

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ EXPERIMENTAL STUDIES

<https://doi.org/10.33266/2070-1004-2024-4-53-58>
УДК 617.7-001.17:612.085

Оригинальная статья
© ФМБЦ им.А.И.Бурназяна

ПРИМЕНЕНИЕ ПАРАКРИННЫХ ФАКТОРОВ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ДЛЯ ПРОФИЛАКТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ПОСТОЖОГОВОЙ НЕОВАСКУЛЯРИЗАЦИИ РОГОВИЦЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

А.В.Терещенко^{1,2}, И.Г.Трифаненкова^{1,2}, С.К.Демьянченко¹, А.М.Кодунов¹,
Д.А.Шатаев¹, Р.Б.Иолчиев¹, А.Н.Склифас³, А.А.Темнов³

¹ Калужский филиал ФГАУ «Национальный медицинский исследовательский центр «Межотраслевой научно-технический комплекс «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н.Фёдорова» Минздрава России, Калуга, Россия

² Медицинский институт ФГБОУ ВО «Калужский государственный университет им. К.Э.Циолковского», Калуга, Россия

³ Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», г.Пушино, Московская область, Россия

Резюме. Цель исследования – оценить эффективность разных фракций пептидного препарата в лечении постожоговой неоваскуляризации (НР) роговицы в эксперименте.

Материалы и методы исследования. Экспериментальное исследование проведено на 40 самцах крыс стока Wistar. Предварительно всем животным наносился химический ожог роговицы и конъюнктивы. В качестве лечения применялись различные фракции пептидного препарата, содержащего паракринные факторы мезенхимальных стволовых клеток (МСК). Культивирование МСК для приготовления препарата проводилось в условиях гипоксии. Были сформированы 4 опытные и одна контрольная группы по 8 крыс (8 глаз). В 1-й группе для лечения применялся пептидный препарат общей фракции; во 2-й – пептидный препарат с фракцией до 3 кДа; в 3-й – с фракцией до 30 кДа; в 4-й – с фракцией от 30 до 120 кДа; в контрольной группе в качестве лечения использовалась культуральная среда. До начала лечения, а также на 14-е и 30-е сутки эксперимента проводили: фоторегистрацию глазного дна, биомикроскопию, оптическую когерентную томографию роговицы, определяли прозрачность роговицы.

Результаты исследования и их анализ. Результаты проведенного исследования показали, что общая фракция и фракция до 30 кДа, полученные при культивировании МСК в условиях гипоксии, являются эффективными при профилактике и лечении неоваскулярного бельма роговицы, вызванного химическим ожогом. Кроме того, данные вещества могут быть перспективными для разработки препаратов, используемых медициной для минимизации последствий травм при техногенных катастрофах.

Ключевые слова: лечение, мезенхимальные стволовые клетки, паракринные факторы, постожоговая неоваскуляризация роговицы, профилактика, экспериментальное исследование

Конфликт интересов. Авторы статьи подтверждают отсутствие конфликта интересов

Для цитирования: Терещенко А.В., Трифаненкова И.Г., Демьянченко С.К., Кодунов А.М., Шатаев Д.А., Иолчиев Р.Б., Склифас А.Н., Темнов А.А. Применение паракринных факторов стволовых клеток для профилактики и лечения постожоговой неоваскуляризации роговицы в эксперименте // Медицина катастроф. 2024. №4. С. 53-58.
<https://doi.org/10.33266/2070-1004-2024-4-53-58>

<https://doi.org/10.33266/2070-1004-2024-4-53-58>
UDC 617.7-001.17:612.085

Original article
© Burnasyan FMBC FMBA

APPLICATION OF PARACRINE FACTORS OF STEM CELLS FOR PREVENTION AND TREATMENT OF POST-BURN NEOVASCULARIZATION OF THE CORNEA IN THE EXPERIMENT

A.V.Tereshchenko^{1,2}, I.G.Trifanenkova^{1,2}, S.K.Demyanchenko¹, A.M.Kodunov¹,
D.A.Shataev¹, R.B.Iolchiev¹, A.N.Sklifas³, A.A.Temnov³

¹ The Kaluga branch of the S.Fedorov Eye Microsurgery Federal State Institution, Kaluga, Russian Federation

² Kaluga State University named after K.E. Tsiolkovskiy, Kaluga, Russian Federation

³ Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences - a Separate Division of the "Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences", Pushchino, Moscow Region, Russian Federation

Summary. Purpose of the study – to evaluate the efficacy of different fractions of a peptide preparation in the treatment of post-burn corneal neovascularization in an experiment.

Materials and methods. The experimental studies were conducted on 40 male Wistar rats. All animals had previously undergone a chemical burn of the cornea and conjunctiva. Various fractions of a peptide preparation containing paracrine factors of mesenchymal stem cells (MSCs) were used as treatment. For the experiment, MSCs were cultivated under hypoxic conditions. Four experimental groups and one control group of 8 rats (8 eyes) were formed. Group 1 - a peptide preparation of the total fraction was used for treatment; group 2 - a peptide preparation with a fraction of molecular weight up to 3 kDa; group 3 - with a fraction of molecular weight up to 30 kDa; group 4 - with a fraction of molecular weight from 30 to 120 kDa, in the control group a culture medium was used as treatment. Before the treatment, as well as on the 14th and 30th day of the experiment, the following studies were performed: photo registration of the fundus, biomicroscopy, corneal OCT, determination of corneal transparency.

