

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc241223>

# Сравнительный анализ регенераторного потенциала производных крови на клеточной модели повреждения стромы роговицы

А.М. Суббот, Е.А. Каспарова, Д.А. Криволапова

Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова, Москва, Российская Федерация

## АННОТАЦИЯ

**Обоснование.** Препараты на основе производных крови содержат вещества, способствующие ускоренному заживлению раневых дефектов. В настоящее время накоплены данные о том, что различные дериваты крови по-разному влияют на процессы регенерации. В связи с этим актуально сравнительное изучение воздействия нескольких типов таких препаратов на клеточную культуру стромы роговицы.

**Цель исследования** — оценка влияния трёх различных дериватов крови на процессы пролиферации, миграции и клеточной гибели кератоцитов *in vitro*.

**Материал и методы.** Данное исследование проведено на первичной клеточной культуре кератоцитов роговицы человека. Образцы крови получали из локтевой вены здоровых добровольцев после подписания информированного согласия на участие в исследовании. Выполняли тест на заращивание раны монослоя, формазановый тест для оценки пролиферации, окрашивание на Annexin V для оценки процессов апоптоза и некроза, а также тестировали действие богатой тромбоцитами плазмы, интактной сыворотки и процессированной сыворотки.

**Результаты.** Установлено, что все 3 стимулятора оказывают положительное влияние на регенерацию экспериментального стромального дефекта, однако реализуется оно разными путями. Процессированная сыворотка показала наибольшее стимулирующее влияние на миграцию клеток. Данная сыворотка снижала уровень клеточной гибели, однако на процессы пролиферации практически не влияла. Целесообразно дальнейшее изучение разных типов стимуляторов для получения процессированной сыворотки. Интактная сыворотка сильнее остальных увеличивала процент делящихся клеток, но также пропорционально увеличивала процент их гибели в культуре. Богатая тромбоцитами плазма показала самое слабое влияние на миграционную способность кератоцитов, но всё же установлено статистически значимое отличие от контроля. На процесс деления клеток этот стимулятор влиял незначительно, на общий уровень клеточной гибели вообще не оказывал влияния.

**Заключение.** Данные эксперимента можно учитывать при выборе тактики лечения, чтобы применять дериваты крови персонализированно: например, назначать одни для ускорения регенерации, а другие — с целью снижения гибели клеток.

**Ключевые слова:** строма роговицы; кератоциты; сыворотка; полиА:У; богатая тромбоцитами плазма; клеточная культура; факторы роста.

## Как цитировать:

Суббот А.М., Каспарова Е.А., Криволапова Д.А. Сравнительный анализ регенераторного потенциала производных крови на клеточной модели повреждения стромы роговицы // Гены и клетки. 2023. Т. 18, № 2. С. 145–153. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc241223>

DOI: <https://doi.org/10.23868/gc241223>

# Comparative analysis of the regenerative potential of blood derivatives on a cell model of corneal stromal injury

Anastasija M. Subbot, Evgenia A. Kasparova, Diana A. Krivolapova

M.M. Krasnov Research Institute of Eye Diseases, Moscow, Russian Federation

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Agents based on blood derivatives contain substances that accelerate the healing of wound defects. Nowadays data have been accumulated that various blood derivatives have different effects on regeneration processes. Therefore, a comparative study of the effect of several types of such preparations on the corneal stroma's cell culture is relevant.

**AIM:** Impact assessment of 3 different blood derivatives on the processes of proliferation, migration and cell death of keratocytes *in vitro*.

**MATERIAL AND METHODS:** This study was conducted on a primary cell culture of human corneal keratocytes. Blood samples were obtained from the cubital vein of healthy volunteers after signing informed consent to participate in the study. Monolayer wound healing test, formazan test to assess proliferation, staining for Annexin V to assess the processes of apoptosis and necrosis were performed. Moreover, effect evaluation of platelet-rich plasma, intact serum and processed serum were performed.

**RESULTS:** It was shown that all 3 stimulants have a positive effect on the regeneration of the experimental stromal defect, but it is implemented in different ways. Processed whey showed the greatest stimulating effect on the process of cell migration. This serum reduced the level of cell death, but had almost no effect on proliferation processes. It is advisable to further study different types of stimulants to obtain processed serum. Intact serum increased the percentage of dividing cells more than others, but also proportionally increased the percentage of death in culture. Platelet-rich plasma showed the weakest effect on the migratory ability of keratocytes, but it still differed significantly from the control. This stimulator had little effect on the process of cell division, and had no effect on the overall level of cell death.

**CONCLUSION:** Experimental data can be taken into account in choosing of the management in clinical practice and personalized usage of blood derivatives, specifically in prescribing some blood derivatives to accelerate regeneration, and other derivatives for reducing cell death's processes.

**Keywords:** corneal stroma; keratocytes; serum; polyA:U; platelet-rich plasma; cell culture; growth factors.

## To cite this article:

Subbot AM, Kasparova EA, Krivolapova DA. Comparative analysis of the regenerative potential of blood derivatives on a cell model of corneal stromal injury. *Genes & cells*. 2023;18(2):145–153. DOI: <https://doi.org/10.23868/gc241223>

