

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
АКТИВАТОРОВ РЕГЕНЕРАЦИИ ПРИ ПОСТЛУЧЕВОЙ КЕРАТОПАТИИ**

Д.В. Рындова¹, Г.Р. Семак², В.В. Громыко²

¹ - УЗ «11-я городская клиническая больница», г. Минск, Республика Беларусь

² - УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика
Беларусь

Кафедра глазных болезней

Научный руководитель - д.м.н., доцент Г.Р. Семак

Резюме. Постлучевая кератопатия является серьёзной проблемой офтальмологии, зачастую не поддающейся консервативному лечению. В данной работе представлено экспериментальное исследование влияния низкомолекулярного натрия гиалуроната и плазмы, обогащённой растворимыми факторами тромбоцитов, на рост и качество мезенхимальных стромальных клеток. Эксперимент проведён с целью определения наилучшего способа малоинвазивной нормализации регенерации роговицы при постлучевой кератопатии.

Ключевые слова: постлучевая кератопатия, натрия гиалуронат, плазма, обогащённая растворимыми факторами тромбоцитов.

**EXPERIMENTAL SUBSTANTIATION OF THE USE OF REGENERATION
ACTIVATORS IN POST-RADIATION KERATOPATHY**

D.V. Ryndova¹, G.R. Semak², V.V. Gromyko²

¹ - HI "11th City Clinical Hospital", Minsk, Republic of Belarus

² - IE "Belarusian State Medical University", Minsk, Republic of Belarus

Department of Eye Diseases

Scientific Supervisor - MD, Associate Professor G.R. Semak

Abstract. Post-radiation keratopathy is a serious problem in ophthalmology, often not amenable to conservative treatment. This paper presents an experimental study of the effect of low-molecular sodium hyaluronate and plasma enriched with soluble platelet factors on the growth and quality of stromal cells. The experiment was conducted to determine the best method for minimally invasive normalization of corneal regeneration in post-radiation keratopathy.

Keywords: post-radiation keratopathy, sodium hyaluronate, platelet rich plasma.

Введение. Лучевая терапия является одним из основных методов лечения онкологических заболеваний и приобретает всё большую актуальность в лечении опухолей головы и шеи. Данный вид противоопухолевой терапии обладает высокой эффективностью среди радиочувствительных опухолей, однако нередко приводит к негативным последствиям со стороны организма. Лучевые реакции отражаются в том числе и на глазной поверхности, где носят название постлучевой кератопатии (ПЛКП). Данное заболевание протекает в острой (точечный кератит) и хронической форме (рубцевание стромы роговицы и её отек) и крайне тяжело поддаётся лечению.

В основе ПЛКП лежит высокодозное облучение слёзной железы, что приводит к нарушению её функции и некрозу, а также радиационное воздействие на роговицу, вызывающее стойкое воспаление и дистрофию роговой оболочки. Также нередки проявления ПЛКП у пациентов с увеальной меланомой после протонной терапии, что вызвано уменьшением количества бокаловидных клеток и стромальным фиброзом роговицы [1-5].

ПЛКП вызывает тотальное помутнение роговицы, а также лизис вплоть до перфораций. Зачастую единственным способом излечить пациента от ПЛКП является проведение сквозной кератопластики, что носит особые риски у онкологических пациентов. Это придаёт особую актуальность изучению малоинвазивных методик с использованием активаторов регенерации для воздействия на роговицу у пациентов с ПЛКП.

Особая роль в восстановлении глазной поверхности отводится мезенхимальным стромальным клеткам (МСК), являющимся предшественниками лимбальных стромальных клеток, которые выстилают всю поверхность роговицы и участвуют в регенерации глазной поверхности. Однако для этого необходимо поддерживать их нормальное микроокружение.

Ранее была доказана высокая эффективность влияния 1%-низкомолекулярного натрия гиалуроната (1%-НМ-NaГ) на МСК в клеточном эксперименте (был доказан усиленный рост МСК, а также улучшение их качества и отсутствие пролиферации), а также получены положительные результаты в клинической практике у пациентов с ПЛКП. Было принято решение об изучении других активаторов регенерации с целью поиска наиболее эффективного.

Цель исследования: исследовать влияние плазмы, обогащённой растворимыми факторами тромбоцитов (ПОРФТ), на пролиферативную активность МСК для экспериментального обоснования использования активаторов регенерации при посттравматической кератопатии.

Материалы и методы. Для оценки влияния ПОРФТ на МСК по модели Г.Р. Семак [и др.] был воспроизведён клеточный эксперимент [6]. Для этого были *in vitro* культивированы МСК (первичное культивирование) 3-го пассажа из костного мозга человека на среде с добавлением ПОРФТ (0,05% в питательной среде), а также на стандартной среде. Клетки для культивирования были взяты из архива образцов МСК лаборатории биологии и генетики стволовых клеток Республиканского научно-практического центра трансфузиологии и медицинских биотехнологий Беларуси. Оценка результатов проводилась по количеству культивированных клеток и их морфологическим различиям. Результаты эксперимента с ПОРФТ сравнивались с результатами культивирования на стандартной среде и с полученным ранее результатом культивирования с 1%-НМ-NaГ. Достоверность эксперимента оценивалась при помощи Statistica 10.0. Оценка показателя достоверности p проводилась на основании критерия Манна-Уитни для малой выборки U .