Results of the study and their analysis. The study showed that the total fraction and the fraction with a molecular weight of up to 30 kDa, obtained by culturing MSCs under hypoxic conditions, are effective in the treatment and prevention of neovascular corneal leukoma caused by a chemical burn, and these substances may be promising for the development of drugs used in medicine to minimize the effects of injuries in man-made disasters.

Key words: experimental studies, mesenchymal stem cells, paracrine factors, post-burn corneal neovascularization, prevention, treatment

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest

For citation: Tereshchenko A.V., Trifanenkova I.G., Demyanchenko S.K., Kodunov A.M., Shataev D.A., Iolchiev R.B., Sklifas A.N., Temnov A.A. Application of Paracrine Factors of Stem Cells for Prevention and Treatment of Post-Burn Neovascularization of the Cornea in the Experiment. *Meditsina Katastrof = Disaster Medicine*. 2024;4:53-58 (In Russ.). <https://doi.org/10.33266/2070-1004-2024-4-53-58>

Контактная информация:

Темнов Андрей Александрович – докт. мед. наук; ведущий научный сотрудник лаборатории проблем клеточного стресса Института биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФГБУН «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук»

Адрес: Россия, 142290, г. Пушкино Московской области, Институтская, 3

Тел.: +7 (4967) 73-94-79

E-mail: aa-temnov@yandex.ru

Contact information:

Andrey A. Temnov – Dr. Sc. (Med.), Leading Researcher at the Laboratory of Cellular Stress Problems of Institute of Cell Biophysics of the Russian Academy of Sciences - a Separate Division of the "Federal Research Center "Pushchino Scientific Center for Biological Research of the Russian Academy of Sciences"

Address: 3, Institutskaya str., Pushchino, Moscow Region, 142290, Russia

Phone: +7 (4967) 73-94-79

E-mail: aa-temnov@yandex.ru

Введение

В общем количестве травм глаза доля ожогов глаз составляет от 6,1 до 38,4%. При этом преобладают химические ожоги глаз, на долю которых приходится около 60,0–80,0% всех ожогов органа зрения. В промышленных районах не менее 65,0–75,0% ожогов глаз бывают производственными, а остальные относятся к бытовым и криминальным [1, 2].

В настоящее время, наряду с бытовыми ожогами, наблюдается резкий рост количества травм глаз, связанных с боевыми действиями и техногенными катастрофами, особенно на химических и нефтегазовых производствах. Тяжелые ожоги роговицы в сочетании с повреждением лимбальной зоны в подавляющем количестве случаев сопровождаются развитием такого тяжелого осложнения, как неоваскуляризация роговицы (НР).

Неоваскуляризация роговицы может также возникать в результате различных патологических состояний. Аномальное разрастание сосудов сопровождается отеком и помутнением роговицы, что может стать причиной снижения остроты зрения и приводить к необратимым последствиям вплоть до инвалидизации пациентов. В мире монокулярная слепота вследствие развития бельма роговицы различной этиологии диагностирована у 1,5–2 млн чел. [3, 4].

Неоваскуляризация роговицы относится к одному из наиболее серьезных осложнений ожогов глаз. Лечение неоваскуляризации сопряжено с многочисленными трудностями, которые обусловлены уникальной структурой и функцией ткани роговицы.

В качестве лечения НР используются различные методы, среди которых: назначение местных кортикостероидов и нестероидных противовоспалительных средств, а также лазерная фотокоагуляция сосудов роговицы;

трансплантация конъюнктивальной, лимбальной и амниотической мембран и др. Однако их применение не дает необходимого клинического эффекта и сопряжено с рядом нежелательных явлений [3].

В настоящее время в различных сферах медицины проводятся исследования, связанные с возможностью использования мезенхимальных стволовых клеток (МСК) как метода специфической терапии. Ряд авторов отметили эффективность применения МСК при ожогах глаз с признаками воспаления и острой органной недостаточности. Однако, несмотря на эффективность, применение МСК ограничено рядом их специфических особенностей. Возможной альтернативой может быть использование пептидного препарата, полученного из культивированных стволовых клеток, который, обладая большинством свойств стволовых клеток, не имеет при этом недостатков [5–9].

Цель исследования – оценить эффективность разных фракций пептидного препарата в лечении постожоговой неоваскуляризации роговицы в эксперименте.

Материалы и методы исследования. Экспериментальное исследование было проведено на 40 самцах крыс стока Wistar.

Масса животных – 300–350 г, возраст животных – 6–7 мес. Предварительно всем животным наносился химический ожог роговицы и конъюнктивы. Создание модели химического ожога в эксперименте проводили методом Обенбергера под общей анестезией с добавлением местной – внутримышечно (в/м) 100 мл Золетила + 0,4%-ный раствор инокаина. Ожог роговицы инициировали в течение одной минуты посредством аппликации на роговицу и конъюнктиву фильтровальной бумаги, вырезанной в форме круга диаметром 5 мм и предварительно смоченной в 95%-ном этаноле.