Received: 02.02.2023

Accepted: 03.06.2023

Published: 02.07.2023

## ВВЕДЕНИЕ

Помутнение роговицы занимает 5-е место среди ведущих причин слепоты во всём мире (3,2% всех случаев) [1]. Любое серьёзное повреждение роговицы с вовлечением её стромы (травмы, инфекции, дегенерации) может привести к помутнению роговицы, формированию лейкомы и, как следствие, к понижению остроты зрения. 5% случаев слепоты могут быть связаны с травмой глаза и вызванной ею инфекцией, при этом одной из самых распространённых причин является инфекционный кератит [2, 3]. Строма — самый «массивный» из слоёв роговицы. «Активная» её часть состоит из кератоцитов — клеток мезенхимального происхождения с функцией производства компонентов стромы (коллагена и гликозаминогликанов). Упорядоченность и определённое соотношение этих компонентов обуславливают поддержание прозрачности роговицы [4]. Ранее считалось, что кератоциты никак не реагируют на травму эпителия роговицы, однако в некоторых работах при гистологическом исследовании ткани отмечено отсутствие кератоцитов в локализации после соскоба эпителия [5]. Позже было показано, что повреждение эпителия роговицы и проникновение цитокинов через повреждённую боуменову мембрану запускает апоптоз кератоцитов в передних слоях стромы [6]. J. Zieske и соавт. [7] сообщили о том, что кератоциты в задних слоях стромы, окружающих бесклеточную зону повреждения, начинают пролиферировать через 12–24 ч после травмы. Таким образом, строма не является пассивным элементом, а активно реагирует и вовлекается в процессы регенерации, даже если в ней не происходит потери вещества ткани. При повреждении же стромы роговицы (травма, воспаление, расплавление), в результате которого происходит потеря объёма ткани, для эффективного восстановления повреждённой области фибробласты, прилегающие к ней, должны размножиться и мигрировать, чтобы восстановить объём ткани [8]. Заживление дефектов роговицы является результатом комплекса активных клеточных и внеклеточных процессов, регулируемых цитокинами и факторами роста [9]. Если объём повреждения слишком велик или есть отягощающие факторы (инфекция), то заживление может не происходить совсем или происходить не полностью. Исходя из вышесказанного, актуальна разработка способов стимуляции регенерации и процессов заживления, особенно в тех случаях, когда дефект толерантен к стандартным консервативным методам лечения.

В последние годы аутологичную сыворотку, богатую тромбоцитами плазму (БоТП, англ. platelet rich plasma, PRP), а также плазму, обогащённую факторами роста, и лизат тромбоцитов широко используют в виде глазных капель для лечения ряда заболеваний поверхности глаза, таких как синдром сухого глаза, эрозии различной этиологии и язвы роговицы [10]. Благоприятный

эффект, получаемый при использовании препаратов крови в виде глазных капель, по всей вероятности, связан с их высокой биосовместимостью, биофизическими свойствами, которые аналогичны слезе, включая pH, осмолярность, противомикробное и противовоспалительное действие [11–13]. Аутологичная сыворотка крови — одна из самых простых технически выполнимых форм получения активного деривата крови, и отчасти поэтому именно она наиболее распространена для терапевтического применения. Трендом последних лет является применение более «концентрированных» субстанций, получаемых путём сбора фракции крови, богатой тромбоцитами. Они позволяют в малом объёме создать высокую концентрацию активных веществ, способствующих регенерации. К числу наиболее изученных компонентов относятся эпидермальный фактор роста (EGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста- $\beta$ 1,2 (TGF- $\beta$ 1,2) и инсулиноподобный фактор роста-I (IGF-I).

И сыворотку, и тромбоконцентраты получают без добавления каких бы то ни было фармакологических субстанций. Активация процессов высвобождения ростовых факторов и цитокинов опосредуется окружающими физико-химическими условиями, приводящими к запуску каскада свёртывания крови и дегрануляции тромбоцитов.

В то же время получать дериваты крови с «управляемым» составом возможно. Ведь находящиеся в циркуляции лейкоциты синтетически активны. Добавляя к ним активное вещество, воздействующее, например, на систему защиты от патогенов (толл-подобные рецепторы), можно «настраивать» вырабатываемый лейкоцитами «коктейль» цитокинов для противовирусной/антибактериальной/антигрибковой защиты. Примером такого «модифицированного» деривата крови может служить процессированная аутологичная сыворотка (ПАС), при получении которой к клеткам крови добавляют мимикрирующий под вирусную РНК комплекс полиадениловой-полиуридиновой кислот, являющийся лигандом толл-подобных рецепторов 3-го типа. Получаемый в результате такой обработки дериват крови имеет цитокиновый состав, отличный от интактной сыворотки и плазмы крови. В нём повышено содержание цитокинов, работающих на «первой линии защиты» от патогенов, — ИЛ-1, -6, -8, ФНО- $\alpha$ , ИФ- $\alpha$ .

Опыт применения препаратов крови в различных сферах медицины показывает ускорение процессов восстановления тканей и заживления ран при их воздействии [14, 15]. Очевидно, что эффект таких комплексных препаратов не может быть опосредован через один определённый фактор, а служит результатом всех вовлечённых механизмов — пролиферации, миграции, гибели и дифференцировки клеток [16]. В связи с этим возникает необходимость изучить влияние препаратов крови как стимуляторов этих видов клеточной деятельности.

**Цель исследования** — анализ влияния различных типов дериватов крови на способность клеточной культуры кератоцитов к пролиферации и миграции клеток, а также оценка клеточной гибели.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

### Получение дериватов крови

Кровь забирали из локтевой вены здоровых добровольцев после подписания информированного согласия на участие в исследовании. Для получения сыворотки 9 мл цельной крови забирали в пробирку без антикоагулянта, после свёртывания крови в течение 2 ч при комнатной температуре и последующего центрифугирования в режиме 1000 g в течение 15 мин (центрифуга фирмы ELMi CM-6M, Латвия) собирали бесклеточную часть.

Для получения PRP кровь забирали в пробирку с 3,8% цитратом натрия (VACUETTE; Greiner Bio-One, Австрия), после двукратного центрифугирования (первое — 900 g в течение 5 мин, затем сбор плазмы и второе — 1500 g в течение 10 мин) верхние 2/3 супернатанта убрали, оставляя нижнюю треть — PRP.

