

Міністерство охорони здоров'я України  
Тернопільський національний медичний університет  
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

Тернопільський національний медичний університет  
імені І. Я. Горбачевського МОЗ України

Кваліфікаційна наукова  
праця на правах рукопису

**ШМИР СОЛОМІЯ МИКОЛАЇВНА**

УДК: 617.713-001-089.844- 031:611.018.46.013)- 092.9

**ДИСЕРТАЦІЯ**  
**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ**  
**СТРОМИ КСЕНОРОГІВКИ, ОТРИМАНОЇ МЕТОДОМ**  
**ДЕЦЕЛЮЛЯРИЗАЦІЇ, ДЛЯ КОРЕКЦІЇ МЕХАНІЧНОЇ**  
**ТРАВМИ РОГІВКИ**

222 «Медицина»

22 «Охорона здоров'я»

Подається на здобуття наукового ступеня доктора філософії.

Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей,  
результатів і текстів мають посилання на відповідне джерело

\_\_\_\_\_ Шмир С.М.

Науковий керівник: **Кліщ Іван Миколайович**, заслужений діяч науки і  
техніки України, доктор біологічних наук, професор.

Тернопіль – 2023

## АНОТАЦІЯ

*Шмир С. М.* Експериментальне обґрунтування застосування строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації, для корекції механічної травми рогівки. – Кваліфікаційна наукова робота на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 222 «Медицина» (22 «Охорона здоров'я»). – Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2023.

Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, Тернопіль, 2023.

Дисертація присвячена експериментальному обґрунтуванню ймовірності і доцільності застосування виготовленої за новою технологією, а саме методом децелюляризації, строми ксенорогівки свині для корекції механічної непроникаючої травми рогівки.

Проведеними дослідженнями встановлено, що за результатами клінічного спостереження за тваринами, застосування ксенотрансплантату, отриманого методом децелюляризації, у ранні терміни спостереження спостерігаються перикорнеальна ін'єкція, виділення із кон'юнктивальної порожнини, помутніння трансплантату. Уже з 14-ої доби перикорнеальна ін'єкція і виділення з ока незначні, помутніння трансплантату значно зменшується, проглядається зіниця. До 28-ої доби виділення відсутні, рогівковий рефлекс збережений, рогівка повністю прозора з незначними хмаркоподібними помутніннями.

Гістологічними дослідженнями встановлено, що за умов механічної травми рогівки значно порушується структурна організація переднього епітелію, пограничної пластинки та власної речовини. Ступінь деструктивних змін залежить від терміну дослідження. У пізні терміни спостереження має місце формування епітеліального регенерату з нечітко вираженою пошаровою

диференціацією, слабким з'єднанням та ділянками відшарувань від набряклої власної речовини рогівки (14 доба) та закриття ним дефекту травмування (28 доба) зі збереженням нерівного рельєфу базальної поверхні та ділянками відшарування від власної речовини рогівки. У верхніх шарах строми виявлено ознаки дозрівання молоді сполучної тканини з наявністю клітин фібробластичного та лейкоцитарного ряду, капілярів та неупорядкованою орієнтацією колагенових волокон.

Мікроскопічно та морфометрично встановлено, що застосування децелюляризованої рогівки свині для корекції механічної травми рогівки покращує динаміку регенерації, пришвидшує дозрівання грануляційної тканини, загоєння дефекту, сприяє відновленню морфології рогівки з максимальною наближеністю до норми.

Електронномікроскопічні дослідження рогівки показали, що за умов змодельованої механічної непроникаючої травми спостерігаються зміни у складових частинах рогівки, які проявляються порушенням електронної щільності в епітеліоцитах, пошкодженням і подальшим руйнуванням міжклітинних контактів, прогресуванням некротичних змін. Відбуваються значні дегенеративні зміни у власній речовині рогівки, що проявляються деструкцією колагенових волокон у складі сполучнотканинних пластинок, значних дистрофічних змін зазнають фіброласти, кератиноцити.

Встановлено, що проведення хірургічної корекції механічної травми рогівки сприяє активації та покращенню регенераторних процесів у всіх структурних компонентах рогівки. У багат шаровому епітелії відзначається впорядковане розташування епітеліоцитів із збереженням їх ультраструктури, що проявляється відновленням цілісності органел, збільшенням кількості тонофіламентів, міжклітинних контактів, появою ядерців і переважанням еухроматину у каріоплазмі ядер. У власній речовині виявлено посилення функціональної та синтетичної активності клітин фібробластичного диферону

і відповідно структурованості міжклітинної речовини із чітким розташуванням сполучнотканинних пластинок.

За умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки спостерігається інтенсифікація вільнорадикальних процесів (підвищення рівнів гідропероксида ліпідів, ТБК–активних продуктів і шифових основ) у крові з максимальним зростанням на 3-тю добу. Застосування строми рогівки, отриманої методом децелюляризації тваринам, яким моделювали механічну травму рогівки, позитивно впливало на показники вільнорадикального окиснення: зменшувалась активність процесів ліпопероксидації та нівелювався пік зростання показників пероксидного окиснення ліпідів за умови досліджуваної патології – на 3-тю і 7-му доби.

Проведення хірургічної корекції механічної травми рогівки запропонованим нами методом супроводжується мобілізацією компонентів першої (супероксиддисмутаза, каталаза) та другої (церулоплазмін, відновлений грутатіон) ліній антиоксидного захисту, що особливо виразно проявляється у ранні терміни патологічного процесу на тлі надмірної активації процесів ліпідної пероксидації.

У ранньому посттравматичному періоді після нанесення механічної травми рогівки суттєво зростає активність процесів протеолізу. У більш пізні терміни спостереження (14-та – 28-ма доби) показники загальної протеолітичної активності як стосовно дрібнодисперсних і великодисперсних білків (азоальбуміну та азоказеїну), так і основної речовини сполучної тканини – колагену знижувались порівняно з попередніми термінами спостереження, однак були достовірно вищими від норми. У тварин, яким проводили хірургічну корекцію з використанням еквівалента строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації, активність процесів протеолізу була меншою, ніж у тварин, яким корекцію не проводили.

Моделювання механічної непроникаючої травми рогівки в ранні терміни супроводжується також збільшенням концентрації факторів антипротеазного

захисту –  $\alpha_1$ -інгібітора протеаз та  $\alpha_2$ -макроглобуліну, що вказує на посилення антипротеолітичного потенціалу для стримування розвитку деструкції. Такі зміни можна розглядати як адаптивну реакцію організму. Хірургічна корекція механічної травми із застосуванням еквівалента строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, супроводжується менш інтенсивним зростанням факторів протеолізу та нормалізацією співвідношення протеази/інгібітори протеаз, на що вказує достовірно менше зростання індекса протеолізу на початкових етапах патологічного процесу і нормалізація його до завершення експерименту.

Змодельована непроникаюча механічна травма рогівки спричинилася до статистично вірогідного зростання ендогенної інтоксикації, що проявлялось збільшенням вмісту молекул середньої маси в сироватці крові та еритроцитарного індекса інтоксикації. Накопичення токсичних продуктів призводить до розвитку запальної реакції, яка неодноразово рецидивує, до різкого гальмування регенераторних процесів, утворення грубих рубцевих помутнінь і втрати зору. Проведення хірургічної корекції з використанням строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації, позитивно впливало на рівень ендотоксикозу, достовірно зменшуючи показники стосовно тварин, яким корекції не проводили.

Аналіз динаміки концентрації основних класів імуноглобулінів сироватки крові у посттравматичному періоді після моделювання непроникаючої механічної травми рогівки призводить до активування у крові кролів факторів гуморального імунітету у ранній посттравматичний період з подальшою нормалізацією до 28-ої доби та виразного порушення клітинного імунітету у вигляді дисбалансу субпопуляційного складу Т-лімфоцитів з переважним зростанням Т-хелперів і прогресивним збільшенням імунорегуляторного індексу.

Проведення хірургічної корекції травми рогівки з використанням строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації, зумовлює

активацію неспецифічної резистентності організму у перші 7 діб експерименту, яка проявляється достовірно вищою концентрацією IgA, IgM, IgG та факторів клітинного імунітету з подальшою їх нормалізацією до 28-ої доби.

За умови експериментальної непроникної механічної травми рогівки зростає концентрація прозапальних цитокінів з максимумом на 3-тю добу після нанесення травми. Хірургічна корекція із застосуванням ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, зменшує системну запальну реакцію організму порівняно з групою тварин, яким моделювали травму рогівки і корекції не проводили.

Поряд із цим спостерігають фазові зміни вмісту протизапального інтерлейкіну-4 – збільшення на 3-тю добу та зменшення в інші терміни спостереження. Застосування строми ксенорогівки мало нормалізуючий вплив на вміст цього цитокіна.

Аналіз індексу запальної активності показав гіперреактивний тип імунної реакції протягом усього експерименту у кролів, яким моделювали травму рогівки, з дисбалансом цитокінової продукції в бік переважання рівня прозапальних інтерлейкінів. При цьому максимальні зміни зафіксовано на 3-тю і 7-му доби. Хірургічна корекція супроводжувалась активацією компенсаторних механізмів, про що свідчила позитивна динаміка індексу запальної активності – уже із 7-ї доби він достовірно не відрізнявся від показника тварин без змодельованої патології, досягаючи максимально наближених до норми значень через 28 діб спостереження. Отримані результати вказують на відмінність типу імунної відповіді після нанесення механічної травми рогівки: у тварин, яким моделювали механічну травму рогівки і хірургічної корекції не проводили, він був гіперреактивним, а за умов хірургічної корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації, – компенсаторним.

*Наукова новизна одержаних результатів.* У дисертаційній роботі вперше вивчено доцільність і ефективність використання строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, для корекції механічного ушкодження рогівки.

Вперше в динаміці (протягом 28-ми діб) досліджено метаболічні порушення в організмі тварин, що виникли внаслідок моделювання непроникаючої травми рогівки, та їх динаміку при застосуванні строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації. Встановлено, що моделювання механічної травми рогівки спричиняється до активації процесів ліпідної пероксидації, зміни активності системи антиоксидного захисту, зростання рівня маркерів ендогенної інтоксикації, підвищення у ранні терміни протеолітичної активності та посилення антипротеолітичного потенціалу для стримування розвитку деструкції.

Доведено, що механічна травма рогівки супроводжується стимулюванням факторів неспецифічної резистентності організму, активацією клітинної та гуморальної ланок імунітету, порушенням балансу про- та протизапальних цитокінів.

Вперше з використанням патоморфологічного і електронно-мікроскопічного методів встановлено, що на тлі проведеної корекції механічної травми рогівки із застосування строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, настає повна епітелізація дефекту рогівки.

Вперше доведено коригувальний вплив кератоластики із застосуванням строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, на перебіг непроникаючого пошкодження рогівки, який полягає у механічному закритті ураженої ділянки рогівки, зменшенні активності вільнорадикальних процесів, нормалізації стану антиоксидантної системи, активації клітинної та гуморальної ланок імунної системи.

*Практичне значення отриманих результатів.* Отримані експериментальні дані і сформульовані на підставі їх аналізу закономірності змін в організмі та рогівці при експериментальній її травмі та застосуванні строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, для корекції механічного ушкодження рогівки є теоретичним підґрунтям для проведення поглиблених досліджень з метою подальшого її застосування у практичній медицині.

*Ключові слова:* рогівка, травма, патогенетичні особливості, хірургічна корекція, ксеноімплантат, децелюляризація.

## ANNOTATION

*Shmyr S. M.* Experimental substantiation of the use of xenocorneal stroma, obtained by the decellularization method, for the correction of mechanical trauma to the cornea. – Qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the Doctor of Philosophy degree in specialty 222 "Medicine" (22 "Health Care"). – Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2023.

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine, Ternopil, 2023.

The dissertation is devoted to the experimental substantiation of the probability and expediency of using pig xenocorneal stroma produced by a new technology, namely the decellularization method, for the correction of mechanical non-penetrating corneal trauma.

According to the results of clinical observation of animals, the use of a xenograft obtained by the decellularization method, in the early periods of observation, pericorneal injection, discharge from the conjunctival cavity, clouding of the transplant are observed. Already from the 14th day, pericorneal injection and discharge from the eye are insignificant, the opacification of the graft is significantly



reduced, the pupil is visible. By the 28th day, there are no discharges, the corneal reflex is preserved, the cornea is completely transparent with slight cloudiness.

Histological studies have established that under conditions of mechanical trauma to the cornea, the structural organization of the anterior epithelium, border plate, and substance proper is significantly disrupted. The degree of destructive changes depends on the term of the experiment. In the late periods of observation, the formation of an epithelial regenerate with a vaguely expressed layer-by-layer differentiation, a weak connection and areas of detachment from the swollen cornea's own substance (14 days) and its closure of the injury defect (28 days) with the preservation of the uneven topography of the basal surface and areas of detachment from own substance of the cornea. In the upper layers of the stroma, signs of maturation of young connective tissue with the presence of fibroblastic and leukocyte cells, capillaries and disordered orientation of collagen fibers were revealed.

Microscopically and morphometrically, it was established that the use of decellularized pig cornea for the correction of mechanical corneal trauma improves the dynamics of regeneration, accelerates the maturation of granulation tissue, the healing of the defect, and helps to restore the morphology of the cornea as close to normal as possible.

Electron microscopic studies of the cornea showed that under the conditions of a simulated mechanical non-penetrating injury, there are changes in the component parts of the cornea, which are manifested by a violation of the electron density in the epitheliocytes, damage and subsequent destruction of intercellular contacts, and the progression of necrotic changes. There are significant degenerative changes in the substance of the cornea itself, manifested by the destruction of collagen fibers in the connective tissue plates, fibroblasts and keratinocytes undergo significant dystrophic changes.

It has been established that surgical correction of mechanical corneal trauma promotes activation and improvement of regenerative processes in all structural components of the cornea. In the multi-layered epithelium, the orderly arrangement of epitheliocytes with the preservation of their ultrastructure is noted, which is manifested by the restoration of the integrity of organelles, an increase in the number of tonofilaments, intercellular contacts, the appearance of nucleoli and the predominance of euchromatin in the karyoplasm of the nuclei. In the proper substance, an increase in the functional and synthetic activity of fibroblastic diferon cells and, accordingly, the structure of the intercellular substance with a clear arrangement of connective tissue plates were revealed.

In the case of experimental non-penetrating mechanical trauma to the cornea, there is an intensification of free radical processes (increased levels of HPL, TBC-active products and Schiff bases) in the blood with a maximum increase on the 3rd day. The application of corneal stroma obtained by the decellularization method to animals that were simulated mechanical corneal trauma had a positive effect on indicators of free radical oxidation: the activity of lipoperoxidation processes decreased and leveled off the peak growth of indicators of lipid peroxidation under the condition of the studied pathology – on the 3rd day.

Surgical correction of mechanical corneal trauma using our proposed method is accompanied by mobilization of the components of the first (superoxide dismutase, catalase) and second (ceruloplasmin, reduced glutathione) lines of antioxidant protection, which is especially clearly manifested in the early stages of the pathological process against the background of excessive activation of lipid peroxidation processes.

In the early post-traumatic period after inflicting a mechanical injury on the cornea, the activity of proteolysis processes increases significantly. In the later periods of observation (14th – 28th days), indicators of general proteolytic activity both in relation to fine and large-dispersed proteins (azoalbumin and azocasein) and the main substance of connective tissue of connective tissue - collagen decreased

compared to previous periods of observation, but remained significantly higher than normal. In animals that underwent surgical correction using the equivalent of xenocorneal stroma obtained by the decellularization method, the activity of proteolysis processes was lower than in animals that did not undergo correction.

Simulation of mechanical non-penetrating corneal injury in the early stages is also accompanied by an increase in the concentration of antiprotease protection factors -  $\alpha$ 1-protease inhibitor and  $\alpha$ 2-macroglobulin, which indicates an increase in the antiproteolytic potential to restrain the development of destruction. Such changes can be considered as an adaptive reaction of the body. Surgical correction of mechanical injury using the equivalent of pig xenocorneal stroma obtained by the decellularization method is accompanied by a less intense increase in proteolysis factors and normalization of the protease/protease inhibitor ratio, as indicated by a significantly lower increase in the proteolysis index at the initial stages of the pathological percentage and its normalization before the end of the experiment.

The simulated non-penetrating mechanical injury of the cornea caused a statistically probable increase in endogenous intoxication, which was manifested by an increase in the content of medium-mass molecules in blood serum and the erythrocyte intoxication index. Accumulation of toxic products leads to the development of an inflammatory reaction that repeatedly recurs, to a sharp inhibition of regenerative processes, the formation of gross cicatricial opacities and loss of vision. Carrying out surgical correction using the stroma of the pig cornea obtained by the decellularization method had a positive effect on the level of endotoxiosis, significantly reducing the indicators in relation to animals that were not corrected.

Analysis of the dynamics of the concentration of the main classes of immunoglobulins in the blood serum in the post-traumatic period after simulation of a non-penetrating mechanical injury to the cornea leads to the activation of humoral immunity factors in the blood of rabbits in the early post-traumatic period with

subsequent normalization by the 28th day and a pronounced violation of cellular immunity in the form of an imbalance of the subpopulation composition of T-lymphocytes with a predominant increase in T-helpers and a progressive increase in the immunoregulatory index.

Surgical correction of corneal trauma using pig corneal stroma obtained by the decellularization method leads to the activation of nonspecific resistance of the body in the first 7 days of the experiment, which is manifested by a significantly higher concentration of IgA, IgM, IgG and cellular immunity factors, with their subsequent normalization by the 28th day.

Under the condition of experimental non-penetrating mechanical trauma to the cornea, the concentration of pro-inflammatory cytokines increases with a maximum on the 3rd day after injury. Surgical correction using a xenocornea of a pig, obtained by the decellularization method, reduces the systemic inflammatory reaction of the body compared to a group of animals that were simulated corneal trauma and no correction was performed.

Along with this, phase changes in the content of anti-inflammatory interleukin-4 are observed - an increase on the 3rd day and a decrease in other periods of observation. The use of xenocorneal stroma had a normalizing effect on the content of this cytokine.

The analysis of the index of inflammatory activity showed a hyperreactive type of immune reaction throughout the experiment in rabbits that simulated corneal injury, with an imbalance of cytokine production towards the predominance of the level of pro-inflammatory interleukins. At the same time, the maximum changes were recorded on the 3rd and 7th days. Surgical correction was accompanied by the activation of compensatory mechanisms, which was evidenced by the positive dynamics of the index of inflammatory activity - already from the 7th day, it did not reliably differ from the index of animals without simulated pathology, reaching values as close as possible to the norm after 28 days of observation. The obtained results indicate a difference in the type of immune response after mechanical trauma

to the cornea: in animals that simulated mechanical trauma to the cornea and did not undergo surgical correction, it was hyperreactive, and under the conditions of surgical correction using the corneal stroma obtained by the decellularization method, it was compensatory.

*Scientific novelty of the obtained results.* For the first time, the feasibility and effectiveness of using pig xenocorneal stroma, obtained by the decellularization method, for the correction of mechanical damage to the cornea was studied in the dissertation work.

For the first time in dynamics (for 28 days), metabolic disturbances in the body of animals, which arose as a result of simulation of non-penetrating corneal trauma, and their dynamics when using pig xenocorneal stroma, obtained by the decellularization method, were investigated. It has been established that simulation of mechanical trauma to the cornea causes the activation of lipid peroxidation processes, changes in the activity of the antioxidant defense system, an increase in the level of markers of endogenous intoxication, an increase in the early stages of proteolytic activity and an increase in the antiproteolytic potential to restrain the development of destruction.

It has been proven that mechanical trauma to the cornea is accompanied by stimulation of factors of non-specific resistance of the body, activation of cellular and humoral links of immunity, disturbance of the balance of pro- and anti-inflammatory cytokines.

For the first time, using pathomorphological and electron-microscopic methods, it was established that complete epithelialization of the corneal defect occurs against the background of correction of a mechanical corneal injury with the use of pig xenocorneal stroma obtained by the decellularization method.

For the first time, the corrective effect of keratoplasty with the use of pig xenocorneal stroma, obtained by the decellularization method, on the course of non-penetrating corneal damage, which consists in the mechanical closure of the affected

area of the cornea, reducing the activity of free radical processes, normalizing the state of the antioxidant system, and activating the cellular and humoral links of the immune system, has been proven.

*Practical significance of the obtained results.* The experimental data obtained and formulated on the basis of their analysis of the regularity of changes in the body and the cornea during experimental injury and the use of xenocorneal stroma of a pig, obtained by the decellularization method, for the correction of mechanical damage to the cornea are the theoretical basis for conducting in-depth research with the aim of further application in practical medicine.

*Key words:* cornea, trauma, pathogenetic features, surgical correction, xenoimplant, decellularization.

## **СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ**

*Наукові праці, в яких опубліковано основні наукові результати дисертації:*

1. Шмир СМ, Крамар СБ. Морфологічні зміни рогівки кролів у пізні терміни після моделювання механічної непроникаючої травми рогівки та за умов її корекції децелюляризованою стромою ксенорогівки. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2023;22(2):37-48. DOI: 10.24061/1727-0847.22.2.2023.16

2. Шмир СМ, Кліщ ІМ. Стан клітинної та гуморальної ланок імунної системи кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2023;(2):149-55. DOI: 10.11603/1811-2471.2023.v.i2.13908

3. Шмир СМ, Кліщ ІМ. Цитокиновий статус сироватки крові кролів з механічною непроникною травмою рогівки та корекція з використанням

строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. Медична та клінічна хімія. 2023;(2):20-5. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2023.i2.13968

4. Шмир СМ, Кліщ ІМ. Стан протеїназо-інгібіторної системи крові кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. Вісник проблем біології і медицини. 2023;3(170):339-48. DOI: 10.29254/2077-4214-2023-3-170-339-348

5. Шмир СМ, Огінська НВ. Субмікроскопічні зміни рогівки при її змодельованій механічній непроникаючій травмі. Шпитальна хірургія. Журнал ім. Л.Я. Ковальчука. 2023;3:69-76.

*Наукові праці, які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:*

6. Шмир СМ. Стан клітинної ланки імунної системи у кролів з механічною травмою рогівки та використанні строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, для її корекції. В: Матеріали XXVII Міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених; 2023 квіт. 10-12; Тернопіль. Тернопіль; 2022. с. 249.

7. Шмир СМ. Показники прозапальних цитокінів у крові кролів з механічною травмою рогівки та використанні строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації для її корекції. В: Матеріали підсумкової LXVI науково-практичної конференції Здобутки клінічної та експериментальної медицини; 2023 черв. 16-17; Тернопіль. Тернопіль, 2023. с. 144.

8. Шмир СМ. Динаміка змін показників ліпідної пероксидації у крові за умови непроникаючої механічної травми рогівки та корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації. В: Матеріали II міжнародної наукової конференції Розвиток наук в умовах нової реальності: проблеми та перспективи; 2023 жовт. 20; Луцьк. Луцьк; 2023. с. 122.

9. Шмир СМ. Застосування строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, для корекції механічної травми рогівки. В: Матеріали III міжнародної наукової конференції Стратегічні напрями розвитку науки: фактори впливу та взаємодії; 2023 жовт. 27; Тернопіль. Тернопіль; 2023. с. 201.



## ЗМІСТ

Перелік умовних позначень, скорочень і термінів	20
Вступ	22
Розділ 1 Ксенотрансплантація рогівки: сучасний стан, проблеми та перспективи її вирішення (огляд літератури)	29
1.1 Епідеміологія захворювань рогівки	29
1.2 Передумови ксенотрансплантації	32
1.3 Імунна привілейованість ока	34
1.4 Сучасні погляди на ксенотрансплантацію рогівки як регенеративну медицину	35
1.5 Характеристика рогівки свиней як належного донорського продукту	35
1.6 Механізми відторгнення при ксенотрансплантації рогівки	38
1.7 Доклінічні дані про ефективність ксенотрансплантації рогівки свиней	41
1.8 Розробка децелюляризованої рогівки та дані про ефективність	43
1.9 Ефективність, безпека та гістологічні дослідження кератопластики з використанням децелюляризованої рогівки свиней	46
1.10 Аналіз та перспективи на майбутнє	49
Розділ 2 Матеріали та методи дослідження	51
2.1 Постановка досліджу	51
2.2 Технологія отримання еквівалента строми рогівки свині методом децелюляризації для подальшої кератопластики	51
2.3 Методи дослідження при моделюванні механічної травми рогівки та використанні строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації	52
2.3.1 Відбір тварин та експериментальна модель	52

2.3.2 Морфологічні дослідження (гістологічні, морфометричні, електронно-мікроскопічні)	54
2.3.3 Методи визначення інтенсивності процесів ліпопероксидації і стану антиоксидантної системи	56
2.3.4 Вивчення стану системи протеїнази/інгібітори протеїназ	61
2.3.5 Методи дослідження клітинного і гуморального імунітету	62
2.3.6 Методи дослідження ендогенної інтоксикації	63
2.4 Методи статистичного аналізу	64
Розділ 3 Оцінка ефективності використання строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації у кролів з механічною травмою рогівки	65
3.1 Клінічний перебіг механічної травми рогівки у кролів, яким проводили кератопластику із застосуванням строми рогівки, отриманої медом децелюляризації	65
3.2 Стан структурної організації рогівки у кролів і особливості морфологічних змін у її компонентах при механічній травми рогівки і корекції з використанням строми рогівки, отриманого методом децелюляризації	69
3.2.1 Гістологічні дослідження рогівки свині після проведення децелюляризації	69
3.2.2 Гістологічні зміни рогівки кролів за умов моделювання механічної непроникаючої травми рогівки та корекції з використання строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації	71
3.2.3 Субмікроскопічні зміни рогівки кролів без патології, в умовах змодельованої механічної непроникаючої травми рогівки та за умов децелюляризованою стромою ксенорогівки	92

3.3 Особливості біохімічних та імунологічних показників кролів за умов механічної травми рогівки і корекції з використанням строми рогівки, отриманого методом децелюляризації	115
Розділ 4 Аналіз та узагальнення результатів дослідження	147
Висновки	173
Список використаних джерел	177
Додатки	203

**ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ**

- Анти- $\alpha$ Gal – антитіла, спрямовані проти Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc
- АОЗ – антиоксидантний захист
- БАПНА – бензоїл-DL-аргінін-пара-нітроаніліду
- ВГ – відновлений глутатіон
- ГПЛ – гідропероксили ліпідів
- ДЦР – децелюляризована рогівка
- ЕП – еритроцитарний індекс інтоксикації
- ІЗА – індекс запальної активності
- КТ – каталаза
- МНС – комплекс гістосумісності
- МДА – малоновий діальдегід
- МСМ – молекули середньої маси
- НКП – наскрізна кератопластика
- НЛП – нелюдиноподібні примати
- ПОЛ – пероксидне окиснення ліпідів
- СОД – супероксиддисмутаза
- ТБК – тіобарбітурова кислота
- ЦП – церулоплазмін
- ШО – основи Шиффа
- ЩЕК – щільність ендотеліальних клітин рогівки свиней
- АСАІD – імунні відхилення, пов’язані з передньою камерою ока
- $\alpha$ <sub>1</sub>-ІП – альфа1-інгібітор протеаз
- $\alpha$ <sub>2</sub>-МГ – альфа2-макроглобулін
- CRISPR – кластеризовані регулярні інтервали коротких паліндромних повторів
- FDA – Управлінням з контролю за харчовими продуктами та ліками
- HLA – людський лейкоцитарний антиген

Ig – імуноглобуліни

IFN – інтерферон

IL –інтерлейкін

NeuGc – N-гліколілнейрамінова кислота

NK – природні кілери

TNF $\alpha$  – фактор некрозу пухлини  $\alpha$

PERV – ендогенний ретровірус свиней

## ВСТУП

**Обґрунтування вибору теми дослідження.** Захворювання, що вражають рогівку, є однією із основних причин сліпоти в усьому світі, поступаючись лише катаракті [98]. Епідеміологія сліпоти, викликаної патологією рогівки є складною та охоплює широкий спектр інфекційних і неінфекційних захворювань очей, які викликають рубцювання рогівки, що в кінцевому підсумку призводить до функціональної сліпоти [195].

Травма та виразка рогівки є важливими причинами рогівкової сліпоти, про які часто не повідомляється. Ще донедавна травма ока та виразка рогівки не вважалися важливими причинами рогівкової сліпоти. Однак, оскільки програми охорони здоров'я більшості країн стали ефективнішими у зниженні поширеності традиційних причин рогівкової сліпоти, таких як трахома, онхоцеркоз і проказа, травми очей та виразки рогівки стали більш важливими. У 1992 році Thylefors В. звернув увагу на той факт, що травма часто є найважливішою причиною односторонньої втрати зору в країнах, що розвиваються, і що до 5 % усієї двосторонньої сліпоти є прямим наслідком травми [217]. Ретельний аналіз світової літератури, проведений Négrel А.-D, Thylefors В. виявив глобальну епідемію очної травми з приблизно 55 мільйонами випадків травм очей, що реєструються щорічно, з яких 750 000 випадків вимагали госпіталізації, а 200 000 – це травми відкритого ока [186]. Крім того, вони підраховали, що приблизно 1,6 мільйона людей стали сліпими через отримані травми, 2,3 мільйона мали двосторонній слабкий зір, а 19 мільйонів втратили зір на одне око. Незважаючи на те, що травма ока є глобальною проблемою, тягар сліпоти внаслідок цієї патології найбільше лягає на країни, що розвиваються, особливо ті, де іде війна чи тривають громадянські заворушення у яких використовуються міни [72, 118, 180, 197, 216].

Стійкі дефекти епітелію рогівки (СДЕР) є результатом неефективності швидкої повторної епітелізації та закриття дефекту протягом 10-14 днів після травми чи виразки рогівки, навіть за стандартного підтримуючого лікування. Порушення захисного епітелію і строми рогівки можуть зробити око сприйнятливим до інфекції, виразки строми, перфорації, рубців і значної втрата зору [219]. Хоча існує декілька методів лікування, однак з'являється все більше нових підходів. Стандартні методи лікування, наприклад бандажні контактні лінзи і штучні сльози, спрямовані на забезпечення бар'єрного захисту епітеліального шару. Нещодавно розроблені методи лікування, націлені на процес реепітелізації шляхом полегшення доступу до факторів росту та протизапальних засобів. Нові хірургічні методики можуть також забезпечити повторну іннервацію рогівки [24, 87, 98, 175].

Одним із перспективних методів, що може бути використаний для закриття дефектів при травмах і виразках рогівки є ксенотрансплантація [22, 54, 62, 67, 86, 95, 107, 106, 124, 159, 173, 184]. Дослідники, що працюють у галузі експериментальної та клінічної офтальмології вказують на ефективність методики ксенотрансплантації з використанням рогівки свині, зважаючи на генетичну спорідненість, а також так званий «іммунний привілей ока», що зменшує ймовірність відторгнення [12, 29, 66, 85, 90, 94, 97, 121, 140, 167, 168]. Однак, як показали ряд дослідників пересадка цілісної рогівки має ризик відторгнення, враховуючи, що як  $\alpha$ Gal, так і не- $\alpha$ Gal (наприклад, N-гліколілнейрамінова кислота) експресуються в клітинах рогівки свиней [84, 90, 160, 164]. Згідно з гістологічним аналізом, у відторгнених трансплантатах, спостерігаються CD4+ і CD8+ Т-клітини, макрофаги, В-клітини та відкладення Ig G і комплементу, іноді виявляються нейтрофіли та еозинофіли [230, 231]. Крім того, повідомляється, що активованій водянистою вологою комплемент і клітини CD8+IFN $\gamma$ + у крові є прогностичним біомаркером ксеногенного відторгнення. Звідси виникає необхідність пошуку методів зменшення імуногенного навантаження та ймовірності відторгнення ксенотрансплантата.

Оскільки клітинні компоненти рогівки свиней є основним джерелом ксеноантигенів [167], децелюляризована рогівка має перевагу у зниженні імунної відповіді після трансплантації [133], чому і присвячене це дослідження.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота є фрагментом комплексних міжкафедральної науково-дослідної роботи ННІ моделювання та аналізу патологічних процесів Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України «Патогенетичні особливості системних та органних порушень за дії надзвичайних факторів на організм» (№ держреєстрації 0122U100071), де дисертант є співвиконавцем.

**Мета дослідження:** обґрунтувати можливість і ефективність застосування строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, для корекції механічної травми рогівки.

**Завдання дослідження:**

1. Встановити особливості клінічного перебігу механічної травми рогівки у кролів та за умов її корекції з використанням строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації.
2. Виявити характерні патоморфологічні ознаки зміни рогівки за результатами цитоморфометричного аналізу у тварин з механічною травмою рогівки та застосуванні строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації.
3. Встановити особливості процесів ліпідної пероксидації, стану антиоксидантної системи у тварин з механічною травмою рогівки та застосуванні строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації.
4. Дослідити особливості функціонування системи протеїнази/інгібітори протеїназ у тварин з механічною травмою рогівки та її корекції.



5. З'ясувати стан, клітинної, гуморальної ланок імунної системи у експериментальних тварин з механічною травмою рогівки та після корекції з використанням строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації.
6. З'ясувати ступінь вираженості ендогенної інтоксикації у тварин з механічною травмою рогівки та застосуванні строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації.
7. Встановити зміни цитокінового профілю та індексу запальної активності у сироватці крові тварин з механічною травмою рогівки та її корекції із застосуванням строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації.

*Об'єкт дослідження:* механічна травма рогівки у кролів та її корекція із застосуванням строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації.

*Предмет дослідження:* особливості неспецифічної реактивності організму, клітинної та гуморальної ланок імунної системи, цитокінового профілю, ендогенної інтоксикації, процесів ліпідної пероксидації, системи антиоксидантного захисту, патоморфологічні зміни рогівки при її механічній травмі та корекції з використанням строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації.

*Методи дослідження:* експериментальні – для моделювання механічної травми рогівки; біохімічні – для визначення показників ендогенної інтоксикації, дослідження процесів ліпопероксидації та стану антиоксидантного захисту; імуноферментні – для дослідження вмісту цитокінів, факторів гуморального імунітету; цитофлуориметричні – для дослідження клітинної ланки імунітету; цитологічні – для визначення функціональної та метаболічної активності фагоцитів; патоморфологічні – для аналізу ступеня структурних змін рогівки; математико-статистичні – для обробки отриманих цифрових результатів.

**Наукова новизна отриманих результатів.** У дисертаційній роботі вперше вивчено доцільність і ефективність використання строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, для корекції механічного ушкодження рогівки.

Вперше в динаміці (протягом 28-ми діб) досліджено метаболічні порушення в організмі тварин, що виникли внаслідок моделювання непроникаючої травми рогівки, та їх динаміку при застосуванні строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації. Встановлено, що моделювання механічної травми рогівки спричиняється до активації процесів ліпідної пероксидації, зміни активності системи антиоксидного захисту, зростання рівня маркерів ендогенної інтоксикації, підвищення у ранні терміни протеолітичної активності та посилення антипротеолітичного потенціалу для стримування розвитку деструкції.

Доведено, що механічна травма рогівки супроводжується стимулюванням факторів неспецифічної резистентності організму, активацією клітинної та гуморальної ланок імунітету, порушенням балансу про- та протизапальних цитокінів.

Вперше з використанням патоморфологічного і електронно-мікроскопічного методів встановлено, що на тлі проведеної корекції механічної травми рогівки із застосування строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, настає повна епітелізація дефекту рогівки.