Через 30 сут после нанесения ожога и формирования сосудистого бельма все животные были разделены на 5 групп, в каждую из которых вошли по 8 крыс – 8 глаз. Для лечения применялся в 1-й группе – пептидный препарат общей фракции; во 2-й – пептидный препарат с фракцией молекулярной массой (далее – с фракцией) до 3 кДа; в 3-й – пептидный препарат с фракцией до 30 кДа; в 4-й группе – пептидный препарат с фракцией от 30 до 120 кДа. Также была выделена контрольная группа, в которой в качестве лечения использовалась культуральная среда.

В процессе лечения применялись различные фракции пептидного препарата, который представляет собой белково-пептидный комплекс, содержащий паракринные факторы МСК. Культивирование МСК для приготовления препарата проводилось в условиях гипоксии. Данные условия культивирования были выбраны в связи с тем, что в ранее проведенных экспериментальных исследованиях была доказана большая жизнеспособность МСК, культивировавшихся в условиях гипоксии, по сравнению с МСК, которые выращивались в условиях нормоксии [10].

До начала лечения, а также на 14-е и 30-е сутки эксперимента проводили следующие виды исследований: фоторегистрацию глазного дна, биомикроскопию, оптическую когерентную томографию (ОКТ) роговицы, прозрачность роговицы измеряли с помощью прибора Pentacam (Oculus, Германия).

Все манипуляции с животными выполняли в соответствии с Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных Хельсинской декларации и рекомендациями Директив Европейского Сообщества (№ 86/609 ЕС).

Лечение химических ожогов роговицы осуществляли закапыванием в конъюнктивальную полость 4 раза в сутки в течение 60 мин различных модификаций пептидного препарата, начиная с первых суток после нанесения ожога. Последняя инстилляционная проводилась на 30-е сутки экспериментального исследования. В контрольной группе по такой же схеме применялась культуральная среда.

Для оценки площади неоваскулярного помутнения и ее динамики на фоне лечения использовали метод морфометрии. После предварительной фоторегистрации на большом увеличении роговицы глаза животных снимки помещали в программу ImageJ (National Institutes of Health, США), в которой выделяли зоны прорастания сосудов, вычисляя их площадь, и давали оценку соотношения пораженной площади и общей площади роговицы.

Статистическую обработку данных выполняли с использованием программы STATISTICA 13.3 (StatSoft, США). Для определения нормальности распределения использовали критерий Колмогорова-Смирнова и Шапиро-Уилка. Оба критерия показали, что исследуемые группы параметров не имеют нормального распределения. Для количественных параметров для сопоставления двух групп – основной и контрольной – использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Для сравнения групп до операции и в различные сроки после ее проведения использовали непараметрический критерий Уилкоксона. Статистически значимыми считали различия данных при $p < 0,05$.

Результаты исследования и их анализ. До начала лечения клинически не было выявлено значительных различий между группами. Сложившаяся офтальмологическая картина позволила сделать заключение о формировании неоваскулярного бельма на роговице. У всех

животных была зафиксирована полная эпителизация. При оценке хода сосудов отмечено, что отдельные стволы сосудистого русла направлены к центральной зоне и формируют между собой анастомозы. Были также выделены сосуды, имеющие, по сравнению с другими, меньший диаметр и оканчивающиеся в парацентральной зоне. Оптическая когерентная томография позволила выявить неравномерность толщины эпителиального слоя роговицы; в толще стромы выявлялось гиперрефлективное помутнение; в большинстве случаев множественные гипорефлективные полости (кисты) выявлялись в верхних слоях стромы.

На основании полученных данных было сделано заключение о прекращении воспалительных и регенераторных процессов, характеризующих химический ожог.

После начала лечения в контрольной группе, в которой использовалась культуральная среда, ни в один из сроков наблюдения офтальмоскопически не наблюдалась динамика. На роговице идентифицировались новообразованные сосуды, главным образом, в форме крупных сосудистых стволов, имеющих стромальные помутнения в своей проекции. Неоваскулярное бельмо не претерпевало каких-либо изменений.

Во 2-й и 4-й группах при лечении пептидными препаратами фракцией до 3 кДа и фракцией от 30 до 120 кДа на 14-е и 30-е сутки эксперимента офтальмоскопически, как и в случае с контрольной группой, не было выявлено значимых изменений в сравнении с состоянием на момент начала лечения. Отсутствие клинического эффекта в 2-й группе можно объяснить невысокой концентрацией (0,12 мг/мл) белково-пептидного компонента (рис. 1). В 4-й группе причиной могло явиться высокое содержание в препарате балластных белков.

В 1-й группе, в которой применялся пептидный препарат общей фракции, а также в 3-й группе, где для лечения применялся пептидный препарат с фракцией до 30 кДа, был выявлен выраженный антиангиогенный эффект. К 14-м суткам эксперимента во всех случаях было отмечено значительное сокращение количества новообразованных сосудов, а на участках сохранения комплексов новообразованных сосудов отмечалось уменьшение их диаметра. Фиксировалось отсутствие помутнений роговицы в проекции запустевших сосудов. Во всех случаях эпителиальный слой оставался сохранным. Передняя камера – без патологических изменений. При этом значимых различий между этими группами не наблюдалось.