Процессированную аутологичную сыворотку получали, забирая 8 мл цельной крови из локтевой вены в пробирку с раствором полиА:У (препарат Полудан®, ООО «Верофарм», РФ) (2 ампулы на 2 мл воды для инъекций). После инкубации в течение 3 ч при 37 °C и последующего центрифугирования в режиме 1000 g в течение 15 мин собирали надосадок.

### Получение клеточной культуры и её характеристика

Первичная клеточная культура кератоцитов роговицы человека взята из кадаверного материала (корнеосклерального кольца, не востребованного в ходе кератопластики) эксплантным методом. Материал в виде корнеосклеральных лоскутов получали из глазного банка ФГБНУ «Научно-исследовательский институт глазных болезней имени М.М. Краснова». Исследование одобрено на заседании локального этического комитета от 08.07.2021 г., протокол № 79/2. Центральная роговичная часть консервированного в среде Борзенка–Мороз корнеосклерального лоскута была пересажена реципиенту, а периферическая часть — использована в эксперименте. Фрагменты лимбальной зоны располагались на поверхности культурального пластика в капле сыворотки, через сутки добавляли питательную среду. Через неделю наблюдали выход клеток из экспланта. По достижении конfluence клетки пассировали в соотношении 1:3. Клетки выращивали на среде RPMI-1640 (Gibco, США) с 10% фетальной бычьей сывороткой (HyClone, США), 2 mM глутамина, раствором антибиотиков/антимикотика (Gibco, США) в стандартных условиях

(37 °C, 5% CO<sub>2</sub> и 100% влажности). Смену среды осуществляли раз в 2–3 дня.

Наблюдение за ростом клеток проводили с помощью микроскопа AxioVert A1 (Carl Zeiss, Германия). В исследовании использовали клетки 3-го пассажа. Перед оценкой регенераторного потенциала производных крови выполняли суточную депривацию по сыворотке. Контрольную группу составили клетки, культивированные без воздействия дериватов крови как стимулятора клеточной деятельности, т.е. в «пустой» среде.

### Анализ миграции клеток

Для исследования влияния стимуляторов на миграцию клеток провели тест на заращивание раны монослоя. С этой целью клетки рассеивали на 24-луночные планшеты в плотности 30 тыс./см<sup>2</sup> за сутки до исследования, после чего на дно, покрытое слоем клеток, наносили дозированную (одинаковую во всех лунках) «царапину» носиком пипетки. После этого лунки промывали и вносили среду со стимуляторами. Доля стимуляторов составляла 10%. Динамику заживления — площадь «раны» (бесклеточную зону) — оценивали в программе ImageJ после ручной обводки на изображениях, полученных с микроскопа AxioVert A1 на фотокамеру Canon 600D (Canon, Япония) через 6, 17 и 24 ч после внесения стимуляторов. Исследования проводили в триплетных повторах.

### Оценка метаболической активности клеток

Для исследования влияния стимуляторов на активность клеточных процессов выполнен колориметрический формазановый MTS-тест, отражающий уровень метаболической активности исследуемых клеток, в ходе которого живые активные клетки переводят неокрашенный реактив CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay (Promega, США) в окрашенную форму. Таким образом, светопропускание в лунке планшета пропорционально количеству живых активных клеток в ней. Для этого теста клетки высевали в лунки 96-луночного планшета за сутки до тестирования в концентрации 10 тыс./см<sup>2</sup>. Стимулятор добавляли в концентрации 10% от объёма среды. Анализ выполняли через 24 ч. Коэффициент пропускания измеряли на фотометре Muliscan-FC (Thermo Fisher Scientific, США) при длине волны 492 нм. Все исследования выполнены в четырёх повторах.

### Анализ митотической активности

Оценку митотической активности выполняли с помощью иммуноцитохимического окрашивания после формалиновой фиксации клеток, засеянных на чашки с вставками для микроскопии (SPL, Корея) на белок-маркёр пролиферации Ki-67, моноклональными антителами (Ki-67 Monoclonal Antibody (20Raj1; eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, US) в разведении 1:200, в условиях инкубации в течение 2 ч при комнатной температуре. Проведены иммуноцитохимическое

окрашивание вторичными антителами Goat anti-Mouse IgG Alexa Fluor 594 (Invitrogen, США) в разведении 1:1000 и инкубация в течение 2 ч при комнатной температуре. Докрашивание ядер осуществляли красителем Hoechst 33342 (Invitrogen, США) в концентрации 1 мкг/мл. Было просчитано 10 полей зрения в каждой группе (от 500 до 1500 клеток).

### Оценка клеточной гибели

Для оценки апоптоза и некроза в культуре клеток использовали набор ApoDETECT Annexin V-FITC (Invitrogen, США). Отбирали каплю (10 мкл) окрашенной клеточной суспензии и переносили на предметное стекло. Анализ окрашенных клеток выполняли с помощью микроскопии в тёмном поле с длиной возбуждения флуоресценции 450–490 нм и эмиссии 515 для регистрации сигнала FITC, для PI длина возбуждения составляла 548 нм, эмиссии — 590 нм. Было просчитано 5 полей зрения в каждой группе (от 500 до 2000 клеток).

### Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 5. Критерий Манна–Уитни использовали для попарного сравнения групп при уровне значимости  $p < 0,05$ . Для множественного сравнения применяли дисперсионный анализ.