Результаты. На 3-й день культивирования был выявлен активный рост на среде с добавлением ПОРФТ, значительно превышающий созревание МСК на стандартной среде (количество клеток на среде с ПОРФТ составило $141 \pm 4,24$, а на среде без ПОРФТ — $110,75 \pm 4,50$ ($p < 0,05$)). Морфологически клетки, культивированные в присутствии ПОРФТ приобретали более удлинённые и утолщённые псевдоподии, что свидетельствовало об их активном росте, а также отсутствовали клетки, отделившиеся от дна культурального флакона, что свидетельствует об отсутствии нежизнеспособных округлых клеток. Также результаты эксперимента с ПОРФТ были значительно лучше результатов культивирования МСК на среде с НМ-NaГ, где количество клеток составило $120,75 \pm 4,50$ ($p < 0,05$).

Важнейшим отличием стало выявленное в ходе эксперимента наличие пролиферативной активности клеток, культивированных на среде с добавлением ПОРФТ. Данный факт объясняется тем, что МСК относятся к нишевым клеткам. Это означает, что они могут быть предшественниками клеток любого типа (в том числе злокачественных). Применение ПОРФТ предполагает, помимо улучшения микроокружения клеток, именно активацию их роста и созревания. В это же время гиалуроновая кислота представляет из себя инертную физиологичную для организма человека молекулу, которая путём запуска каскада реакций смягчает процессы, влияющие на стабильное микроокружение клеток и тканей, но не активизирует их напрямую.

Обсуждение. Таким образом, клеточный эксперимент продемонстрировал способность

ПОРФТ за счёт богатого состава факторов активации способность поддержанию микроокружения МСК, способствуя их активному созреванию, однако наличие пролиферативной активности является серьёзным ограничением её применения для лечения воспалительных и дистрофических поражений роговицы у онкологических пациентов. Эксперимент показал, что в настоящее время именно гиалуронат натрия потенциально является оптимальным методом лечения ПЛКП.

Выводы. Вследствие того, что гиалуроновая кислота является важнейшей частью благополучного микроокружения МСК и обеспечивает их восстановление без усиления пролиферации, именно она по итогам эксперимента потенциально является оптимальным способом нормализации регенерации глазной поверхности у онкологических пациентов с ПЛКП. Вследствие пролиферативного эффекта ПОРФТ применение данного препарата в настоящее время ограничено у изучаемой группы пациентов и требует дальнейшего исследования.

Список литературы

1. Gore, S.K. Corneal complications after orbital radiotherapy for primary epithelial malignancies of the lacrimal gland / Gore S.K., Plowman N.P., Dharmasena A., Verity D.H., Rose G.E. // Br J Ophthalmol. – 2018. – Vol. 3, No.7. – P. 882-884.
2. Stephens, L.C. Acute Radiation Injury of Ocular Adnexa / Stephens L.C., Schultheiss T.E., Peters L.J., Ang K.K., Gray K.N.// Arch Ophthalmol. – 1988. – Vol. 3, № 3. – P. 389 – 391.
3. Parsons, J.T. Response of the normal eye to high dose radiotherapy / Parsons J.T., Bova F.J., Mendenhall W.M., Million R.R., Fitzgerald C.R. // Oncology (Williston Park). – 1996. – Vol. 11, №. 6. – P. 837 – 847.
4. Harris, D.L. A Novel Murine Model of Radiation Keratopathy / Harris D.L., Yamaguchi T., Hamrah P. // Invest Ophthalmol. – 2018. – Vol. 7, №10. – P. 3889-3896.
5. Zemba, M. Ocular Complications of Radiotherapy in Uveal Melanoma. / Zemba M., Dumitrescu O.M., Gheorghe A.G., Radu M., Ionescu M.A., Vatafu A., Dinu V. // Cancers (Basel). – 2023. - Vol. 16, № 2. – P. 333 – 348.
6. Влияние плазмы человека, обогащенной растворимыми факторами тромбоцитов, на мезенхимальные стромальные/стволовые клетки *in vitro* / Г.Р. Семак, А.В. Сментина, М.П. Потапнев, Д.В. Рындова // Актуальные вопросы в офтальмологии: Сб. материалов XV Респ. конф. (с междунар. участием), Минск, 9 – 10 дек. 2022 г. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь, Белорус. мед. акад. последиплом. образования; под общ. ред. Т.А. Имшенецкой. – Минск, 2022. – С. 171-172.