На 30-е сутки лечения у большей части животных 1-й и 3-й групп (общая фракция – культуральная среда и фракция до 30 кДа соответственно) новообразованные сосуды выявлены не были (рис. 2). Было отмечено наличие отдельных сосудистых стволов, берущих свое начало

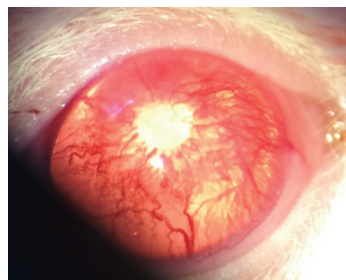


Рис. 1. Фоторегистрация переднего отрезка глаза крысы: 2-я группа (фракция до 3 кДа) – 30-е сутки лечения

Fig. 1. Photo of the anterior segment of the rat eye. Group 2 (fraction up to 3 kDa). 30th day of treatment

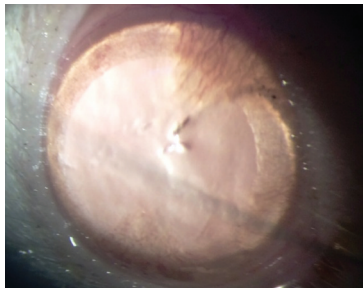


Рис. 2. Фоторегистрация переднего отрезка глаза крысы: 3-я группа (фракция до 30 кДа) – 30-е сутки лечения
Fig. 2. Photo of the anterior segment of the rat eye. Group 3 (fraction up to 30 kDa). 30th day of treatment

в лимбальной области, проходящих через толщу роговицы и вновь идущих в область лимбальной сосудистой сети. Отмечено также отсутствие помутнений в зонах сохранившихся новообразованных сосудов.

Отдельно была оценена динамика изменения прозрачности и площади поражения роговицы на 14-е и 30-е сутки (таблица). При оценке прозрачности роговицы 100 усл. ед. соответствуют ее полной непрозрачности. Прозрачность роговицы у интактного животного составляла $(32,2 \pm 0,1)$ усл. ед.

Как видно из данных таблицы, в группах до начала лечения прозрачность роговицы была одинаковой – $(100,00 \pm 0,00)$ усл. ед. В контрольной группе в разные сроки наблюдения данный показатель практически не менялся, составив к концу наблюдения $(96,20 \pm 0,30)$ усл. ед. Незначительные изменения также наблюдались во 2-й и 4-й группах, тогда как в 1-й (общая фракция) и 3-й (фракция до 30 кДа) группах отмечено значительное увеличение прозрачности от срока к сроку, приблизившееся к концу эксперимента к нормальным значениям глаза до нанесения ожога.

Значения площади пораженной роговицы – по аналогии с изменением прозрачности в контрольной, 2-й и 4-й группах – имели схожие показатели на всех сроках наблюдения. На 30-е сутки лечения ни в одной из указанных групп площадь пораженной роговицы не снизилась больше, чем на 23,0%. В 1-й (общая фракция) и

3-й (фракция до 30 кДа) группах уже на 14-е сутки лечения наблюдалось значительное – на 89,5 и 86,4% соответственно – уменьшение площади пораженной роговицы.

Обсуждение. Неоваскуляризация роговицы – угрожающая зрению патология, которой страдают 1,4 млн чел. в год. Ожидается, что заболеваемость НР будет расти. Она является осложнением таких заболеваний роговицы, как термический и химический ожог, сопровождающиеся дефицитом лимбальных стволовых клеток. Неоваскуляризация роговицы возникает из-за нарушения равновесия в проангиогенных и антиангиогенных медиаторах, включающих сложную систему молекулярных взаимодействий [11].

До настоящего времени ни один из существующих лекарственных препаратов, применяемых в курсе медикаментозной терапии, не показал себя как эффективное средство против НР. Такие противовоспалительные средства, как кортикостероиды, являются базой терапии при неоваскуляризации роговицы из-за их доступности и хорошо изученного профиля безопасности, однако они обладают ограниченной эффективностью и не способны вызывать регресс зрелой НР [12].

Разработка эффективных методов медикаментозной терапии НР требует патогенетически ориентированного подхода. Участвующие в патогенезе НР проангиогенные факторы включают в себя: фактор роста эндотелия сосудов (VEGF); тромбоцитарный фактор роста; матриксную металлопротеиназу (ММП) и такие воспалительные цитокины, как интерлейкин-1 (IL-1) и интерлейкин-6 (IL-6) – [13].

Широко изучен ангиогенный медиатор VEGF-A, являющийся членом семейства белков, включающего VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, вирусно кодируемый VEGF-E и плацентарный фактор роста [14]. VEGF-A секретируется широким спектром клеток, включая макрофаги, Т-клетки, фибробласты, клетки пигментного эпителия сетчатки и клетки роговицы [15].