Вперше доведено коригувальний вплив кератоластики із застосуванням строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, на перебіг непроникаючого пошкодження рогівки, який полягає у механічному закритті ураженої ділянки рогівки, зменшенні активності вільнорадикальних процесів, нормалізації стану антиоксидантної системи, активації клітинної та гуморальної ланок імунної системи.

Встановлені в експерименті регенераторні, корнеопротекторні та мембраностабілізуючі властивості строми ксенорогівки свині, отриманої

методом децелюляризації дозволяють рекомендувати проведення подальших досліджень щодо використання її у практичній медицині для лікування у хворих з виразками рогівки різної етіології.

**Практичне значення отриманих результатів.** Отримані експериментальні дані і сформульовані на підставі їх аналізу закономірності змін в організмі та рогівці при експериментальній її травмі та застосуванні строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, для корекції механічного ушкодження рогівки є теоретичним підґрунтям для проведення поглиблених досліджень з метою подальшого її застосування у практичній медицині.

Результати дослідження впроваджені у лекційний курс кафедр патологічної фізіології, оториноларингології, офтальмології та нейрохірургії, функціональної і лабораторної діагностики, гістології та ембріології, фізіології з основами біоетики та біобезпеки Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.

**Особистий внесок здобувача.** Автор самостійно провела патентно-інформаційний пошук, аналіз літератури з досліджуваної проблеми, сформулювала мету та завдання дослідження, провела оперативні втручання із змодельовання непроникаючої травми рогівки та її покриття стромою ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, провела чи проаналізувала результати лабораторних досліджень. Самостійно провела статистичну обробку даних, аналіз та узагальнення результатів дослідження, написала й оформила дисертаційну роботу. Проводила підготовку матеріалів до публікації.

У наукових працях, опублікованих у співавторстві, та актах впровадження викладено дані, отримані в процесі виконання дисертаційного дослідження. Виконання морфологічних досліджень здійснювались за консультативної допомоги співробітників кафедри гістології та ембріології

Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.

**Апробація результатів дисертації.** Матеріали дисертаційної роботи оприлюднено на підсумковій LXVI науково-практичній конференції «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, 16-17 червня 2023 р.); XXVII Міжнародному медичному конгресі студентів і молодих вчених (м. Тернопіль, 10-12 квітня 2023 р.); II міжнародній науковій конференції «Розвиток наук в умовах нової реальності: проблеми та перспективи» (м. Луцьк, 20 жовтня 2023 р.); III міжнародній науковій конференції «Стратегічні напрями розвитку науки: фактори впливу та взаємодії» (м. Тернопіль, 27 жовтня 2023 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертаційної роботи опубліковано 5 статей у фахових наукових виданнях України, 4 публікації у матеріалах наукових форумів.

**Структура дисертації.** Дисертація викладена на 210 сторінках і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалів та методик дослідження, розділу власних досліджень, аналізу та узагальнення результатів досліджень, висновків, списку використаних джерел літератури (всього 238 найменувань, з них 53 кирилицею та 185 латиницею), додатків. Робота проілюстрована 9-ма таблицями та 60-ма рисунками. Список використаних джерел і додатки викладено на 33 сторінках.

# РОЗДІЛ 1

## КСЕНОТРАНСПЛАНТАЦІЯ РОГІВКИ: СУЧАСНИЙ СТАН, ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ ЇЇ ВИРІШЕННЯ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

### 1.1 Епідеміологія захворювань рогівки

Захворювання, що вражають рогівку, є основною причиною сліпоти в усьому світі, поступаючись лише катаракті [98]. Епідеміологія рогівкової сліпоти є складною та охоплює широкий спектр інфекційних і неінфекційних захворювань очей, які викликають рубцювання рогівки, що в кінцевому підсумку призводить до функціональної сліпоти [195]. Крім того, поширеність захворювань рогівки варіює у різних країнах і навіть у різних прошарках суспільства, що залежить від багатьох факторів, таких як доступність і загальні стандарти догляду за очима [186, 197, 217].

Використання Всесвітньою організацією охорони здоров'я визначення сліпоти як гострота зору 3/60 або менше, показує, що наразі є 45 мільйонів осіб у всьому світі, які є двосторонньо сліпі та ще 135 мільйонів, які мають серйозні порушення зору на обидва ока [118, 180, 197, 216]. Отже, 180 мільйонів людей у світі сьогодні мають важкі вади, що є надзвичайно важливою не лише з медичного, а й соціального та економічного вимірів. Це не включаючи додаткових сотень мільйонів, які є інвалідами через монокулярну втрату зору, спричинену в основному травмами та виразками рогівки. Травма та виразка рогівки є важливими причинами рогівкової сліпоти, вони можуть складати біля 1,5–2,0 мільйона нових випадків монокулярної сліпоти щороку [98, 215, 232, 233].

Донедавна травма ока та виразка рогівки не вважалися важливими причинами рогівкової сліпоти. Як травма, так і виразка зазвичай монокулярні, тому уражені особи не характеризуються як повністю сліпі, а лише як інваліди

зору. Однак, оскільки програми охорони здоров'я стали більш ефективними у зниженні поширеності традиційних причин рогівкової сліпоти, таких як трахома, онхоцеркоз і проказа, отже, очні травми та виразки рогівки стали більш важливими. У 1992 році В. Thylefors звернув увагу на той факт, що травма часто є найважливішою причиною односторонньої втрати зору в країнах, що розвиваються, і що до 5 % усієї двосторонньої сліпоти є прямим наслідком травми [217]. Мається на увазі, що понад півмільйон людей у світі є сліпими внаслідок травм очей. Ретельний аналіз світової літератури, проведений Negrel і Thylefors у 1998 році, виявив глобальну епідемію очної травми з приблизно 55 мільйонами травм очей, які відбуваються щорічно, з яких 750 000 випадків вимагали госпіталізації, а 200 000 були травмами відкритого ока [186]. Крім того, вони підраховали, що приблизно 1,6 мільйона людей були сліпими через отримані травми, 2,3 мільйона мали двосторонній слабкий зір, а 19 мільйонів були односторонньо сліпими або мали слабкий зір. Незважаючи на те, що очна травма є глобальною проблемою, тягар сліпоти внаслідок травм ока найбільше лягає на країни, що розвиваються, особливо ті, де ведуться війни та існують громадянські заворушення і де можливі травми очей від такої зброї, як міни [98, 215, 232, 233].

В Україні наслідки травм ока також посідають чільне місце серед причин первинної очної інвалідності та посідають 25,5 % [37].

Виразка рогівки нещодавно була визнана «тихою епідемією» у деяких країнах [227]. Zhang MC та ін. виявили, що кількість виразок рогівки, які щорічно виникають у країнах, що розвиваються, швидко наближається до 1,5–2 мільйонів, а фактична кількість, ймовірно, більша [233]. Кінцевим результатом більшості цих станів незмінно є рогівкова сліпота [98].

Травма та захворювання рогівки можуть спричинити незворотні порушення нормальної структури та фізіології рогівки, що часто призводить до трансплантації рогівки. На жаль, пропозиція донорської рогівки є недостатньою через культурні бар'єри, відсутність належної

поінформованості суспільства або матеріально-технічні проблеми, пов'язані із закупівлею донорської тканини [59, 122, 162, 166, 212]. Репрезентативне опитування показало, що 53 % населення світу не мали доступу до кератопластики [122]. Очікується, що підвищена потреба у трансплантаціях призведе до збільшення нестачі донорської рогівки [23, 24].

Оскільки торгівля органами та тканинами рогівки викликає глобальне занепокоєння, замітники алотрансплантата є дуже важливим альтернативним підходом до вирішення проблеми торгівлі людьми та людськими органами [152-155, 164]. Тому ряд підходів, таких як використання терапії на основі стовбурових клітин, продуктів біоінженерії та ксенотрансплантації, були досліджені для заміни алотрансплантатів [63, 139, 183, 189, 190, 195, 202, 208, 209, 223].

Одним із перспективних методів, що може бути використаний для закриття дефектів при травмах і виразках рогівки є ксенотрансплантація. Дослідники, що працюють у галузі експериментальної та клінічної офтальмології вказують на ефективність методики ксенотрансплантації з використанням рогівки свині, зважаючи на генетичну спорідненість, а також так званий «іммунний привілей ока», що зменшує ймовірність відторгнення.

Концепція ксенотрансплантації рогівки виникла у 19-му столітті, коли у 1824 році Франц Рейзінгер запропонував замінити помутнілу рогівку людини на прозору рогівку тварини. Перша справжня трансплантація рогівки у людей за допомогою свинячого трансплантата відбулася в 1838 році Річардом Кіссамом. Після цього, аж до початку 1970-х років, неодноразово повідомлялося про ксенотрансплантацію рогівки від гібонів і риб людям [95]. Серед них ксенотрансплантація рогівки приматів людині продемонструвала виживання понад 5 місяців у 50 % реципієнтів [83, 94, 132, 177, 230, 231].

## 1.2 Передумови ксенотрансплантації

### *Свині як джерело донорів*

Нелюдиноподібні примати (НЛП) є філогенетично найбільш схожими тваринами на людину. Однак використання НЛП як донора має кілька недоліків, включаючи етичні проблеми, легку зоонозну передачу інфекції, високу вартість і тривалий час розведення, а також відсутність досвіду генетичної модифікації НЛП [91].

Порівняно з НЛП та іншими тваринами, використання свиней має кілька переваг [91, 92, 146, 166, 181, 214]. Свиней легко і дешево розводити, вони мають кілька послідів, їх можна генетично модифікувати, щоб подолати імунні бар'єри, їх можна вирощувати в умовах, вільних від патогенів. Етичних проблем менше, оскільки свиней вирощують як їжу для людей. Тому використання органів або тканин свиней як джерела ксенотрансплантації становить значний інтерес.

### *Генно-інженерні свині*

На відміну від алогенного відторгнення, ксеногенна відповідь на орган свиней включає унікальне гіпергостре відторгнення протягом годин, яке опосередковується природними анти-Gal $\alpha$ 1-3Gal $\beta$ 1-4GlcNAc-R (анти- $\alpha$ Gal) антитілами (Abs), після чого відбувається гостре гуморальне та клітинне відторгнення протягом кількох днів, що опосередковується антитілами, активованими комплементами, системою згортання крові та вродженими імунними клітинами, а також хронічне клітинне відторгнення, яке опосередковується головним чином Т-клітинами та макрофагами протягом кількох тижнів [84, 90, 97, 160, 164]. Щоб подолати ксеногенне відторгнення поза межами імуносупресії, були апробовані три основні підходи – генетична зміна вихідної тварини, розвиток химеризму кісткового мозку в реципієнта та інкапсуляція ксеногенних клітин або тканин [121, 128, 131].



Свині з нокаутом гена альфа-1,3-галактозилтрансферази (GT-KO), створені за допомогою технології перенесення соматичного ядра на початку 2000-х років, наблизили ксенотрансплантацію до клініки, зменшивши гіпергостре відторгнення [97]. Наразі сконструйовано понад 40 генів: експресія регуляторних білків людського комплексу (Кластер диференціації (CD)55, CD46, CD59), білків, що регулюють згортання крові (тромбомодулін, CD39), протизапальних білків людини (CD47, сигнальний регуляторний білок) альфа (SIRP $\alpha$ ), гемоксигеназа 1, CD39) і модулюючі молекули клітин природних кілерів (NK) (людський лейкоцитарний антиген G (HLA-G), HLA-E, бета2 мікроглобулін), а також зменшення антигенних епітопів, таких як  $\alpha$ Gal, домінантно-негативний трансактиватор основного комплексу гістосумісності (MHC) I та MHC II (СІТА-DN) [107, 108, 196]. Враховуючи, що звичайна технологія шляхом гомологічної рекомбінації та перенесення ядра соматичних клітин займає 3 роки, щоб створити свиню, гомозиготну за допомогою однієї модифікації гена, новітня технологія редагування генів із використанням кластеризованих регулярних інтервалів коротких паліндромних повторів (CRISPR)-Cas9 дає можливість отримати множинні генетичні зміни із високою швидкістю. Як імунологічні гени, так і всі гени ендегенного ретровірусу свиней (PERV) можуть бути порушені за допомогою цієї нової технології, таким чином усуваючи ризик ксенозоонозів [196].

На сьогодні ксенотрансплантати від доступних ГМ свиней все ще можуть мати як гуморальне, так і клітинне ксеногенне відторгнення в моделях НЛП. Таким чином, оптимальна комбінація імунологічного редагування генів для найменшої антигенності в ксенотрансплантатах свиней ще не визначена.

### 1.3 Імунна привілейованість ока

Багато доказів вказують на те, що при трансплантації рогівки існують як супресивні, так і активні імунорегуляторні механізми [141, 143, 187, 188]. Відомо, що рогівка регулюється антилімфангіогенними та антигемангіогенними факторами. Однак його можуть порушити такі молекули, як інтерлейкіни (IL)-1 і -8, моноцитарний хемотаксичний білок 1, фактор росту ендотелію судин, 12-гідрокси-5,8,14-ейкозатрієнова кислота або епітеліальні клітини. Антигемангіогенні або антилімфангіогенні фактори виділяються епітеліальними клітинами рогівки і ендотеліальними клітинами або існують у водянистій волозі [29, 143]. Око має клітинну поверхню та розчинні імунomodуючі фактори для придушення ефекторних Т-клітин та інших вроджених клітин або індукування Tregs [143]. Крім того, CD46, CD55 і CD59, присутні в епітеліальних клітинах рогівки та стромі або у водянистій волозі як розчинні молекули, діють як модулятори комплементу [131, 132, 144]. Оскільки функціонально активна система комплементу присутня у водянистій волозі, сльозах і рогівці, сувора регуляція регуляторними білками комплементу є критичною для підтримки імунної привілейованості [237]. Таким чином, дисфункція або відсутність регуляторних молекул комплементу відповідного виду на ксенотрансплантаті рогівки може сприяти більш вираженому опосередкованому комплементом пошкодженню, ніж в алотрансплантаті. Ендотеліальні клітини рогівки конститутивно експресують інгібіторні костимулюючі сигнальні молекули, які опосередковують апоптоз Т-клітин, індукцію Tregs або індукцію ACAID, усі вони призводять до зменшення відторгнення алотрансплантата [143, 187, 188]. ACAID має системну толерантність до алоантигенів, розміщених у передній камері, звідки антиген-несучі антигенпрезентуючі клітини (АРК) мігрують через кровотік, переважно до селезінки, шляхом підвищення регуляції. CD8<sup>+</sup> Tregs діють в оці як еферентні регулятори, тоді як CD4<sup>+</sup> Tregs діють у лімфоїдних органах як

аферентні регулятори, які сприяють виживанню алотрансплантата рогівки [71, 141].

Крім того, адренергічний нерв визначено як регулятор рекрутингу лейкоцитів, тоді як симпатичні та сенсорні нерви впливають на міграцію APC [144]. Streilein JW повідомив, що наскрізна кератопластика (НКП) анулює ACAID, що може прискорити відторгнення трансплантата [212]. Модуляція нейропептидів може продовжити виживання алотрансплантата рогівки [194].

#### 1.4 Сучасні погляди на ксенотрансплантацію рогівки як регенеративну медицину

Наукові досягнення припускають, що нові методи лікування можуть замінити алотрансплантацію хворої рогівки [69, 76, 127, 157]. Технічні підходи можна згрупувати в три основні категорії – терапія стовбуровими клітинами, ксенотрансплантація та продукти біоінженерії. Ці методи застосовуються по-різному залежно від шару рогівки, який потрібно замінити. Є повідомлення про клінічні результати трансплантації культивованого лімбального епітелію, трансплантації слизової оболонки порожнини рота, аутологічну терапію лімбальними епітеліальними стовбуровими клітинами, а також були проведені клінічні випробування з використанням деяких біосинтетичних аналогів [73, 127].

#### 1.5 Характеристика рогівки свиней як належного донорського продукту

Рогівка свиней, для її використання з метою трансплантації повинна відповідати ряду умов щодо її товщини, біомеханічних і оптичних властивостей.

*Біомеханічні та оптичні властивості рогівки свиней*

Центральна рогівка свиней товща (659–995 мкм) порівняно з рогівкою людини [152, 153, 157, 166]. Якщо центральна товщина ксенотрансплантата складає більше 900 мкм, він може бути неприйнятним для трансплантації. На відміну від людей, у свиней периферична товщина подібна до центральної [157]. Враховуючи, що товщина рогівки свиней залежить від віку та породи свині, слід вибрати відповідний вік свині, щоб максимально відповідати периферійній товщині її рогівки рогівці реципієнта. Враховуючи, що наявність набряку призводить до більшої товщини, вимірної в оцінці *ex vivo*, ніж у *in vivo*, свинячий трансплантат рогівки з дещо більшою центральною товщиною, ніж у людини, вважається придатним для трансплантації.

З точки зору біомеханіки, рогівка демонструє як анізотропну еластичність, так і в'язкопружну властивість. Для характеристики пружності зазвичай використовуються модуль Юнга (відношення поздовжньої напруги до деформації) і модель зсуву (відношення напруги зсуву до деформації зсуву). Еластичність є показником жорсткості матеріалу (співвідношення напруга-деформація), а міцність на розтяг, як інтенсивна властивість матеріалу, є максимальним навантаженням, яке матеріал може витримати під час розтягування, тоді як в'язкопружна поведінка є залежна від часу відповіді на швидкість деформації, представлена релаксацією напруги та повзучістю [220]. Релаксація напруги визначається як зміна навантаження, прикладеного до матеріалу при постійній деформації, а повзучість визначається як деформаційна зміна деформації матеріалу під постійним навантаженням. Рогівка також має властивість набухати, що впливає на її біомеханіку [220].

Є повідомлення, що тиск набухання рогівки свиней нижчий, ніж тиск рогівки людини, що свідчить про швидке набухання в носії для зберігання. Незважаючи на те, що міцність на розрив рогівки свиней виглядає порівнянною з міцністю рогівки людини, співвідношення напруга-деформація вказує на те, що рогівка свиней менш стійка до поздовжніх і зсувних напруг

[110]. Стрес-релаксація та тест на повзучість показують, що свиняча рогівка менш здатна підтримувати свою початкову форму, ніж людська рогівка, що є статистично значущим [110]. Тим часом показано подібну релаксацію напруги у значеннях констант жорсткості та констант часу між рогівками людини та свині [58].

Отже, той факт, що свиняча рогівка є менш жорсткою та більш в'язкоеластичною, ніж людська, може бути наслідком видоспецифічних структурних відмінностей строми або факторів, що вводять в оману, таких як залежне від віку природне перехресне зшивання у людей літнього віку і швидший набряк рогівки свиней у розчині для зберігання. Враховуючи, що на в'язкопружну поведінку впливає внутрішньоочний тиск, вимірювання *in vivo* гістерезису в трансплантаті рогівки свиней слід додатково досліджувати з різним внутрішньоочним тиском.

Сила заломлення рогівки дикого типу свині (36,5–40,4 D) більш плоска, ніж у рогівки людини; однак вона посилюється після кератопластики, коли використовується ксенотрансплантат великого розміру [152, 157]. Сила заломлення рогівки генно модифікованих свиней GT-КО ( $43,2 \pm 6,1$  D) подібна до сили заломлення рогівки людини [230].

#### *Характеристика ендотеліальних клітин рогівки свиней*

Ендотеліальні клітини рогівки можуть підтримувати прозорість рогівки. Таким чином, функціональний потенціал ендотеліальних клітин рогівки свиней повинен бути подібним до потенціалу людини. Дійсно, проліферативний потенціал ендотеліальних клітин рогівки свиней можна порівняти з людським [121].

Крім того, щільність ендотеліальних клітин рогівки свиней (ЩЕК) зменшується з віком, подібно до людей [152]. З огляду на те, що для донорського трансплантата бажана ЩЕК більше 2200/мм, вік свині може бути обмежений відповідно до ЩЕК. Попереднє дослідження показало, що вік свиней може бути обмежений до 72 місяців або менше для відповідних

трансплантатів (ЩЕК  $\geq 2200$  клітин/мм<sup>2</sup>). Вікові обмеження для свиней ПІ можуть відрізнятися від обмежень для звичайних свиней. Залежне від часу збереження зниження ЩЕК можна порівняти з таким у людей, незалежно від типу свиней [152, 230].

Таким чином, механічні та біофізичні властивості свинячої рогівки можна порівняти з властивостями людини, якщо обраний донор відповідного віку.

### 1.6 Механізми відторгнення при ксенотрансплантації рогівки

Існує різниця у механізмах відторгнення між судинним органом і рогівкою. Так, при ксенотрансплантації серця або нирок свині до НЛП можливі такі варіанти [173]: гіпергостре відторгнення відбувається протягом хвилин або годин і воно індукується активацією комплементу через існуючі природні антитіла, здебільшого проти  $\alpha$ Gal на ендотелії судин; відтерміноване відторгнення ксенотрансплантата (тобто гостре відторгнення судин) відбувається протягом днів або тижнів і опосередковується анти- $\alpha$ Gal, анти-не- $\alpha$ Gal і Т-клітинно-залежними антитілами; активовані комплемент і система згортання; клітини вродженого імунітету, такі як природні клітини-кілери (NK), макрофаги та нейтрофіли; і хронічне відторгнення відбувається протягом тижнів або місяців і опосередковується головним чином CD4<sup>+</sup> Т-клітинами та макрофагами. Однак детальний механізм хронічного відторгнення недостатньо відомий, оскільки гостре гуморальне та клітинне відторгнення досі не вдалося подолати при ксенотрансплантації серця та нирок.

Існують також відмінності між ксеногенними та алогенними реакціями при кератопластиці. Хоча око є імунно-привілейованим місцем, алогенне відторгнення все одно відбувається через порушення імунної привілейованості. Алогенне відторгнення опосередковується переважно CD4<sup>+</sup>

Т-клітинами [71, 141, 187]. Було показано також, що CD8<sup>+</sup> Т-клітини опосередковують алогенне відторгнення [71, 141]. Також повідомлялося, що НК-клітини відіграють роль у алогенному відторгненні рогівки [203].

*Механізм ксеногенного відторгнення з донорами варіантів у ранніх дослідженнях*

Імунологічні бар'єри при ксенотрансплантації рогівки нижчі, ніж при ксенотрансплантації судинних органів, однак вони перевищують бар'єри при алотрансплантації рогівки [78, 88]. У ранніх дослідженнях використовувались моделі невеликих тварин (наприклад, гризунів) для вивчення механізму відторгнення або середніх і великих тварин (кроликів, котів, свиней, НЛП) для оцінки ефективності в якості доклінічного випробування з різними донорами (риба, кролик, курка, собака) [129, 163, 201]. Вживання трансплантата та механізм ксеногенного відторгнення залежать від філогенетичної неузгодженості, розміру донора, хірургічної та післяопераційної травми та різних тваринних моделей (імунна система хазяїна) [129], у моделях щурів [201] та інші [163] повідомили, що не було надгострого відторгнення, інфільтрація Т-клітин, нейтрофілів і макрофагів, а також відкладення Ig G та Ig M в трансплантаті, і продукування ксенореактивних Ig M та Ig G після трансплантації або попередньо сформованих ксенореактивних антитіл у сироватці крові. Було також повідомлено, що сенсibiliзація до ксеноантигену прискорює ксеногенне відторгнення рогівки [201]. Інфільтрація еозинофілів також була виявлена в деяких моделях щурів [163]. У сукупності гостра гуморальна відповідь з пізнішою клітинно-опосередкованою відповіддю є критичною ознакою, що відрізняє ксеногенне від алогенного відторгнення. Загалом вплив кожної імунної клітини або гуморальних факторів на ксеногенне відторгнення запропоновано в наступному порядку; CD4<sup>+</sup> Т-клітини макрофаги Abs, комплемент нейтрофіли, еозинофіли CD8<sup>+</sup> Т-клітини [129]. Повідомлялося, що клітини НК/НК-Т не беруть участь у відторгненні ксенотрансплантата рогівки [203].

### *Механізм ксеногенного відторгнення у свиней-донорів*

Ксенотрансплантати рогівки свині до НЛП живуть довше (>933 днів), ніж серцеві (>195 днів) або нирки (310 днів) ксенотрансплантати свині до НЛП [86, 94, 223], що свідчить про меншу кількість імунологічних бар'єрів. HAR не спостерігається в ксенотрансплантатах рогівки свиней на відміну від твердих органів [129]. Враховуючи, що як  $\alpha$ Gal, так і не- $\alpha$ Gal (наприклад, N-гліколілнейрамінова кислота (NeuGc)) експресуються в клітинах рогівки свиней, гостре гуморальне відторгнення може відбутися [90, 160].

Під час ксенотрансплантації рогівки свині кролику виявлено Т-клітини, моноцити та еозинофіли [189-192], а пластинчасті трансплантати збереглися довше, ніж трансплантати повної товщини [191]. Згідно з гістологічним аналізом, у відторгнених трансплантатах НЛП, спостерігаються CD4<sup>+</sup> і CD8<sup>+</sup> Т-клітини, макрофаги, В-клітини та відкладення Ig G і комплементу, іноді виявляються нейтрофіли та еозинофіли. Крім того, повідомляється, що активований водянистою вологою комплемент і клітини CD8<sup>+</sup>IFN $\gamma$ <sup>+</sup> у крові є прогностичним біомаркером ксеногенного відторгнення в НЛП [231]. Отже, критична роль комплементу в ксеногенному відторгненні, ймовірно, пов'язана з тим фактом, що свинячий еквівалент комплемент-регуляторного білка менш здатний забезпечити захист від активації людського комплементу. Це, ймовірно, пов'язано з відносно видоспецифічними комплементарними модуляторними білками [237]. Збільшення донор-специфічного Ig G та анти-не- $\alpha$ Gal Ig G постійно спостерігається в більшості НЛП з відторгненими трансплантатами. Таким чином, ксеногенні механізми відторгнення при ксенотрансплантації рогівки свиней можна представити так: HAR не спостерігається на всіх тваринних моделях; гострі та хронічні відторгнення відбуваються через опосередковані CD4<sup>+</sup> Т-клітинами клітинні, гуморальні, і вроджені відповіді, опосередковані комплементом; участь CD8<sup>+</sup> Т-клітин різна залежно від моделей на тваринах, а пов'язане з CD8<sup>+</sup> Т-клітинами



відторгнення є основним у моделі НЛП; відторгнення, пов'язане з НК-клітинами, спостерігається не в усіх моделях тварин.

### 1.7 Доклінічні дані про ефективність ксенотрансплантації рогівки свиней

Вживаність ксенотрансплантата рогівки залежить від типу трансплантата, розміру трансплантата, рівня імуносупресії та ієрархічної неузгодженості між донором і реципієнтом [155]. Таким чином, виживання ксенотрансплантатів рогівки в дослідженнях НЛП відрізняється між моделями малих і середніх тварин.

Міжнародна асоціація ксенотрансплантації досягла консенсусу щодо встановлення порогу доклінічної ефективності дослідження НЛП, достатнього для виправдання початку клінічного випробування ксенотрансплантації рогівки [156]. Дані НЛП підтверджують клінічне випробування, якщо ксенотрансплантати рогівки свиней виживали більше 6 місяців у п'яти з восьми послідовних НЛП; і в ідеалі протягом 12 місяців в одному або двох успішних випадках [156].

#### *Передня пластинчаста кератопластика*

Оскільки ендотеліальні клітини не включені, імунна відповідь при передній кератопластиці є меншою, ніж при НКП. При трансплантації передніх пластинчастих (від 100 мкм до передньої половини товщини) трансплантатів малого діаметра (5,0–7,0 мм) повідомляється про виживання близько 90–180 днів навіть без імуносупресії [60, 169]. Водночас, незважаючи на те, що використовувався місцевий КС, більш товсті пластинчасті трансплантати (350–400 мкм) відторгалися протягом 28 дня. Коли використовували анти-CD40 Аб, глибока передня пластинчаста кератопластика показала понад 180 днів виживання ксенотрансплантата [155].

### *Наскрізна кератопластика (НКП).*

НКП потребує сильних імунодепресантів для подолання ксеногенного відторгнення

Оскільки трансплантати рогівки розміром 7,5–8,0 мм зазвичай використовуються у людей, результати досліджень НЛП, у яких використовувалися трансплантати розміром 7,5 мм або більше, ближчі до результатів НКП людини, ніж результати з меншими трансплантатами [78, 161, 174].

Ряд досліджень показали, що трансплантат живе понад 6 місяців [86, 153, 230, 231]. Серед цих досліджень одне задовольнило порогові вимоги для клінічного випробування імуносупресивного режиму на основі анти-CD40 Аб або анти-CD20 Аб/такролімусу [86, 153]. У відторгнутому трансплантаті спостерігалася щільна інфільтрація CD4+ Т- і CD8+ Т-клітин, В-клітин і макрофагів, тоді як більшість трансплантатів, що прижилися показали мінімальну інфільтрацію цих клітин. У НЛП з відторгненими трансплантатами компонент комплементу 3а (С3а) у водянистій волозі збільшився, і в трансплантатах було виявлено сильне відкладення компонента комплементу 3с (С3с) [86, 153, 231].

### *Ендотеліальна кератопластика*

Ендотеліальна кератопластика (ЕК) показує кращі візуальні результати та менше відторгнення, ніж НКП [144]. При проведенні ЕК не потрібно визначати відповідність товщини, а також не потрібно вибирати молодого донора для підбору розміру. Крім того, ЕК може потребувати слабшої імуносупресивної схеми та демонструє менший ризик ксенозоозу, ніж НКП, оскільки в задньому пластинчастому трансплантаті менше свинячих клітин. Рогівка свиней, на відміну від людської, має сильну адгезію десцеметової мембрани до строми [177]. Таким чином, підготовка донорського трансплантата до ендотеліальної кератопластики десцеметової мембрани є складною. ЕК з трансплантатом рогівки свиней може бути корисною для

подолання ксеногенного відторгнення. Тому необхідні подальші дослідження ЕК з використанням великого розміру свинячого трансплантата для перевірки доклінічної ефективності НЛП.

Підсумовуючи, трансплантація повної товщини рогівки від свині до НЛП демонструє доклінічну ефективність із клінічно застосовним розміром трансплантата при ко-стимулюючих блокаторах або комбінованому режимі анти-CD20 Abs/інгібітор кальциневрину, тоді як доклінічна ефективність від свині до- НЛП ендотеліальної кератопластики поки що вивчена недостатньо.

## 1.8 Розробка децелюляризованої рогівки та дані про ефективність

### *Поняття про децелюляризацію та різні методи*

Децелюляризація – це процес видалення клітин із тканин, які будуть використовуватися в безклітинних каркасах. Оскільки, як було вказано раніше, клітинні компоненти рогівки свиней є основним джерелом ксеноантигенів, децелюляризована рогівка має перевагу у зниженні імунної відповіді після трансплантації [133]. Незважаючи на те, що децелюляризована рогівка (ДЦР) розглядається як медичний пристрій [158], міжнародне співтовариство ксенотрансплантологів все ще обговорює, чи відноситься до трансплантації ксенотрансплантація ДЦР. Важливо також порівняти її ефективність з нативною ксенотрансплантацією.

Ендотеліальні клітини рогівки є вирішальним бар'єром для запобігання проникненню водянистої вологи в строму рогівки. Дійсно, дисфункція ендотеліальних клітин призводить до набряку рогівки та зменшення прозорості [73]. Оскільки ДЦР не містить ендотеліальних клітин рогівки, терапевтичні показання для ДЦР обмежені використанням лише як передніх пластинчастих трансплантатів для рогівки зі здоровими ендотеліальними клітинами. Були публікації про посів на ДЦР культивованих ендотеліальних

клітин рогівки людини, але не було досліджень трансплантації *in vivo* з використанням цих трансплантатів [228].

ДЦР як передній пластинчастий трансплантат показує довгострокову виживаність трансплантата не лише в моделях НЛП, але й у дослідженнях на людях [233, 234].

#### *Різні методи децелюляризованої рогівки свиней*

Децелюляризовані методи для ДЦР (які використовуються окремо або в комбінації) класифікуються на три категорії: хімічні, фізичні та біологічні (Fernandez-Perez and Ahearne, 2020). Для хімічної децелюляризації застосовуються детергенти, зокрема додецилсульфат натрію, дезоксихолат натрію, тритон X-100, пероцтова кислота, мурашина кислота, гідроксид амонію, хлорид натрію та етилендіамінтетраоцтова кислота (ЕДТА). Фізична децелюляризація включає перемішування, заморожування-розморожування, електрофорез, високий гідростатичний тиск, осмотичний тиск, надкритичний CO<sub>2</sub>, ультразвук, гліцерин і ліофілізацію [170]. Біологічні методи – це переважно ферменти, які включають трипсин, диспазу, фосфоліпазу A<sub>2</sub>, сироватку крові людини та нуклеази.

Ідеальна децелюляризація спрямована на видалення всіх клітинних компонентів, зберігаючи при цьому прозорість рогівки та структуру позаклітинних матриць [146]. Науковці вказують на такі методи, що є достатніми для процесу децелюляризації: 1,5 М NaCl окремо або 0,05 трипсину/0,02 % ЕДТА після нанесення 1,5 М NaCl [167, 189]; 0,05 % або 0,1 % додецилсульфат натрію [105, 125]; високий гідростатичний тиск [134]; заморожування-відтаювання з подальшою обробкою ДНК-азою, РНК-азою [170]; N<sub>2</sub> з Тритон X-100 [171]; 200 ОД/мл фосфоліпази A<sub>2</sub> з 0,5 % дезоксихолату натрію [167]; Гліцерин з наступним хімічним зшиванням [176].

### *Характеристики децелюляризованої рогівки свиней*

ДЦР показали низьку імуногенність із меншим зв'язуванням імуноглобуліну людини незалежно від методів децелюляризації порівняно з нативною рогівкою свиней [167]. Менше відторгнення трансплантата та зменшена інфільтрація Т- і В-клітин були показані в трансплантованих НЛП [85]. Незважаючи на те, що  $\alpha$ Gal не було повністю видалено, ДЦР показали довготривале виживання в дослідженнях НЛП порівняно з трансплантатами НРС [84, 167], що свідчить про те, що зниження антигенного навантаження є корисним. Оскільки для децелюляризації використовуються хімічні речовини, що створює проблему цитотоксичності, у процедури децелюляризації слід включити процеси ретельного вимивання.

Після децелюляризації слід зберегти прозорість. Прозорість ДЦР може відрізнитися залежно від методу децелюляризації, а ДЦР за допомогою певних методів не є задовільними для клінічного використання [167, 191, 199]. Повідомлялося про збереження прозорості в таких методах:  $N_2$ , SDS, гіпер/гіпотонічний розчин, гідростатичний тиск/ДНКаза, заморожування, гіпертонічний NaCl, заморожування-розморожування з подальшою інкубацією з ДНК-азою/РНК-азою або дистильована вода/трипсин/заморожування-розморожування/NaOH/ДНКаза/РНКаза [134, 175, 179]. Зневоднення гліцерином широко використовується для відновлення прозорості після децелюляризації [134, 199]. ДЦР може стати непрозорим через набухання під час зберігання або відразу після операції. Набряк зменшується через кілька днів або тижнів після трансплантації, а колагенові волокна перерозподіляються, таким чином відновлюється прозорість ДЦР [135]. ДЦР продемонстрував подібні механічні властивості порівняно з НРС щодо міцності на розрив, еластичності та пропускання світла [105, 106, 133, 179, 225].

