

## ПОРФТ КАК АКТИВАТОР РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ ГЛАЗНОЙ ПОВЕРХНОСТИ

<sup>1,2</sup>Сментина А.В., <sup>2</sup>Семак Г.Р., <sup>2,3</sup>Рындова Д.В.

<sup>1</sup>Государственное учреждение «432 ордена Красной Звезды главный военный клинический медицинский центр Вооруженных Сил Республики Беларусь»,

г. Минск, Республика Беларусь

<sup>2</sup>Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

<sup>3</sup>Учреждение здравоохранения «11-я городская клиническая больница», г. Минск, Республика Беларусь

**Актуальность.** Из всех оболочек глаза именно роговица, как наружная оболочка, наиболее всего подвержена влиянию физических, химических и механических факторов внешней среды. По данным ВОЗ слепота в исходе поражения роговицы занимает 4 место среди основных причин в мире после катаракты, глаукомы и возрастной макулярной дегенерации. Роговичная слепота в Республике Беларусь составляет 6% от всех слепых и слабовидящих. Кроме этого, в 30-50% случаев наблюдается значительное снижение зрения в исходе перенесенного кератита, до 40% пациентов – становятся инвалидами по зрению. Поэтому, одной из актуальных направлений в современной офтальмологии является поиск и применение активаторов регенерации для восстановления прозрачности роговицы после кератита.

**Цель.** Установить влияние плазмы, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, (далее – ПОРФТ) на мезенхимальные стволовые/стромальные клетки (далее – МСК) человека *in vitro*, и оценить восстановление прозрачности роговицы глаз у экспериментальных животных с применением ПОРФТ.

**Материалы и методы.** МСК человека и ПОРФТ для экспериментов *in vitro* были представлены лабораторией биологии и генетики государственного учреждения «Республиканский научно-практический центр трансфузиологии и медицинских биотехнологий». В качестве экспериментальных животных были использованы кролики вивария учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет».

Для оценки пролиферации МСК человека в лунки культурального планшета вносили образцы ПОРФТ 1:20 и доводили до объема 0,9 мл питательной среды. МСК 2-3 пассажей с исходной жизнеспособностью не менее 95 % добавляли в лунки в количестве  $3 \times 10^4$  клеток в объеме 0,1 мл питательной среды DMEM с добавками. Каждый вариант постановки культуры клеток ставили в двух повторах. Препарат использовали в разведении 1:20, варианты эксперимента поставлены в дуплете. Клетки культивировали в течение 72-х часов в CO<sub>2</sub> – инкубаторе. По окончании инкубации культуры клеток оценивали микроскопически, затем из лунок удаляли супернатант, клеточный монослой отмывали раствором ФСБ («Lonza»). Клетки ресуспендировали, затем отмывали

с помощью центрифугирования при 900 об/мин. в течение 4 минут и вновь ресуспендировали в 1 мл питательной среды. Микроскопический учет живых (неокрашенных в синий цвет) клеток проводили в камере Горяева при увеличении в 40 раз. Подсчет клеток проводили параллельно 2 независимых исследователя. Статистическая обработка проведена программой STATISTICA 10.0.

В эксперимент были включены 6 кроликов породы «Шиншилла» (исключены кролики-альбиносы), животные были разделены на 2 группы, по 3 кролика в каждой, пронумерованы, взвешены. В качестве экспериментальной модели воспаления роговицы на правом глазу была использована методика, разработанная Т.К.Волкович и И.В.Самсоновой. Левый глаз оставался интактным. Через 1 сутки после воспроизведения модели кератита всем кроликам было назначено стандартное лечение в виде инстилляций в конъюнктивальную полость травмированного глаза антибиотика (левофлоксацин 0,5%) и кортикостероида (дексаметазон 0,1%). В 1-ой группе – контрольной, лечение включало только инстилляций антибиотика и кортикостероида. Во 2-ой группе – к стандартному лечению были добавлены инстилляций ПОРФТ по 1 капле 6 раз в день в течение 7 дней. Динамика изменений переднего отдела глаз животных оценивалась по диаметру язвенного дефекта и бальными критериями согласно приложения 3 к Инструкции 1.1.11-12-35-2004 «Требования к постановке экспериментальных исследований для первичной токсикологической оценки и гигиенической регламентации веществ». Наблюдение за кроликами проводили с помощью фоторегистрации и протоколирования воспалительного процесса в день воспроизведения модели кератита, на 1 сутки после моделирования воспалительного процесса, который считался исходным отрезком в проведении эксперимента и началом лечения, а также на 1, 3, 5, 7, 10 и 14 сутки с момента начала терапии.

**Результаты.** Мезенхимальные стволовые/стромальные клетки при культивировании в присутствии ПОРФТ были более контрастные, приобретали псевдоподии (утолщенные, удлиненные отростки). Активный рост МСК подтверждался отсутствием клеток, отлипших от дна культурального флакона, а также округлых нежизнеспособных клеток. Рост-стимулирующее действие ПОРФТ на МСК человека при внесении в состав питательной среды в 5% концентрации проявилось увеличением популяции клеток в 1,26-2,65 раза ( $p < 0,05$ ).

Модель кератита (кератоконъюнктивита) была успешно воспроизведена у всех кроликов через 1 сутки после введения их в эксперимент. Она проявлялась выраженным хемозом, гиперемией конъюнктивы, обильным количеством гнойного отделяемого, которое увлажняло веки и окружающие ткани. На третьи сутки лечения у всех животных конъюнктивальная полость очистилась от патологического отделяемого. Отличительной особенностью 2-й группы кроликов (с применением ПОРФТ) явилось значительно меньшая площадь деэпителизации роговицы, в сравнение со стандартным лечением в 1-й группе. На 7-е сутки лечения, во 2-й группе экспериментальных животных признаки

воспаления были минимальные, среднее количество баллов составило 1, в то время как в 1-й группе – 4. Также, существенная разница наблюдалась в размерах язвенного дефекта: 1,0 мм – во 2-й группе, и 3,0 мм – в 1-й.

К 14 суткам у кроликов обеих групп наступила эпителизация роговицы без признаков воспаления. Полная прозрачность наблюдалась во 2-й группе (с применением ПОРФТ), у кроликов 1-й группы – сохранялось облаковидное помутнение.

**Выводы.** Плазма, обогащенная растворимыми факторами тромбоцитов, в эксперименте *in vitro* не оказывала токсического действия и обладала выраженным рост-стимулирующим действием в отношении мезенхимальных стромальных/стволовых клеток. Применение ПОРФТ в эксперименте приводит к сокращению сроков эпителизации дефектов роговицы и полному восстановлению ее прозрачности. Поэтому ПОРФТ, как активатор регенерации тканей глазной поверхности, может быть в дальнейшем использован при лечении острых воспалительных заболеваний.