Матриксная металлопротеиназа – это Zn²⁺-зависимые ферменты, которые подразделяются или на секретируемые ММП, или на ММП мембранного типа. Первым трансмембранным ММП, который был идентифицирован,

Таблица / Table

Средние показатели прозрачности (усл. ед.) и площади поражения (%) роговицы в группах в различные сроки наблюдения, M±m

Average indicators of corneal transparency (arbitrary units) and area of corneal damage (%) by groups at different observation periods, M±m

| Группы / Groups | Показатель / Index | Сроки наблюдения / Observation period | | |
|---|---|---------------------------------------|--|--|
| | | до лечения / before treatment | на 14-е сутки лечения / 14 th day | на 30-е сутки лечения / 30 th day |
| Контрольная группа – культуральная среда / Control group – cultural medium | Прозрачность / Transparency | 100,00±0,00 | 100,00±0,00 | 96,20±0,30 |
| | Площадь поражения / Corneal lesion area | 61,30±0,4 | 60,48±0,22 ¹ | 49,4±0,16 ¹ |
| 1-я группа – общая фракция / Group 1 – general fraction | Прозрачность / Transparency | 100,00±0,00 | 64,30±0,6 ^{1,2} | 33,50±0,41 ^{1,2} |
| | Площадь поражения / Corneal lesion area | 62,40±0,5 | 6,51±0,30 ^{1,2} | 4,44±0,22 ^{1,2} |
| 2-я группа – фракция до 3 кДа / Group 2 – fraction up to 3 kDa | Прозрачность / Transparency | 100,00±0,00 | 97,32±0,80 | 96,11±0,50 |
| | Площадь поражения / Corneal lesion area | 62,80±0,5 | 63,40±0,8 | 48,8±0,46 ¹ |
| 3-я группа – фракция до 30 кДа / Group 3 – fraction up to 30 kDa | Прозрачность / Transparency | 100,00±0,00 | 66,50±0,41 ^{1,2} | 34,59±0,35 ^{1,2} |
| | Площадь поражения / Corneal lesion area | 61,40±0,5 | 8,44±0,12 ^{1,2} | 5,09±0,03 ^{1,2} |
| 4-я группа – фракция от 30 до 120 кДа / Group 4 – fraction from 30 to 120 kDa | Прозрачность / Transparency | 100,00±0,00 | 98,81±0,12 | 97,40±0,50 |
| | Площадь поражения / Corneal lesion area | 62,35±0,5 | 61,38±0,23 | 51,5±0,14 |

Примечания / Note: различия статистически достоверны при $p < 0,05$ / differences are statistically significant at $p < 0,05$;

¹ достоверно по отношению к предыдущему значению по срокам наблюдения / reliable in relation to the previous value according to the observation period; ² достоверно по отношению к контрольной группе / significant in relation to the control group

являлся MMP-14. Он связан с несколькими молекулярными механизмами, участвующими в избирательном связывании и расщеплении VEGF-R1, который индуцирует ангиогенез роговицы [16].

IL-1 и IL-6 являются провоспалительными цитокинами, которые усиливают экспрессию хемокинов и факторов роста, приводящих к неоваскуляризации [17].

С растущим пониманием патогенеза НР расширяется круг исследований, нацеленных на поиск новых подходов к её нехирургическому лечению.

Клеточные технологии – многообещающая патологически ориентированная стратегия в лечении разнообразного спектра заболеваний, в том числе заболеваний глазной поверхности, включая постожоговые бельма роговицы [18].

Использование мезенхимальных стволовых клеток является привлекательным инструментом клеточной терапии, однако оно ограничивается такими факторами, как большие капитальные вложения, дорогостоящее культивирование клеток, сложности в управлении безопасностью и качеством при обращении с клетками [19].

В ряде исследований, изучавших влияние кондиционной среды МСК на различные заболевания и состояния, было установлено, что её применение имеет весомые преимущества по сравнению с использованием стволовых клеток [20, 21].

В 2022 г. нами были опубликованы результаты изучения влияния кондиционной среды культивированных стволовых клеток на развитие патологического ангиогенеза роговицы [22]. Исследование проводили на экспериментальной модели химического ожога роговицы у 22 крыс (22 глаза), которые были включены в две опытные и одну контрольную группы. В первой опытной группе в качестве лечения применяли пептиды кондиционной среды общей фракции; во второй опытной группе – пептиды кондиционной среды фракции до 30 кДа; в контрольной группе – культуральную среду. Методы исследования включали офтальмоскопию переднего отрезка глаза, определение площади повреждения роговицы и гистологическое исследование роговицы. Было показано, что использование инстилляций пептидного препарата для лечения химического ожога роговицы имело антиангиогенный эффект, выразившийся в отсутствии васкуляризации роговицы к концу периода наблюдения (30 сут) и наличии субэпителиально лишь единичных заплывших капилляров у животных опытных групп. В контроле к окончанию срока эксперимента сформировалась васкуляризованное бельмо роговицы.

В настоящем исследовании мы оценивали эффективность разных модификаций пептидного препарата – общей фракции, фракции до 3 кДа, фракции до 30 кДа, фракции от 30 до 120 кДа – в лечении хронической постожоговой неоваскуляризации роговицы в эксперименте. Результаты сравнительного количественного анализа показателей прозрачности роговицы (усл. ед.) в срок эксперимента – 30 сут и площади поражения роговицы (%) в сроки эксперимента – 14 и 30 сут достоверно указывают на эффективность общей фракции и фракции до 30 кДа по сравнению с фракцией до 3 кДа, фракцией от 30 до 120 кДа и контрольной культуральной средой, $p < 0,05$.

