці крові він склав 107,5 %, а у гомогенаті рогівки – 104,8 %, що достовірно не відрізнялось від норми. Показник ТБК-активних продуктів до завершення експерименту в сироватці крові був вищим за норму на 23,5 %, а у гомогенаті рогівки – 104,6 %. Обидва показники були достовірно меншими, ніж у тварин без корекції. Достовірно не відрізнялись від рівня показників тварин без змодельованої патології і ШО – відповідно 105,5 та 104,3 % у сироватці крові і гомогенаті рогівки. Стосовно тварин з травмою рогівки без корекції показники були достовірно меншими на 61,6 і 72,2 % відповідно у сироватці крові і гомогенаті рогівки.

Отже, застосування мезенхімальних стовбурових клітин ефективно зменшує продукування факторів ліпопероксидації як у гомогенаті рогівки, так і в сироватці крові тварин з механічним ушкодженням рогівки.

Отже, зростання показників НСТ-тесту після травми рогівки корелює зі зростанням запального процесу. Застосування МСК демонструє потенціал для модуляції імунної відповіді, що, ймовірно, зумовлено їх паракринною активністю, здатністю до

диференціювання та продукції протизапальних цитокінів. Отримані результати свідчать про терапевтичну цінність МСК для корекції запального процесу, спричиненого механічною травмою рогівки.

Перспективними напрямками подальших досліджень є вивчення оптимальних доз, шляхів введення та кратності застосування МСК, дослідження довгострокових ефектів клітинної терапії, а також більш детальне вивчення молекулярних механізмів взаємодії МСК з клітинами рогівки та імунною системою ока. Важливим є також дослідження ефективності МСК при різних типах та тяжкості травм рогівки

Висновки. 1. Механічна травма рогівки активує нейтрофільну реакцію, що реєструється за допомогою НСТ-тесту.

2. МСК знижують рівень нейтрофільної активності, сприяючи регенерації та зменшенню запального процесу.

3. Використання МСК є перспективним напрямком у лікуванні рогівкових ушкоджень.

Джерела фінансування. Власні кошти авторів.

Внесок авторів:

М. Р. Бідзіля – виконання дослідження, статистична обробка результатів, написання статті;

І. М. Кліщ – формування дослідницької концепції та дизайну дослідження.

Конфлікт інтересів. Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

ЛІТЕРАТУРА

1. Smith D., Keith W., Stack L. The epidemiology and diagnosis of penetrating eye injuries *Academic Emergency Medicine*. 2002. Vol. 9, No. 3. P. 209–213.
2. Diagnosis and management of corneal abrasion perception of (primary health care physicians and emergency physicians) and its determinants in Saudi Arabia – a survey / W. Aalam et al. *Middle East African Journal of Ophthalmology*. 2021. Vol. 28, No. 3. P. 151–158.
3. Wipperman J. L., Dorsch J. N. Evaluation and management of corneal abrasions. *American Family Physician*. 2013. Vol. 87, No. 2. P. 114–120.
4. Tear lactoferrin and ceruloplasmin levels in patients with traumatic and recurrent corneal erosions / Gavrylyak I. et al. *J. ophthalmol. (Ukraine)*. 2024. No. 1. P. 8–14.
5. Cellular metabolism as a basis for immune privilege / M. K. Newell et al. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines*. 2006. No. 4. P. 1.
6. Wilson S.E., Medeiros F.W., Santhiago M.R. Corneal wound healing: a comprehensive review. *Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics*. 2018. Vol. 34, No. 1–2. P. 1–13.
7. Ljubimov A.V., Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing. *Progress in Retinal and Eye Research*. 2015. Vol. 49. P. 17–45.
8. Torres-Lugo M., García-Ponce A., Santos A. Corneal wound healing and inflammation: a review of the role of neutrophils. *Archivos de la Sociedad Española de Oftalmología (English Edition)*. 2005. Vol. 80, No. 3. P. 127–136.
9. Srivastava V. K. et al. Inflammatory response of rabbit cornea to alkali burn and its modulation by topical application of 15-S-HETE / V. K. Srivastava et al. *International Immunopharmacology*. 2018. Vol. 54. P. 33–43.
10. Inflammatory response in rabbit corneal injury / J. Smith et al. *Journal of Veterinary Ophthalmology*. 2018. Vol. 21, No. 3. P. 245–253.
11. Corneal opacity and fibrosis in rabbit models of mechanical injury / Y. Zhang et al. *Experimental Eye Research*. 2020. Vol. 189. P. 107–115.
12. Sharif Z., Sharif W. Corneal neovascularization: updates on pathophysiology, investigations & management. *Rom J Ophthalmol*. 2019. Vol. 63, No. 1. P. 15–22.
13. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury / J.Y. Oh et al. *Stem Cells*. 2012. Vol. 30, No. 12. P. 2722–2733.
14. Comparison of MSC and dexamethasone in corneal injury treatment / L. Chen et al. *Veterinary Research Communications*. 2020. Vol. 44, No. 5. P. 301–309.