### 1.9 Ефективність, безпека та гістологічні дослідження кератопластики з використанням децелюляризованої рогівки свиней

У дослідженнях НЛП тривалість життя понад 6 місяців була показана у 14 реципієнтів із 15 [85, 169]. Гістологічні результати показали, що більшість трансплантатів ДЦР не мали запальної клітинної інфільтрації або мали слабку інфільтрацію залежно від методу децелюляризації. Таким чином, доведена доклінічна ефективність використання ДЦР при кератопластиці.

Вживання трансплантата залежить не тільки від цитотоксичності та антигенності після децелюляризації, але також від розміру та товщини трансплантата. Залишки донорських клітин або клітинного сміття після децелюляризації, можливо, діяли як індуктори запалення [122]. Чим більший трансплантат, тим більше залишкових донорських клітин і уламків можна трансплантувати в рогівку реципієнта. Крім того, чим більший розмір трансплантата, тим ближче з'єднання трансплантат-реципієнт знаходиться до лімба, отже, збільшується вплив імунних клітин реципієнта в лімбі.

Таким чином, методи, які показали ефективність у дослідженнях НЛП (вживання  $\geq 6$  місяців), такі як хлорид кальцію або гіпертонічний NaCl у поєднанні з трипсином/EDTA, вважаються клінічно прийнятними методами [85].

З огляду на вплив розміру трансплантата, метод із більшим розміром трансплантата (7–10 мм), який показав хороший результат (вживаність  $\geq 6$  місяців), може бути можливим методом. Методи, які показали ефективність (вживаність  $\geq 6$  місяців) з розміром трансплантата 7,0 мм або більше в дослідженнях на кроликах або НЛП, такі: Гіпертонічний NaCl (трипсин/EDTA), додецилсульфат натрію, хлорид кальцію та гліцерин, зшитий N-гідроксисульфосукцинімідом і 1-етил-3-(3-диметиламінопропіл) карбодіїмідом (EDC) [85, 167]. У сукупності гіпертонічний NaCl у поєднанні з

методом трипсину/ЕДТА або хлоридом кальцію може бути клінічно можливим. Однак слід провести подальші порівняльні дослідження.

На сьогоднішній день ДЦР був схвалений для використання лише Китайським національним інститутом контролю за харчовими продуктами та ліками в 2017 році [207]. Було опубліковано три клінічних випробування та один випадок використання ДЦР у Китаї; усі дослідження проводилися з використанням тих самих комерційно доступних продуктів ДЦР [170-172, 207, 233, 236]. ДЦР була децелюляризована шляхом чергування гіпертонічної NaCl-надчистої води, консервована у гліцерині та стерилізована опроміненням  $60\text{Co}$  [236]. Перше клінічне випробування повідомило про покращення гостроти зору та поступове відновлення прозорості трансплантата у 34 з 47 очей із грибковим кератитом [233]. У другому клінічному дослідженні також повідомлялося про покращення гостроти зору в 9 з 13 очей з герпетичним кератитом, але розплавлення трансплантата було виявлено в 3 очах [236]. У третьому клінічному дослідженні 39 пацієнтів з прогресуючим інфекційним кератитом отримали трансплантацію з використанням ДЦР протягом 12 місяців спостереження. У 12 пацієнтів (30,8%) спостерігалася відторгнення трансплантата, пов'язане з герпетичним кератитом, і розміром трансплантата більше 8,0 мм. У ще одному звіті показано, що ДЦР трансплантували пацієнтам з виразкою рогівки, і гістологія показала мінімальну інфільтрацію запальних клітин і міграцію стромальних клітин реципієнта. Це свідчить про те, що ДЦР може бути біосумісним каркасом [207].

Два клінічні дослідження ДЦР також були проведені в Україні [104, 215]. Автори використовували таку ж ліофілізовану рогівку українського виробництва. В одному дослідженні ДЦР трансплантували в 32 ока з некротичним кератитом, але всі трансплантати були відторгнені [104]. В іншому дослідженні ДЦР трансплантували в 49 очей із ускладненими виразками рогівки [215]. Повідомляється, що виразки були загоєні у всіх

пацієнтів, хоча ксенотрансплантати повністю розсмоктувалися між 2 і 3 місяцями.

ДЦР розглядається як медичний пристрій Управлінням з контролю за харчовими продуктами та ліками (FDA) (а не як ксенопродукт) лише тоді, коли підтверджується повне видалення клітин [112]. FDA не розглядає ДЦР у регулюванні продуктів для ксенотрансплантації, а натомість вимагає, щоб ДЦР дотримувався вказівок відповідно до медичних пристроїв, що містять матеріали, отримані з тваринного походження. Крім того, FDA вимагає документувати джерело та поводження з тканинами тварин і підтримує достатню стерилізацію ксенозоонозних патогенів, а також перевірку методів стерилізації [112].

Оскільки поточні процедури децелюляризації зазвичай забезпечують достатнє видалення клітин, деякі клітини свиней або вірус PERV можуть залишатися в ДЦР. Незважаючи на те, що фарбування гематоксиліном і еозином не ідентифікувало клітини, було повідомлено про виявлення ядерних уламків або залишків свинячої дезоксирибонуклеїнової кислоти (ДНК) у ДЦР [206, 234, 235, 238]. Тому, якщо не буде забезпечено повне видалення клітин, юридичне визначення ДЦР знаходиться десь між медичним пристроєм і ксенотрансплантатом. Наразі немає консенсусу щодо того, як повністю видалити клітини та перевірити це в ДЦР [146] Щоб підтвердити відсутність ядра, пропонуються різноманітні методи, які включають фарбування гематоксиліном-еозином або 4', 6-діамідіно-2-феніліндолом, кількісне визначення дцДНК та визначення максимальної довжини залишків ДНК.

Для клінічного застосування на людях слід розробити не лише стандартні процедури виробництва ДЦР, але й стандартні процедури для перевірки повної децелюляризації, щоб відповідним чином регулювати їх як медичний пристрій відповідними законами.



### 1.10 Аналіз та перспективи на майбутнє

Відколи на початку 2000-х років були створені свині GT-КО, було досягнуто серйозного прогресу в дослідженнях ксенотрансплантації як альтернативи алотрансплантатам. Однак імунне відторгнення та необхідність сильної імуносупресії залишаються основною перешкодою. Для клінічно прийняттого імуносупресивного режиму в клінічних випробуваннях потрібне виробництво менш антигенних ГМ свиней. Розуміння того, як відбувається ксеногенне відторгнення, може допомогти вибрати свиней ГМ, які підходять для ксенотрансплантації рогівки. Нещодавно оголошена технологія редагування генів з використанням CRISPR-Cas9 може маніпулювати декількома генами за короткий проміжок часу і може дати нам найменш імуногенні та вільні від PERV свині ГМ.

Завдяки накопиченню доказів і нещодавнім досягненням доклінічної ефективності, ксенотрансплантати рогівки можуть бути запропоновані для клінічних випробувань. Дані про ефективність є очевидними при тривалому виживанні трансплантатів свиней під час введення ко-стимулюючих блокаторів або комбінованих схем анти-CD20 Abs/CNI. Що стосується трансплантатів рогівки свиней, які мають ГМ, слід провести подальші експерименти, щоб перевірити їхню ефективність. Перед проведенням клінічного випробування слід стандартизувати імуносупресію. Крім того, тісне спілкування з дослідницькою спільнотою ксенотрансплантації призведе до глобального консенсусу щодо наближення ксенотрансплантації рогівки до реальності.

Поточні високі витрати на утримання свиней DPF або виробництва свиней ГМ, а також дорогий процес виробництва ксенопродукту рогівки можна розглядати як практичну проблему для розповсюдження ксенопродукту рогівки в країнах, що розвиваються, де дійсно може знадобитися ксенотрансплантація. Нарешті, багато країн досі не мають

нормативно-правової бази для ксенотрансплантації рогівки, яку слід встановити перед клінічним впровадженням. Ці проблеми слід розглядати та намагатися вирішити у співпраці з офтальмологічним співтовариством та товариством ксенотрансплантологів.

Хоча доклінічна ефективність використання ДЦР у кератопластиці доведена, юридичне визначення ДЦР лежить десь між медичним пристроєм і ксенотрансплантатом, якщо не гарантовано повне видалення клітин. Тому перед проведенням клінічних випробувань слід затвердити стандартні процедури перевірки повної децелюляризації. Немає довгострокових даних безпеки використання ДЦР; тому необхідно проводити подальші дослідження для оцінки ефективності та безпеки пересадки ДЦР.

## РОЗДІЛ 2

### МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Згідно з поставленою метою, спрямованою на покращення ефективності корекції механічної травми рогівки шляхом використання строми рогівки, отриманої медом децелюляризації, було розроблено дизайн дослідження.

#### 2.1 Постановка досліджу

Дослідження було проведене у 3 етапи.

На першому етапі було відпрацьовано технологію виготовлення еквівалента строми рогівки методом децелюляризації та проведено її дослідження як субстрату для проведення кератопластики. зокрема вивчено його морфологічні характеристики.

На другому етапі провели дослідження стану рогівки та організму в цілому у тварин, яким моделювали механічну травму рогівки.

На третьому етапі проводилась оцінка ефективності використання еквівалента строми рогівки, отриманого методом децелюляризації як матеріалу для проведення корекції механічної непроникаючої травми рогівки у кролів.

#### 2.2 Технологія отримання еквівалента строми рогівки свині методом децелюляризації для подальшої кератопластики

Забір рогівок проводили в цеху забою тварин з дотриманням принципів біоетики [11]. Рогівку, отриману з видалених очей свиней, розміщували у середовищі для культивування тканини, після чого проводили її децелюляризацію таким чином: обробляли 0,5 % розчином додецилсульфату натрію за умов постійного струшування при температурі 4 °С, у подальшому

обробли ультразвуком з використанням ультразвукового диспергатора УЗдН-М 750 протягом 5 хв, інкубували за присутності 0,1% розчину папаїну (рН 6,5) впродовж 2,5 год при температурі 30 °С, промивали у калій-фосфатному 0,1 м буфері (рН 6,5) трикратно по 5 хв. Знову обробляли ультразвуком протягом 5 хв, обробляли 0,5 % розчином додецил-сульфату натрію двічі впродовж 3 год, промивали у калій-фосфатному 0,1 м буфері (рН 6,5) трикратно по 5 хв, ще раз обробляли ультразвуком протягом 5 хв, промивали у калій-фосфатному буфері (рН 6,5) п'ятикратно по 5 хв. Центрифугували на центрифугі ROTOFIX 32-А при 3000 g 15 хв з декантацією трикратно і переносили у середовище для зберігання – 2 % розчин полівінілпіролідону при температурі 0 °С [5]

2.3 Методи дослідження при моделюванні механічної травми рогівки та використанні строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації

### 2.3.1 Відбір тварин для дослідження та експериментальна модель

Для проведення дослідження використали статевозрілих кролів породи “Шиншила” та масою тіла 2,5-3 кг. Усі маніпуляції проводились з дотриманням загальних принципів експериментів на тваринах [11]. Тварин утримували в умовах віварію, для годування використовували інгредієнти, що входять до стандартного раціону віварію. В процесі роботи нами використано 30 кролів.

Моделлю пошкодження рогівки слугувала непроникаюча механічна травма. З допомогою трепана діаметром 7 мм наносили концентричну епітеліальну насічку у верхній половині рогівки, а у подальшому проводили видалення епітелію разом з переднім шаром строми рогівки одноразовим офтальмологічним скальпелем. (викроювали клапоть товщиною до 0,2 мм) у межах нанесеної насічки [32] (рис. 2.1).



Рисунок 2.1 – Моделювання механічної непроникаючої травми рогівки

Для контролю відтворення ерозії проводили фарбування рогівки 0,5 % розчином флуоресцеїну, місце ерозії зафарбовувалось зеленим кольором. Маніпуляцію проводили на обох очах з використанням методу знечулення – місцевої епібульбарної анестезії 0,5 % розчином алкаїну та ретробульбарної анестезії 2 % розчином лідокаїну 1,0 мл (рис. 2.2).



Рисунок 2.2 – Фарбування флуоресцеїном нанесеної травми рогівки

Проведення евтаназії здійснювали методом повітряної емболії з використанням загальної анестезії натрій тіопенталом (80 мг на кілограм маси тіла тварини), після чого проводили енуклеацію обох очей, висікали рогівку для проведення гістологічних досліджень.

Тварин поділили на три групи: контрольна група – I – тварини без змодельованої патології (інтактні тварини); II – тварини, яким моделювали механічну непроникаючу травму рогівки на обох очах; III – тварини, яким моделювали травму рогівки і проводили хірургічну корекцію з використанням строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації..

На 3-тю, 7-му, 14-ту і 28-му доби після нанесення механічної травми рогівки нами проводився забір крові із крайової вени вуха піддослідних тварин для проведення подальших досліджень. На 28-му кролів виводили з експерименту методом повітряної емболії.

Проведення хірургічної корекції травми ока полягало у закритті дефекту рогівки еквівалентом строми рогівки свині, отриманого методом децелюляризації (рис. 2.3), шляхом пришивання його у 4-ох місцях (на 3-ій, 6-ій, 9-ій та 12-ій годинах) через кон'юнктиву до склери з використанням атравматичної голки 8/0 нейлон. Впродовж 8-ми діб усім тваринам проводилась інстиляція розчину антибіотика фторхінолонового ряду – Вігамокс (1 крапля 3 рази на день).

### 2.3.2 Морфологічні дослідження (гістологічні, морфометричні, електронно-мікроскопічні)

При проведенні морфологічних досліджень використовували загальноприйняті методики [26]. Для гістологічного дослідження шматочки рогівки фіксували протягом ночі в 10 % нейтральному забуференому формаліні. Обробку тканини проводили в гістопроесорі LOGOSone (Milestone, Італія). Парафінові зрізи рогівки фарбували гематоксиліном та еозином, оцінювали за

допомогою світлового мікроскопа Nikon Eclipse Si-E (Nikon, Японія) та фотодокументували цифровою камерою Sigeta M3CMOS 14000.



Рисунок 2.3 – Закривання дефекту рогівки з використанням строми, отриманої методом децелюляризації

Для морфометричних досліджень використовували програму візуального аналізу Tour View. Визначали товщину переднього епітелію рогівки у центральній та крайовій ділянках травмування, товщину строми та товщину рогівки загалом.

Використання електронно-мікроскопічного методу. Забір матеріалу для електронно-мікроскопічних досліджень проводили за загальноприйнятою методикою. Маленькі шматочки рогівки відпрепарували і фіксували у 2,5 % розчині глютаральдегіду (рН 7,2–7,4), який готували на фосфатному буфері. Через 60 хвилин фіксований матеріал переносили у буферний розчин і промивали протягом 20-30 хвилин. Проведення постфіксації відбувалось 1 % розчином чотириокису осмію протягом 60 хвилин з подальшою його дегідратацію у пропіленоксид та заливкою у суміш епоксидних смол з аралдитом.

Для вигоотовлення ультратонких зрізів використовували ультрамікромом LKB-3 (Швеція). Зрізи контрастували за методом Рейнольдса із застосуванням 1 %-ного водного розчину ураніацетату та цитрату свинцю і досліджували за допомогою електронного мікроскопа ПЕМ-125К.

Використовували також морфометричні та кількісні методи, які дають можливість об'єктивно оцінити морфо-функціональний стан рогівки в нормі, а також встановити закономірності її морфологічних змін при моделювання механічної травми та її корекції.

Для проведення морфометричних та кількісних досліджень використовували систему програму Відео Тест 5.0 КААРА Image Base та Microsoft Excel з можливістю візуального аналізу гістологічних препаратів, на персональному комп'ютері. Проводили визначення товщини цілісної рогівки, її переднього епітелію та власної речовини, розмірів базальних клітин і площі. Вираховували також ядерно-цитоплазматичне співвідношення, що дозволяє визначити ступінь диференціювання епітеліоцитів, а також встановити глибину і характеру морфо-функціональних змін.

### 2.3.3 Методи визначення інтенсивності процесів ліпопероксидації і стану антиоксидантної системи

*Визначення вмісту гідропероксидів ліпідів (ГПЛ).* Для визначення концентрації GPL [14] використовували метод ґрунтується на їх екстрагуванні гептан-ізопропіловою сумішшю. Екстраговані продукти мають максимум поглинання при  $\lambda=232$  нм. Набрали 0,2 мл сироватки крові і додавали 4 мл суміші гептан-ізопропанолу у співвідношенні 1:1 з подальшим струшуванням на лабораторному струшувачі протягом 15 хв. Після струшування вносили по 1 мл розчину HCl (рН=2,0) і 2 мл гептану. Утворену суміш інтенсивно струшували залишали для відстоювання на 30 хв. відбувалось розшарування суміші на два шари. Верхній (гептановий) шар відбирали у кювети спектрофотометра і вимірювали його оптичну щільність



при  $\lambda=232$  нм проти контролю, у який замість досліджуваного матеріалу вносили 0,2 мл дистильованої води. Розраховували концентрацію ГПЛ у відносних одиницях за формулою:

$$C = 10 \cdot E \cdot V_1 / V_2 \text{ ум. од./мл} \quad (2.1)$$

де  $E$  – оптична щільність гептанового шару проби,

$V_1$  – кінцевий об'єм гептанового екстракту (4 мл),

$V_2$  – об'єм досліджуваного матеріалу (2 мл).

*Метод визначення вмісту ТБК-реагуючих продуктів.* Вміст ТБК\_реактантів визначали за здатністю малонового діальдегіду – ключового продукту, що реагує з тіобарбітуровою кислотою, утворювати в кислому середовищі забарвлений комплекс [27].

Для визначення ТБК-реактантів викоистовували центрифужні пробірки, у які вносили: 1 мл дистильованої води, 0,5 мл сироватки крові, 2 мл 30 %-ого розчину трихлороцтової кислоти, 0,2 мл розчину HCl 5-ти молярної концентрації, 2 мл ТБК. Суміш кип'ятили протягом 15 хв на водяній бані. Після охолодження центрифугували при 3000 об./хв. протягом 10 хв і вимірювали оптичну щільність верхньої фази при довжині хвилі  $\lambda=535$  нм проти води. При проведенні розрахунків враховували коефіцієнт молярної екстинкції для МДА, що складає  $1,56 \times 10^5$  моль $\times$ см $^{-1}$ . Активність ТБК-реагуючих продуктів виражали у мкмоль/л.

*Визначення вмісту основ Шиффа (ШО).* Метод визначення ШО – кінцевих продуктів ліпопероксидації, ґрунтується на поглинанні ліпідним екстрактом монохроматичного світлового потоку в ультрафіолетовій ділянці спектра. У центрифужні пробірки набирали 0,1 мл сироватки крові, вносили 8 мл суміші гептан-ізопропанол у (1:1). Суміш струшували протягом 15 хв. на лабораторному струшувачі з подальшим центрифугуванням протягом 10 хв. при 6000 об/хв. Верхній шар переносили в чисту пробірку, куди вносили 5 мл суміші гептан-ізопропанол (3:7) та 2 мл 0,01 N розчину хлоридної кислоти.

Відбувалось розділення фаз і видалення неліпідних домішок. Верхню (гептанову) фазу переносили в чисту пробірку, і вимірювали оптичну щільність на спектрофотометрі проти відповідного контролю при довжинах хвиль 232 нм й 275 нм і виражали у відносних одиницях екстинкції [47].

*Визначення супероксиддисмутазної активності (СОД) в гемолізаті еритроцитів.* Для визначення СОД користувались методом [48]. 0,1 мл цільної крові розводили у співвідношенні 1:9 тріс-буферним розчином з концентрацією 5 мМ та рН 7,4. Отримували гемолізат, з якого осаджували гемоглобін додаванням 0,25 мл етанолу та 0,15 мл хлороформу. Отриману суміш заморожували при  $-30^{\circ}\text{C}$ , після чого гемолізат перемішували та центрифугували для видалення гемоглобіну і хлороформу протягом 15 хв при 3000 об/хв. отримували прозорий супернатант у якому визначали активність СОД. Набирали 0,2 мл супернатанту, до нього вносили 1,3 мл пірофосфатного буферу з молярною концентрацією 0,1 моль/л та рН =8,3, 0,3 мл розчину феназинметасульфату, 1 мл розчину нітротетразолію синього та 2 мл розчину НАДН з молярною концентрацією 0,2 ммоль/л. Після 10-ти хвилинного витримання у темноті проводили вимірювання екстинкції на спектрофотометрі при  $\lambda=540$  нм проти проб, до яких НАДН не додавали. Контрольними були проби, в які замість гемолізату вносили 0,2 мл фосфатного буферу. Ензимну активність розраховували таким чином: спочатку розраховували відсоток інгібування відновлення нітротетразолію синього за формулою:

$$T=(E_k - E_d) \times 100/E_k, \quad (2.2)$$

де T – відсоток інгібування;

$E_k$  – екстинкція контрольної проби;

$E_d$  – екстинкція дослідної проби.

За цим показником у подальшому розраховували ензимну активність за формулою:

$$A_{\text{сод}} = T / (100 \% - T)/C, \quad (2.3)$$

де  $A_{\text{СОД}}$  – активність супероксиддисмутази;

T – відсоток інгібування,

C – концентрація білка у цільній крові.

Виразали ензимну активність в умовних одиницях на 1 мг білка у цільній крові.

*Визначення каталазної активності (КТ).* Для визначення каталазної активності використовували метод, що базується на її здатності каталізувати реакцію розщеплення пероксиду водню [7, 8]. Дослідження проводили у 3 етапи. Перший етап полягав в отриманні еритроцитів з цільної крові, для чого її центрифугували протягом 15 хв при 1500 об/хв. з подальшим їх відмиванням. 2 мл відмитих еритроцитів розводили у співвідношенні 1:1000, використовуючи 0,9 % розчин NaCl і визначали оптичну щільність при  $\lambda=410$  нм. Показник оптичної щільності 0,7 відповідає концентрації еритроцитів  $1,5 \times 10^8$  /мл.

Другий етап полягав в отриманні гемолізату еритроцитів, вільного від гемоглобіну за методикою, як це робилось при визначенні активності СОД. У супернатанті визначали каталазну активність, розбавивши його попередньо бідистильованою водою у співвідношенні 1:10.

Третій етап полягав власне у визначенні каталазної активності. Готували реакційну суміш, що містила: 0,5 мл фосфатного буфера (0,01 моль/л), рН 6,7, 0,5 мл ЕДТА ( $10^{-4}$  моль/л), 2 мл гідроген пероксиду (0,015 моль/л), 0,1 мл досліджуваного зразка. У контрольну і дослідну проби, що містили досліджуваний ензимний розчин, додавали фосфатний буфер, гідроген пероксид і ЕДТА. У контрольній пробі реакцію зупиняли внесенням 1 мл 10 % розчину сульфатної кислоти, після чого проби інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Після закінчення часу інкубації у дослідні проби вносили 1 мл 10 % розчину сульфатної кислоти. Проводили визначення екстинкції на спектрофотометрі при  $\lambda=250$  нм.

Одночасно ставили також холосту пробу, щоб можна було врахувати

спонтанну реакцію розкладання гідроген пероксиду. У цю пробу замість зразка, що містив каталазу, аналогічний об'єм фосфатного буфера. За одиницю активності (А) приймали таку кількість (в молях) гідроген пероксиду, який розклався при інкубації в одиницю часу:

$$A = \frac{\Delta D \cdot V_1 \cdot c_1 \cdot n}{D_x \cdot V_2 \cdot c_2 \cdot t} \quad (2.4)$$

де  $\Delta D$  – різниця оптичної щільності дослідної та контрольної проб;

$D_x$  – оптична щільність холостої проби;

$V_1$  – загальний об'єм інкубаційної суміші;

$V_2$  – об'єм досліджуваного зразка;

$c_1$  – концентрація  $H_2O_2$ ;

$c_2$  – концентрація білка в пробі;

$n$  – фактор розведення;

$t$  – час інкубації.

Результати виражали у моль/хв на 1 мг білка крові.

*Визначення концентрації церулоплазміну (ЦП).* Для визначення ЦП використовували метод, що базується на утворенні забарвлених продуктів при окисненні пара-фенілендіаміну у присутності церулоплазміну [13].

До 0,1 мл сироватки крові без слідів гемолізу вносили по 8 мл розчину ацетатного буферу з молярною концентрацією 0,4 моль/л (рН 5,5) і по 1 мл пара-фенілендіаміну. У пробірку з контрольною пробою з метою інактивації ензиму вносили 1 мл 0,5 % розчину солянокислого гідроксиламіну. Пробірки поміщали у в термостат при 37 °С на 1 годину, закривши перед цим корками. Після інкубації в усі пробірки, крім контрольної, вносили по 1 мл солянокислого гідроксиламіну, витримували їх протягом 30 хвилин при 4 °С і визначали оптичну щільність проти контролю на спектрофотометрі  $\lambda=530$  нм. Розраховували концентрацію церулоплазміну за формулою:

$$C=E \times 875, \quad (2.5)$$

де С – концентрація церулоплазміну в мг/л;

Е – екстинкція проби.

*Визначення концентрації відновленого глутатіону.* Відновлений глутатіон визначали за реакцією 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойної) кислоти з його вільними SH-групами, внаслідок чого утворюється тіонітрофенильний аніон в кількості, що прямо пропорційна вмісту SH-груп [3]. Набирали у пробірку 0,2 мл цільної крові, до неї вносили 1,6 мл гідроген пероксиду і 0,2 мл 25 % сульфосаліцилової кислоти. Суміш центрифугували протягом 15 хвилин при 3000 об/хв. Після центрифугування відбирали центрифутат в об'ємі 0,5 мл до якого додавали 2,5 мл 0,2 М тріс-буферу (рН = 8,4) і 0,05 мл 0,04 % розчину 5,5'-дитіобіс(2-нітробензойної) кислоти. В пробірку з контрольною пробою вносили 0,2 мл води замість досліджуваного матеріалу. Після інкубування протягом 10 хвилин проби фотометрували на спектрофотометрі при  $\lambda=412$  нм проти контролю. При розрахунку концентрації відновленого глутатіону використовували коефіцієнт молярної екстинкції для тіонітрофенильного аніону, що складає  $11400 \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .

#### 2.3.4 Вивчення стану системи протеїнази/інгібітори протеїназ

*Визначення загальної протеолітичної активності плазми крові.* Визначення загальної протеолітичної активності плазми крові проводили за лізисом азоальбуміну, азоколу та азоказеїну за допомогою набору реактивів «Simko Ltd» (Україна) за методом, котрий базується на тому, що при інкубації білкових азосполук в присутності активаторів і інгібіторів протеолізу, котрі містяться в тканинах, відбувається лізис азоальбуміну (розпад низькомолекулярних протеїнів), азоказеїну (розпад високомолекулярних протеїнів) та азоколагену (колагеноліз), інтенсивність якого оцінювали за ступенем забарвлення інкубаційного середовища на спектрофотометрі при довжині хвилі 440 нм. Таким чином протеолітичну активність визначали в одиницях екстинкції на 1 мл плазми за 1 годину [2].

*Визначення вмісту  $\alpha 2$ -макроглобуліну.* Вміст  $\alpha 2$ -макроглобуліну ( $\alpha 2$ -МГ) визначали за методом, суть котрого полягає у тому, що  $\alpha 2$ -МГ утворює із трипсином активний комплекс, який є нечутливим до дії інгібітору з бобів сої. При виконанні методики використовували трипсин («Srofa», Чехія) [9, 10]. За даним методом концентрацію  $\alpha 2$ -МГ визначали за калібрувальним графіком, у котрому по осі абсцис відкладали кількість трипсину, а по осі ординат – оптичну щільність проб, у яких відбувся гідроліз N-бензоїл-DL-аргінін-пара-нітроаніліду (БАПНА) відповідною концентрацією трипсину. Таким чином концентрацію  $\alpha 2$ -МГ виражали у г/л в сироватці крові [9].

*Визначення вмісту  $\alpha 1$ -інгібітора протеаз.* Визначення вмісту  $\alpha 1$ -інгібітора протеаз ( $\alpha 1$ -ІП) у сироватці крові проводили методом, суть якого полягає на здатності  $\alpha 1$ -ІП сироватки крові пригнічувати гідроліз трипсином БАПНА. А також трипсин у комплексі з  $\alpha 2$ -МГ здатний розщеплювати БАПНА. Вміст  $\alpha 1$ -інгібітора протеаз визначали за різницею між відомою кількістю трипсину та кількістю ферменту, що залишився після його взаємодії із інгібіторами плазми. Вміст  $\alpha 1$ -інгібітора протеаз визначали за калібрувальним графіком, у якому по осі абсцис відкладено кількість трипсину (1 – 10 мкг), а по осі ординат – оптична щільність проб, у яких відбувся гідроліз БАПНА відповідною концентрацією трипсину. Вміст  $\alpha 1$ -І інгібітора протеаз у сироватці крові виражали в мкмоль/л [10].

Розраховували (ІП), котрий відображає напруженість або «керованість» протеолітичних процесів, як відношення ЗПА до сумарної інгібіторної ємності (сума активності  $\alpha 1$ -ІП і  $\alpha 2$ -МГ) [10].

### 2.3.5 Методи дослідження клітинного і гуморального імунітету

*Дослідження клітинного імунітету.* Методика полягає у взаємодії моноклональних антитіл (МКАТ), які мічені флуоресцентною міткою, з поверхневими антигенами лімфоцитів [17]. У пробірки вносили досліджуваний матеріал в об'ємі 20 мкл антитіл до CD4+, CD8+, CD22+ і

ЕДТА, струшували на вортексі та інкубували у темному місці протягом 15-30 хвилин. Рекомендована кількість лейкоцитів – 3,5-9,4 Г/л. Щоб провести лізис еритроцитів, до кожної пробірки вносили лізуючий розчин в об'ємі 500 мкл з подальшим струшуванням та інкубуванні протягом 10-15 хвилин. У подальшому до пробірок додавали по 500 мкл буферного розчину та аналізували на проточному цитофлюориметрі.

*Визначення вмісту імуноглобулінів класів А, М і G.* Для визначення вмісту імуноглобулінів сироватки крові використовували набори реагентів «GeneTex» (США) згідно з інструкціями фірми-виробника. Визначення проводили методом твердофазового імуноферментного аналізу. Концентрацію імуноглобулінів виражали у г/л.

*Дослідження цитокінового статусу.* Концентрацію цитокінів TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-4 та IL-6 досліджували з використанням наборів реагентів «ELISA Kit for Rabbits Usen, Life Science Inc» (США) згідно з інструкціями фірми-виробника методом твердофазового імуноферментного аналізу [17].

### 2.3.6 Методи дослідження ендогенної інтоксикації

*Визначення еритроцитарного індекса інтоксикації (ЕІІ).* Метод базується на уявленні про те, що еритроцит є універсальним адсорбентом [28]. У пробірку вносили 1 мл 3,8 % розчину натрій цитрату, після чого добавляли по 4 мл крові. Суміш перемішували і центрифугували протягом 10 хвилин при 3000 об./хв. Надосад видаляли, а еритроцитарну масу об'ємом 1 мл переносили в пробірку, де попередньо було внесено по 3 мл 0,025 % розчину метиленового синього. Після перемішування, пробірки інкубували при кімнатній температурі протягом 10-ти хвилин. Після інкубування проводили повторне центрифугування при 3000 об./хв протягом 10 хвилин, відбирали надосадову рідину й визначали оптичну густину вихідного розчину та надосадової рідини відносно фізіологічного розчину при  $\lambda=630$  нм.

Проводили розрахунок поглинутого барвника за формулою:

$$A = 100 - C \times 100 / B, \quad (2.10)$$

де А – кількість поглинутого барвника, %;

В – оптична густина вихідного розчину;

С – оптична густина розчину барвника після інкубації з еритроцитами.

*Визначення вмісту молекул середньої маси (МСМ).* Для визначення використовували кислоторозчинну фракцію сироватки крові, додаючи до 0,2 мл сироватки 1,8 мл 10 % розчину трихлороцтової кислоти з подальшим центрифугуванням протягом 30 хв при 3000 об./хв.

0,5 мл виділеної фракції розводили у співвідношенні 1:10 дистильованою водою і визначали екстинкцію проти дистильованої води при  $\lambda=254$  нм для визначення визначаються ланцюгових амінокислот та  $\lambda=280$  нм для визначення ароматичних амінокислот. Результати виражали в умовних одиницях, що чисельно дорівнювали показникам екстинкції [21].

#### 2.4 Методи статистичного аналізу

Для проведення статистичної обробки цифрових даних використовували програмне забезпечення «Excel» та «STATISTICA 7.0». Для всіх показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), дисперсії вибірки і помилки середньої (m). Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали при нормальному розподілі за t-критерієм Стьюдента, в інших випадках – за допомогою U-критерію Мана-Вітні [16].



**РОЗДІЛ 3**  
**ОЦІНКА ЕФЕКТИВНОСТІ ВИКОРИСТАННЯ СТРОМИ**  
**КСЕНОРОГІВКИ, ОТРИМАНОЇ МЕТОДОМ ДЕЦЕЛЮЛЯРИЗАЦІЇ**  
**У КРОЛІВ З МЕХАНІЧНОЮ ТРАВМОЮ РОГІВКИ**

3.1 Клігічний перебіг механічної травми рогівки у кролів, яким проводили кератопластику із застосуванням строми рогівки, отриманої медом децелюляризації

Перша доба після операції (рис. 3.1). Око подразнене. Перикорнеальна ін'єкція, слизово-гнійні виділення із кон'юнктивальної порожнини. Рогівковий рефлекс значно ослаблений. Ксенотрансплантат рогівки дифузно мутний із синюшним відтінком.



Рисунок 3.1 – Око кроля через 1 добу після ксеноімплантації строми рогівки, отриманої медом децелюляризації

7-ма доба після операції (рис. 3.2). Око подразнене, помірна перикорнеальна ін'єкція і слизисто-гнійні виділення. Рогівковий рефлекс ослаблений. Ксенотрансплантат рогівки мутний із синюшним відтінком.



Рисунок 3.2 – Око кроля через 7 діб після ксеноімплантації строми рогівки, отриманої медом децелюляризації

14-та доба після операції (рис. 3.3). Око помірно подразнене, перикорнеальна ін'єкція і слизисто-гнійні виділення незначні. Рогівковий рефлекс помірно ослаблений. Ксенотрансплантат рогівки помірно мутний, через нього, в тумані, проглядається зіниця.



Рисунок 3.3 – Око кроля через 14 діб після ксеноімплантації строми рогівки, отриманої медом децелюляризації

21-ша доба після операції (рис. 3.4). Око незначно подразнене, помірна кон'юнктивальна ін'єкція, слизові виділення незначні. Ксенотрансплантат відсутній. Рогівковий рефлекс незначно ослаблений. В нижній частині рогівки нерівномірне помутніння у вигляді плями.

28-ма доба після операції (рис. 3.5). Око спокійне, слизові виділення незначні. Рогівковий рефлекс збережений, в нижній частині рогівки гомогенне хмаркоподібне помутніння.



Рисунок 3.4 – Око кроля через 21-ну добу після ксеноімплантації строми рогівки, отриманої медом децелюляризації



Рисунок 3.5 – Око кроля через 28 діб після ксеноімплантації строми рогівки, отриманої медом децелюляризації

3.2 Стан структурної організації рогівки у кролів і особливості морфологічних змін у її компонентах при механічній травмі рогівки і корекції з використанням строми рогівки, отриманого методом децелюляризації

3.2.1 Гістологічні дослідження рогівки свині після проведення децелюляризації

Гістологічні дослідження показали відсутність у ній як переднього, так і заднього епітелію. Виявлялися залишки Боуменової мембрани, а власна речовина рогівки була деструктуризованою. Сполучнотканинні пластинки у складі строми розшаровані (рис. 3.6). За великого збільшення мікроскопа спостерігали сітку колагенових фібрил, що утворилася внаслідок розволокнення колагенових волокон. На світлооптичному рівні у власній речовині рогівки свині не виявлено кератоцитів чи інших клітин фібробластичного диферону, що свідчить про ефективність проведеної децелюляризації (рис. 3.7).