Заключение. Таким образом, полученные данные доказывают наличие антиангиогенного эффекта при лечении постожоговой неоваскуляризации роговицы у пептидного препарата общей фракции, полученного при культивировании МСК в условиях гипоксии, и пептидного препарата с фракцией до 30 кДа. В то же время пептидные препараты с фракцией до 3 кДа и фракцией от 30 до 120 кДа также, как и культуральная среда, не обладают подобным действием.

Результаты экспериментального исследования свидетельствуют, что применение пептидного препарата общей фракции и фракции до 30 кДа, полученных при культивировании МСК в условиях гипоксии, является перспективным при лечении неоваскулярного бельма роговицы и требует дальнейшего изучения.

Вероятно, что полученные паракринные факторы, показавшие высокую эффективность при лечении неоваскуляризации роговицы у экспериментальных животных, не будут в такой же степени эффективно работать при лечении высших приматов и человека, что может быть обусловлено различием в метаболизме, анатомоморфологическим строением и особенностями иммунной системы. Однако данное направление, связанное с разработкой пептидных препаратов для лечения острых и критических состояний, несомненно заслуживает внимания и дальнейшего изучения.

Работа содержит материалы исследования, выполненного за счет гранта Российской научной фонды №23-25-10091 «Изучение антиангиогенных эффектов паракринных факторов мезенхимальных стволовых клеток при трансплантации роговицы в эксперименте», <https://rscf.ru/project/23-25-10091/>, а также за счет гранта в форме субсидии из бюджета Калужской области.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Алексеева Г.Ф., Бордюгова Г.Г. Особенности диагностики и лечения ожоговой контузионной травмы // Материалы науч.-практ. конф. МНИИГБ им. Гельмгольца. М.: 2001. С. 36-37.
2. Ахмедов А.А. Основные аспекты травмы зрения // Труды МНИИГБ им. Гельмгольца. М.: 1998. С. 171-172.
3. Малугин Б.Э., Исабеков Р.С., Калинин С.Ю., Антонова О.П. Методы диагностики и лечения неоваскуляризации роговицы // Вестник офтальмологии. 2023. Т.139. №4. С. 86-92. <https://doi.org/10.17116/oftalma202313904186>
4. Камиллов Х.М., Максудова Л.М., Инагамджанова Ш.Б., Бабаханова Д.М. Клиническая оценка современных аспектов лечения постожоговой эрозии роговицы // Advanced Ophthalmology. 2023. Т.1. №1. С. 92-96. <https://doi.org/10.57231/j.ao.2023.1.1.021>
5. Оразалиева А.М., Овезкычев П.Т., Ламанова Д.Б., Петрова Г.К. Влияние аутоплазмы на неоваскуляризацию роговицы в динамике лечения гнойного кератита // Лучшие теоретические и прикладные исследования 2023: Сборник статей Международного научно-исследовательского конкурса. Пенза: Наука и просвещение, 2023. С. 78-81.

REFERENCES

1. Alekseeva G.F., Bordyugova G.G. Features of Diagnostics and Treatment of Burn Contusion Injury. Proceedings of the Scientific-Practical. Conference of Helmholtz Research Institute of City Hospitals. Moscow Publ., 2001. P. 36-37 (In Russ.).
2. Akhmedov A.A. Basic Aspects of Vision Injury. *Trudy MNIIGB im. Gel'mgol'tsa* = Proceedings of Helmholtz Research Institute of City Hospitals. Moscow Publ., 1998. P.171-172 (In Russ.).
3. Malugin B.E., Isabekov R.S., Kalinnikova S.Yu., Antonova O.P. Methods for Diagnosis and Treatment of Corneal Neovascularization. *Vestnik Oftal'mologii* = Bulletin of Ophthalmology. 2023;139;4: 86-92 (In Russ.). <https://doi.org/10.17116/oftalma202313904186>.
4. Kamilov H.M., Maksudova L.M., Inagamdzhanova Sh.B., Babakhanova D.M. Clinical Assessment of Modern Aspects of the Treatment of Post-Burn Corneal Erosion. *Advanced Ophthalmology*. 2023;1;1:92-96 (In Russ.). <https://doi.org/10.57231/j.ao.2023.1.1.021>.
5. Orazaliev A.M., Ovezklychev P.T., Lamanova D.B., Petrova G.K. The Influence of Autoplasma on Corneal Neovascularization in the Dynamics of Treatment of Purulent Keratitis. *Luchshye Teoreticheskiye i Prikladnyye Issledovaniya 2023: Sbornik Statey Mezhdunarodnogo*