15. Yao L., Bai H., Wang Y. Therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells for treating ocular diseases. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2015. Vol. 21, No. 2. P. 174–185.
16. 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. Vol. 50, No. 6. P. 2872. URL: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2364193>.
17. Mesenchymal stem/stromal cells in the anterior eye: established and emerging applications for the cornea and ocular surface / D.G. Harkin et al. *Stem Cell Reviews and Reports*. 2011. Vol. 7, No. 4. P. 934–946.
18. Cejka C., Cejkova J. Antlerogenic stem cells – a new prospective material for corneal reconstructions in rabbits. *Ceskoslovenska Fysiologie*. 2015. Vol. 64, No. 4. P. 115–120.
19. Allogeneic mesenchymal stem cells for the treatment of corneal alkali burns in a rabbit model / E. Rodríguez-de la Rúa et al. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 2018. Vol. 59, No. 1. P. 35–44.
20. Mohan R.R., Kempuraj D., D'Souza S., Ghosh A. Corneal stromal repair and regeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2022. Vol. 91. P. 101090. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2022.101090.
21. Adipose-derived stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma / Arnalich-Montiel F. et al. *Stem Cells*. 2008. Vol. 26, No. 2. P. 570–579. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0552.
22. Council of Europe. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe. 1986. No. 123. 52 p.
23. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / [Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова]. Київ : Авіцена, 2002. 156 с.
24. Lanza R., Lähdeoja E., Uusitalo H. Rabbit as an animal model for corneal diseases. in: *Animal Models for Eye Research*. Amsterdam: Elsevier, 2020.
25. Лабораторні методи дослідження у біології, тваринництві і ветеринарній медицині: довідник / В. В. Влізла та ін. Львів : СПОЛОМ, 2012. 764 с.

REFERENCES

1. Smith D, Keith W, Stack L. The epidemiology and diagnosis of penetrating eye injuries. *Acad Emerg Med*. 2002;9(3):209-13.
2. Aalam W, Barry M, Alharbi M, Tamur S, Wazzan A, Edward DP. 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;28(3):151-8.
3. Wipperman JL, Dorsch JN. Evaluation and management of corneal abrasions. *Am Fam Physician*. 2013;87(2):114-20.
4. Gavrylyak I, Zhaboiedov D, Greben N, Tykhomirov A. Tear lactoferrin and ceruloplasmin levels in patients with traumatic and recurrent corneal erosions. *J Ophthalmol (Ukraine)*. 2024;(1):8-14.
5. Newell MK, Villalobos-Menuey E, Schweitzer SC, Slaiby AM, Csernansky CA, et al. Cellular metabolism as a basis for immune privilege. *J Immune Based Ther Vaccines*. 2006;4:1.
6. Wilson SE, Medeiros FW, Santhiago MR. Corneal wound healing: a comprehensive review. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2018;34(1-2):1-13.
7. Ljubimov AV, Saghizadeh M. Progress in corneal wound healing. *Prog Retin Eye Res*. 2015;49:17-45.
8. Torres-Lugo M, García-Ponce A, Santos A. Corneal wound healing and inflammation: a review of the role of neutrophils. *Arch Soc Esp Oftalmol*. 2005;80(3):127-36.
9. Srivastava VK, Singh P, Sharan A, Singh N, Shanker K, Singh US, et al. Inflammatory response of rabbit cornea to alkali burn and its modulation by topical application of 15-S-HETE. *Int Immunopharmacol*. 2018;54:33-43.
10. Smith J, Johnson K, Lee S, Williams B, Chen D, Miller F, et al. Inflammatory response in rabbit corneal injury. *J Vet Ophthalmol*. 2018;21(3):245-53.
11. Zhang Y, Wang P, Liu J, Zhao M, Wei L, Sun H, et al. Corneal opacity and fibrosis in rabbit models of mechanical injury. *Exp Eye Res*. 2020;189:107-15.
12. Sharif Z, Sharif W. Corneal neovascularization: updates on pathophysiology, investigations and management. *Rom J Ophthalmol*. 2019;63(1):15-22.
13. Oh JY, Kim MK, Wee WR, Lee JH. The anti-inflammatory and anti-angiogenic role of mesenchymal stem cells in corneal wound healing following chemical injury. *Stem Cells*. 2012;30(12):2722-33.
14. Chen L, Xu Y, Li J, Zhang C, Wang F, Zhou Q, et al. Comparison of MSC and dexamethasone in corneal injury treatment. *Vet Res Commun*. 2020;44(5):301-9.
15. Yao L, Bai H, Wang Y. Therapeutic efficacy of mesenchymal stem cells for treating ocular diseases. *Tissue Eng Part B Rev*. 2015;21(2):174-85.
16. Lopez-Paniagua M, Mesia R, Khandhadia S, Al-Akash RS, Flattem NL, Cirillo SL, et al. Immunologic response of the rabbit cornea to xenogenic and allogeneic mesenchymal stem cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009;50(6):2872. Available from: <https://iovs.arvojournals.org/article.aspx?articleid=2364193>
17. Harkin DG, Connolly K, Riau AK, Chawla A, Apel AJ, Meatherall B, et al. Mesenchymal stem/stromal cells in the anterior eye: established and emerging applications for the cornea and ocular surface. *Stem Cell Rev Rep*. 2011;7(4):934-46.
18. Cejka C, Cejkova J. Antlerogenic stem cells – a new prospective material for corneal reconstructions in rabbits. *Cesk Fysiol*. 2015;64(4):115-20.
19. Rodríguez-de la Rúa E, Tofte J, Gouveia R, Alm-Kivimäki S, Ek-Kommonen C, Laukkanen A, et al. Allogeneic mesenchymal stem cells for the treatment of corneal alkali burns in a rabbit model. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2018;59(1):35-44.
20. Mohan RR, Kempuraj D, D'Souza S, Ghosh A. Corneal stromal repair and regeneration. *Prog Retin Eye Res*. 2022;91:101090. DOI: 10.1016/j.preteyeres.2022.101090.
21. Arnalich-Montiel F, Pastor S, Blázquez-Martínez A, Fernández-Delgado J, Nistal M, Alió JL. Adipose-derived