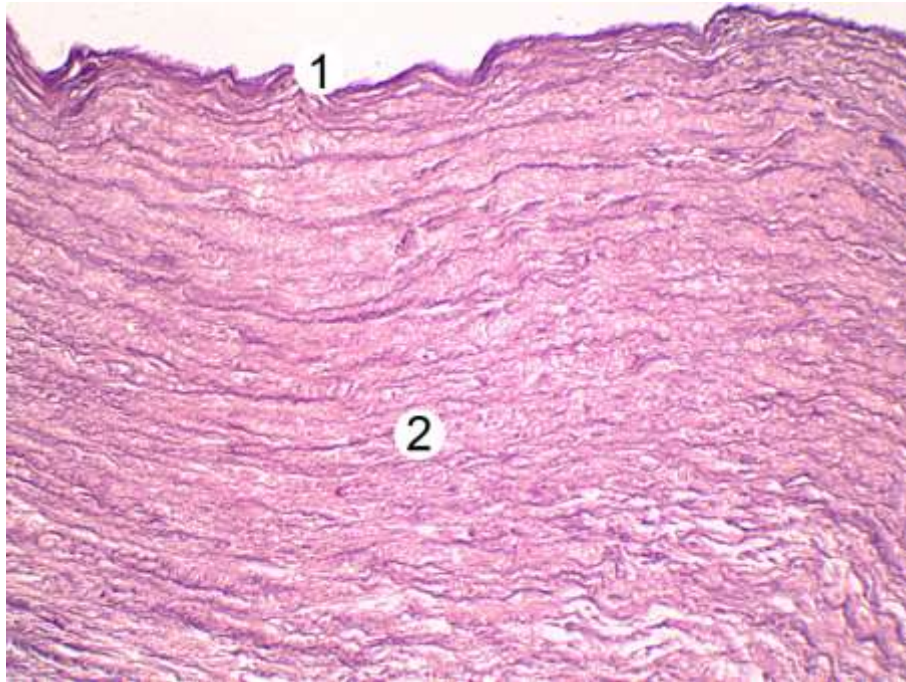


Рисунок 3.6 – Гістологічний стан рогівки свині після децелюляризації.

1 – передня погранична пластинка, 2 – власна речовина. Збарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення:  $\times 40$

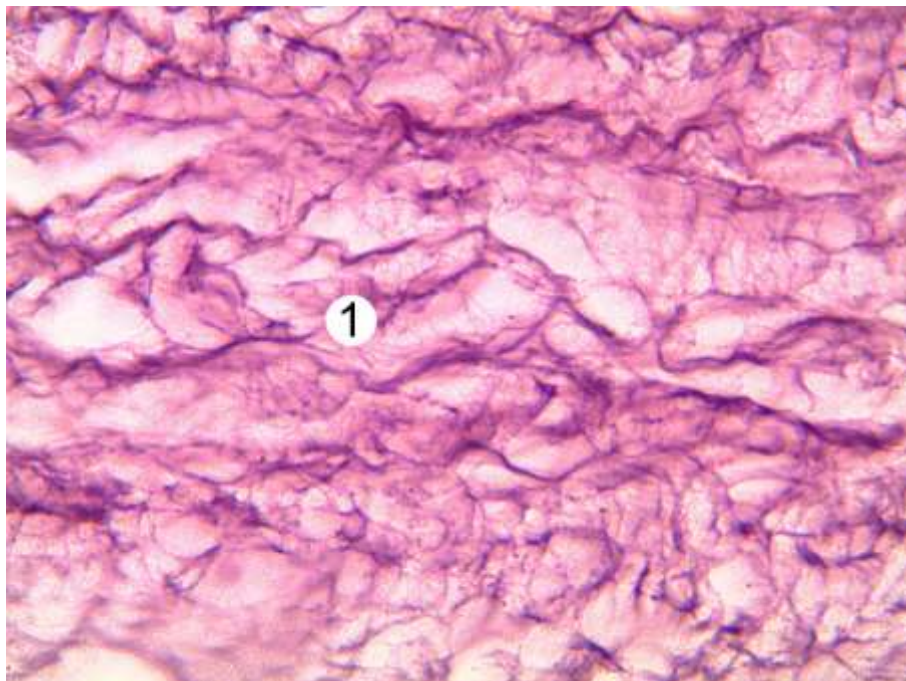


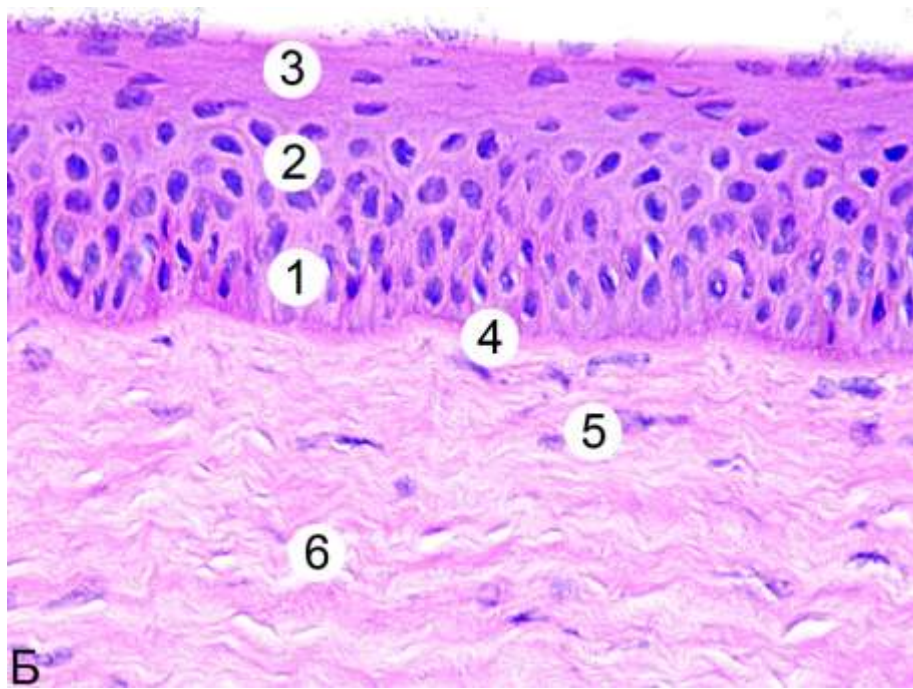
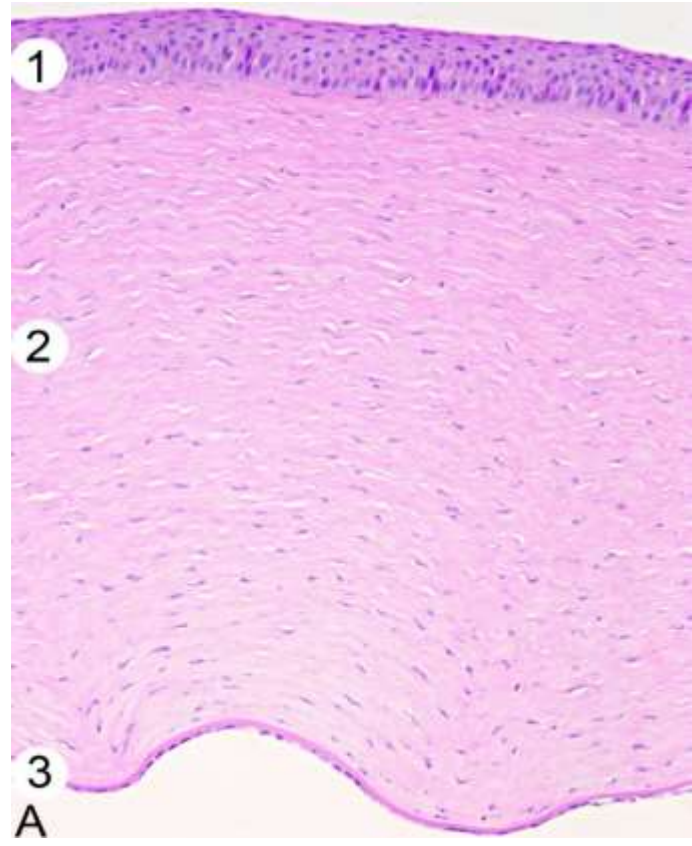
Рисунок 3.7 – Гістологічний стан власної речовини рогівки свині після децелюляризації. 1 – колагенові фібрили. Збарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення:  $\times 400$

3.2.2 Гістологічні зміни рогівки кролів за умов моделювання механічної непроникаючої травми рогівки та корекції з використання стромі ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації

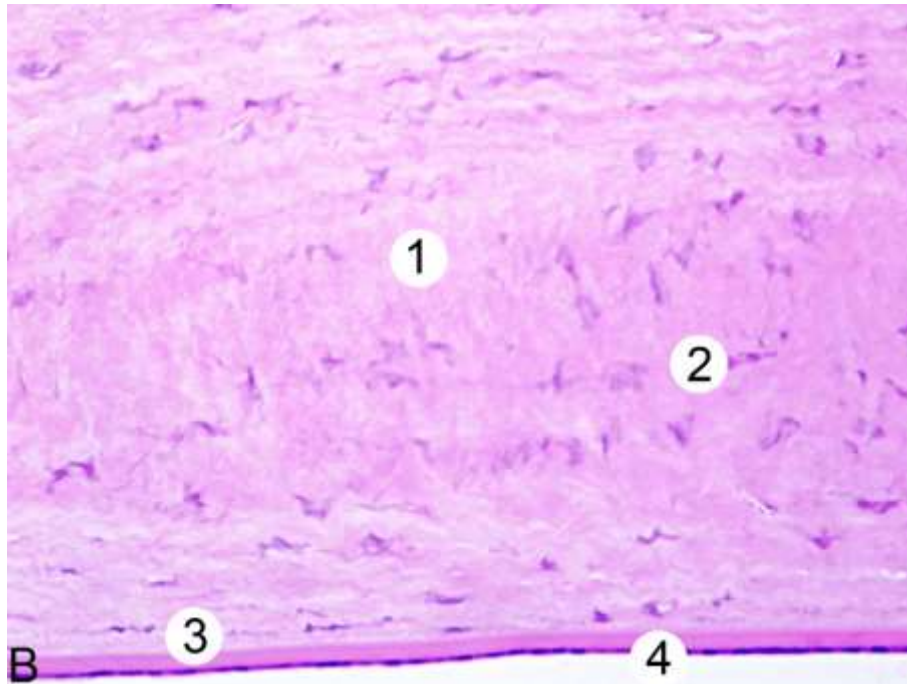
Гістологічні дослідження препаратів рогівки першої інтактною групи тварин засвідчили відповідність її структури загальновідомій морфології цього компоненту очного яблука. Мікроскопічно візуалізувалося п'ять шарів рогівки: передній епітелій, що лежить на мембрані Боумена (передній пограничній пластинці), власна речовина (строма), яка мембраною Десцеметовою (задньою пограничною пластинкою) відмежована від заднього епітелію (ендотелію) (рис. 3.8).

Передній епітелій рогівки представлений багат шаровим плоским незроговілим епітелієм, що складається з трьох шарів клітин різної форми (див. рис. 3.8Б). Його товщина у інтактною групи тварин складала ( $52,25 \pm 1,89$ ) мкм, а у ділянці лімба, де розташовані стовбурові клітини – ( $71,64 \pm 2,57$ ) мкм (табл. 3.1). Боуменова мембрана, що побудована з колагенових фібрил та протеогліканів, мала гомогенну еозинофільну структуру (див. рис. 1Б). Під нею виявляли власну речовину рогівки, що побудована з щільної сполучної тканини. Її товщина у першої дослідної групи тварин становила ( $318,14 \pm 13,87$ ) мкм (див. табл. 3.1). Колагенові фібрили стромі рогівки інтактною групи тварин груповані у чисельні пучки та формують щільно прилеглі один до одного хвилеподібні пластинки між якими залягають видовжені кератоцити (фіброцити рогівки).

Мембрана Десцеметова інтенсивно еозинофільна та гомогенна, рівномірної товщини. На ній розташований одношаровий плоский епітелій (ендотелій передньої камери ока), ядра якого видовжені та гіперхромні (див. рис. 3.8В). Морфометрично встановлено, що товщина рогівки тварин інтактною групи становила ( $377,72 \pm 16,78$ ) мкм (див. табл. 3.1).







Умовні позначки: А (100×): 1 – передній епітелій; 2 – власна речовина рогівки; 3 – задній епітелій. Б (400×): 1 – базальний шар переднього епітелію рогівки; 2 – остистий шар переднього епітелію рогівки; 3 – шар плоских клітин переднього епітелію рогівки; 4 – мембрана Боумена; 5 – кератоцити; 6 – сполучнотканинні пластинки. В (200×): 1 – сполучнотканинні пластинки, 2 – кератоцити, 3 – мембрана Десцеметова, 4 – задній епітелій.

Рисунок 3.8 – Мікроскопічна структура рогівки інтактної групи тварин. Забарвлення гематоксиліном та еозином

Таблиця 3.1 – Динаміка змін товщини структурних компонентів рогівки кролів за умови механічної непроникаючої травми рогівки та її хірургічної корекції ( $M \pm m$ )

Група тварин	Показник товщини, мкм (n (кількість вимірів) $\geq 50$ )			
	переднього епітелію в ділянці ураження	переднього епітелію в маргінальній зоні	власної речовини рогівки	рогівки загалом (центральна ділянка)
1	2	3	4	5
Без змодельованої патології (n=10)	52,25 $\pm$ 1,89	71,64 $\pm$ 2,57	318,14 $\pm$ 13,87	377,72 $\pm$ 16,78

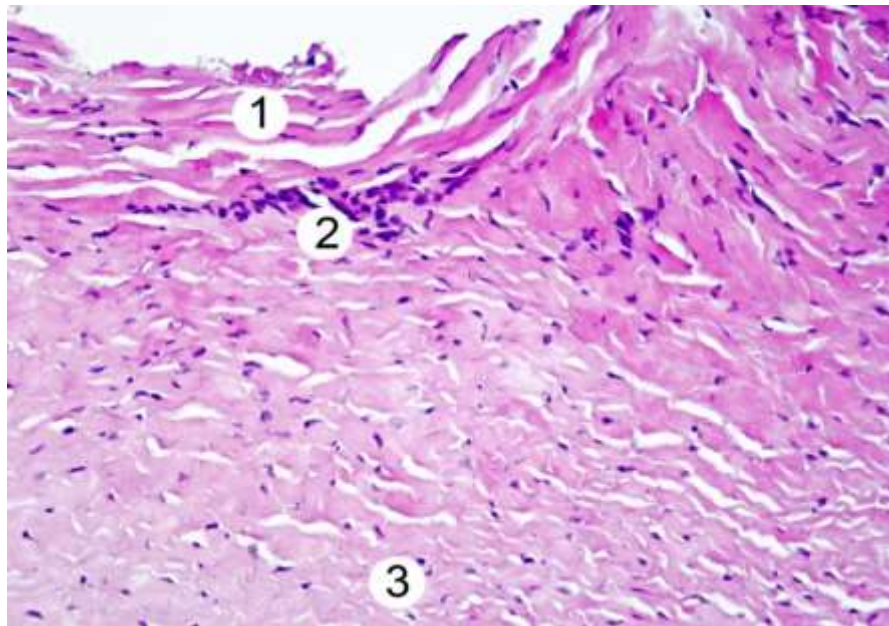
Продовження таблиці 3.1

		1	2	3	4	5
Механічна травма рогівки (n=10)	3-тя доба		-	83,33 ± 2,79*	563,47 ± 24,63*	575,80 ± 23,12*
	7-ма доба	14,37 ± 0,74*		96,85 ± 3,88*	750,66 ± 32,44*	776,57 ± 29,84*
	14-та доба	29,88 ± 1,47*		103,49 ± 5,17*	759,42 ± 27,12*	799,63 ± 29,31*
	28-ма доба	60,27 ± 2,01*		86,19 ± 1,97*	487,26 ± 18,74*	556,96 ± 21,49*
Механічна травма рогівки+хірургічна	3-тя доба		-	80,21 ± 2,11*	689,17 ± 32,65*#	701,20 ± 34,79*#
	7-ма доба	20,79 ± 1,15*#		106,27 ± 5,02*	782,44 ± 35,21*	815,88 ± 37,94*
	14-та доба	35,20 ± 1,07*#		126,37 ± 5,06*#	658,61 ± 27,19*#	703,59 ± 22,96*#
	28-ма доба	54,19 ± 2,09#		92,13 ± 3,74*	423,44 ± 18,55*#	487,39 ± 24,11*#
Примітка. * – відмінності достовірні між групою тварин без моделювання патологічного процесу і тварин, яким моделювали механічну травму рогівки p<0,05); # – відмінності достовірні між дослідними групами тварин без хірургічної корекції та з хірургічною корекцією у відповідні терміни спостереження ( p<0,05).						

Гістологічні дослідження препаратів рогівки тварин другої дослідної групи, через три доби після моделювання механічної непроникаючої травми рогівки показали відсутність переднього епітелію та мембрани Боумена у ділянках травмування. Колагенові пучки строми рогівки були набряклими, спостерігалось розволокнення пластинок та значного об'єму просвіти між ними. Внаслідок цього товщина власної речовини рогівки достовірно (p<0,001) збільшилася у порівнянні з першою дослідною групою до (563,47 ± 24,63) мкм (див. табл. 3.1). Крім набряку, у стромі зафіксували осередки скупчення клітин лейкоцитарного ряду (рис. 3.9).

У зонах, що оточували ділянку травмування товщина епітелію становила (83,33 ± 2,79) мкм, що достовірно (p<0,01) більше за показник норми (див.

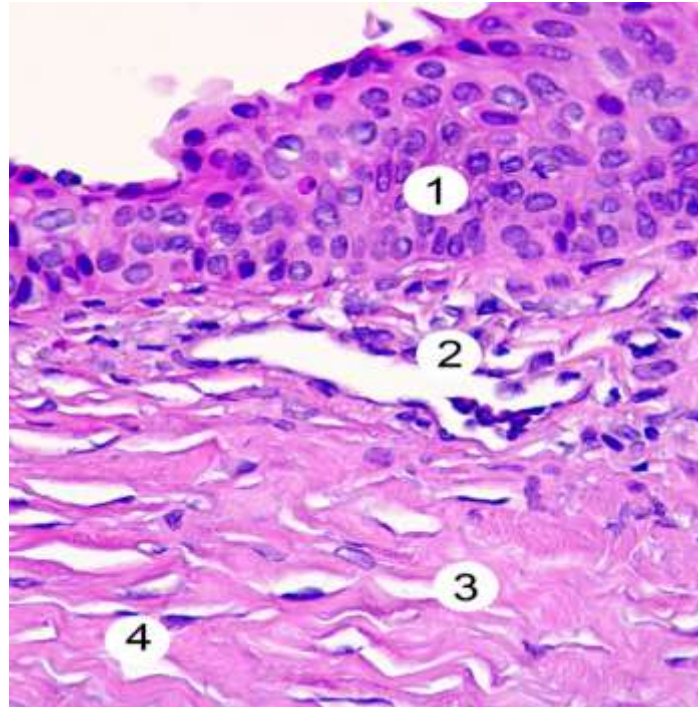
табл. 3.1) та може бути спричинене частково набряком та частково активацією поділів базальних епітеліоцитів. Клітини у складі епітелію мали різну форму та розміри, а їх пошарове розташування не було збережене (рис. 3.10).



Умовні позначки: 1 – набряклі та розволокнені сполучнотканинні пластинки, 2 – лейкоцитарний інфільтрат, 3 – кератоцити.

Рисунок 3.9 – Структурні зміни рогівки другої групи тварин через три доби після моделювання механічної непроникаючої травми. Забарвлення гематоксиліном та еозином (200×)

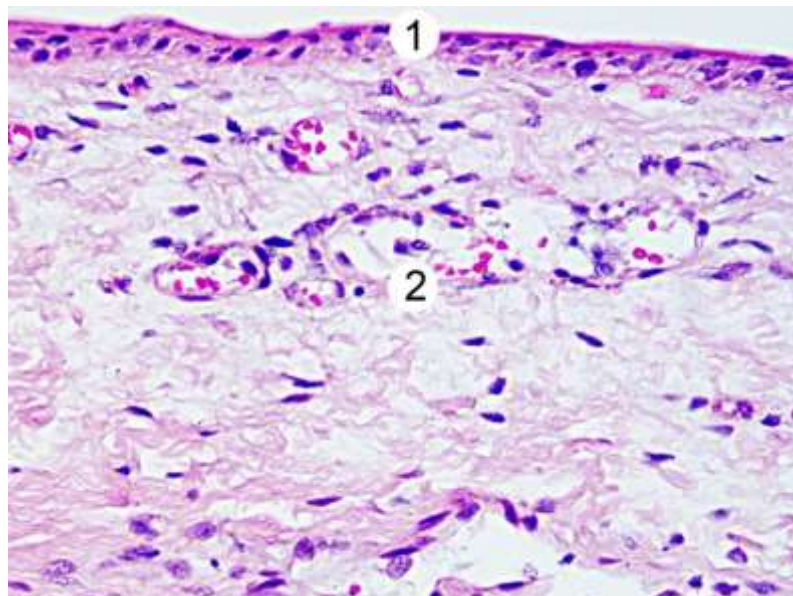
Через 7 діб після моделювання механічної непроникаючої травми рогівки на мікроскопічному рівні спостерігали закриття ділянки ураження тонким шаром ( $14,37 \pm 0,74$  мкм) епітеліального регенерату (рис. 3.11), що у численних місцях відшаровувався від нижче розташованої строми. Джерелом його утворення служили маргінальні ділянки, товщина епітелію яких становила ( $96,85 \pm 3,88$ ) мкм, а це достовірно ( $p < 0,001$ ) перевищувало показник першої групи тварин в 1,35 раза (рис. 3.12).



Умовні позначки: 1 – потовщений багатошаровий епітелій, 2 – судина, 3 – сполучнотканинні пластинки, 4 – кератоцити.

Рисунок 3.10 – Крайова ділянка зони травмування рогівки кроля другої дослідної групи через 3 доби після моделювання механічної травми.

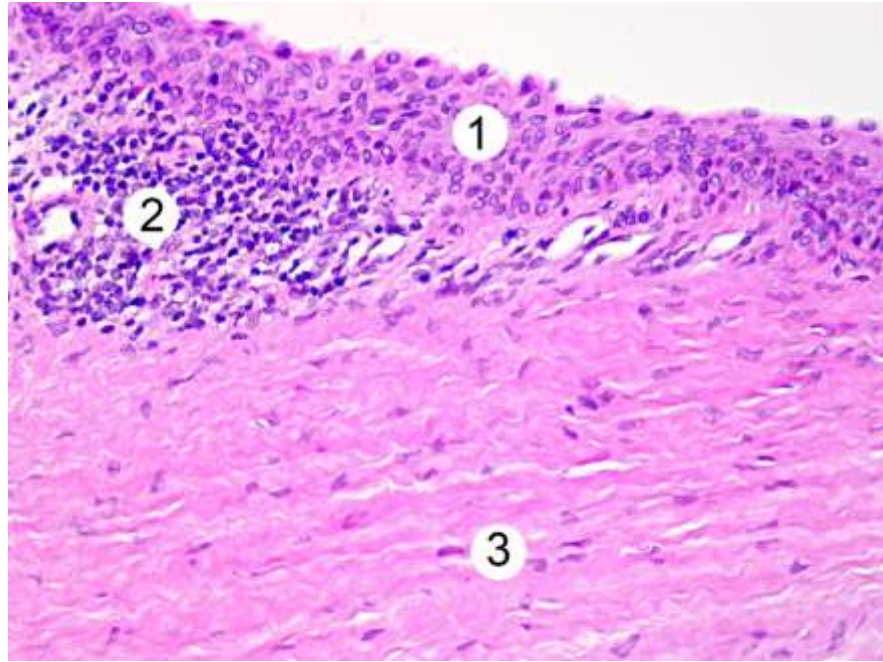
Забарвлення гематоксиліном та еозином (400×)



Умовні позначки: 1 – епітеліальний регенерат, 2 – грануляційна тканина.

Рисунок 3.11 – Центральна ділянка рогівки кроля через 7 діб після моделювання механічної травми. Забарвлення гематоксиліном

та еозином (400×)

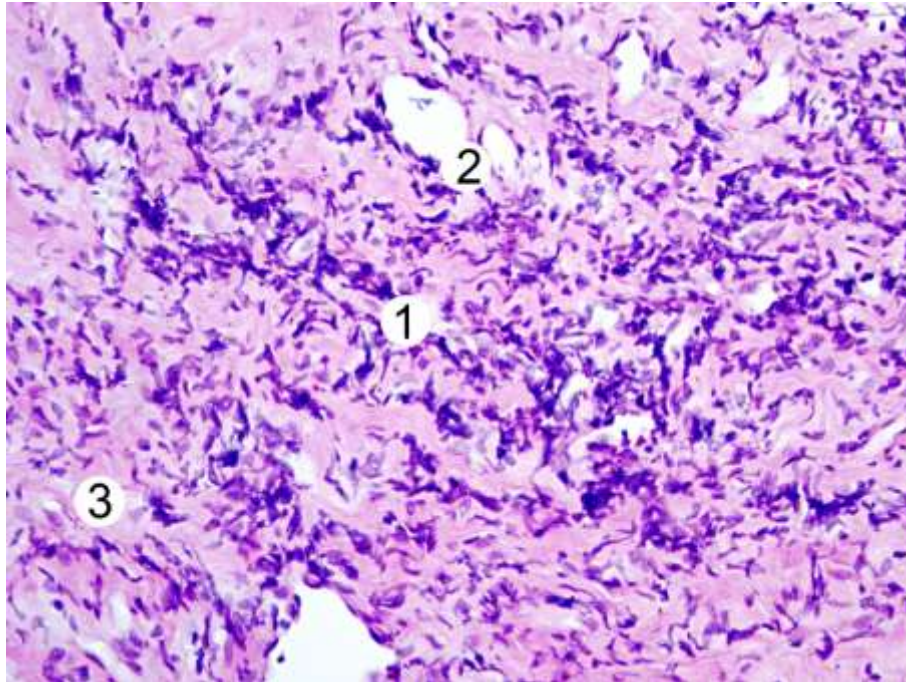


Умовні позначки: 1 – потовщений епітеліальний пласт, 2 – грануляції, 3 – збережена строма рогівки.

Рисунок 3.12 – Крайова ділянка рогівки кроля через 7 діб після моделювання механічної травми. Забарвлення гематоксилином та еозином (200×)

Власна речовина рогівки у цей термін експерименту залишається набряклою, інтенсивно інфільтрованою лейкоцитами, а також клітинами фібробластичного ряду. Її товщина –  $(750,66 \pm 32,44)$  мкм – достовірно ( $p < 0,001$ ) перевищує показник норми у 2,36 раза (рис. 3.13, див. табл. 3.1). У верхній шарі строми спостерігали осередки формування грануляційної тканини.

Мікроскопічно через 14 діб після моделювання травми рогівки другій групі тварин у препаратах рогівки виявляли закриття ділянки ураження багатошаровим плоским епітелієм (рис. 3.14А) середньою товщиною  $(29,88 \pm 1,47)$  мкм, що достовірно ( $p < 0,001$ ) менша за інтактний показник (див. табл. 3.1).

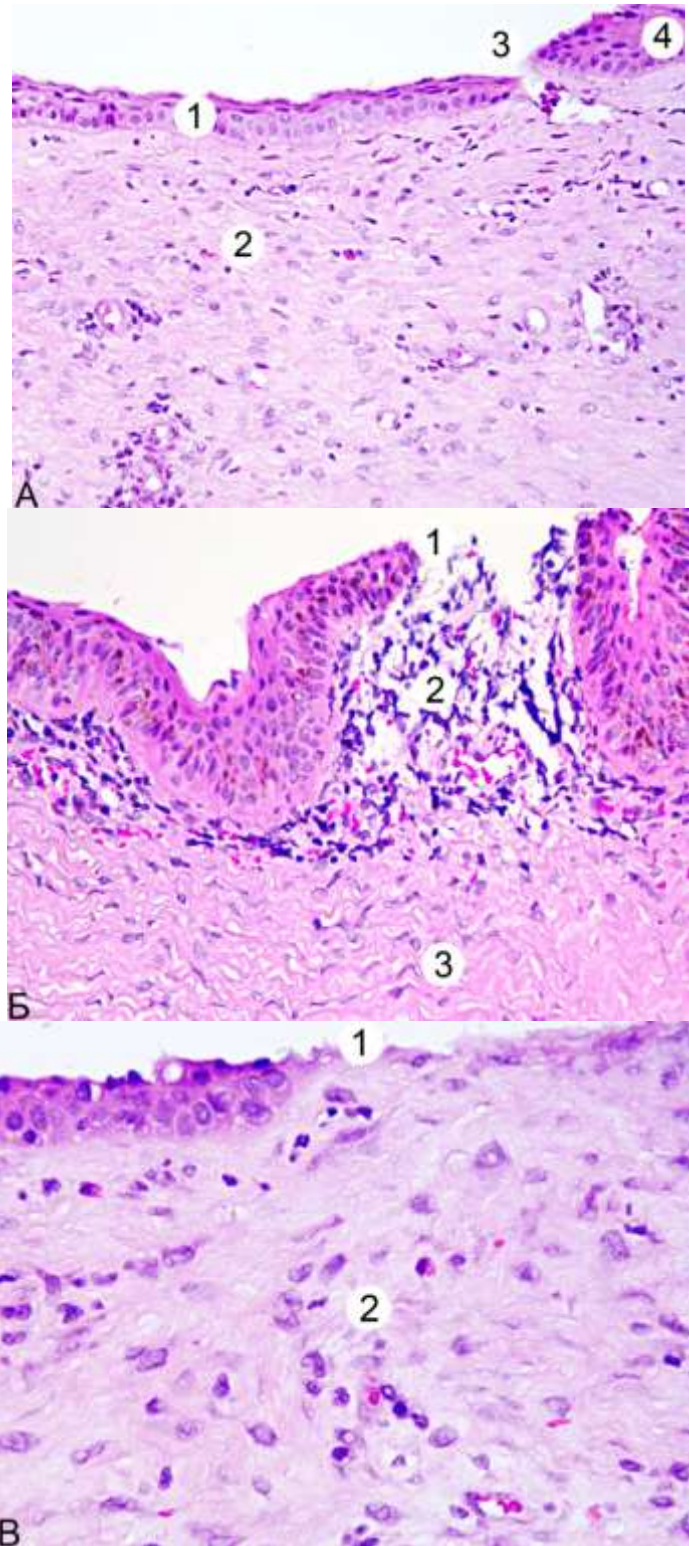


Умовні позначки: 1 – скупчення фіброblastів та лейкоцитів, 2 – судини, 3 – колагенові фібрили.

Рисунок 3.13 – Власна речовина рогівки тварин другої групи у зоні травмування через 7 діб експерименту. Забарвлення гематоксилином та еозином (200×)

Слід зазначити, що товщина епітеліального регенерату була варіабельною. У деяких осередках спостерігали розрив епітелію з ушкодженням грануляційної тканини, що розташовувалась безпосередньо під ним (рис. 3.14А, 3.14Б), а у інших – його відсутність через відшарування (рис. 7В). У маргінальних ділянках та зоні лімба товщина переднього епітелію інтенсивно зросла та складала  $(103,49 \pm 5,17)$  мкм, що в 1,44 раза ( $p < 0,001$ ) більше норми (див. рис. 3.14А).

У власній речовині рогівки в цей термін відмічено сформовану грануляційну тканину з численними капілярами, лейкоцитами, клітинами фіброblastичного ряду, колагеновими фібрилами (див. рис. 3.14В).



Умовні позначки: А (200×): 1 – епітеліальний регенерат, 2 – сформована грануляційна тканина, 3 – розрив епітеліального пласта, 4 – потовщений передній епітелій в маргінальній зоні. Б (200×). 1 – розрив епітеліального пласта, 2 – ушкоджена грануляційна тканина, 3 – строма. В (400×). 1 – пошкоджений епітеліальний регенерат, 2 – грануляційна тканина

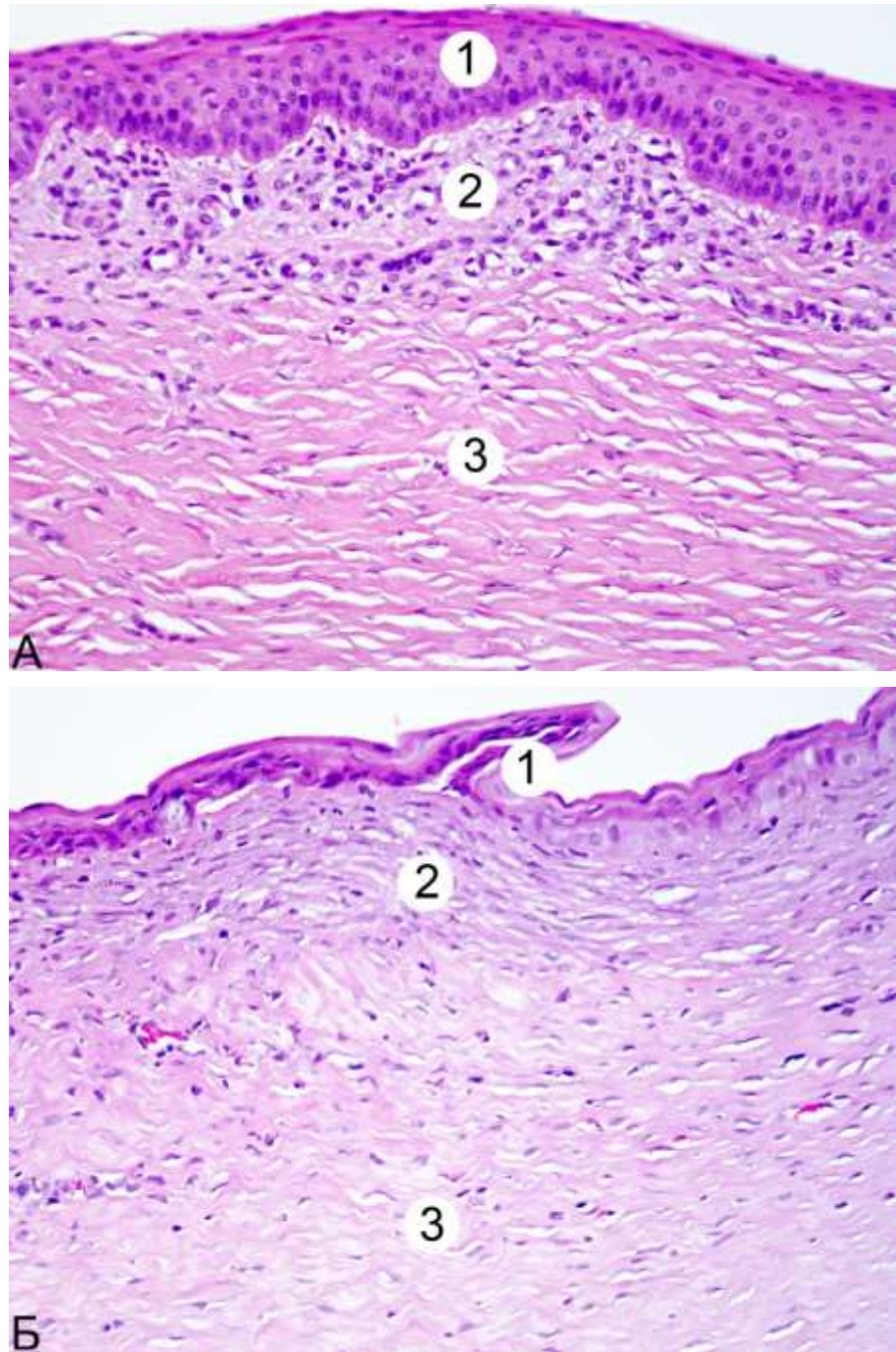
Рисунок 3.14 – Рогівка кроля другої експериментальної групи через 14 днів після її механічного травмування. Забарвлення гематоксиліном та еозином.