6. Хазамова А.И., Вериги Е.Н., Ченцова Е.В. Роль микротравмы роговицы в развитии бактериальных язв // Офтальмология. 2017. Т.14. №2. С. 136–140.
7. Самойлов А.С., Астрелина Т.А., Аксененко А.В., Кобзева И.В., Сучкова Ю.Б. Применение клеточных технологий при термических ожоговых повреждениях кожи // Саратовский научно-медицинский журнал. 2019. Т.15. №4. С. 999-1004
8. Хубутия М.С., Вагабов А.В., Темнов А.А., Склифас А.Н. Паракринные механизмы противовоспалительного и органопротективного действия при трансплантации мезенхимальных стволовых клеток. Обзор литературы // Трансплантология. 2014. №1. С.20-32.
9. Khubutiya M.S., Vagabov A.V., Temnov A.A., Sklifas A.N. Paracrine Mechanisms of Proliferative, Anti-Apoptotic and Anti-Inflammatory Effects of Mesenchymal Stromal Cells in Models of Acute Organ Injury // Cytotherapy. 2014. V.16. No.5. P.579-585. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.07.017>.
10. Плахотный М.А., Кодунов А.М., Горина Е.В., Бояринцев В.В., Трофименко А.В., Бiryukov С.А., Фильков Г.И. Влияние условий культивирования мезенхимальных стволовых клеток на их жизнеспособность при трансплантации в субретинальное пространство // Биофизика. 2020. Т.65. №6. С. 1126-1134. <https://doi.org/10.31857/S0006302920060125>.
11. Wu D., Chan K.E., Lim B.X.H., Lim D.K., Wong W.M., Chai C., Manotosh R., Lim C.H.L. Management of Corneal Neovascularization: Current and Emerging Therapeutic Approaches // Indian J Ophthalmol. 2024. V.72. No.3. P.354-371. https://doi.org/10.4103/IJO.IJO_3043_23.
12. Oray M., Abu Samra K., Ebrahimiadib N., Meese H., Foster C.S. Long-Term Side Effects of Glucocorticoids // Expert Opin Drug Saf. 2016. V.15. No.4. P. 457-465. <https://doi.org/10.1517/14740338.2016.1140743>.
13. Tu Y., Luo Y., Zhao Q., Zeng Y., Leng K., Zhu M. Role of Macrophage in Ocular Neovascularization // Heliyon. 2024. V.10. No.10. P.e30840. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30840>.
14. Apte R.S., Chen D.S., Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. Cell. 2019. V.176. No.6. P.1248–1264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>.
15. Ahmad A., Nawaz M.I. Molecular Mechanism of VEGF and its Role in Pathological Angiogenesis // J Cell Biochem. 2022. V.123. No.12. P. 1938–1965. <https://doi.org/10.1002/jcb.30344>.
16. Han K.Y., Chang J.H., Lee H., Azar D.T. Proangiogenic Interactions of Vascular Endothelial MMP14 with VEGF Receptor 1 in VEGFA-mediated Corneal Angiogenesis // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2016. V.57. No.7. P.3313–3322. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19420>.
17. Ebihara N., Matsuda A., Nakamura S., Matsuda H., Murakami A. Role of the IL-6 Classic- and Trans-Signaling Pathways in Corneal Sterile Inflammation and Wound Healing // Invest Ophthalmol Vis Sci. 2011. V.52. No.12. P. 8549–8557. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7956>.
18. Ye J., Yao K., Kim J.C. Mesenchymal Stem Cell Transplantation in a Rabbit Corneal Alkali Burn Model: Engraftment and Involvement in Wound Healing // Eye (Lond). 2006. V.20. No.4. P. 482-490. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6701913>.
19. Покровская Л.А., Шерстобоев Е.Ю., Надеждин С.В., Данилец М.Г., Трофимова Е.С., Лигачева А.А., Чуринов А.А., Дубская Т.Ю. Безопасность применения кондиционной среды, полученной при направленной остеогенной индукции мезенхимальных стволовых клеток костного мозга крыс // Сибирский научный медицинский журнал. 2020. Т.40. №2. С. 47–55. <https://doi.org/10.15372/SSMJ20200206>.
20. Pawitan J.A. Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine // BioMed. Res. Int. 2014. No. 2014. P. 1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/965849>.
21. Sanchooli T., Norouziyan M., Ardashiryajimi A., Ghoreish S.K., Abdollahifar M.A., Nazarian H., Piryaei A. Adipose Derived Stem Cells Conditioned Media in Combination with Bioceramic Collagen Scaffolds Improved Calvarial Bone Healing in Hypothyroid Rats // Iran. Red. Crescent. Med. J. 2017. 19. P. e45516. <https://doi.org/10.5812/ircmj.45516>.
22. Кодунов А.М., Темнов А.А., Терещенко А.В., Трифаненкова И.Г., Склифас А.Н., Шацких А.В. Механизмы влияния кондиционированной среды культивированных стволовых клеток на развитие патологического ангиогенеза роговицы глаза в эксперименте // Патогенез. 2021. Т.19. №4. С. 41-52. <https://doi.org/10.25557/2310-0435.2021.04.41-52>.
- Nauchno-Issledovatel'skogo Konkursa = Best Theoretical and Applied Research 2023: Collection of articles from the International Research Competition. Penza, Nauka i Prosveshcheniye, 2023. P. 78-81 (In Russ.).