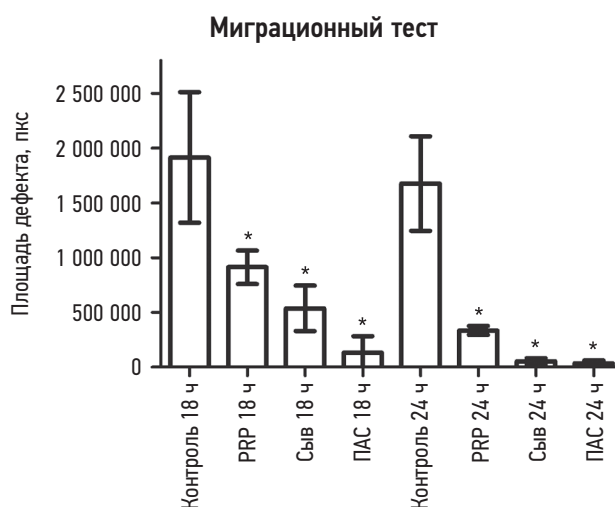
## РЕЗУЛЬТАТЫ

Тест на закрытие раны монослоя продемонстрировал, что все три стимулятора способствуют ускорению процесса закрытия оголённой поверхности. Уже через 18 ч свободная площадь в группах со стимуляцией статистически значимо сократилась. При этом наибольшие темпы зарастивания продемонстрировали образцы, стимулированные ПАС, чуть меньше — сыворотка и затем — PRP (рис. 1).

Такая же тенденция сохранилась и через сутки, когда в образцах, стимулированных ПАС и сывороткой, экспериментальная рана закрылась полностью.

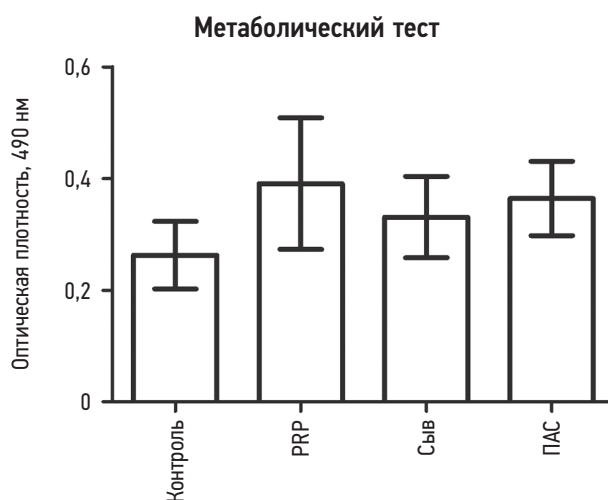
Тест на метаболическую активность не выявил значимых различий между группами с различными стимуляторами (рис. 2). Хотя средние значения в группах после воздействия дериватов крови были выше, чем в контрольной, статистические критерии не показывают наличия различий. Вероятно, для развития значимого эффекта требуется больше времени, чем 24 ч.

Анализ влияния стимуляторов на экспрессию белка-маркера пролиферативной активности Ki-67 выявил следующую тенденцию: контрольная культура была полностью отрицательна по этому параметру (рис. 3). Установлено также, что из стимуляторов наибольшим эффектом по стимуляции включения в пролиферативный цикл обладает сыворотка (детектировано 2,6% клеток,



**Рис. 1.** Графическое отображение динамики «закрытия» экспериментальной раны,  $M \pm \sigma$ ; \* статистически значимые различия с контролем. PRP — богатая тромбоцитами плазма, Сыв — интактная сыворотка, ПАС — процессированная аутологичная сыворотка.

**Fig. 1.** Graphical dynamics of the experimental wound's "closure",  $M \pm \sigma$ ; \* significant differences with control. Контроль — control, PRP — platelet rich plasma, Сыв — intact serum, ПАС — processed autologous serum.



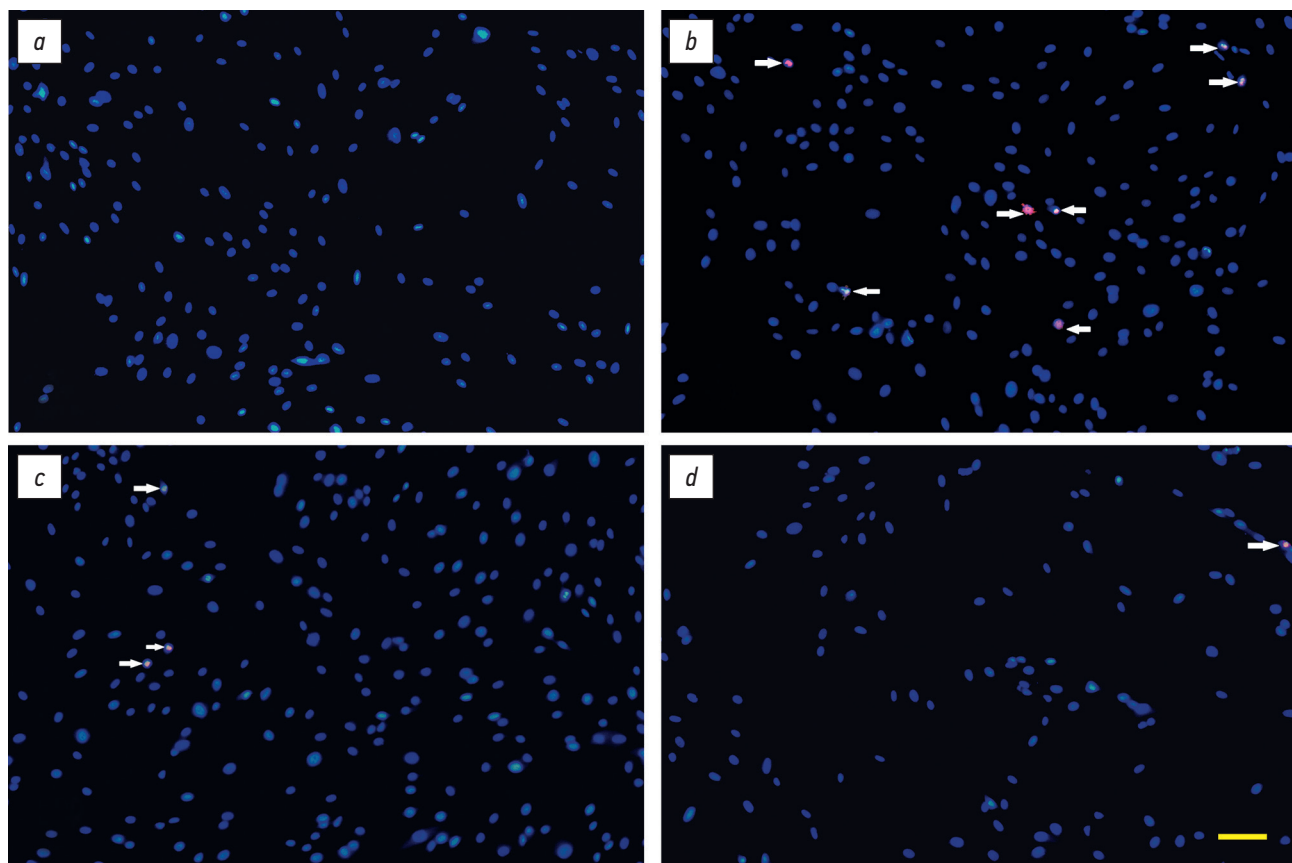
**Рис. 2.** Графическое отображение влияния производных крови на метаболическую активность кератоцитов,  $M \pm \sigma$ . PRP — богатая тромбоцитами плазма, Сыв — интактная сыворотка, ПАС — процессированная аутологичная сыворотка.