Товщина строми ((759,42 ± 27,12) мкм) не зазнала суттєвих змін у порівнянні з попереднім терміном експерименту, проте була достовірно ( $p < 0,001$ ) більшою порівняно з інтактним показником (див. табл. 3.1). Та, на відміну від результатів сьомої доби експерименту, в цей термін високий показник товщини строми пов'язаний, в основному, з наявністю грануляцій та значного об'єму аморфного компонента у них, а набряк колагенових пластинок, що розташовані ближче до заднього епітелію рогівки був значно меншим.

Через 28 діб експерименту у рогівці другої дослідної групи тварин мікроскопічно спостерігали передній багатошаровий незроговілий епітелій середньою товщиною (60,27 ± 2,01) мкм, що більше показника інтактної групи тварин в 1,15 раза ( $p < 0,01$ ) (рис. 3.15А, див. табл. 3.1). Такий епітелій характеризувався нерівністю рельєфу базальної поверхні та, відповідно, мембрани Боумена (див. рис. 3.15А). У деяких ділянках відмічено його нечітку диференціацію на шари. Слід відмітити і слабке з'єднання переднього епітелію та пограничної пластинки з новоутвореною сполучною тканиною, внаслідок чого на мікроскопічному рівні виявлено зони їх відшарування (рис. 3.15Б). Молода сполучна тканина у верхній шарі рогівки складалася з світло оксифільних колагенових волокон з конгломератами базофільних ядер, що належали клітинам здебільшого фібробластичного ряду та, в меншій мірі, лімфоцитам. Поміж пучками волокон спостерігали і капіляри (див. рис. 3.15А, рис. 3.15Б). Товщина строми рогівки в цей термін становила (487,26 ± 18,74) мкм, що в 1,56 раза менше у порівнянні з показником на 14 добу, та все ж достовірно ( $p < 0,001$ ) перевищує показник норми (див. табл. 3.1).

Гістологічні дослідження рогівки третьої групи тварин, яким проводили хірургічну корекцію механічної травми рогівки із застосуванням децелюляризованої рогівки свині на 3 добу експерименту показали наявність вираженої запальної реакції у власній речовині, її набряк та відсутність переднього епітелію.



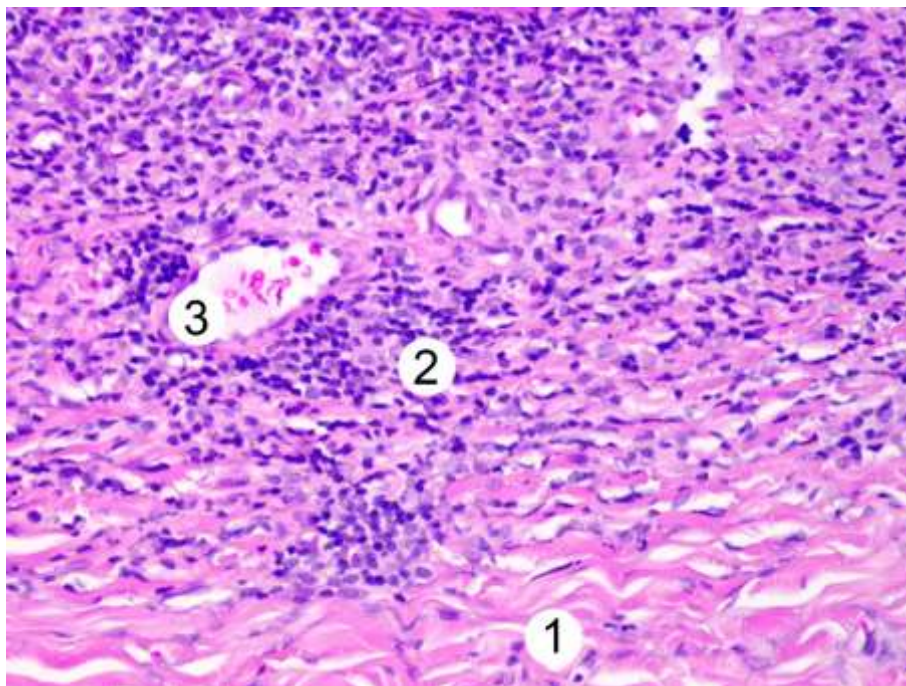


Умовні позначки: А (200×): 1 – передній епітелій, 2 – новоутворена сполучна тканина, 3 – строма. Б (200×): 1 – відшарування епітеліального пласта, 2 – новоутворена сполучна тканина, 3 – строма.

Рисунок 3.15 – Мікроскопічний стан рогівки кроля другої дослідної групи через 28 діб від моделювання механічної травми. Забарвлення

гематоксиліном та еозином

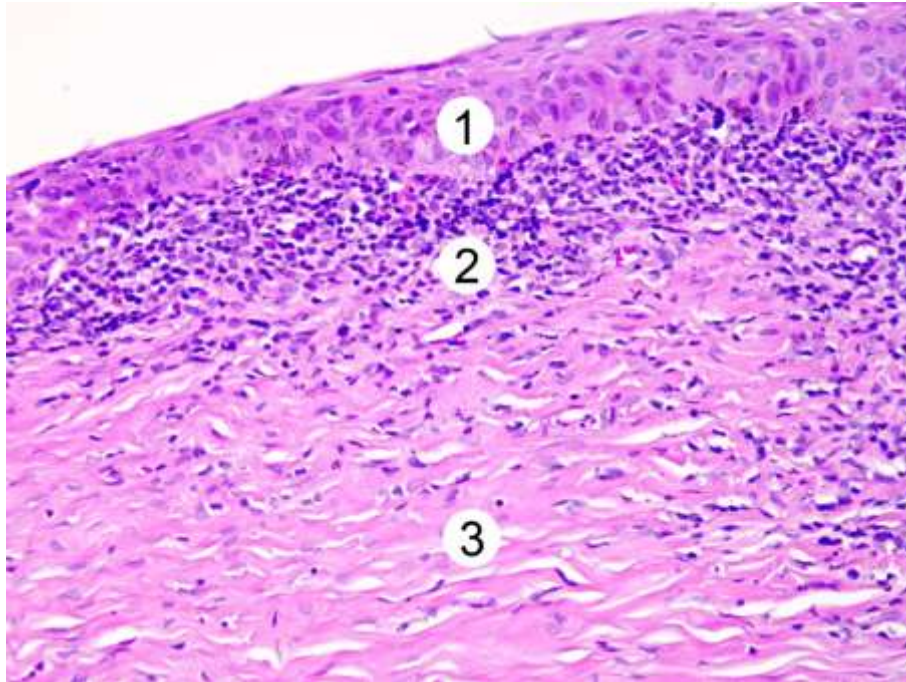
Поміж набряклими та розволокненими сполучнотканинними пластинками виявлено масивну лейкоцитарну інфільтрацію, наявні еритроцити та проростання дрібних судин (рис. 3.16). Товщина строми в цей термін досліджу становила  $(689,17 \pm 32,65)$  мкм, що у 2,17 раза достовірно ( $p < 0,001$ ) перевищує показник норми та у 1,22 раза ( $p < 0,01$ ) аналогічний параметр другої дослідної групи (див. табл. 3.1). Це може бути пов'язано хірургічним втручанням та нанесенням швів.



*Умовні позначки:* 1 – розволокнені сполучнотканинні пластинки, 2 – лейкоцитарна інфільтрація, 3 – новоутворена судина.

Рисунок 3.16 – Мікроскопічний стан рогівки кроля третьої групи на 3 добу після хірургічної корекції. Забарвлення гематоксиліном та еозином (200×)

Лейкоцитарну інфільтрацію було зафіксовано також і у маргінальних зонах під збереженими ділянками переднього епітелію (рис. 3.17), товщина якого складала  $(80,21 \pm 2,11)$  мкм, достовірно ( $p < 0,05$ ) перевищуючи показник першої групи в 1,12 раза (див. табл. 3.1).

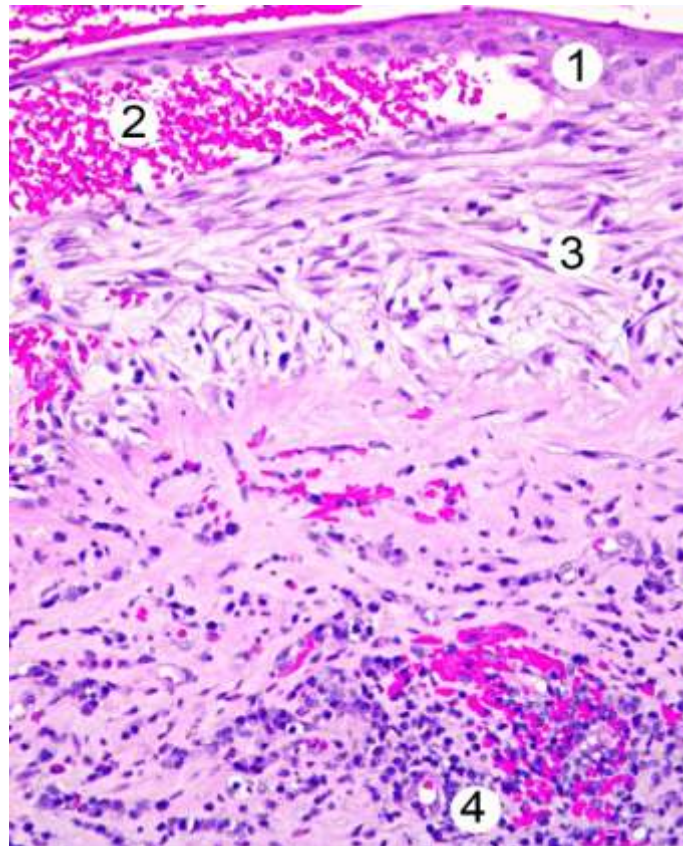


Умовні позначки: 1 – збережений передній епітелій, 2 – лейкоцитарна інфільтрація, 3 – сполучнотканинні пластинки.

Рисунок 3.17 – Крайова зона рогівки кроля третьої групи на третю добу після хірургічної корекції. Забарвлення гематоксиліном та еозином (200×)

Через 7 діб після хірургічного втручання із застосуванням децелюляризованої рогівки свині у препаратах рогівки відмічено епітеліальний регенерат, що затягує дефект спричинений травмуванням (рис. 3.18). Згідно з морфометричними дослідженнями його усередни́на товщина становила  $(20,79 \pm 1,15)$  мкм, що достовірно ( $p < 0,001$ ) більше показника другої групи, де корекція не проводилася (див. табл. 3.1). У багатьох ділянках цей епітеліальний пласт нещільно прилягав до нижче лежачих тканин та відшаровувався. У зонах відшарування нерідко фіксували крововиливи (рис. 3.18). Строма рогівки тварин третьої групи в цей термін зросла у товщині до  $(782,44 \pm 35,21)$  мкм, що у 2,46 рази ( $p < 0,001$ ) перевищує інтактний показник, проте достовірно не відрізняється від аналогічного параметра другої групи (див. табл. 3.1). Таке збільшення розмірів власної речовини пов'язане, як з набряком, так і з активним формуванням грануляційної тканини у верхніх

її шарах. Мікроскопічно у стромі відмічено дрібні судини, лейкоцитарну інфільтрацію та чисельні крововиливи. Над збереженими колагеновими пластинками спостерігали велику кількість активних фібробластів та формування колагенових фібрил (рис. 3.18).



*Умовні позначки:* 1 – епітеліальний регенерат, 2 – крововиливи, 3 – грануляційна тканина, 4 – лейкоцитарна інфільтрація.

Рисунок 3.18 – Гістологічні зміни в рогівці кролів через 7 діб після хірургічної корекції механічної травми з використанням децелюляризованої рогівки свині. Забарвлення гематоксиліном та еозином (200×)

Зони рогівки, що близькі до лімба вкриті багат шаровим плоским незроговілим епітелієм, товщина якого ( $(106,27 \pm 5,02)$  мкм) в 1,48 раза ( $p < 0,001$ ) більша за таку у тварин інтактної групи, але практично не відрізняється від групи тварин, яким корекцію не проводили (див. табл. 3.1). Між сполучнотканинними пластинками стромы крайової зони помітно

небагато судин, численні клітини фібробластичного ряду та поодинокі лейкоцити (рис. 3.19).

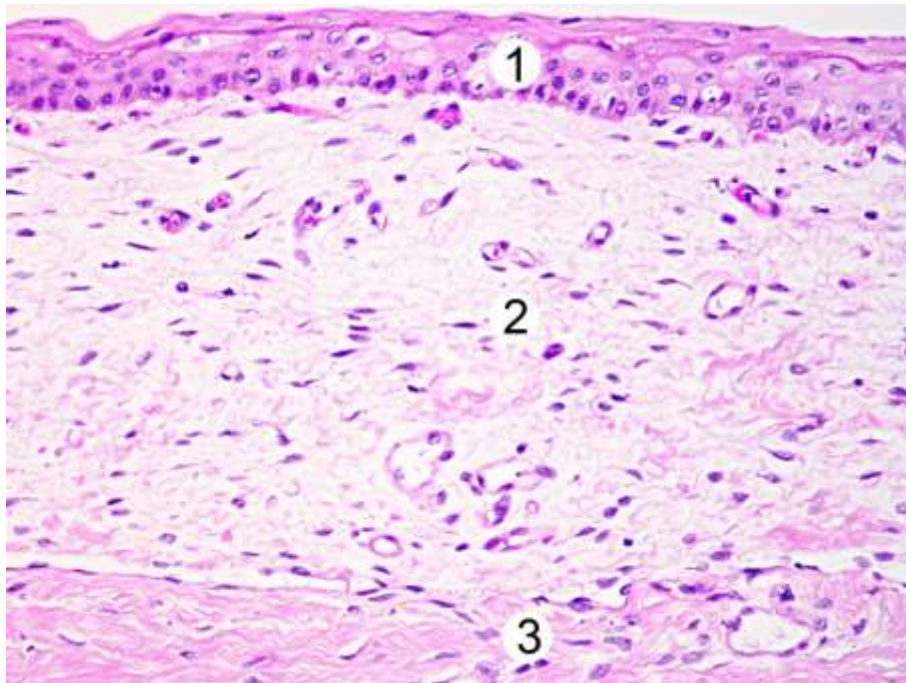


Умовні позначки: 1 – потовщений передній епітелій, 2 – сполучнотканинні пластинки, 3 – лейкоцити, 4 – судина, 5 – фібробласти.

Рисунок 3.19 – Крайова ділянка рогівки кроля через 7 діб після хірургічної корекції механічної травми з використанням децелюляризованої рогівки свині. Збарвлення гематоксиліном та еозином (200×)

На 14-ту добу після хірургічної корекції механічної травми рогівки на мікроскопічному рівні у препаратах рогівки кролів спостерігали багатошаровий плоский незроговілий епітелій середньою товщиною ( $35,20 \pm 1,07$ ) мкм. Цей параметр був достовірно ( $p < 0,001$ ) меншим за інтактний, проте перевищував показник групи без корекції в 1,18 рази ( $p < 0,01$ ) (див. табл. 3.1). В епітелії прослідковувалась диференціація на шари. Численні епітеліоцити остистого шару мали просвітлену цитоплазму та пікнотичні ядра. На мікроскопічному рівні не відмічалось відшарувань епітелію, а навпаки, добра сформованість Боуменової мембрани та заякореність її компонентів у

нижче лежачу сполучну тканину (рис. 3.20). Строма рогівки у цей термін досліду мала товщину ( $658,61 \pm 27,19$ ) мкм, а це в 2,07 раза більше ( $p < 0,001$ ) за її товщину у інтактних тварин, але у 1,15 раза менше ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з показником другої групи. Прослідковується також зменшення цього параметра у порівнянні з 7 добою експерименту у тварин цієї ж (третьої) групи (див. табл. 3.1). У верхніх шарах власної речовини спостерігали зрілу грануляційну тканину, що складалася з капілярів, фібробластів, пучків колагенових фібрил та поодиноких лейкоцитів (див. рис. 3.20).

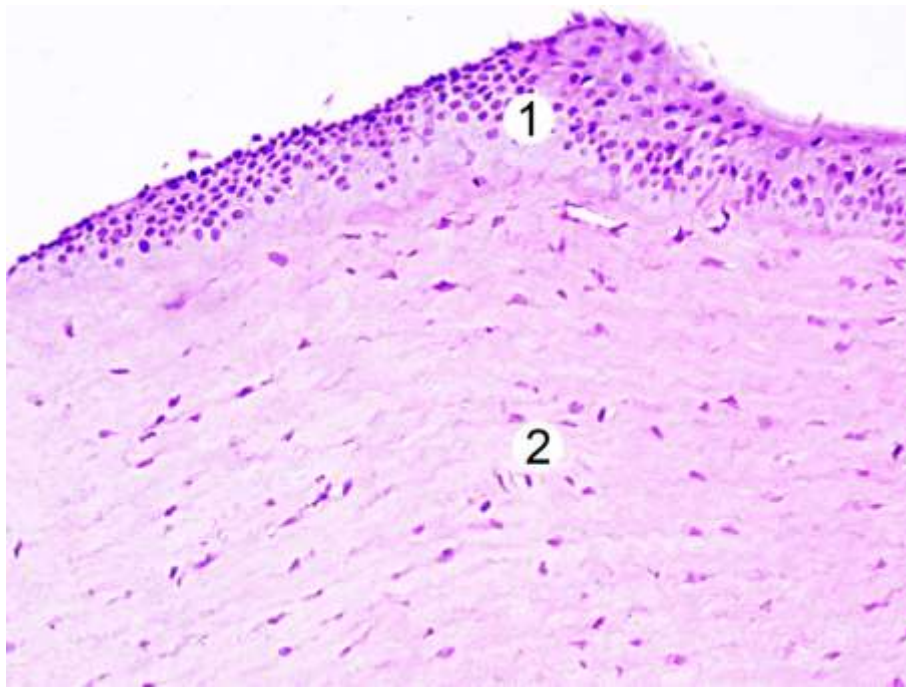


*Умовні позначки:* 1 – епітеліальний регенерат, 2 – грануляційна тканина, 3 – колагенові волокна.

Рисунок 3.20 – Центральна ділянка травмованої рогівки кроля через 14 діб після хірургічної корекції. Забарвлення гематоксиліном та еозином ( $200\times$ )

У маргінальній зоні рогівки на 14 добу після хірургічної корекції виявлено передній епітелій товщина якого ( $126,37 \pm 5,06$ ) мкм) у 1,76 раза ( $p < 0,001$ ) більша за показник групи інтактних тварин та у 1,22 раза за показник групи тварин без корекції (див. табл. 3.1). Велика кількість дрібних клітин у

базальному шарі та багато рядів клітин остистого шару вказують на активну проліферацію епітеліоцитів, які забезпечують регенераторні можливості. У стромі маргінальної зони спостерігали структурно збережені колагенові пластинки та клітини фібробластичного диферону (рис. 3.21).

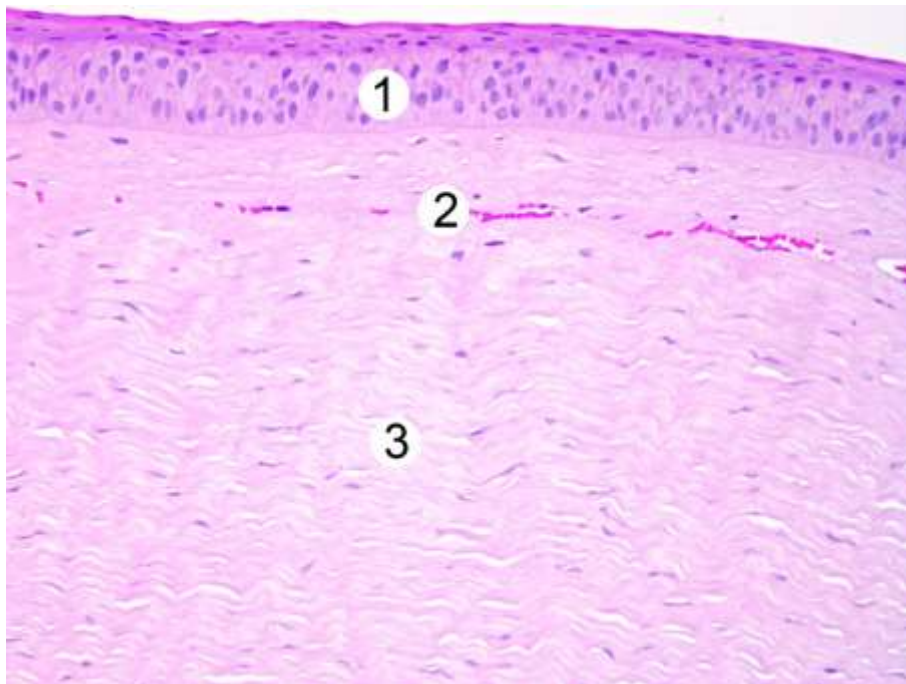


*Умовні позначки:* 1 – потовщений епітелій, 2 – строма.

Рисунок 3.21 – Крайова зона рогівки кроля на 14 добу після хірургічної корекції із застосуванням децелюляризованої рогівки свині. Забарвлення гематоксиліном та еозином (100×)

Гістологічні дослідження рогівки тварин третьої групи через 28 діб після хірургічної корекції встановили відновлення її типової структури. Передній епітелій, товщиною ( $54,19 \pm 2,09$ ) мкм, що достовірно не відрізнялася від показника норми (див. табл. 3.1), складався з трьох шарів клітин. Мембрана Боумена чітко контурована, з рівним рельєфом. Прослідковується міцний контакт епітелію та мембрани з сполучною тканиною, що розташована нижче. Строма рогівки у цей термін досліду вже не містила грануляцій, а складалася з хвилеподібних сполучнотканинних пластинок, що побудовані з пучків

колагенових фібрил та орієнтовані паралельно. Між ними залягали базофільні кератоцити видовженої форми. Слід зазначити, що у поодиноких ділянках верхньої частини власної речовини рогівки виявляли дрібні крововиливи або капіляри, що редукуються (рис. 3.22). Товщина строми рогівки тварин третьої групи на 28 добу складала  $(423,44 \pm 18,55)$  мкм, що у 1,33 раза ( $p < 0,001$ ) більше показника норми, проте в 1,55 раза менше у порівнянні з її товщиною на 14 добу після корекції (див. табл. 3.1).



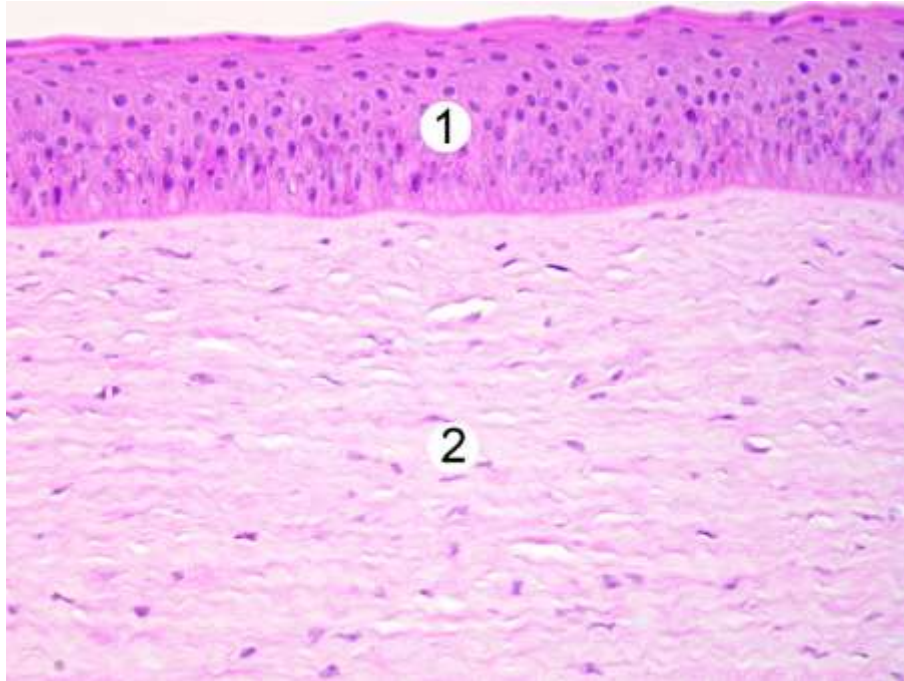
Умовні позначки: 1 – передній епітелій, 2 – капіляри в стані редукції, 3 – сполучнотканинні пластинки.

Рисунок 3.22 – Гістологічний стан рогівки кроля третьої експериментальної групи на 28 добу після корекції. Забарвлення гематоксиліном та еозином (200×)

У периферійних ділянках рогівки в цей термін експерименту передній епітелій залишався потовщеним ( $(92,13 \pm 3,74)$  мкм) у 1,29 раза порівняно з нормою, але цей параметр мав тенденцію до зниження ( $p < 0,001$ ) (див.



табл. 3.1). Прослідковувалась збереженість диференціації на шари. Строма рогівки у цій зоні мала типову будову без ознак запалення (рис. 3.23).



*Умовні позначки:* 1 – передній епітелій, 2 – власна речовина.

Рисунок 3.23 – Мікроскопічний стан крайової ділянки рогівки тварин третьої групи на 28-му добу досліді. Забарвлення гематоксиліном та еозином (200×)

Таким чином, гістологічно встановлено, що рогівка тварин першої групи, яким не проводили моделювання механічної непроникаючої травми мала типову морфологію та складалася з п'яти шарів: переднього епітелію, мембрани Боумена, власної речовини, мембрани Десцеметової та заднього епітелію. Морфометрично товщина переднього епітелію у центральній ділянці рогівки становила  $(52,25 \pm 1,89)$  мкм, а у крайовій –  $(71,64 \pm 2,57)$  мкм. Товщина стромы складала  $(318,14 \pm 13,87)$  мкм, а рогівки загалом –  $(377,72 \pm 16,78)$  мкм.

За умов моделювання механічної непроникаючої травми до 14 доби досліді у рогівці кролів мікроскопічно встановлено активацію проліферації клітин у збережених ділянках епітелію, що наближені до лімба та, як наслідок,

формування епітеліального регенерату; набряк сполучної тканини, розвиток запальної реакції у ній з подальшим формуванням грануляцій. Гістологічно у епітеліальному пласті не прослідковувалась виражена клітинна диференціація, мембрана Боумена неструктурована, а контакт зі сполучною тканиною був слабким, що зумовлювало значні відшарування. Морфометрично досліджено динамічне наростання товщини переднього епітелію у маргінальних зонах до  $(103,49 \pm 5,17)$  мкм на 14 добу досліджу, що більше у 1,44 раза ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з показником норми, а товщини рогівки, з максимальним значенням у цей же термін, до  $(759,42 \pm 27,12)$  мкм, що перевищувало інтактний показник у 2,39 раза ( $p < 0,001$ ).

На 28 добу експерименту за умов моделювання механічної травми на мікроскопічному рівні виявлено закриття дефекту епітелієм середньою товщиною  $(60,27 \pm 2,01)$  мкм з нерівним рельєфом базальної поверхні та ділянками відшарування від власної речовини рогівки. У верхніх шарах стромі мікроскопічно виявлені ознаки дозрівання молодого сполучної тканини з наявністю клітин фібробластичного та лейкоцитарного ряду, капілярів та неупорядкованою орієнтацією колагенових волокон. Морфометрично на 28 добу товщина власної речовини рогівки тварин другої групи достовірно ( $p < 0,001$ ) більша за показник норми, проте в 1,56 раза менша у порівнянні з 14 добою експерименту.

Мікроскопічно та морфометрично встановлено, що застосування децелюляризованої рогівки свині для корекції механічної травми рогівки покращує динаміку регенерації, пришвидшує дозрівання грануляційної тканини, загоєння дефекту, сприяє структурованості та відновленню морфології рогівки з максимальною наближеністю до норми.

Гістологічно встановлено, що на 3 та 7 доби після корекції у стромі рогівки наявна виражена реакція запалення, на що вказує масивна лейкоцитарна інфільтрація, як у центральних, так і периферійних ділянках рогівки, що зумовлено хірургічним втручанням. Для цих же термінів характерно

наростання товщини епітелію маргінальних ділянок та товщини власної речовини рогівки з піковим значенням на 7 добу ( $(782,44 \pm 35,21)$  мкм).

Мікроскопічно та морфометрично встановлено, що гіперплазія епітелію крайових ділянок найбільш виражена на 14 добу після хірургічної корекції ( $(126,37 \pm 5,06)$  мкм), результатом чого було закриття дефекту добре структурованим епітеліальним регенератом ( $35,20 \pm 1,07$ ) мкм без ділянок відшарувань. Дані морфометричні параметри достовірно ( $p < 0,001$ ) перевищували аналогічні у рогівці групи тварин без корекції. У цей же термін зафіксовано зменшення товщини власної речовини рогівки у 1,19 раза у порівнянні з 7 добою експерименту, домінування у грануляційній тканині клітин фібробластичного ряду та відсутність морфологічних проявів запалення.

Гістологічно досліджено, що застосування децелюляризованої рогівки свині через 28 діб після корекції забезпечує відновлення типової структури рогівки з наближенням морфометричних показників до групи інтактних тварин. На відміну від другої дослідної групи, де корекція не проводилася, оновлений передній епітелій центральної зони рогівки тварин третьої групи мав чітку диференціацію на шари, рівний рельєф базальної поверхні та контуровану мембрану Боумена, а його товщина ( $(54,19 \pm 2,09)$  мкм) недостовірно відрізнялася від показника норми. У цей термін досліду при застосуванні корекції у стромі гістологічно виявлено зрілу сполучну тканину та поодинокі капіляри в стані редукції, у той час як у рогівці тварин другої дослідної групи ще часто прослідковувались явища дозрівання сполучнотканинних компонентів. Мікроскопічно, у власній речовині пучки колагенових фібрил були орієнтовані паралельно, що є одним з факторів, які забезпечують прозорість рогівки.

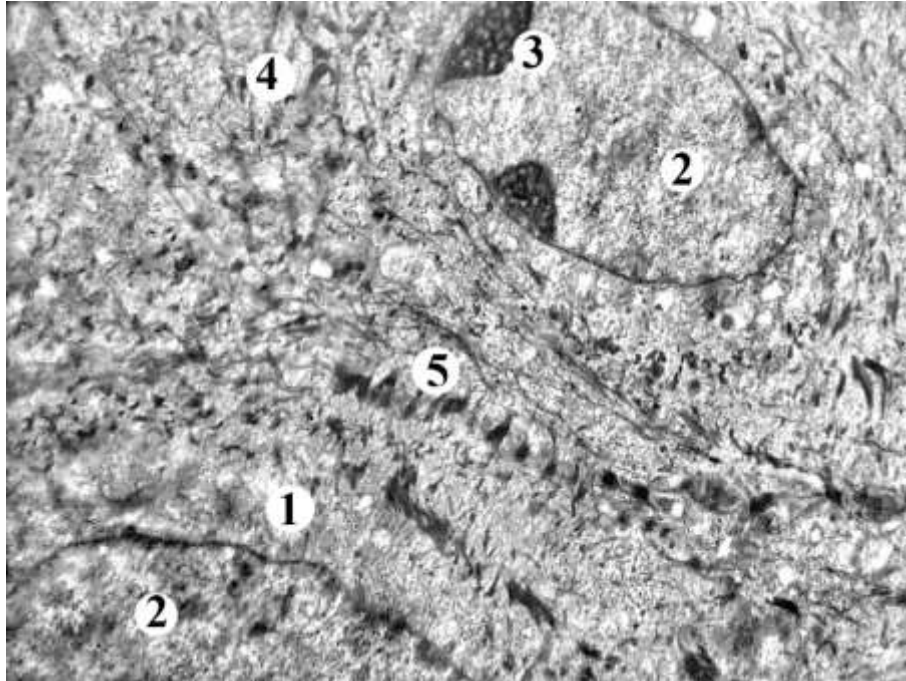
3.2.3 Субмікроскопічні зміни рогівки кролів без патології, в умовах змодельованої механічної непроникаючої травми рогівки та за умов децелюляризованою строною ксенорогівки

Субмікроскопічні дослідження інтактною групи тварин показали, що передній епітелій рогівки утворений багат шаровим плоским незроговілим епітелієм, клітини якого формують різні за морфологією шари. Епітеліоцити поверхневого шару мають витягнуту, плоску форму. У електроннощільній цитоплазмі спостерігаються дрібні мітохондрії із чітко контурованими мембранами, світлим мітохондріальним матриксом та нечисельними кристами. Канальці гранулярної ендоплазматичної сітки добре структуровані, на їх поверхні знаходяться осміофільні рибосоми. Також у цитоплазмі відзначаються вільні рибосоми та тонкі щільні тонофіламенти. Ядра мають овальну форму із чіткою рівною каріолемою, яка на деяких ділянках формує неглибокі інвагінації. Перинуклеарний просвіт рівномірний, неширокий. Каріоплазма електронносвітла із еухроматином та осміофільними ядерцями, які ексцентрично зміщені. Епітеліоцити поверхневого шару з'єднані між собою за допомогою чисельних щільних, осміофільних десмосомальних контактів, у склад яких входять пластинки прикріплення та компоненти цитоскелету клітин.

Проміжний шар переднього епітелію рогівки представлений епітеліоцитами неправильної, остистої форми. У плазмолемі виявляються багато електроннощільних десмосом із світлими нерозширеними міжклітинними просторами (рис. 3.24).

У цитоплазмі наявні мембранні та немембранні органели загального та спеціального призначення. Ядра епітеліоцитів округлі із чітко контурованою двомембранною каріолемою та вузьким перинуклеарним простором (рис. 3.25). У світлій каріоплазмі наявний функціонально активний еухроматин, гетерохроматин розташовується локально щільними грудками,

наявні одне або два осміофільні ядерця із фібрилярною та аморфною частинами.