6. Khazamova A.I., Verigo E.N., Chentsova E.V. The Role of Corneal Microtrauma in the Development of Bacterial Ulcers. *Oftal'mologiya = Ophthalmology*. 2017;14;2:136–140 (In Russ.).
7. Samoylov A.S., Astrelina T.A., Akseenko A.V., Kobzeva I.V., Suchkova Yu.B. Application of Cellular Technologies for Thermal Burn Injuries of the Skin. *Saratovskiy Nauchno-Meditsinskiy Zhurnal = Saratov Scientific and Medical Journal*. 2019;15;4:999-1004 (In Russ.).
8. Khubutiya M.S., Vagabov A.V., Temnov A.A., Sklifas A.N. Paracrine Mechanisms of Anti-Inflammatory and Organoprotective Action during Mesenchymal Stem Cell Transplantation. Literature Review. *Transplantologiya = Transplantation*. 2014;1:20-32 (In Russ.).
9. Khubutiya M.S., Vagabov A.V., Temnov A.A., Sklifas A.N. Paracrine Mechanisms of Proliferative, Anti-Apoptotic and Anti-Inflammatory Effects of Mesenchymal Stromal Cells in Models of Acute Organ Injury. *Cytotherapy*. 2014;16;5:579-585. <https://doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.07.017>.
10. Plakhotniy M.A., Kodunov A.M., Gorina E.V., Boyarintsev V.V., Trofimenko A.V., Biryukov S.A., Filkov G.I. The Influence of Cultivation Conditions of Mesenchymal Stem Cells on their Viability During Transplantation into the Subretinal Space. *Biofizika = Biophysics*. 2020;65;6:1126-1134 (In Russ.). <https://doi.org/10.31857/S0006302920060125>.
11. Wu D., Chan K.E., Lim B.X.H., Lim D.K., Wong W.M., Chai C., Manotosh R., Lim C.H.L. Management of Corneal Neovascularization: Current and Emerging Therapeutic Approaches. *Indian J Ophthalmol*. 2024;72;3:354-371. https://doi.org/10.4103/IJO.IJO_3043_23
12. Oray M., Abu Samra K., Ebrahimiadib N., Meese H., Foster C.S. Long-Term Side Effects of Glucocorticoids. *Expert Opin Drug Saf*. 2016;15;4:457-465. <https://doi.org/10.1517/14740338.2016.1140743>.
13. Tu Y., Luo Y., Zhao Q., Zeng Y., Leng K., Zhu M. Role of Macrophage in Ocular Neovascularization. *Heliyon*. 2024;10;10:e30840. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e30840>.
14. Apte R.S., Chen D.S., Ferrara N. VEGF in Signaling and Disease: Beyond Discovery and Development. *Cell*. 2019;176;6:1248–1264. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.01.021>.
15. Ahmad A., Nawaz M.I. Molecular Mechanism of VEGF and its Role in Pathological Angiogenesis. *J Cell Biochem*. 2022;123;12:1938–1965. <https://doi.org/10.1002/jcb.30344>.
16. Han K.Y., Chang J.H., Lee H., Azar D.T. Proangiogenic Interactions of Vascular Endothelial MMP14 with VEGF Receptor 1 in VEGFA-Mediated Corneal Angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2016;57;7:3313–3322. <https://doi.org/10.1167/iovs.16-19420>.
17. Ebihara N., Matsuda A., Nakamura S., Matsuda H., Murakami A. Role of the IL-6 Classic- and Trans-Signaling Pathways in Corneal Sterile Inflammation and Wound Healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2011;52;12:8549–8557. <https://doi.org/10.1167/iovs.11-7956>.
18. Ye J., Yao K., Kim J.C. Mesenchymal Stem Cell Transplantation in a Rabbit Corneal Alkali Burn Model: Engraftment and Involvement in Wound Healing. *Eye (Lond)*. 2006;20;4:482-490. <https://doi.org/10.1038/sj.eye.6701913>.
19. Pokrovskaya L.A., Sherstoboev E.Yu., Nadezhdin S.V., Danilets M.G., Trofimova E.S., Ligacheva A.A., Churin A.A., Dubskaya T.Yu. Safety of Using a Conditioned Medium Obtained During Targeted Osteogenic Induction of Rat Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Sibirskiy Nauchnyy Meditsinskiy Zhurnal = Siberian Scientific Medical Journal*. 2020;40;2:47–55 (In Russ.). <https://doi.org/10.15372/SSMJ20200206>.
20. Pawitan J.A. Prospect of Stem Cell Conditioned Medium in Regenerative Medicine. *BioMed. Res. Int*. 2014;2014:1–14. <https://doi.org/10.1155/2014/965849>.
21. Sanchooli T., Norouziyan M., Ardashiryajimi A., Ghoreish S.K., Abdollahifar M.A., Nazarian H., Piryaei A. Adipose Derived Stem Cells Conditioned Media in Combination with Bioceramic Collagen Scaffolds Improved Calvarial Bone Healing in Hypothyroid Rats. *Iran. Red. Crescent. Med. J*. 2017;19: e45516. <https://doi.org/10.5812/ircmj.45516>.
22. Kodunov A.M., Temnov A.A., Tereshchenko A.V., Trifanenkova I.G., Sklifas A.N., Shatskikh A.V. Mechanisms of Influence of the Conditioned Medium of Cultured Stem Cells on the Development of Pathological Angiogenesis of the Cornea in Experiment. *Patogenez = Pathogenesis*. 2021;19;4:41-52 (In Russ.) <https://doi.org/10.25557/2310-0435.2021.04.41-52>.

Материал поступил в редакцию 11.09.24; статья принята после рецензирования 07.10.24; статья принята к публикации 05.12.24
The material was received 11.09.24; the article after peer review procedure 07.10.24; the Editorial Board accepted the article for publication 05.12.24