**Fig. 2.** Graph of the influence of blood derivatives on the metabolic activity of keratocytes.  $M \pm \sigma$ . Контроль — control, PRP — platelet rich plasma, Сыв — intact serum, ПАС — processed autologous serum.

положительных на Ki-67). Чуть меньшие цифры продемонстрировала PRP — 1,9%. При стимуляции ПАС лишь 0,6% клеток оказались положительными.

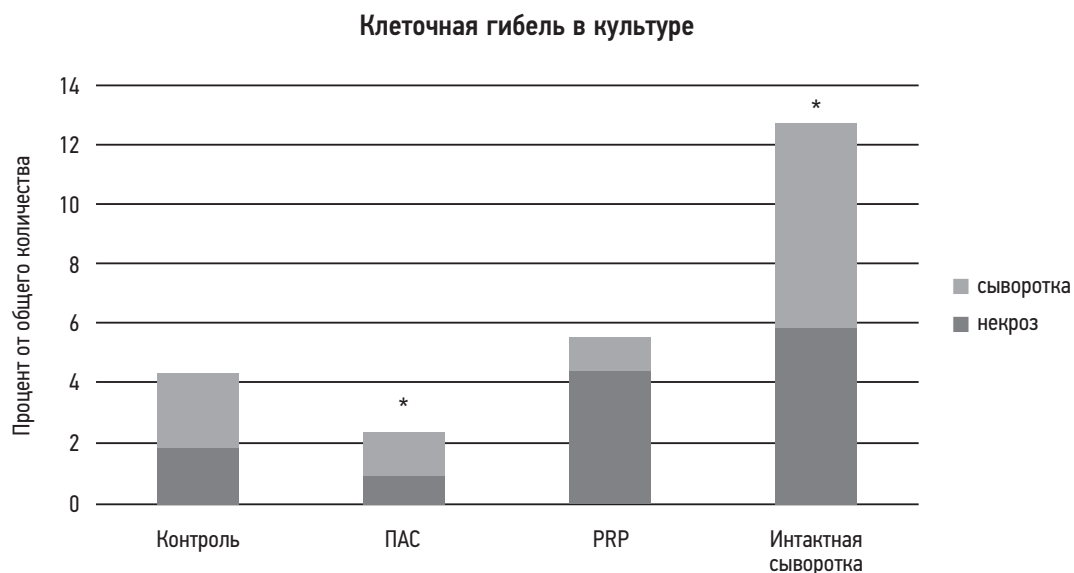
Уровень клеточной гибели после экспозиции кератоцитов с дериватами крови значимо увеличивался по сравнению с контролем только в группе, стимулированной сывороткой, и составил 12,8% (рис. 4). При этом





**Рис. 3.** Репрезентативные поля зрения при окрашивании монослоя кератоцитов на белок Ki-67 (розовый канал); синий канал — окрашивание ядер Hoechst 33342. Стрелками обозначены Ki-67-позитивные клетки в процессе подготовки к делению: *a* — контроль; *b* — после внесения сыворотки; *c* — после внесения PRP; *d* — после внесения ПАС. Бар — 100 мкм.

**Fig. 3.** Representative fields of view when staining a monolayer of keratocytes for Ki-67 protein (pink channel), blue channel staining for Hoechst 33342 nuclei. Arrows indicate Ki-67 positive cells in preparation for division: *a* — control; *b* — after addition of serum; *c* — after PRP application; *d* — after the addition of PAS. The scale bar is 100  $\mu\text{m}$ .



**Рис. 4.** Графическое отображение доли погибших кератоцитов при стимуляции производными крови и в контроле; \* статистически значимые различия с группой контроля. PRP — богатая тромбоцитами плазма, ПАС — процессированная аутологичная сыворотка.

**Fig. 4.** Graph of the proportion of dead keratocytes during stimulation with blood derivatives and in control; \* significant differences with the control group. Контроль — control, PRP — platelet rich plasma, сыворотка — intact serum, ПАС — processed autologous serum.