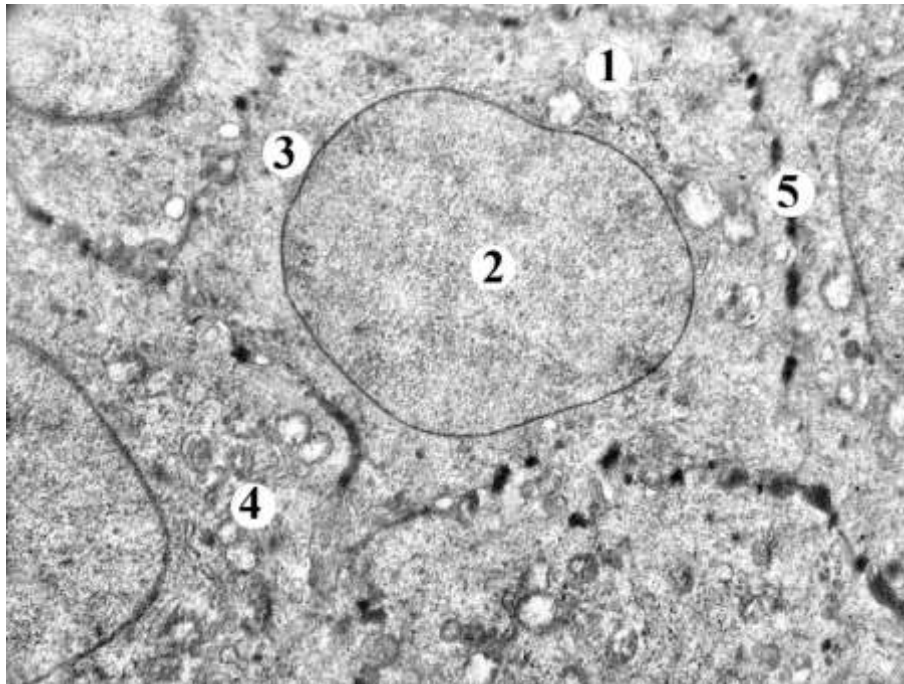


*Умовні позначки:* 1 – цитоплазма епітеліоцита, 2 – ядро, 3 – ядерце, 4 – тонофіламенти, 5 – десмосомальні міжклітинні контакти.

Рисунок 3.24 – Субмікроскопічний стан клітин переднього епітелію рогівки тварин інтактної групи. Електронограма. Збільшення:  $\times 7000$

Глибокий базальний шар переднього епітелію рогівки складається із одного шару епітеліоцитів, які з'єднуються із базальною мембраною за допомогою осміофільних гемідесмосом, що розташовані на базальній частині плазмолемі клітин. На латеральних сторонах та апікальній частині плазмолемі наявні чисельні зв'язувальні міжклітинні контакти. У цитоплазмі спостерігаються короткі, чітко контуровані каналця гранулярної ендоплазматичної сітки та цистерни комплексу Гольджі, багато невеликих, дрібних мітохондрій із електроннонещільним матриксом та типовими кристами. Виявляються поодинокі осміофільні рибосоми, вільні рибосоми та тонофіламенти. Округлі ядра розташовані ближче до базального полюсу,

містять добре структуровану каріолему та світлу каріоплазму із переважанням еухроматину, відзначається одне, два осміофільних ядерця. У базальному шарі часто спостерігаються епітеліоцити у різних фазах мітозу. Субмікроскопічно, базальна мембрана представлена електронносвітлою та темною пластинкою і переходить у передню пограничну пластинку – мембрану Боумена.

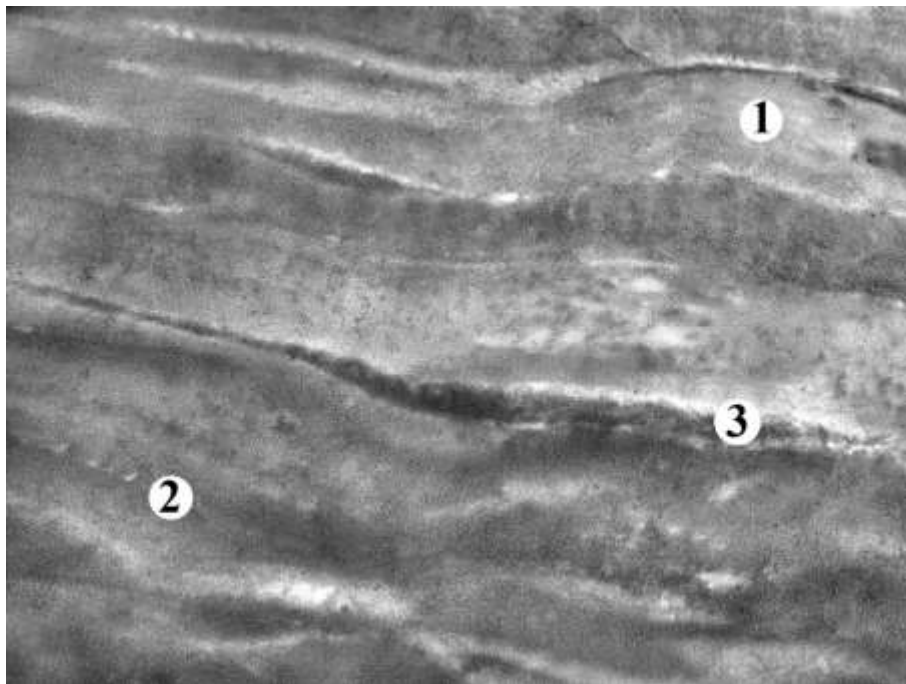


Умовні позначки: 1 – цитоплазма, 2 – ядро, 3 – каріолема, 4 – мітохондрії, 5 – десмосоми.

Рисунок 3.25 – Ультраструктурний стан епітеліоцитів переднього епітелію рогівки тварин інтактної групи. Електронограма. Збільшення:  $\times 8\ 000$

Строма рогівки сформована сполучнотканинними пластинками, які розташовані паралельно відносно поверхні рогівки. Пластинки побудовані із помірно електроннощільних колагенових фібрил і можуть мати вигляд чисельних ниток або крапок в залежності від площі перерізу. У проміжках між сполучнотканинними пластинками відзначаються сплющені відростчасті фіброцити – кератиноцити, відростки клітин повторюють шлях залягання пластинок (рис. 3.26). Клітини характеризуються вузьким обідком цитоплазми

навколо подовгастого ядра. У електроннощільній цитоплазмі спостерігаються поодинокі канальця гранулярної ендоплазматичної сітки із рибосомами на поверхні, дрібні мітохондрії, багато вільних осміюфільних рибосом. Ядро має добре контуровану каріолему із нечисельними ядерними порами. У каріоплазмі переважає помірно електроннощільний гетерохроматин, над локально розташованим еухроматином.

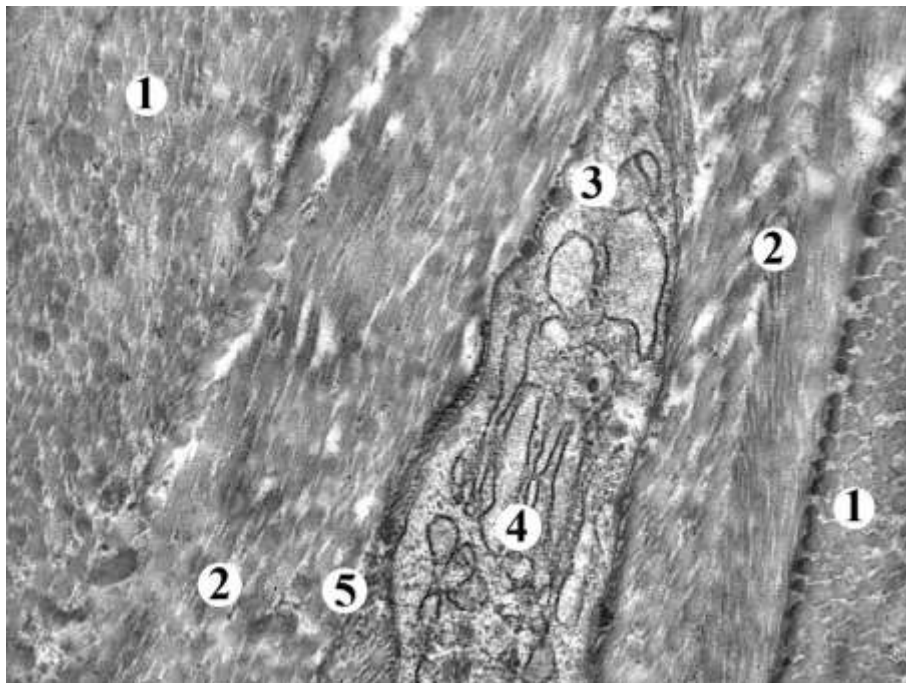


*Умовні позначки:* 1 – світла сполучнотканинна пластинка, 2 – темна сполучнотканинна пластинка, 3 – відросток кератиноцита.

Рисунок 3.26 – Субмікроскопічний стан строми рогівки тварин інтактної групи. Електронограма. Збільшення:  $\times 7\ 000$

У власній речовині рогівки виявляються популяція кератиноцитів із більшими об'ємами цитоплазми і активним продукуванням компонентів міжклітинної речовини – зрілі фібробласти (рис. 3.27). Для цих клітин характерним є добре розвинена мережа каналців гранулярної ендоплазматичної сітки, на поверхні яких багато фіксованих рибосом, виявляється комплекс Гольджі із цистернами і впорядкованими пухирцями.

Мітохондрії з чітко контурованою зовнішньою мембраною та внутрішньою мембраною, що утворює вгинання – кристи, матрикс частково просвітлений. У еухроматиновому ядрі наявна чітка каріолема із чисельними ядерними порами, перинуклеарний простір нерозширений. По всій площі зрілих фібробластів відзначаються скупчення колагенових фібрил, які продукуються даними клітинами. Сполучнотканинні пластинки у стромі рогівки оточені електронноосвітлою основною аморфною речовиною, яка закономірно чергується із ними.



*Умовні позначки:* 1 – поперечний переріз колагенових волокон, 2 – повздовжній зріз сполучнотканинних пластинок, 3 – фрагмент зрілого фібробласта, 4 – каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, 5 – синтез волокнистих компонентів міжклітинної речовини.

Рисунок 3.27 – Субмікроскопічний стан власної речовини рогівки тварин інтактної групи. Електроннограма. Збільшення:  $\times 12\ 000$

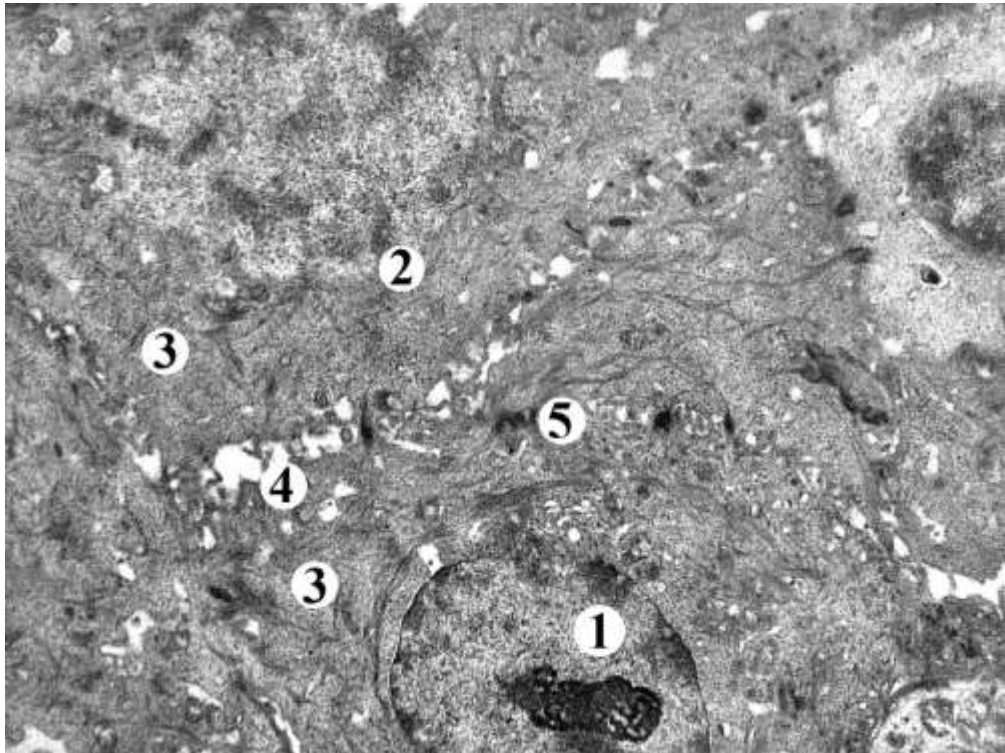
Власна речовина рогівки межує із задньою граничною пластинкою – мембраною Десцетовою і складається із фібрилярного, гранулярного та



аморфного компонентів. Задній епітелій рогівки представлений одношаровим плоским епітелієм. У базальному полюсі епітеліоцитів відзначаються чисельні осміюфільні напівдесмосоми, які скріплюють епітеліальний пласт із базальною мембраною. Міжклітинні простори вузькі, нерозширені. У цитоплазмі наявні невеликі мітохондрії із чіткими кристами та світлим мітохондріальним матриксом. Наявні каналця гранулярної ендоплазматичної сітки, цистерни комплексу Гольджі. Виявляються поодинокі електроннощільні лізосоми. Еліпсоподібної форми ядра мають чітку каріолему, в каріоплазмі наявний функціонально активний світлий хроматин та осміюфільний маргінально розташований гетерохроматин.

Субмікроскопічні дослідження показали, що через 3 доби після змодельованої механічної непроникаючої травми рогівки спостерігається поліморфізм епітеліоцитів переднього епітелію із різним ступенем альтеративних змін. Виявлялися епітеліоцити із гомогенною осміюфільною цитоплазмою із фрагментами мембранних та немембранних органел. Плазмолема нечітко контурована, на деяких ділянках якої відзначається відсутність десмосом або їх складові значно пошкоджені, міжклітинні простори розширені, просвітлені (рис. 3.28). Гетерохроматинове ядро розташовується ексцентрично, воно електроннощільне, осміюфільне із деформованою, на деяких ділянках гомогенною каріолемою, яка формує значні інвагінації. У поодиноких епітеліоцитів наявні осміюфільні ядерця.

У деструктивно зміненій власній речовині рогівки спостерігалися розволокнення, фрагментація колагенових фібрил у складі сполучнотканинних пластинок. Виявлялися електроннопросвітлені ділянки аморфної речовини, що вказувало на значний набряк. Хвилеподібна структура пластинок втрачалася і набувала більш звивистого розташування (рис. 3.29).



*Умовні позначки:* 1 – осміюфільне ядро з ядерцем, 2 – нечітка каріолема, 3 – гомогенна цитоплазма, 4 – розширені міжклітинні простори, 5 – десмосоми.

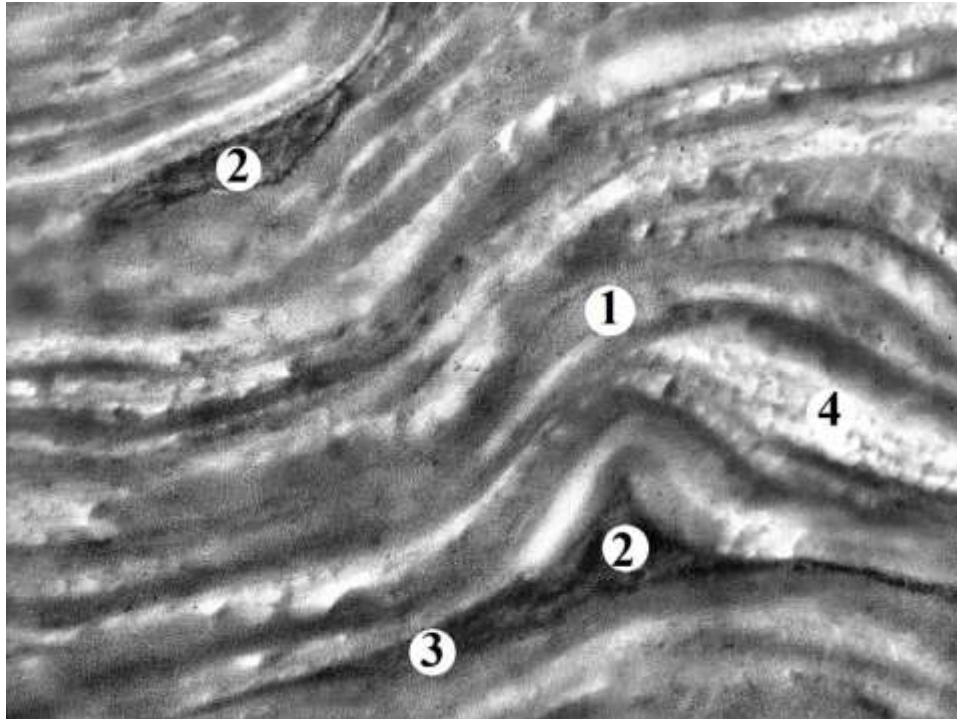
Рисунок 3.28 – Ультраструктурні зміни епітеліоцитів рогівки кроля через 3 доби після змодельованої механічної непроникаючої травми.

Електронограма. Збільшення:  $\times 7000$

У проміжках між пошкодженими помірно осміюфільними колагеновими волокнами розташовані електроннощільні тіла кератиноцитів із гетерохроматиновим ядром і однорідною осміюфільною цитоплазмою.

На субмікроскопічному рівні через 7 діб після моделювання механічної непроникаючої травми рогівки встановлено, що у периферійних ділянках епітеліоцити втратили своє по шарове розташування, але у цитоплазмі клітин виявлялися помірно дистрофічно змінені органели (рис. 3.30). Мітохондрії мали просвітлений мітохондріальний матрикс, фрагментовані кристи і локально гомогенну мембрану. Поодинокі каналця гранулярної

ендоплазматичної сітки потовщені, набряклі або значно стоншені, дезорганізовані. У ядрах епітеліоцитів каріоплазма електроннощільна за рахунок переважання осміофільного гетерохроматину, каріолема формує глибокі інвагінації, перинуклеарний простір розширений.

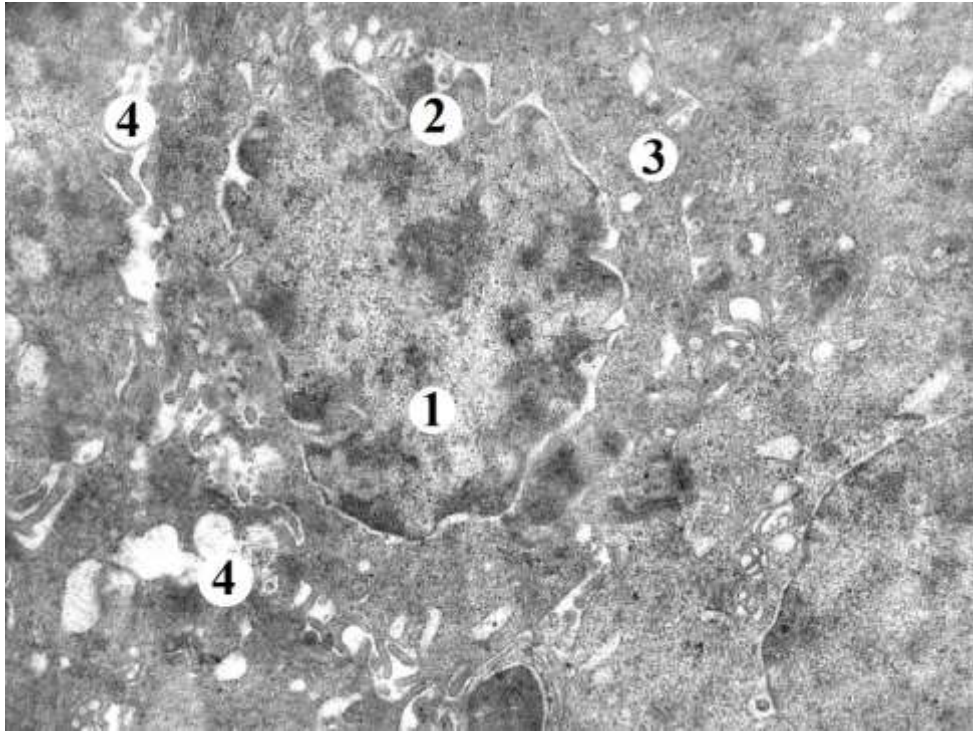


*Умовні позначки:* 1 – хвилеподібний хід сполучнотканинних пластинок, 2 – ядра кератиноцитів, 3 – осміофільні відростки кератиноцитів, 4 – набряк аморфної речовини.

Рисунок 3.29 – Субмікроскопічні зміни власної речовини рогівки кроля через 3 доби після змодельованої механічної непроникаючої травми.

Електронограма. Збільшення:  $\times 7000$

Сполучнотканинні пластинки строми рогівки через 7 діб експерименту дезорганізовані, виявляються ділянки фрагментації колагенових волокон. У проміжках між якими розташований набряклий, електроннопросвітлений аморфний компонент власної речовини рогівки.



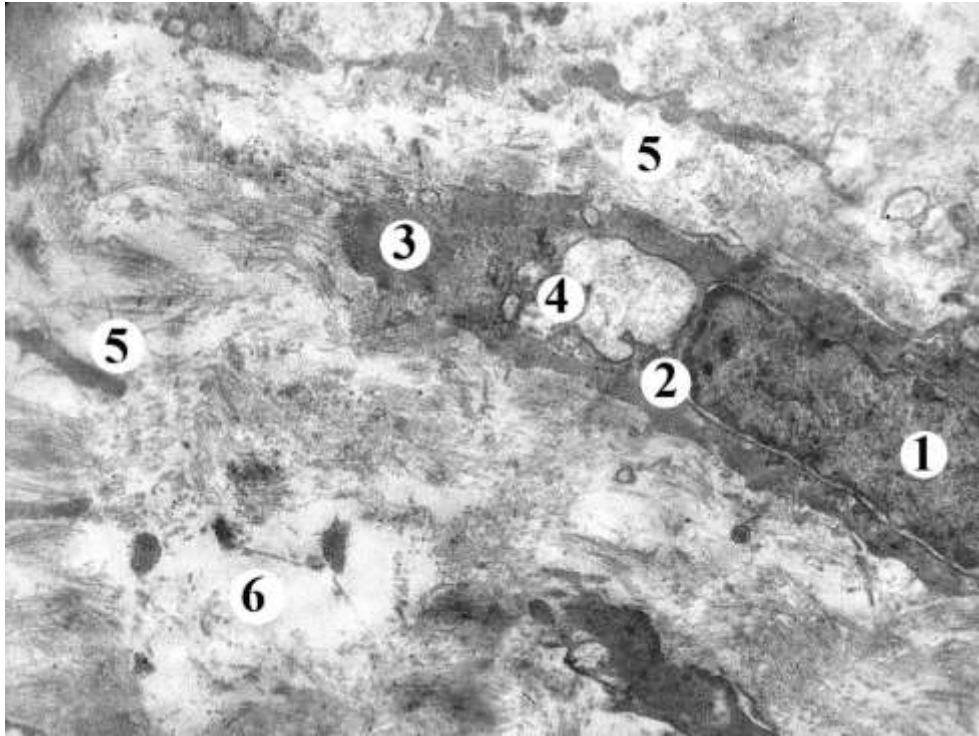
*Умовні позначки:* 1 – ядро епітеліоцита, 2 – інвагінації каріолеми, 3 – осміюфільна цитоплазма, 4 – розширені міжклітинні простори.

Рисунок 3.30 – Субмікроскопічні зміни епітеліального пласта рогівки кроля через 7 дів після змодельованої механічної непроникаючої травми.

Електронограма. Збільшення:  $\times 8000$

Кератиноцити перебувають у стані значної деструкції, що проявляється нечіткими, часто гомогенними контурами плазмолем, цитоплазма осміюфільна із пошкодженими органелами загального призначення. Продукування компонентів міжклітинного матриксу здійснюється локально. Ядра фіброцитів мають погано структуровану каріолему, перинуклеарний простір локально розширений, у каріоплазмі розташований електроннощільний, конденсований хроматин (рис. 3.31).

Субмікроскопічно, через 14 дів після змодельованої травми рогівки у епітеліоцитах проявлялися ознаки деструктивних та регенераторних процесів. На плазмолемі клітин виявлялися багато осміюфільних десмосомальних контактів, проте міжклітинні проміжки були розширені.

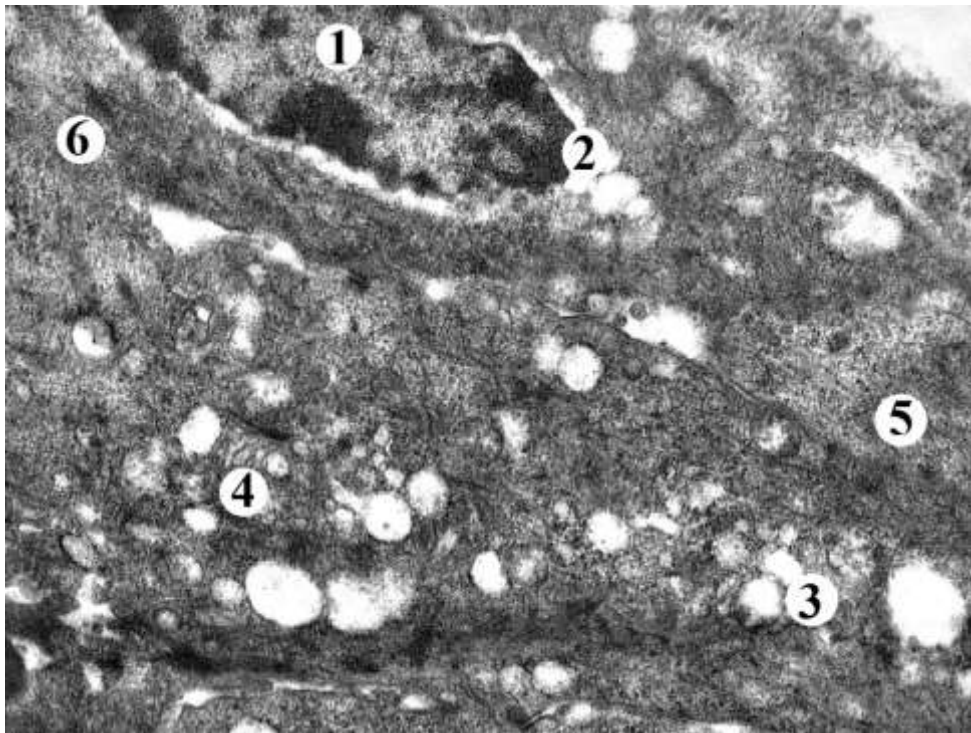


*Умовні позначки:* 1 – ядро фібробласта, 2 – інвагінації каріолеми, 3 – електроннощільна цитоплазма, 4 – деструктивно змінені каналця ендоплазматичної сітки, 5 – фрагментовані колагенові фібрили, 6 – аморфний матрикс.

Рисунок 3.31 – Ультраструктурні зміни власної речовини рогівки кроля через 7 діб після змодельованої механічної непроникаючої травми.

Електронограма. Збільшення:  $\times 10\ 000$

У цитоплазмі відзначалися дрібні мітохондрії із помірно електронноосвітлим мітохондріальним матриксом, кристи мали порушену будову, зовнішня і внутрішня оболонка на деяких ділянках гомогенна, нечітка. Виявлялися потовщені каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, які містили небагато фіксованих рибосом. Спостерігалися поодинокі, дрібні, осміюфільні лізосоми. Ядро епітеліоцитів демормоване, але у каріоплазмі відзначаються електронноосвітлі осередки еухроматину, проте щільний конденсований хроматин займає більшу частину, інколи виявляються осміюфільні ядерця (рис. 3.32).

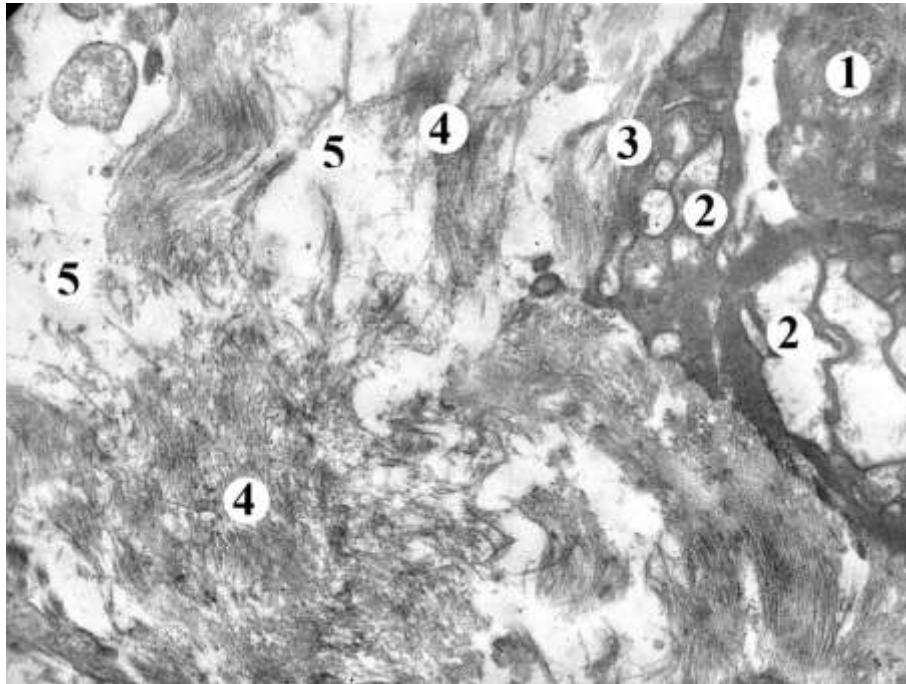


Умовні позначки: 1 – піктотичне ядро, 2 – нечітка каріолема із інвагінаціями, 3 – вакуолізована цитоплазма, 4 – пошкоджені мітохондрії, 5 – фрагментовані тонофіламенти, 6 – гомогенна плазмолема.

Рисунок 3.32 – Субмікроскопічні зміни епітеліоцитів рогівки через 14 діб після змодельованої механічної непроникаючої травми. Електронограма.

Збільшення:  $\times 9000$

У власні речовині у даний термін експерименту відзначається формування грануляцій. Виявляються місця формування гемокапілярів, кератиноцити мають дещо просвітлену цитоплазму, в навколоядерній зоні якої відзначаються фрагменти мітохондрій, каналців гранулярної ендоплазматичної сітки. Сполучнотканинні пластинки на деяких ділянках значно звивисті або розташовуються паралельними рядами. Проміжки між колагеновими фібрилами значно просвітлені, що вказує на набряк аморфного компоненту стромы рогівки. Зрілі фібробласти мають нечітко контуровану плазмолему, місцями гомогенну (рис. 3.33).



*Умовні позначки:* 1 – осміофільне ядро фібробласта, 2 – розширені, деструктивно змінені канальця ендоплазматичної сітки, 3 – нечітка плазмолема, 4 – окремі колагенові мікрофібрили, 5 – набрякла аморфна речовина.

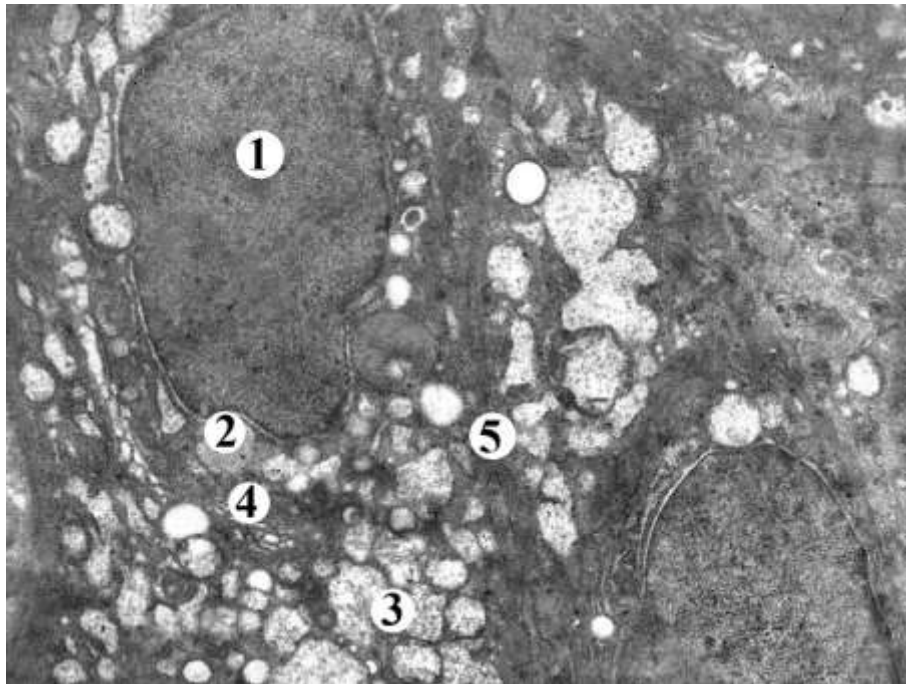
Рисунок 3.33 – Субмікроскопічні зміни строми рогівки через 14 діб після змодельованої механічної непроникаючої травми. Електроннограма.

Збільшення:  $\times 8000$

На субмікроскопічному рівні через 28 діб після моделювання механічної непроникаючої травми рогівки встановлено, що епітеліоцити багат шарового плоского незроговілого епітелію розташовані невпорядковано, міжклітинні простори значно розширені, електроннопросвітлені (рис. 3.34).

Локально спостерігається значне порушення будови у десмосомальних міжклітинних контактів. У електроннонещільній, вакуолізованій цитоплазмі епітеліоцитів виявляються набряклі мітохондрії із просвітленим мітохондріальним матриксом, редукованими кристами, подекуди нечіткою

зовнішньою і внутрішньою мембраною. Канальці ендоплазматичної сітки і цистерни комплексу Гольджі потовщені або значно стоншені. Гетерохроматинові ядра епітеліоцитів осміюфільні із гомогенною на окремих ділянках каріолемою, яка утворює інвагінації, перинуклеарний простір розширений (рис. 3.35).



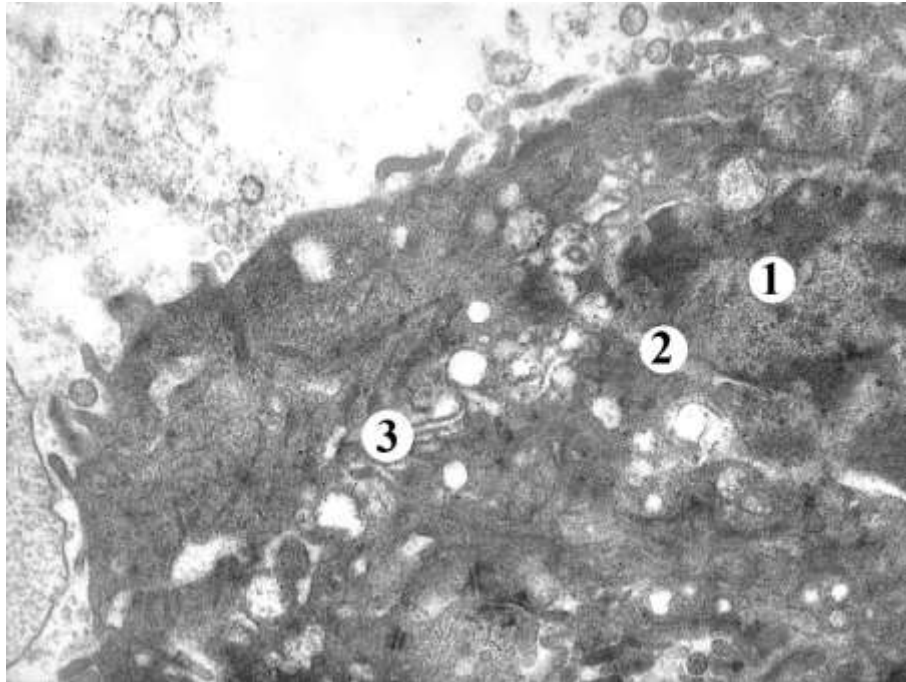
*Умовні позначки:* 1 – ядро епітеліоцита, 2 – розширений перинуклеарний простір, 3 – вакуолізована цитоплазма, 4 – комплекс Гольджі, 5 – нечітка плазмолема.

Рисунок 3.34 – Субмікроскопічні зміни епітелію рогівки через 28 діб після змодельованої механічної непроникаючої травми. Електронограма.