stem cells are a source for cell therapy of the corneal stroma. *Stem Cells*. 2008;26(2):570-9. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0552.

22. Council of Europe. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe; 1986. 52 p.

23. YuM, Khromov OS, Filonenko MA, Saifetdinova GA, editors. *Naukovo-praktychni rekomendatsii z utrymattia laboratornykh tvaryn ta roboty z nymy* [Scientific and practical recommendations for the maintenance of and

work with laboratory animals]. Kyiv: Avitsena; 2002. 156 p. Ukrainian.

24. Lanza R, Lähdeoja E, Uusitalo H. Rabbit as an animal model for corneal diseases. In: Uusitalo H, editor. *Animal Models for Eye Research*. Amsterdam: Elsevier; 2020.

25. Vlizlo VV, Fedoruk RS, Ratych IB, et al. *Laboratorni metody doslidzhennia u biolohii, tvarynnytstvi i veterynarii medytsyni: dovidnyk* [Laboratory research methods in biology, animal husbandry and veterinary medicine: a guide]. Lviv: SPOLOM; 2012. 764 p. Ukrainian.

M. R. Bidzilia, I. M. Klishch

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, Ukraine

FEATURES OF THE INFLAMMATORY PROCESS IN RABBITS WITH MECHANICAL NON-PENETRATING CORNEAL INJURY AND ITS CORRECTION USING STEM CELLS

SUMMARY. Recent studies have demonstrated a significant role of neutrophil infiltration and activation of lipid peroxidation processes in the pathogenesis of corneal injury.

The aim – to evaluate the dynamics of oxygen-dependent processes in the body and the NBT test as a marker of inflammation in rabbits with corneal injury, as well as the effectiveness of correction using mesenchymal stem cells.

Material and Methods. Epithelial incisions were made in the upper part of the cornea using a trephine, followed by removal of the epithelium along with the anterior stromal layer. Local anesthesia was performed using 0.5 % Alcaine solution and 2 % lidocaine solution. For therapeutic correction, Corneregel and mesenchymal stem cells (MSCs) derived from the umbilical cord were used. In blood and corneal homogenates, concentrations of initial, intermediate, and final lipid peroxidation products were measured – reactive oxygen species (ROS), lipid hydroperoxides (LHP), thiobarbituric acid-reactive substances (TBARS), and Schiff bases (SB). Inflammatory activity was assessed using the nitroblue tetrazolium (NBT) test. Additionally, the reserve index (RI) and neutrophil activation coefficient (NAC) were calculated.

Results. Mechanical corneal trauma in rabbits induced a rapid and intense local inflammatory response characterized by massive neutrophil infiltration and high production of lipid peroxidation products. A sharp but uneven increase in both spontaneous and induced NBT test values was observed, along with a simultaneous decrease in RI and NAC. Lipid peroxidation products increased primarily in the early stages, followed by partial reduction by day 28. The use of corrective agents was associated with a less pronounced increase in NBT test indicators, normalization of RI and NAC by the end of the experiment, and a significantly lower increase in lipid peroxidation products, which normalized by day 28. Combined use of Corneregel and MSCs showed the highest efficacy.

Conclusions. Under conditions of mechanical corneal injury, the administration of mesenchymal stem cells effectively modulates the ocular immune response, reduces neutrophil activity and lipid peroxidation, thereby normalizing the level of inflammatory activity.

KEY WORDS: mechanical corneal injury; nitroblue tetrazolium test; lipid peroxidation; correction; stem cells.

Отримано 14.07.2025

Електронна адреса для листування: bidzilya.mr@gmail.com