некротическая гибель зафиксирована в 5,9%, апоптотическая — в 6,9% случаев. После экспозиции с PRP апоптотическая гибель была зафиксирована даже в меньшем проценте случаев, чем в контроле, и составила 1,1%, однако уровень некроза был высоким (4,4%) и суммарный показатель клеточной гибели в этой группе не отличался от контрольной (5,5%). При воздействии ПАС уровень детектированной клеточной гибели был статистически значимо ниже, чем в контрольной группе, и составил 2,4% (1,5% гибель путём апоптоза, 0,9% — некроза) по сравнению с 4,3% в контроле (2,5 и 1,8% соответственно).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Полученные данные свидетельствуют об общем положительном влиянии дериватов крови на регенерацию в культуре кератоцитов. Очевидно также и то, что их эффект реализуется через разные механизмы — сыворотка является наиболее «мощным» активатором деления, активно стимулирует миграцию, однако при этом увеличивает уровень гибели клеток. ПАС максимально активирует миграционные способности клеток, уменьшая при этом уровень некроза и апоптоза и незначительно стимулируя деление. Возможно, что миграционная активность кератоцитов усиливается из-за высокого содержания в ПАС ИЛ-8, чья функция — привлечение миграционно-активных клеток [17]. Наблюдающийся эффект ПАС по снижению уровня гибели клеток согласуется с ранее опубликованными данными о влиянии полиА:У на выживаемость лейкоцитов [18].

По всей вероятности, использование для стимуляции клеток и приготовления процессированного деривата крови другого стимулятора — лиганда других типов толл-рецепторов (например, 2-го и 4-го типов, ответственных за защиту от бактерий) — дало бы иные эффекты. Этот факт является предметом дальнейшего изучения.

Богатая тромбоцитами плазма занимает промежуточное место по уровню стимуляции деления и в меньшей степени, чем остальные дериваты, стимулирует миграцию, однако снижает уровень апоптоза в культуре. Некротическая гибель при этом увеличивается, оставляя общие цифры гибели на уровне контроля.

Похожая вариативность эффектов между различными дериватами крови описана и другими авторами. Так, при сравнении эффекта тромбоцитарного лизата и бычьей фетальной сыворотки на клетки стромы роговицы зарегистрировано большее увеличение пролиферации и экспрессии Ki-67 после применения лизата тромбоцитов по сравнению с фетальной сывороткой [19]. В другой работе отмечено более значимое усиление пролиферации и миграции стромальных клеток после стимуляции PRP по сравнению с сывороткой [20]. Следует отметить, что в настоящей работе наблюдали обратную тенденцию: эффект сыворотки был более выражен по сравнению

с PRP. Возможно, различия обусловлены разной методикой постановки эксперимента и степенью обогащения тромбоконцентрата.

Ранее было показано, что PRP снижает уровень апоптоза в культурах стромальных клеток по сравнению с контрольной группой уже через 4 ч экспозиции и эффект сохраняется до 3–5 дней [21]. Результаты, полученные в представленном исследовании, согласуются с этими данными.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дериваты крови положительно влияют на регенерацию экспериментального стромального дефекта. Препараты на основе сыворотки обладают более выраженным стимулирующим миграцию действием, чем тромбоконцентрат. Деление клеток сильнее всего активизируется сывороткой. Наименьший процент гибели клеток наблюдается в группе с процессированной сывороткой.

Целесообразны дальнейшие исследования для изучения различий в воздействии каждого из дериватов крови на процессы, вовлечённые в регенерацию стромы, апробирование различных типов стимуляторов регенерации на основе препаратов крови для их патогенетически ориентированного использования. К примеру, при поверхностных изъязвлениях быстрая миграция кератоцитов в область дефекта (стимулированная препаратами сыворотки) будет ускорять заживление, а повышенный уровень клеточной гибели не позволит развиваться фиброзу за счёт элиминации миофибробластов. В случае же инфекционного процесса с потерей значительного объёма вещества роговицы более целесообразно применять стимуляторы с антиапоптотическим действием — процессированную аутологичную сыворотку и обогащённую тромбоцитами плазму.

## ДОПОЛНИТЕЛЬНО

**Источник финансирования.** Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

**Конфликт интересов.** Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

**Вклад авторов.** Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: А.М. Суббот — дизайн исследования, экспериментальные процедуры, анализ полученных результатов, сбор и анализ литературных источников, подготовка и написание текста статьи; Е.А. Каспарова — разработка дизайна исследования, сбор экспериментального материала, экспериментальные

процедуры, написание и редактирование текста статьи; Д.А. Криволапова — обзор литературы, сбор экспериментального материала, сбор и анализ литературных источников, написание текста и редактирование статьи.