Збільшення:  $\times 8000$

Власна речовина рогівки підлягає деструктивним і дегенеративним змінам, що проявляються значним розволокненням, фрагментацією колагенових волокон. Сполучнотканинні пластинки дезорганізовані, втрачають паралельне розташування. Аморфна речовина набрякла, електроннопросвітлена.





Умовні позначки: 1 – каріопікноз ядра, 2 – гомогенна плазмолема, 3 – цитоплазма із фрагментами органел.

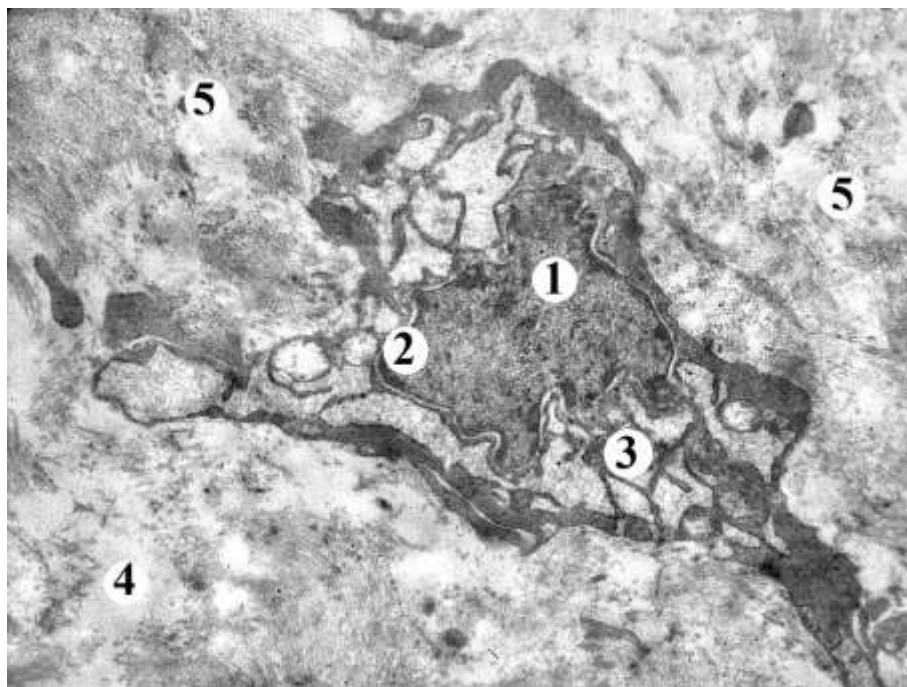
Рисунок 3.35 – Субмікроскопічні зміни епітеліоцитів рогівки через 28 діб після змодельованої механічної непроникаючої травми.

Електронограма. Збільшення:  $\times 12000$

Зрілі фібробласти характеризуються елетронносвітлою цитоплазмою із пошкодженою мережею поодиноких, стоншених каналців ендоплазматичної сітки, мітохондрії вакуолізовані із нечітким мембранами. Ядро у стадії каріопікнозу із гомогенної на деяких ділянках каріолемою, перинуклеарний просвіт розширений нерівномірно (рис. 3.36). Каріоплазма заповнена осміофільним, елетроннощільним функціонально неактивним хроматином. Дані порушення у структурі ядра, мембранних і немембранних органел вказують на значне сповільнення і інактивацію продукування колагенових фібрил.

Ультраструктурні дослідження рогівки третьої експериментальної групи тварин, яким здійснювали хірургічну корекцію механічної травми рогівки із застосуванням децелюляризованої рогівки свині через 3 доби досліду

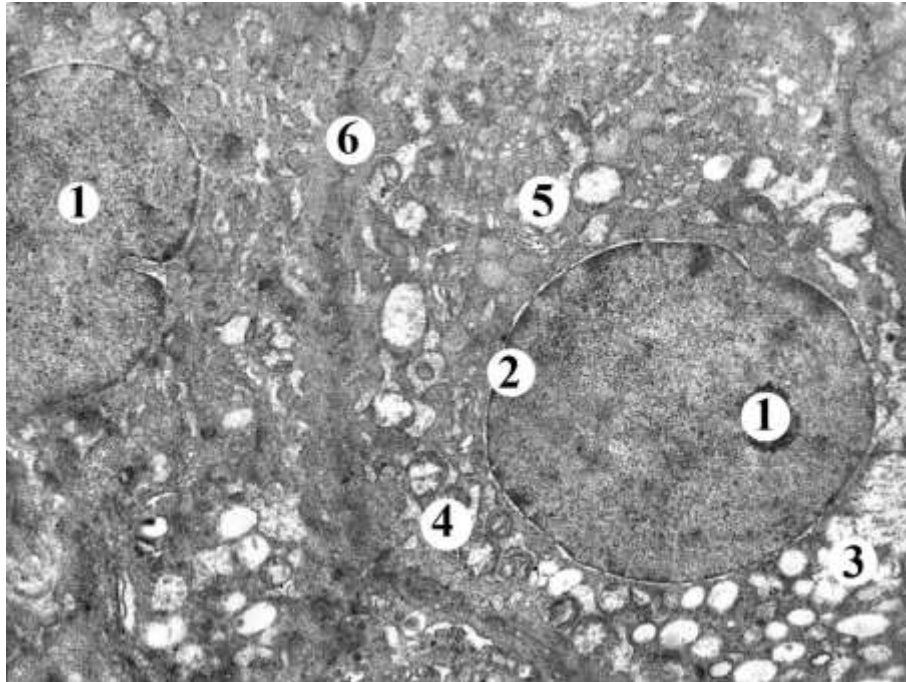
встановлено, що клітини епітелію характеризувалися різним морфологічним станом: одні епітеліоцити мали світлу набряклу цитоплазму із значно фрагментованими органелами загального призначення, а інші характеризувалися осміофільно цитоплазмою із мітохондріями, що були вакуолізовані із електроннопросвітленим мітохондріальним матриксом. Спостерігаються широкі міжклітинні простори, на деяких ділянках десмосомальні контакти погано контуровані. Ядра епітеліоцитів містили переважно осміофільний, функціонально неактивний гетерохроматин. Каріолема на деяких ділянках нечітка, перинуклеарний простір часто нерівномірно розширений (рис. 3.37).



*Умовні позначки:* 1 – каріопікноз ядра фібробласта, 2 – розширений перинуклеарний простір, 3 – деструктивно змінена цитоплазма, 4 – аморфний матрикс, 5 – фрагментовані колагенові волокна.

Рисунок 3.36 – Субмікроскопічні зміни власної речовини рогівки через 28 діб після змодельованої механічної непроникаючої травми.

Електронограма. Збільшення:  $\times 8000$



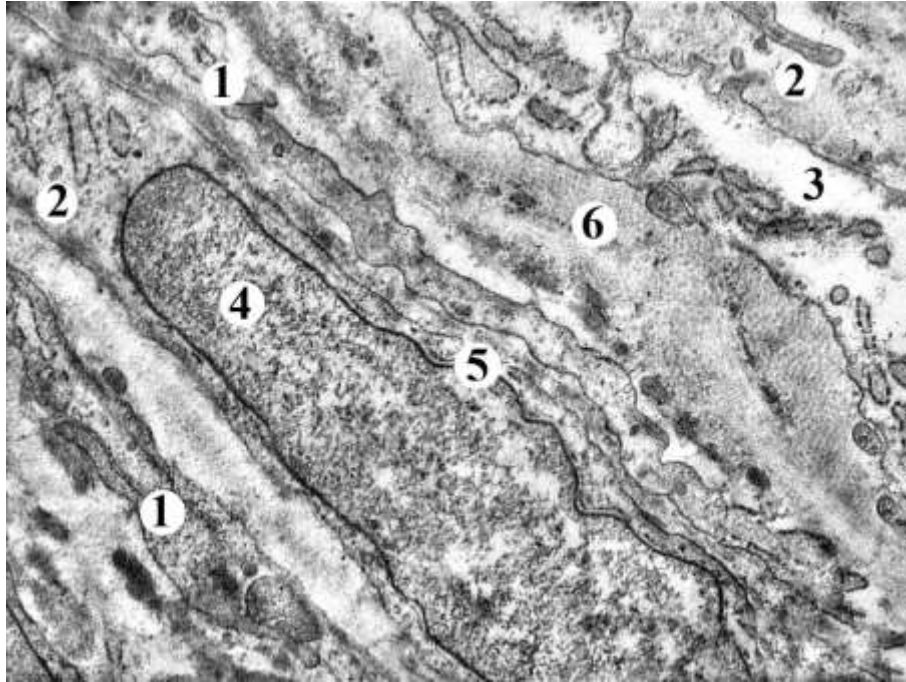
Умовні позначки: 1 – ядра епітеліоцитів, 2 – розширений перинуклеарний простір, 3 – вакуолізована цитоплазма, 4 – мітохондрії із пошкодженою структурою, 5 – комплекс Гольджі, 6 – нечітка плазмолема.

Рисунок 3.37 – Субмікроскопічні зміни епітелію рогівки кроля через 3 доби після змодельованої механічної непроникаючої травми за умов застосуванням децелюляризованої рогівки свині.

Електронограма. Збільшення:  $\times 8000$

Строма рогівки характеризується хаотичним розташуванням колагенових волокон, меншим ступенем їх фрагментації. Виявляються ділянки формування грануляційної тканини. Сполучнотканинні пластинки дезорганізовані, проте у проміжках залягаються фібробласти із частково збереженою структурою. Спостерігаються ознаки формування нових колагенових фібрил фібробластами (рис. 3.38). У таких клітин в цитоплазмі виявляються потовщені, стоншені каналці гранулярної ендоплазматичної сітки із частково фрагментованими мембранами. На їх поверхні відзначаються поодинокі осміофільні рибосоми. Мітохондрій небагато, мають на деяких ділянках нечіткі мембрани і редуковані кристи, мітохондріальний матрикс

помірно осміюфільний. Ядра фібробластів витягнуті, із переважанням гетерохроматину, перинуклеарний простір на деяких зонах розширений, каріолема формує неглибокі, поодинокі інвагінації.



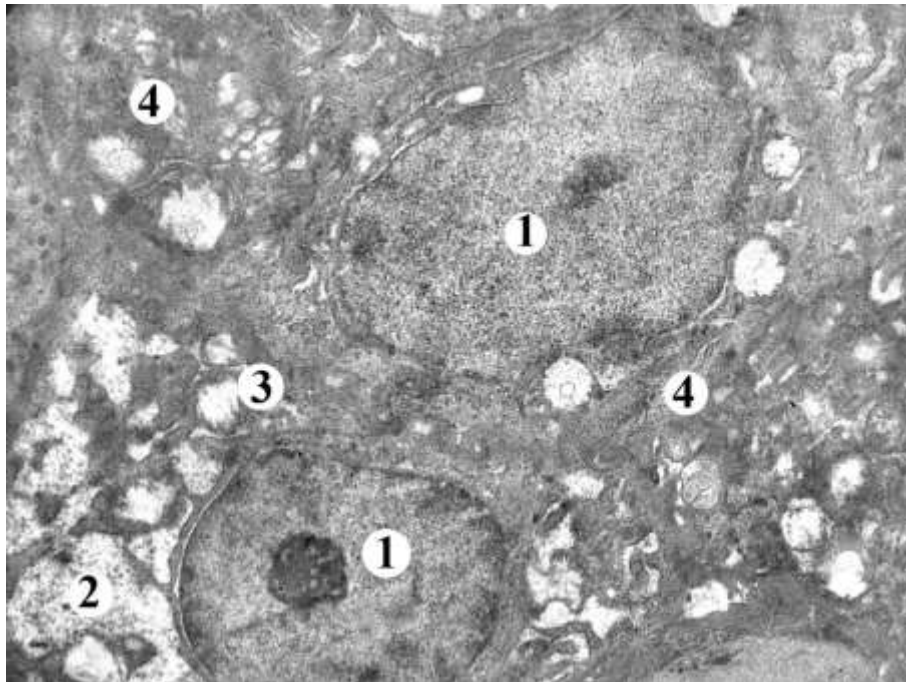
*Умовні позначки:* 1 – відростки фібробластів, 2 – цитоплазма, 3 – каналця гранулярної ендоплазматичної сітки, 4 – ядро, 5 – інвагінації каріолеми, 6 – сполучнотканинна пластинка.

Рисунок 3.38 – Субмікроскопічні зміни власної речовини рогівки кроля через 3 доби після змодельованої механічної непроникаючої травми за умов застосуванням децелюляризованої рогівки свині.

Електронограма. Збільшення:  $\times 12000$

Субмікроскопічно, через 7 діб експерименту за умов корекції встановлено ознаки регенерації у структурних компонентах рогівки. Спостерігається відновлення пошарового розташування епітеліоцитів у товщі епітеліально пласта. Проте все ще присутні електроннопрозорі, розширені міжклітинні простори. Епітеліоцити мають чітку плазмолему із небагатьма десмосомальними контактами. У цитоплазмі наявні дещо фрагментовані

каналъця гранулярної ендоплазматичної сітки. Виявлялися різні популяції мітохондрій із елетронноосвітлим або осміюфільним мітохондріальним матриксом, чітко контурованими кристами і мембранами. Спостерігалися поодинокі вільні рибосоми. Ядра клітин помірно елетронноосвітліні із чіткими контурами каріолеми, виявлялися зони розширення перинуклеарного простору (рис. 3.39).



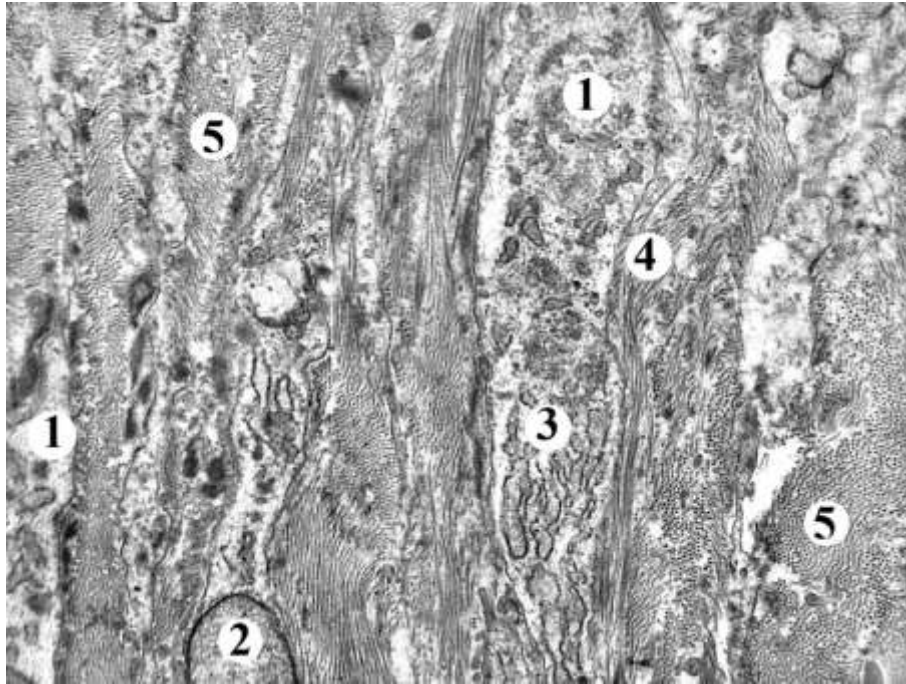
*Умовні позначки:* 1 – елетронноосвітле ядро, 2 – набрякла цитоплазма, 3 – мітохондрії, 4 – осміюфільна цитоплазма.

Рисунок 3.39 – Субмікроскопічні зміни епітеліоцитів рогівки через 7 діб після змодельованої механічної непроникаючої травми за умов корекції.

Електронограма. Збільшення:  $\times 8000$

У власній речовині спостерігається утворення грануляцій у верхніх шарах. У центральній частині виявляються ознаки набряку аморфного компоненту. Сполучнотканинні пластинки мають незначно звивистий хід. Клітини фібробластичного ряду починають синтезувати колагенові фібрили, які відходять на окремих ділянках від тіла і відростків. У активних

фіброblastів відзначаються багато каналців гранулярної ендоплазматичної сітки, яка розташовується в навколоядерній та периферичній зонах (рис. 3.40). Мітохондрії дрібні із дещо зміненою структурою з електронно-світлим мітохондріальним матриксом.



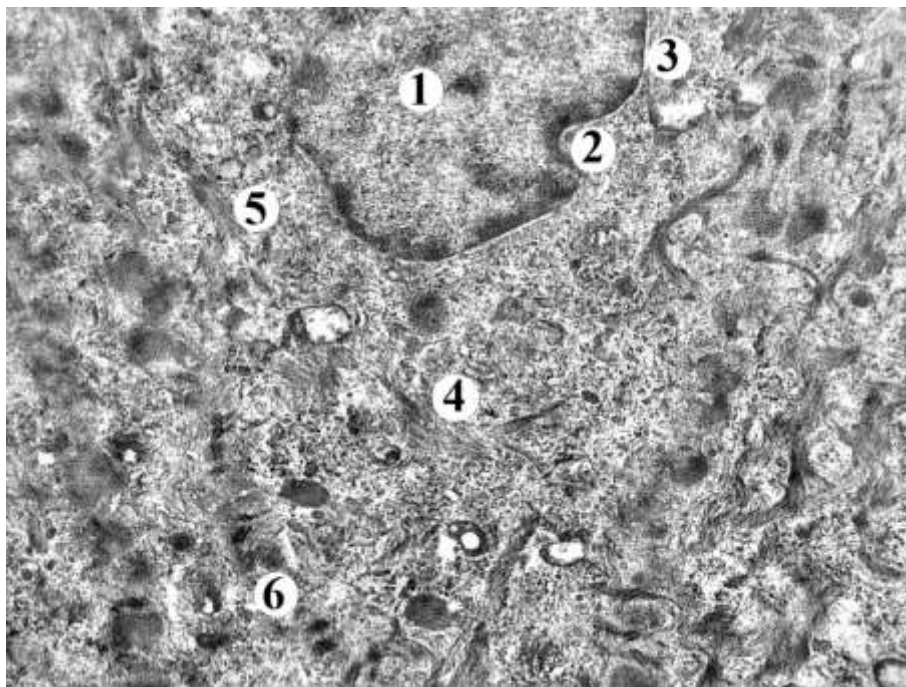
Умовні позначки: 1 – відростки фібробластів, 2 – фрагмент ядра, 3 – цитоплазма з каналцями гранулярної ендоплазматичної сітки, 4 – утворення волокнистих структур, 5 – колагенові волокна.

Рисунок 3.40 – Субмікроскопічні зміни строми рогівки через 7 діб після змодельованої механічної непроникаючої травми за умов корекції.

Електронограма. Збільшення:  $\times 7000$

Субмікроскопічні дослідження рогівки третьої експериментальної групи тварин, яким здійснювали хірургічну корекцію механічної травми рогівки із застосуванням децелюляризованої рогівки свині через 14 діб досліду встановили відновні, регенераторні процеси у епітеліоцитах та власній речовині. Клітини багат шарового плоского незроговілого епітелію характеризувалися новоутвореними та гіпертрофованими формами. Незрілі епітеліальні

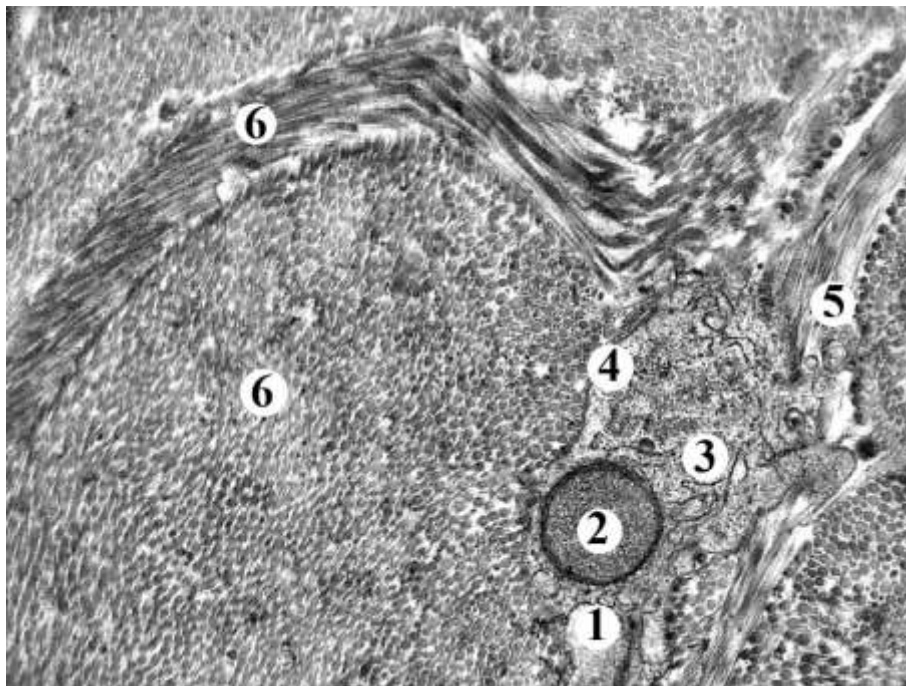
клітини мали помірно електронно світлу цитоплазму із округлим ядром. Мітохондрії невеликі із чіткими кристами та електронно щільним матриксом. Виявлялися достатньо багато вільних осміофільних рибосом, добре структуровані канальця ендоплазматичної сітки. У цитоплазмі відзначалися осередки тонофібрилярних структур. Проте в деяких епітеліоцитів спостерігався незначний набряк цитоплазми, збільшення кількості мембранних і немембранних органел. У ядрах виявлялися одне, два осміофільних ексцентрично зміщених ядерця. Каріоплазма характеризувалася дифузно розташованим електронно світлим еухроматином. Дані ознаки підтверджують мітотичну активність та проліферацію. Міжклітинні простори звужені, чітко видно багато електронно щільних десмосом (рис. 3.41).



*Умовні позначки:* 1 – ядро із осміофільним гетерохроматином, 2 – інвагінація каріолеми, 3 – розширений перинуклеарний простір, 4 – тонофібрилярні структури, 5 – цитоплазма, 6 – десмосоми.

Рисунок 3.41 – Субмікроскопічні зміни епітеліоцитів рогівки через 14 діб після корекції. Електронограма. Збільшення:  $\times 8000$

У власній речовині рогівки відзначається посилення функціональної активності фібробластичного диферону, особливо спостерігається синтетична здатність зрілих фібробластів, які продукують колагенові фібрили. Такі клітини мали добре розвинену мережу каналців гранулярної ендоплазматичної сітки, які на деяких ділянках були потовщені. На їх поверхні було багато фіксованих осміюфільних рибосом. Комплекс Гольджі характеризувався частково набряклими цистернами. Мітохондрії невеликі із чітко контурованими мембранами та помірно електронноосвітлим матриксом. По периферії фібробласта спостерігається багато синтезованих колагенових фібрил (рис. 3.42).



*Умовні позначки:* 1 – цитоплазма фібробласта, 2 – ядро, 3 – каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, 4 – плазмолема, 5 – насинтезовані колагенові фібрили, 6 – сполучнотканинні пластинки перерізані під різним кутом.

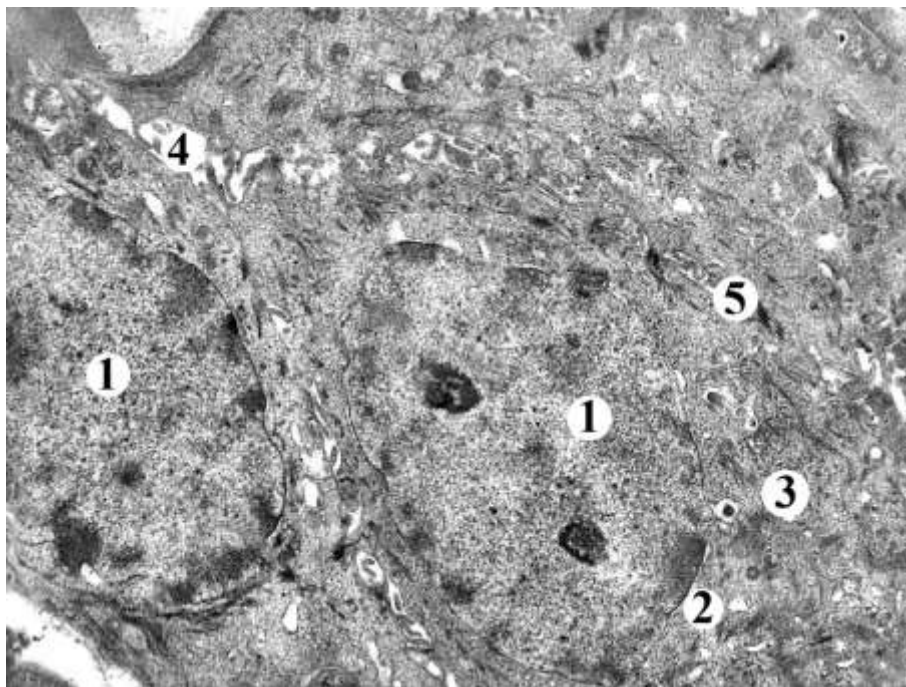
Рисунок 3.42 – Субмікроскопічні зміни власної речовини рогівки кроля через 14 діб після змодельованої механічної непроникаючої травми

за умов застосуванням децелюляризованої рогівки свині.

Електронограма. Збільшення:  $\times 5000$



Через 28 діб після корекції механічної непроникаючої травми рогівки субмікроскопічно, встановлено, активацію епітеліоцитів у чітко структурованих рядах багат шарового плоского незроговілого епітелію (рис. 3.43). Клітини характеризувалися чіткою плазмолемою із осміофільними десмосомальними контактами, міжклітинні простори нерозширені. У цитоплазмі виявляються добре збережені та функціонально активні мітохондрії із зовнішньою мембраною, добре контурованою внутрішньою мембраною і кристами, помірно електроннощільним мітохондріальним матриксом. Виявляються каналці ендоплазматичної сітки, численні вільні рибосоми, осміофільні поодинокі лізосоми. В еухроматиновому ядрі виявляються грудки осміофільного, маргінального гетерохроматину.

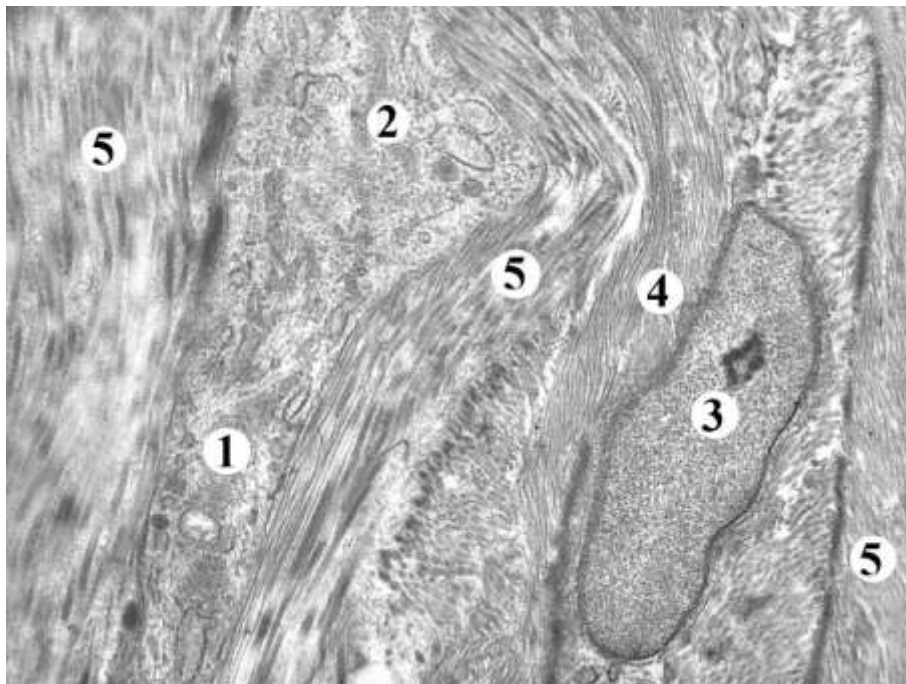


*Умовні позначки:* 1 – ядра епітеліоцитів, 2 – чітка каріолема, 3 – цитоплазма, 4 – міжклітинні простори, 5 – добре контуровані десмосоми.

Рисунок 3.43 – Субмікроскопічні зміни епітелію рогівки кроля через 28 діб після змодельованої механічної непроникаючої травми за умов корекції.

Електронограма. Збільшення:  $\times 8000$

У власній речовині роги́вки в даний термін експерименту спостерігається відновлення усіх компонентів. Міжклітинна речовина була структурованою із поздовжньою орієнтацією колагенових волокон, які формують сполучнотканинні пластинки, проміжками між якими залягають функціонально активні фібробласти із овальним частково осміюфільним ядром, органелами які займають навколоядерну зону. У цитоплазмі відзначаються добре розвинена система каналців гранулярної ендоплазматичної сітки та цистерн комплексу Гольджі. Незначна кількість добре контурованих, дрібних мітохондрій. Спостерігається активна діяльність фібробластів, що проявляється значною кількістю синтезованих колагенових фібрил по всьому периметру тіла і відростків клітини (рис. 3.44).



*Умовні позначки:* 1 – фрагмент відростка фібробласта, 2 – цитоплазма фібробласта, 3 – ядро з ядерцем, 4 – утворені колагенові фібрили, 5 – сполучнотканинні пластинки.

Рисунок 3.44 – Субмікроскопічні зміни власної речовини роги́вки через 28 діб після змодельованої механічної непроникаючої травми за умов застосуванням децелюляризованої роги́вки свині. Електронограма.

Збільшення:  $\times 7000$

Отже, проведення електронномікроскопічних досліджень рогівки дозволяє констатувати, що за умов змодельованої механічної непроникаючої травми розвиваються морфологічні зміни у складових частинах рогівки, що характеризуються порушенням електронної щільності у епітеліоцитах, пошкодженням і подальшим руйнуванням міжклітинних контактів, прогресуванням некротичних змін. Відбуваються значні дегенеративні зміни у власній речовині рогівки, що проявляються деструкцією колагенових волокон у складі сполучнотканинних пластинок, значних дистрофічних змін зазнають фібробласти, кератиноцити.

Встановлено, що проведення хірургічної корекції механічної травми рогівки сприяє активації та покращенню регенераторних процесів у всіх структурних компонентах рогівки. У багат шаровому епітелії відзначається впорядковане розташування епітеліоцитів із збереженням їх ультраструктури, що проявляється відновленням цілісності органел, збільшенням кількості тонофіламентів, міжклітинних контактів, появою ядерців і переважанням еухроматину у каріоплазмі ядер. У власній речовині виявлено посилення функціональної та синтетичної активності клітин фібробластичного диферону і відповідно структурованістю міжклітинної речовини із чітким розташуванням сполучнотканинних пластинок.

3.3 Особливості біохімічних та імунологічних показників кролів за умов механічної травми рогівки і корекції з використанням строми рогівки, отриманого методом децелюляризації

У роботах багатьох науковців робиться висновок про те, що патогенез цілого ряду патологічних процесів, у тому числі і очей, пов'язаний з активацією процесів ліпопероксидації. У нашому дослідженні було проаналізовано показники, що характеризують оксидативний стрес та рівень антиоксидантного захисту у тварин, яким моделювали механічну травму

рогівки та проводили корекцію із застосуванням сроми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації.

Аналізуючи динаміку вмісту гідропероксидів ліпідів (ГПЛ) можна констатувати, що моделювання механічної травми рогівки спричиняється до зростання цього показника уже на 3-тю добу до 165,7 % від рівня тварин, яким патологічний процес не моделювали (табл. 3.2; рис. 3.45).

Таблиця 3.2 – Концентрація продуктів вільнорадикального окиснення у сироватці крові кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням сроми рогівки, отриманої методом децелюляризації,  $M \pm m$

Показник/ група тварин		ГПЛ, ум. од/мл	ТБП, мкмоль/л	ШО, ум. од/мл
Без патології, (n=10)		4,46 ± 0,18	3,22 ± 0,12	0,036 ± 0,004
Механічна травма рогівки, (n=10)	3-тя доба	7,38 ± 0,22*	5,94 ± 0,19*	0,068 ± 0,003*
	7-ма доба	5,94 ± 0,14*	4,86 ± 0,16*	0,056 ± 0,004*
	14-та доба	5,39 ± 0,14*	4,36 ± 0,18*	0,048 ± 0,005*
	28-ма доба	5,12 ± 0,18*	3,88 ± 0,14*	0,044 ± 0,002*
Механічна травма рогівки+ хірургічна корекція, (n=10)	3-тя доба	6,12 ± 0,24*#	4,62 ± 0,16*#	0,054 ± 0,005*#
	7-ма доба	5,74 ± 0,17*#	4,26 ± 0,12*	0,048 ± 0,003*#
	14-та доба	5,52 ± 0,18*#	4,12 ± 0,14*	0,046 ± 0,004*
	28-ма доба	5,14 ± 0,16*	3,36 ± 0,12#	0,037 ± 0,003#
Примітка. Тут і в інших таблицях розділу: * – відмінності достовірні між групою тварин без моделювання патологічного процесу і тварин, яким моделювали механічну травму рогівки (p<0,05); # – відмінності достовірні між дослідними групами тварин без хірургічної корекції і з хірургічною корекцією у відповідні терміни спостереження (p<0,05).				

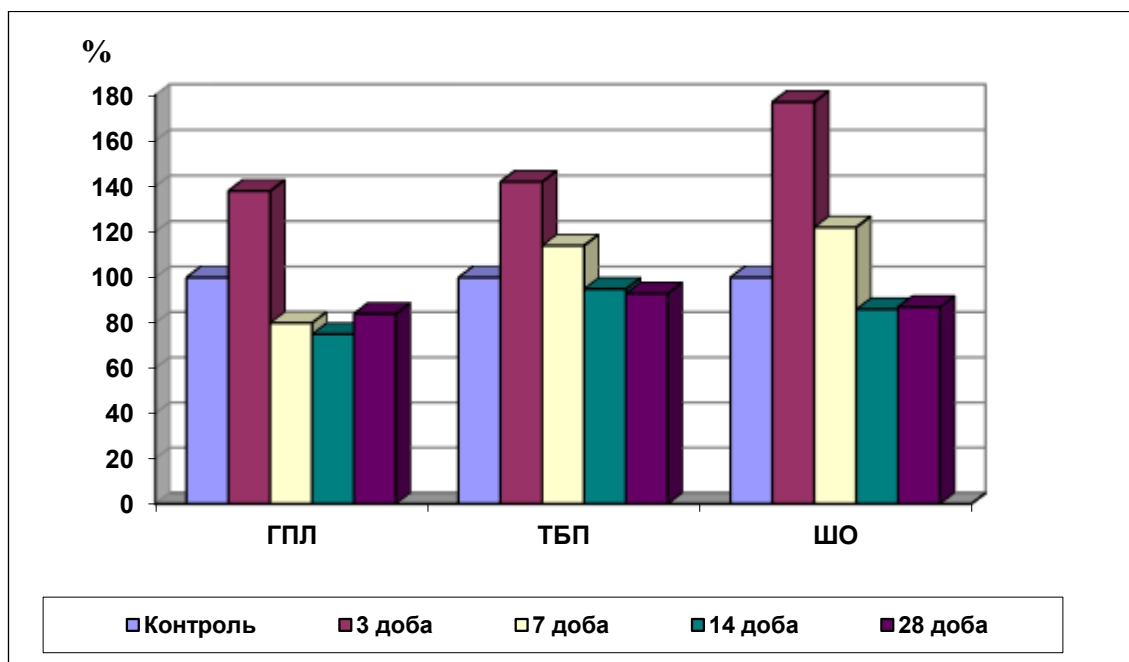


Рисунок 3.45 – Динаміка змін показників ліпідної пероксидації у крові за умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки

До 7-ої доби вміст ГПЛ дещо зменшився і склав 133,2 % від норми, що, однак, достовірно вище, ніж у тварин без змодельованого патологічного процесу. Ця ж тенденція спостерігається і у подальші терміни спостереження – на 14-ту добу показник склав 114,8 % а на 28-му – 114,8 % від рівня тварин без патології. Зростає також вміст проміжних компонентів ПОЛ – ТБК-реагуючих продуктів. На 3-тю добу від моменту моделювання механічної травми рогівки вміст ТБП зріс на 84,4% від рівня тварин без патології (див. рис. 3.45). У подальшому також спостерігалось зниження концентрації цього продукту порівняно з 3-ою добою. На 7-му добу зростання склало 42,9 %, 14-ту – 35,4 % а 28-му – 23,6 % від рівня тварин без патології. Аналогічна динаміка спостерігається і щодо кінцевого продукту ліпопероксидації – основ Шиффа. На 3-тю добу патологічного процесу показник ШО зріс на 88,9 % від норми, 7-му – 55,6 %. 14-ту – 33,3 % а 28-му – 22,1 % від рівня тварин, яким механічної травми не моделювали (див. рис. 3.45).