## ADDITIONAL INFORMATION

**Funding source.** This study was not supported by any external sources of funding.

**Competing interests.** The authors declare that they have no competing interests.

**Authors' contribution.** All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors

have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication). The author contribution is distributed as follows: A.M. Subbot — development of research design, experimental procedures, analysis of experimental data, collection and analysis of literary sources, preparation and writing of the text of the article; E.A. Kasparova — development of research design, collection of experimental materials, experimental procedures, writing and editing the text of the article; D.A. Krivolapova — literature review, collection of experimental material, collection and analysis of literary sources, writing the text and editing the article.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Wang E.Y., Kong X., Wolle M., et al. Global trends in blindness and vision impairment resulting from corneal opacity 1984–2020: a meta-analysis // *Ophthalmology*. 2023. P. S0161–6420(23)00187-2. doi: 10.1016/j.ophtha.2023.03.012
2. Ung L., Bispo P., Shanbhag S., et al. The persistent dilemma of microbial keratitis: Global burden, diagnosis, and antimicrobial resistance // *Surv Ophthalmol*. 2019. Vol. 64, N 3. P. 255–271. doi: 10.1016/j.survophthal.2018.12.003
3. Ting D., Ho C., Cairns J. et al. 12-year analysis of incidence, microbiological profiles and in vitro antimicrobial susceptibility of infectious keratitis: the Nottingham Infectious Keratitis Study // *Br J Ophthalmol*. 2020. Vol. 105, N 3. P. 328–333. doi: 10.1136/bjophthalmol-2020-316128
4. Ligocki A.J., Fury W., Gutierrez C., et al. Molecular characteristics and spatial distribution of adult human corneal cell subtypes // *Sci Rep*. 2021. Vol. 11, N 1. P. 16323. doi: 10.1038/s41598-021-94933-8
5. Campos M., Szerenyi K., Lee M., et al. Keratocyte loss after corneal deepithelialization in primates and rabbits // *Arch Ophthalmol*. 1994. Vol. 112, N 2. P. 254. doi: 10.1001/archophth.1994.01090140130034
6. Wilson S., He Y., Weng J., et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing // *Exp Eye Res*. 1996. Vol. 62, N 4. P. 325–338. doi: 10.1006/exer.1996.0038
7. Zieske J., Guimarães S., Hutcheon A. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement // *Exp Eye Res*. 2001. Vol. 72, N 1. P. 33–39. doi: 10.1006/exer.2000.0926
8. Fini M.E., Stramer B.M. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes // *Cornea*. 2005. Vol. 24, N 8 Suppl. P. S2–S11. doi: 10.1097/01.ico.0000178743.06340.2c
9. Klenkler B., Sheardown H., Jones L. Growth factors in the tear film: role in tissue maintenance, wound healing, and ocular pathology // *Ocul Surf*. 2007. Vol. 5, N 3. P. 228–239. doi: 10.1016/s1542-0124(12)70613-4
10. Anitua E., de la Sen-Corcuera B., Orive G., et al. Progress in the use of plasma rich in growth factors in ophthalmology: from ocular surface to ocular fundus // *Expert Opin Biol Ther*. 2022. Vol. 22, N 1. P. 31–45. doi: 10.1080/14712598.2021.1945030
11. Anitua E., Alonso R., Girbau C., et al. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF®-Endoret®) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains // *Clin Exp Dermatol*. 2012. Vol. 37, N 6. P. 652–657. doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04303.x
12. Anitua E., Muruzabal F., de la Fuente M., et al. PRGF exerts more potent proliferative and anti-inflammatory effects than autologous serum on a cell culture inflammatory model // *Exp Eye Res*. 2016. Vol. 151. P. 115–121. doi: 10.1016/j.exer.2016.08.012
13. Sanchez-Avila R.M., Merayo-Llodes J., Riestra A.C., et al. The effect of immunologically safe plasma rich in growth factor eye drops in patients with Sjögren syndrome // *J Ocul Pharmacol Ther*. 2017. Vol. 33, N 5. P. 391–399. doi: 10.1089/jop.2016.0166
14. Foster T.E., Puskas B.L., Mandelbaum B.R., et al. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications // *Am J Sports Med*. 2009. Vol. 37, N 11. P. 2259–2272. doi: 10.1177/0363546509349921
15. Park Y.B., Kim J.H., Ha C.W., Lee D.H. Clinical efficacy of platelet-rich plasma injection and its association with growth factors in the treatment of mild to moderate knee osteoarthritis: a randomized double-blind controlled clinical trial as compared with hyaluronic acid // *Am J Sports Med*. 2021. Vol. 49, N 2. P. 487–496. doi: 10.1177/0363546520986867
16. Wilson S.E. Corneal wound healing // *Exp Eye Res*. 2020. Vol. 197. P. 108089. doi: 10.1016/j.exer.2020.108089
17. Каспаров А.А., Каспарова Евг.А., Фадеева Л.Л., и др. Персонализированная клеточная терапия ранней буллезной кератопатии (экспериментальное обоснование и клинические результаты) // *Вестник офтальмологии*. 2013. Т.129, № 5. С. 53–61.
18. Ковальчук Л.В., Павлюк А.С., Каспаров А.А., и др. Анализ фармакологических средств на модели апоптоза лимфоцитов человека *in vitro* в норме и при иммунопатологии // *Аллергология и иммунология*. 2000. № 1. С. 24–30.
19. Seidemann N., Duarte Campos D.F., Rohde M., et al. Human platelet lysate as a replacement for fetal bovine serum in human corneal stromal keratocyte and fibroblast culture // *J Cell Mol Med*. 2021. Vol. 25, N 20. P. 9647–9659. doi: 10.1111/jcmm.16912
20. Anitua E., de la Fuente M., Muruzabal F., et al. Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts // *Exp Eye Res*. 2015. Vol. 135. P. 118–126. doi: 10.1016/j.exer.2015.02.016
21. Koulikovska M., Szymanowski O., Lagali N., Fagerholm P. Platelet-rich plasma prolongs myofibroblast accumulation in corneal stroma with incisional wound // *Curr Eye Res*. 2015. Vol. 40, N 11. P. 1102–1110. doi: 10.3109/02713683.2014.978478



## REFERENCES

1. Wang EY, Kong X, Wolle M, et al. Global trends in blindness and vision impairment resulting from corneal opacity 1984–2020: a meta-analysis. *Ophthalmology*. 2023;S0161-6420(23)00187-2. doi: 10.1016/j.ophtha.2023.03.012
2. Ung L, Bispo P, Shanbhag S, et al. The persistent dilemma of microbial keratitis: Global burden, diagnosis, and antimicrobial resistance. *Surv Ophthalmol*. 2019;64(3):255–271. doi: 10.1016/j.survophthal.2018.12.003
3. Ting D, Ho C, Cairns J, et al. 12-year analysis of incidence, microbiological profiles and in vitro antimicrobial susceptibility of infectious keratitis: the Nottingham Infectious Keratitis Study. *Br J Ophthalmol*. 2020;105(3):328–333. doi: 10.1136/bjophthalmol-2020-316128
4. Ligocki AJ, Fury W, Gutierrez C, et al. Molecular characteristics and spatial distribution of adult human corneal cell subtypes. *Sci Rep*. 2021;11(1):16323. doi: 10.1038/s41598-021-94933-8
5. Campos M, Szerenyi K, Lee M, et al. Keratocyte loss after corneal deepithelialization in primates and rabbits. *Arch Ophthalmol*. 1994;112(2):254. doi: 10.1001/archophth.1994.01090140130034
6. Wilson S, He Y, Weng J, et al. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res*. 1996;62(4):325–338. doi: 10.1006/exer.1996.0038
7. Zieske J, Guimarães S, Hutcheon A. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Exp Eye Res*. 2001;72(1):33–39. doi: 10.1006/exer.2000.0926
8. Fini ME, Stramer BM. How the cornea heals: cornea-specific repair mechanisms affecting surgical outcomes. *Cornea*. 2005;24(8 Suppl):S2–S11. doi: 10.1097/01.ico.0000178743.06340.2c
9. Klenkler B, Sheardown H, Jones L. Growth factors in the tear film: role in tissue maintenance, wound healing, and ocular pathology. *Ocul Surf*. 2007;5(3):228–239. doi: 10.1016/s1542-0124(12)70613-4
10. Anitua E, de la Sen-Corcuera B, Orive G, et al. Progress in the use of plasma rich in growth factors in ophthalmology: from ocular surface to ocular fundus. *Expert Opin Biol Ther*. 2022;22(1):31–45. doi: 10.1080/14712598.2021.1945030
11. Anitua E, Alonso R, Girbau C, et al. Antibacterial effect of plasma rich in growth factors (PRGF®-Endoret®) against *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* strains. *Clin Exp Dermatol*. 2012;37(6):652–657. doi: 10.1111/j.1365-2230.2011.04303.x
12. Anitua E, Muruzabal F, de la Fuente M, et al. PRGF exerts more potent proliferative and anti-inflammatory effects than autologous serum on a cell culture inflammatory model. *Exp Eye Res*. 2016;151:115–121. doi: 10.1016/j.exer.2016.08.012
13. Sanchez-Avila RM, Merayo-Llodes J, Riestra AC, et al. The effect of immunologically safe plasma rich in growth factor eye drops in patients with sjögren syndrome. *J Ocul Pharmacol Ther*. 2017;33(5):391–399. doi: 10.1089/jop.2016.0166
14. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, et al. Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*. 2009;37(11):2259–2272. doi: 10.1177/0363546509349921
15. Park YB, Kim JH, Ha CW, Lee DH. Clinical efficacy of platelet-rich plasma injection and its association with growth factors in the treatment of mild to moderate knee osteoarthritis: a randomized double-blind controlled clinical trial as compared with hyaluronic acid. *Am J Sports Med*. 2021;49(2):487–496. doi: 10.1177/0363546520986867
16. Wilson SE. Corneal wound healing. *Exp Eye Res*. 2020;197:108089. doi: 10.1016/j.exer.2020.108089
17. Kasparov AA, Kasparova EvgA, Fadeeva LL, et al. Personalized cell therapy for early postoperative bullous keratopathy (experimental proof and clinical results). *Vestnik Oftalmologii*. 2013;129(5):53–61. (In Russ).
18. Koval'chuk LV, Pavlyuk AS, Kasparov AA, et al. Analysis of pharmacological agents in the model of apoptosis of human lymphocytes in vitro in normal conditions and in immunopathology. *Allergology and Immunology*. 2000;1:24–30. (In Russ).
19. Seidelmann N, Duarte Campos DF, Rohde M, et al. Human platelet lysate as a replacement for fetal bovine serum in human corneal stromal keratocyte and fibroblast culture. *J Cell Mol Med*. 2021;25(20):9647–9659. doi: 10.1111/jcmm.16912
20. Anitua E, de la Fuente M, Muruzabal F, et al. Plasma rich in growth factors (PRGF) eye drops stimulates scarless regeneration compared to autologous serum in the ocular surface stromal fibroblasts. *Exp Eye Res*. 2015;135:118–126. doi: 10.1016/j.exer.2015.02.016
21. Koulikovska M, Szymanowski O, Lagali N, Fagerholm P. Platelet-rich plasma prolongs myofibroblast accumulation in corneal stroma with incisional wound. *Curr Eye Res*. 2015;40(11):1102–1110. doi: 10.3109/02713683.2014.978478

## ОБ АВТОРАХ

\* **Криволапова Диана Алексеевна**, аспирант;  
адрес: Российская Федерация, 119021, Москва,  
ул. Россолимо, д. 11 а, б;  
ORCID: 0000-0001-6974-7872;  
eLibrary SPIN: 4861-4771;  
e-mail: dia.med94@gmail.com

**Суббот Анастасия Михайловна**, к.м.н.;  
ORCID: 0000-0002-8258-6011;  
eLibrary SPIN: 3898-2570;  
e-mail: kletkagb@gmail.ru

**Каспарова Евгения Аркадьевна**, к.м.н.;  
ORCID: 0000-0001-8594-2395;  
eLibrary SPIN: 9019-6581;  
e-mail: kasparova\_jane@mail.ru

\* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

## AUTHORS' INFO

\* **Diana A. Krivolapova**, PhD, Student;  
address: 11 A, B Rossolimo street, 119021 Moscow,  
Russian Federation;  
ORCID: 0000-0001-6974-7872;  
eLibrary SPIN: 4861-4771;  
e-mail: dia.med94@gmail.com

**Anastasija M. Subbot**, MD, Cand. Sci. (Med.);  
ORCID: 0000-0002-8258-6011;  
eLibrary SPIN: 3898-2570;  
e-mail: kletkagb@gmail.ru

**Evgenia A. Kasparova**, MD, Cand. Sci. (Med.);  
ORCID: 0000-0001-8594-2395;  
eLibrary SPIN: 9019-6581;  
e-mail: kasparova\_jane@mail.ru