Застосування строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації зменшувало інтенсивність зростання процесів ліпідної пероксидації. Так, концентрація ГПЛ у тварин цієї групи на 3-тю добу зростала на 37,5 %, що однак значно менш виразно, ніж у тварин без корекції – на 28 %. На 7-му добу зростання склало 28,7 % від норми (на 4,5 % менше, ніж у тварин без корекції). До 14-ої доби показник майже не змінювався, а до 28-ої доби показник склав 115,2 %, що на рівні показника тварин без корекції (рис. 3.46).

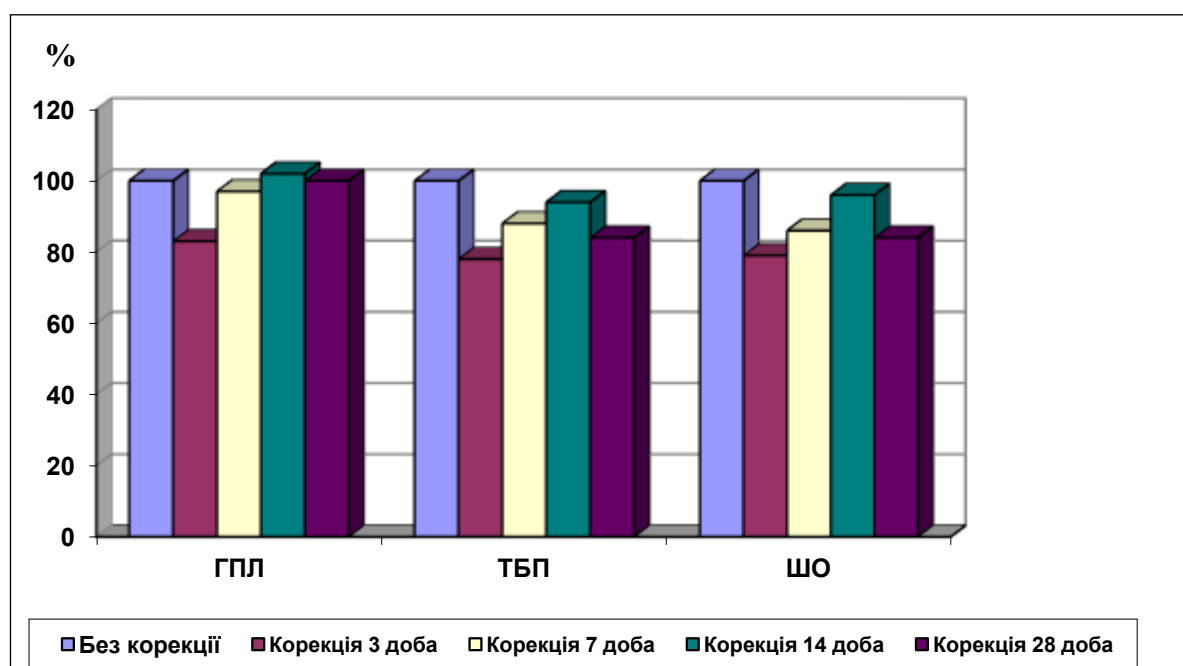


Рисунок 3.46 – Динаміка змін показників ліпопероксидації у крові кролів за умови хірургічної корекції експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки

Менш виразно, порівняно з тваринами, яким корекцію не проводили, зростала також концентрація ТБК-активних продуктів (див. табл. 3.2). На 3-тю добу показник склав 143,5 % від норми, що на 41,2 % менше, ніж у групі без корекції. На 7-му добу зростання склало 32,3 %, а це на 10,6 % менше, ніж без корекції. До 14-ої доби рівень ТБП склав 127,9 % (на 7,5 % менше від тварин, яким корекцію не проводили). До 28-ої доби показник ТБП достовірно не

відрізнявся від аналогічного показника тварин без патології, що, однак, на 19,3 % менше, ніж у тварин, яким корекцію не проводили (див. рис. 3.46).

Стосовно кінцевого продукту ліпопероксидації – основ Шиффа, то їхня динаміка була подібною до початкових і проміжних продуктів. Зокрема, на 3-тю добу показник склав 150 % від рівня тварин без патологічного процесу, що на 38,9 % менше, ніж у тварин з механічною травмою рогівки, яким корекцію не проводили. На 7-му добу показник склав 133,3 %, а це на 22,3 % менше, ніж без корекції. До 14-ої доби спостерігалось подальше зниження ТБП – він склав 127,9 %, що достовірно не відрізнялось від показника тварин без корекції. Нормалізація рівня ШО наступила на 28-му добу спостереження, проте стосовно тварин без корекції цей показник був меншим на 19,4 % (див. рис. 3.46).

Отже, застосування строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації, було ефективнішим на початкових етапах патологічного процесу щодо рівня продуктів ліпопероксидації, однак і до завершення терміну спостереження ми спостерігали більш низькі показники ПОЛ, ніж у тварин, яким корекцію не проводили.

За результатами проведеного дослідження показників першої лінії антиоксидантної системи можна констатувати, що на 3-тю добу експерименту супероксиддитсмутазна активність супернатанту гемолізатів еритроцитів зросла на 38,1 % відносно тварин без змодельованої патології (табл. 3.3). З 7-ої доби спостереження цей показник достовірно зменшився і склав 79,8 % від рівня тварин, яким механічну травму не моделювали. До 14-ої доби спостереження активність СОД залишалась практично однаковою порівняно із показником на 7-му добу. На 28-шу добу експерименту показник дещо зростав, однак склав лише 83,9 % від аналогічного показника тварин без змодельованої патології.

Таблиця 3.3 – Показники антиоксидантної системи кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації,  $M \pm m$

Показник/ група тварин		СОД, кров, ум.од/мл	КТ кров, ум.од/мл	ЦП, мг/л	ВГ, ммоль/л
Без патології, (n=10)		1,68 ± 0,04	0,648 ± 0,014	256,5 ± 9,9	4,12 ± 0,11
Механічна травма рогівки, (n=10)	3-тя доба	2,32 ± 0,03*	0,917 ± 0,012*	452,7 ± 11,6*	3,74 ± 0,10*
	7-ма доба	1,34 ± 0,02*	0,736 ± 0,015*	288,3 ± 9,4*	3,42 ± 0,09*
	14-та доба	1,26 ± 0,02*	0,614 ± 0,012*	221,5 ± 12,7*	3,26 ± 0,10*
	28-ма доба	1,41 ± 0,03*	0,585 ± 0,006	224,2 ± 10,7	3,72 ± 0,09*
Механічна травма рогівки+ хірургічна корекція, (n=10)	3-тя доба	2,55 ± 0,04*#	0,984 ± 0,016*	561,9 ± 11,7*#	3,96 ± 0,09*
	7-ма доба	1,94 ± 0,04*#	0,832 ± 0,012#	518,8 ± 10,9*#	3,82 ± 0,11*#
	14-та доба	1,86 ± 0,05#	0,756 ± 0,011*#	426,6 ± 11,4*#	3,71 ± 0,09#
	28-ма доба	1,72 ± 0,04#	0,678 ± 0,011#	345,8 ± 12,5#	4,14 ± 0,11#

Каталазна активність у супернатанті гемолізатів еритроцитів, як видно з результатів, представлених у таблиці 3.3, у посттравматичному періоді змінювалась аналогічно до активності СОД, однак з певними відмінностями. Якщо на 3-тю добу від моменту моделювання механічної непроникаючої травми рогівки показник достовірно зростав і склав 141,5 % відносно тварин без змодельованої патології, то на 7-му добу він хоч і зменшувався, однак був достовірно вищим від норми – 113,6 %.

Виразне підвищення супероксиддисмутази і каталазної активності у ранні терміни патологічного процесу (рис. 3.47) вказує на мобілізацію



факторів першої лінії антиоксидного захисту, спрямовану на стримування розвитку оксидативного стресу.

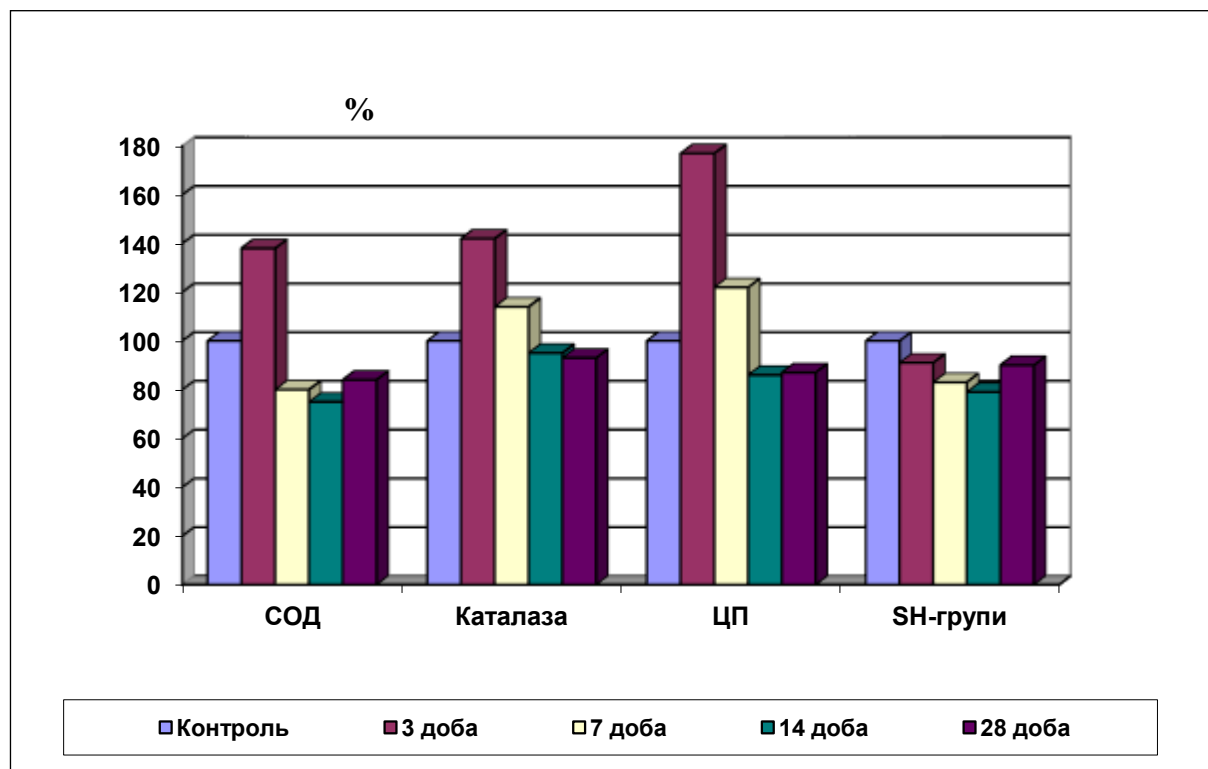


Рисунок 3.47 – Динаміка змін показників АОЗ у крові за умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки

У подальшому каталазна активність знижувалась і на 14-ту добу склала 94,8 %, а на 28-му – 92,7 % від показника тварин без змодельованої патології.

Зважаючи на наведене вище можна припустити, що токсичний вплив продуктів ліпопероксидації у тварин, яким проводилось моделювання механічної непроникаючої травми рогівки зростає внаслідок недостатньої ефективності факторів першої лінії антиоксидного захисту, показником чого є зменшення у пізні терміни спостереження активності СОД та каталази [1, 200, 300].

Реакцію дисмутації, подібно до супероксиддисмутази, каталізує й інший антиоксидант – мідьвмісний білок другої лінії антиоксидного захисту церулоплазмін. Як показано у табл. 3.3, концентрація церулоплазміну у

сироватці крові кролів, яким моделювали механічну травму рогівки достовірно змінювалась. На 3-тю добу вона склала 176,5 % від рівня тварин без патології, на 7-му – 122,4 %, а у подальшому суттєво зменшувалась, становлячи 86,4 % на 14-ту і 87,4 % на 28-му доби від моменту моделювання патологічного процесу (див. рис. 3.47).

Важливими компонентами системи антиоксидного захисту є біомолекули, що містять сульфгідрильні групи, зокрема відновлений глутатіон.

Аналіз вмісту відновленого глутатіону у супернатанті гемолізатів еритроцитів показує його достовірне зниження в усі терміни спостереження за тваринами з механічною отравмою рогівки. Зокрема, на 3-тю добу після нанесення травми показник склав 90,78 % від рівня тварин без змодельованої патології, на 7-му – 83 %, 14-ту – 79,12 %. А до 28-ої доби показник дещо зріс і склав 90,29 % від норми, що, однак, достовірно менше, ніж у тварин без змодельованої патології (див. рис. 3.47).

Застосування стріми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації, покращувало антиоксидантний потенціал, особливо у більш пізні терміни спостереження (рис. 3.48). Зокрема, супероксиддисмутазна активність на 3-тю добу спостереження зростала ще більш виразно, ніж у тварин без корекції і склала 157,8 % від норми, що на 14,2 % вище, ніж у тварин, яким корекцію не проводили. На 7-му добу показник склав 127,4 %, а це на 59,7 % вище, ніж у тварин без корекції. Така ж тенденція спостерігалась і на 14-ту добу – зростання на 47,6 % порівняно з тваринами без проведення хірургічної корекції. До 28-ої доби показник СОД фактично досягав рівня тварин без змодельованої патології, а у порівнянні з тваринами без корекції був на 21,9 % вищим.

Аналогічні за спрямованістю результати ми отримали і щодо каталазної активності, проте більш виразне зростання щодо тварин без корекції ми зафіксували у більш пізні терміни спостереження, зокрема на 28-му добу

показник каталази перевищував рівень тварин, яким корекції не проводили на 55,9 % (див. рис. 3.48).

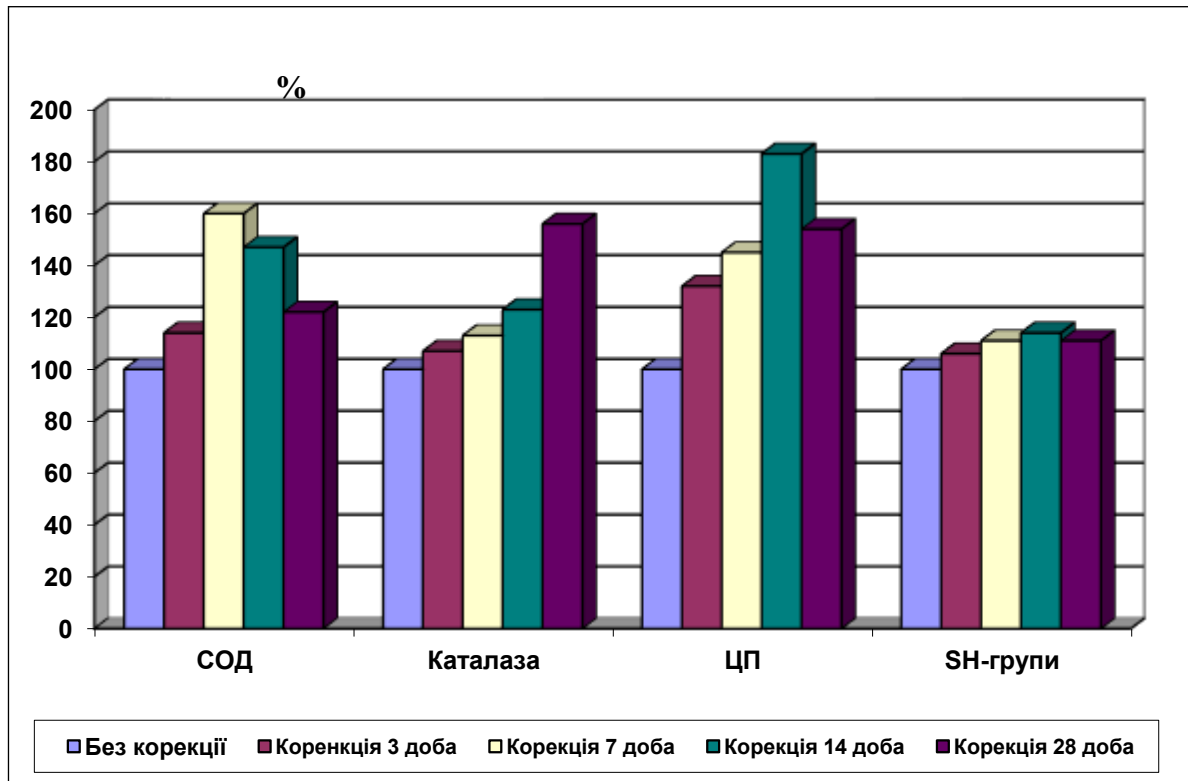


Рисунок 3.48 – Динаміка змін показників АОЗ у крові за умови хірургічної корекції експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки

Зростання рівня антиоксидантного захисту можна констатувати і стосовно показників другої лінії. Зокрема, концентрація церулоплазміну за умов хірургічної корекції на 3-тю добу спостереження склала 219,1 % від аналогічного показника тварин, яким травму рогівки не моделювали, а це на 32 % більше, стосовно кролів з травмою без корекції. На 7-му добу показник склав 163,2 % ( на 45,1 % більше, ніж у тварин без корекції), а на 14-ту – 158,5 % ( на 86,3 % від тварин, яким корекцію не проводили). Навіть до 28-мої доби концентрація церулоплазміну була вищою від норми на 34,8 %, що на 54,2 % вище, ніж у тварин без корекції (див. рис. 3.48).

Стосовно концентрації відновленого глутатіону ми отримали менш значимі значення зростання, як це було у випадку церулоплазміну. Зокрема, на 3-тю добу показник фактично перебував на рівня тварин без змодельованої патології і достовірно не відрізнявся від аналогічного показника тварин з травмою рогівки без корекції. На 7-му та 14-ту доби показники були вищими, ніж у тварин без корекції відповідно на 11,7 та 13,8 %. До 28-ої доби рівень відновленого глутатіону нормалізувався, а стосовно тварин без корекції склав 111,3 % (див. рис. 3.48).

Провідну роль в деградації компонентів сполучної тканини, типовим представником якої є строма рогівки, відіграють протеолітичні ферменти. У ранньому посттравматичному періоді після нанесення механічної травми рогівки активність процесів протеолізу суттєво зростає. Зокрема, на 3-тю добу спостереження ми зафіксували достовірне зростання в плазмі крові лізису азоальбуміну на 46,4 %, азоказеїну – на 51,7 %, азоколу – на 73,1 % від рівня тварин, яким травми не моделювали (табл. 3.4; рис. 3.49).

До 7-ої доби спостереження показники загальної протеолітичної активності як стосовно дрібнодисперсних і великодисперсних білків, так і основної речовини сполучної тканини – колагену знижувались порівняно з попереднім терміном спостереження, однак буди достовірно вищими від норми – лізис альбуміну – на 37,4 %, азоказеїну – на 36,4 %, азоколу – на 51,3 %. Така ж тенденція мала місце і у подальші терміни спостереження, однак і на 28-му добу загальна протеолітична активність хоч і зменшилася, але все ж продовжувала достовірно перевищувати контрольні показники відповідно на 22,7 %, 22,5 % та 7,7 % стосовно лізису азоальбуміну, азоказеїну та азоколу.

У тварин, яким проводили хірургічну корекцію з використанням еквівалента строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації активність процесів протеолізу була меншою, ніж у тварин, яким корекцію не проводили (рис. 3.50). Зокрема, на 3-тю добу спостереження показник лізису

азоальбуміну склав 126,8 % порівняно з тваринами без патології, що на 19,6 % менше, ніж у тварин, яким корекцію не проводили.

Таблиця 3.4 – Загальна протеолітична активність плазми крові кролів за умови механічної непроникаючої травми рогівки та її корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації (M ± m)

Група тварин		Показник		
		Лізис азоальбуміну, мл <sup>-1</sup> · год <sup>-1</sup>	Лізис азоказеїну, мл <sup>-1</sup> · год <sup>-1</sup>	Лізис азоколу, мл <sup>-1</sup> · год <sup>-1</sup>
Без змодельованої патології, (n=10)		2,78 ± 0,10	2,36 ± 0,11	0,78 ± 0,07
Механічна травма рогівки, (n=10)	3-тя доба	4,07 ± 0,11*	3,58 ± 0,12*	1,35 ± 0,05*
	7-ма доба	3,82 ± 0,12*	3,22 ± 0,11*	1,18 ± 0,04*
	14-та доба	3,44 ± 0,14*	3,14 ± 0,10*	0,95 ± 0,05*
	28-ма доба	3,41 ± 0,13*	2,89 ± 0,12 *	0,84 ± 0,06
Механічна травма рогівки+ хірургічна корекція, (n=10)	3-тя доба	3,55 ± 0,11*#	3,82 ± 0,14*#	1,18 ± 0,05*#
	7-ма доба	3,38 ± 0,10*#	3,13 ± 0,09*	1,06 ± 0,06*#
	14-та доба	3,17 ± 0,13*#	2,77 ± 0,10*#	1,19 ± 0,07*#
	28-ма доба	2,84 ± 0,14#	2,58 ± 0,08*#	0,81 ± 0,04

Показник лізису азоказеїну дещо перевищував рівень тварин без корекції (на 10,1 %), а лізис азоколу був меншим, ніж у тварин без корекції на 20,8 %. На 7-му добу показники зменшились ще більше. Лізис азоальбуміну склав 121,6 %, азоказеїну 132,6 %, азоколу 135,9 % від рівня тварин без змодельованої патології, що достовірно менше, ніж у тварин з механічною травмою рогівки без корекції відповідно на 15,8 %, 3,8 % та 15,4 %. На 14-ту добу показники лізису азоальбуміну та азоказеїну і надалі знижувались, а показник азоколу зріс порівняно з попереднім терміном спостереження і склав 152,5 % від норми.

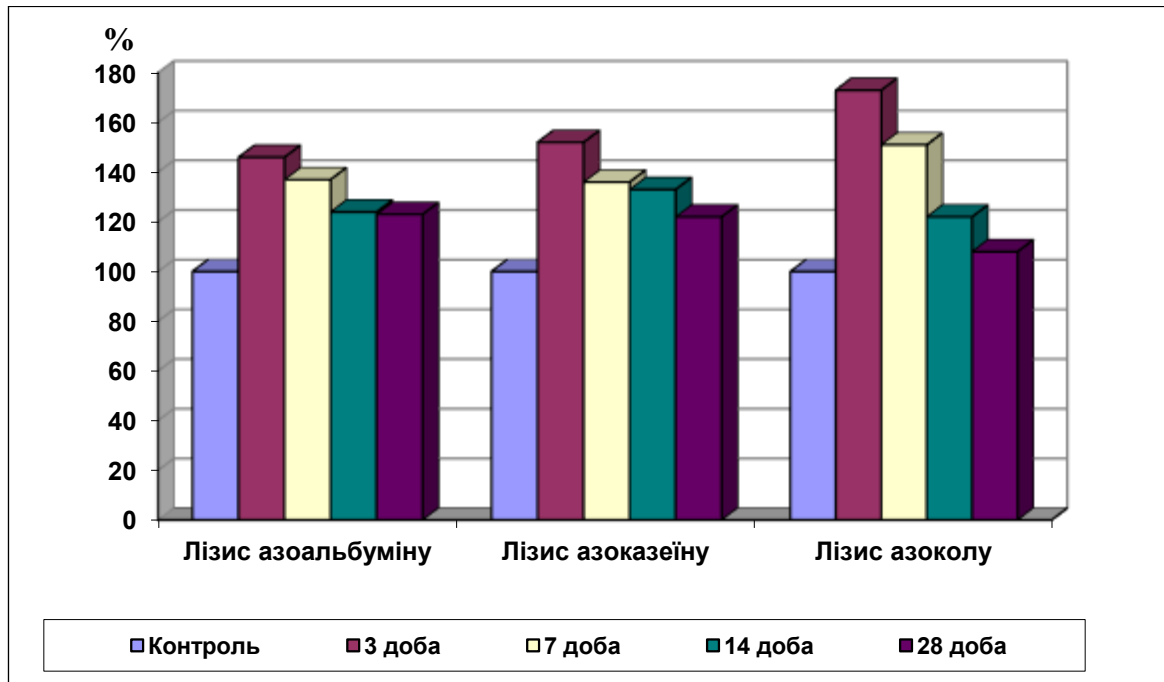


Рисунок 3.49 – Динаміка змін показників протеазної системи крові за умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки

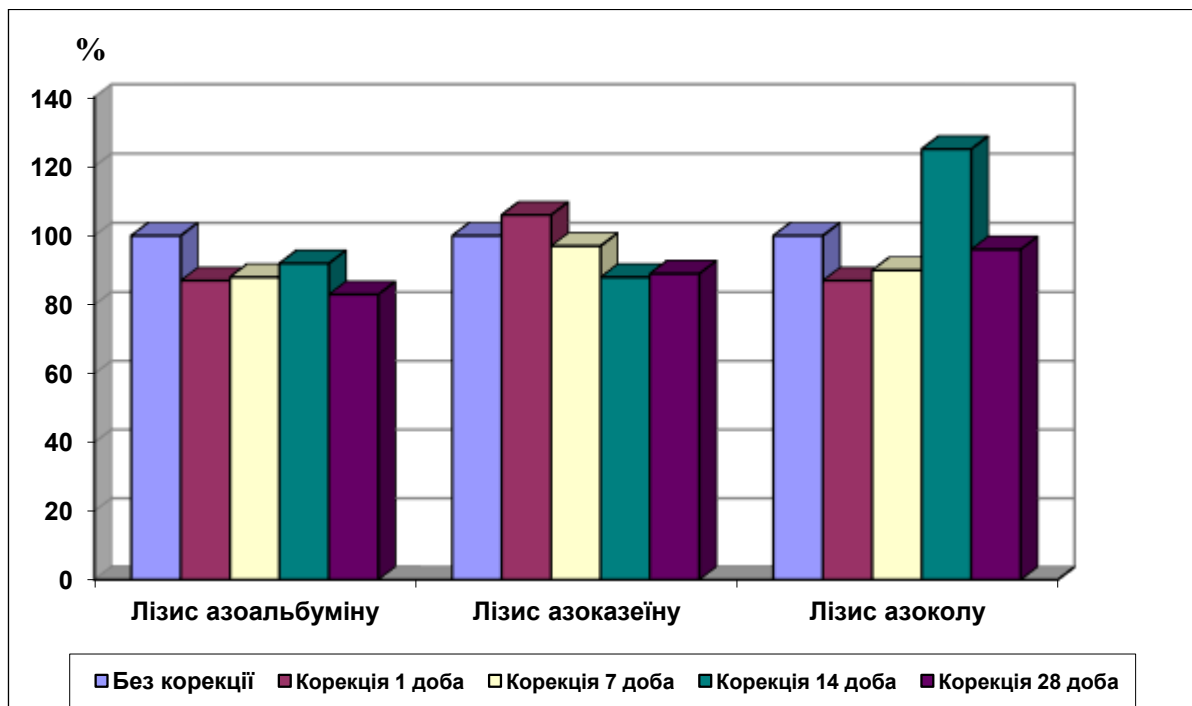


Рисунок 3.50 – Динаміка змін показників протеазної системи крові за умови механічної травми рогівки та корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації

До 28-ої доби показники азоальбуміну та азоколу перебували на рівні тварин без змодельованої патології, а рівень лізису азоказеїну був вищим на 9,3 %, причому стосовно показників тварин без корекції показники були достовірно нижчими.

Оскільки, ми виявили виразне зростання протеолітичної активності, наступним етапом нашого дослідження було проаналізувати зміни вмісту інгібіторів протеолізу –  $\alpha_1$ -ІІІ та  $\alpha_2$ -МГ, а також розрахувати індекс протеолізу (табл. 3.5).

Таблиця 3.5 – Показники антипротеазної системи крові кролів за умови механічної непроникаючої травми рогівки та її корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації (M $\pm$ m)

Група тварин		Показник		
		$\alpha_1$ -ІІІ, мкмоль/л	$\alpha_2$ -МГ, г/л	Індекс протеолізу
Інтактні, (n=10)		40,32 $\pm$ 1,12	2,73 $\pm$ 0,09	0,137 $\pm$ 0,006
Механічна травма рогівки, (n=10)	3-тя доба	45,22 $\pm$ 1,54	3,87 $\pm$ 0,14*	0,183 $\pm$ 0,011*
	7-ма доба	46,53 $\pm$ 1,22*	3,55 $\pm$ 0,12*	0,164 $\pm$ 0,014*
	14-та доба	42,21 $\pm$ 1,16	3,44 $\pm$ 0,15*	0,156 $\pm$ 0,012*
	28-ма доба	41,22 $\pm$ 1,11	2,88 $\pm$ 0,11	0,160 $\pm$ 0,007*
Механічна травма рогівки+хірургічна корекція, (n=10)	3-тя доба	48,33 $\pm$ 1,24* <sup>#</sup>	3,35 $\pm$ 0,12* <sup>#</sup>	0,165 $\pm$ 0,009* <sup>#</sup>
	7-ма доба	47,34 $\pm$ 1,44*	3,28 $\pm$ 0,14* <sup>#</sup>	0,149 $\pm$ 0,014* <sup>#</sup>
	14-та доба	46,17 $\pm$ 1,12* <sup>#</sup>	3,22 $\pm$ 0,11*	0,144 $\pm$ 0,012* <sup>#</sup>
	28-ма доба	42,11 $\pm$ 1,14	2,87 $\pm$ 0,09	0,138 $\pm$ 0,011 <sup>#</sup>

На 3-тю добу експерименту вміст у плазмі крові  $\alpha_1$ -ІІІ зріс на 12,2, а  $\alpha_2$ -МГ на 41,8 % (p<0,05) відносно показників тварин без змодельованої патології.

На 7-му добу спостереження показник  $\alpha_1$ -ІП залишався майже на тому ж рівні, а  $\alpha_2$ -МГ дещо знизився порівняно з попереднім терміном і склав 130 % від норми ( $p>0,05$ ). На 14-ту добу зафіксовано подальше зниження антипротеаз – концентрація  $\alpha_1$ -ІП склала 104,7 % від норми,  $\alpha_2$ -МГ – 126 %. До 28-ої доби експерименту показники не відрізнялись від рівня тварин без змодельованого патологічного процесу (рис. 3.51).

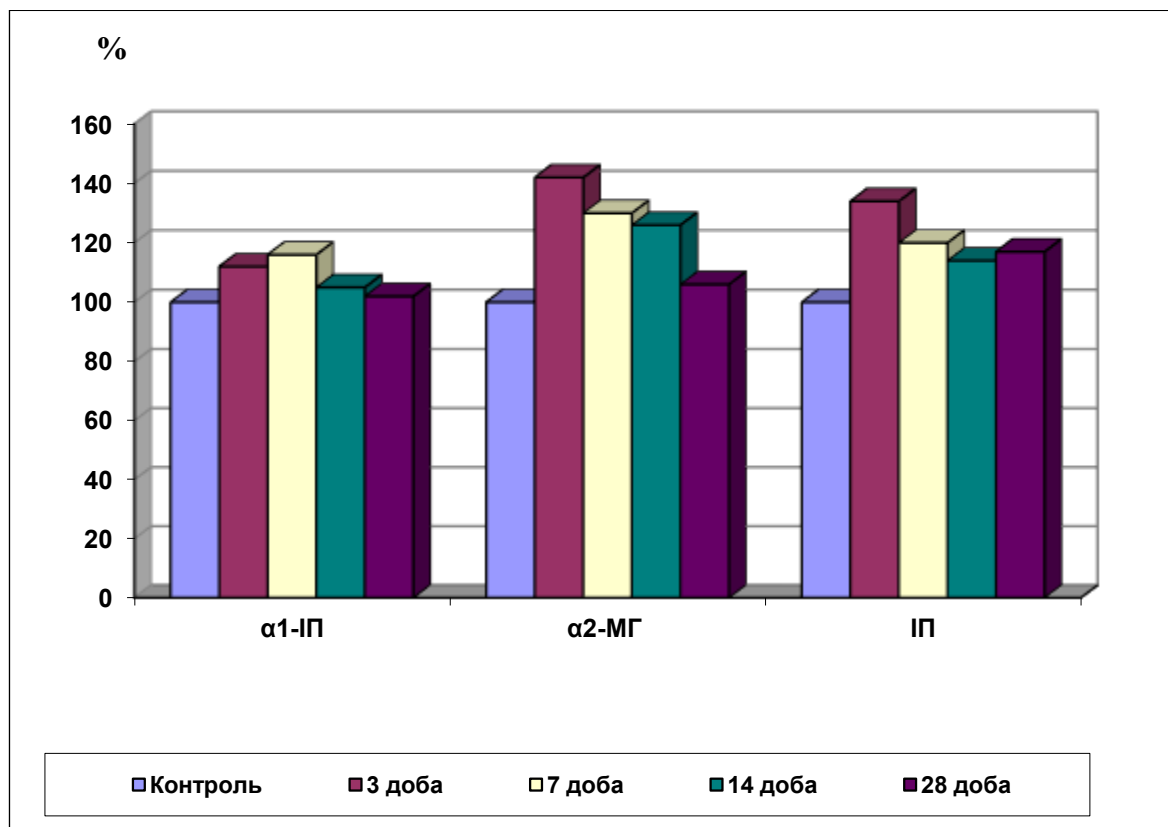


Рисунок 3.51 – Динаміка змін показників антипротеазної системи крові та індекса протеолізу за умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки

За умов хірургічної корекції з використанням еквівалента строми рогівки, отриманої методом децелюляризації антипротеазна активність крові на 3-тю добу від проведення оперативного втручання зростала – показник  $\alpha_1$ -ІП склав 119,9 % а  $\alpha_2$ -МГ – 122,7 % відносно тварин без змодельованої тології, причому у тварин порівнянні з тваринами із травмою рогівки без корекції



рівень  $\alpha_1$ -ІП був вищим на 6,9 %, а  $\alpha_2$ -МГ нижчим на 21,7 %. У подальші терміни спостереження показники антипротеазної активності поступово знижувались і до 28-ої доби перебували на рівні тварин без змодельованої патології (рис. 3.52).

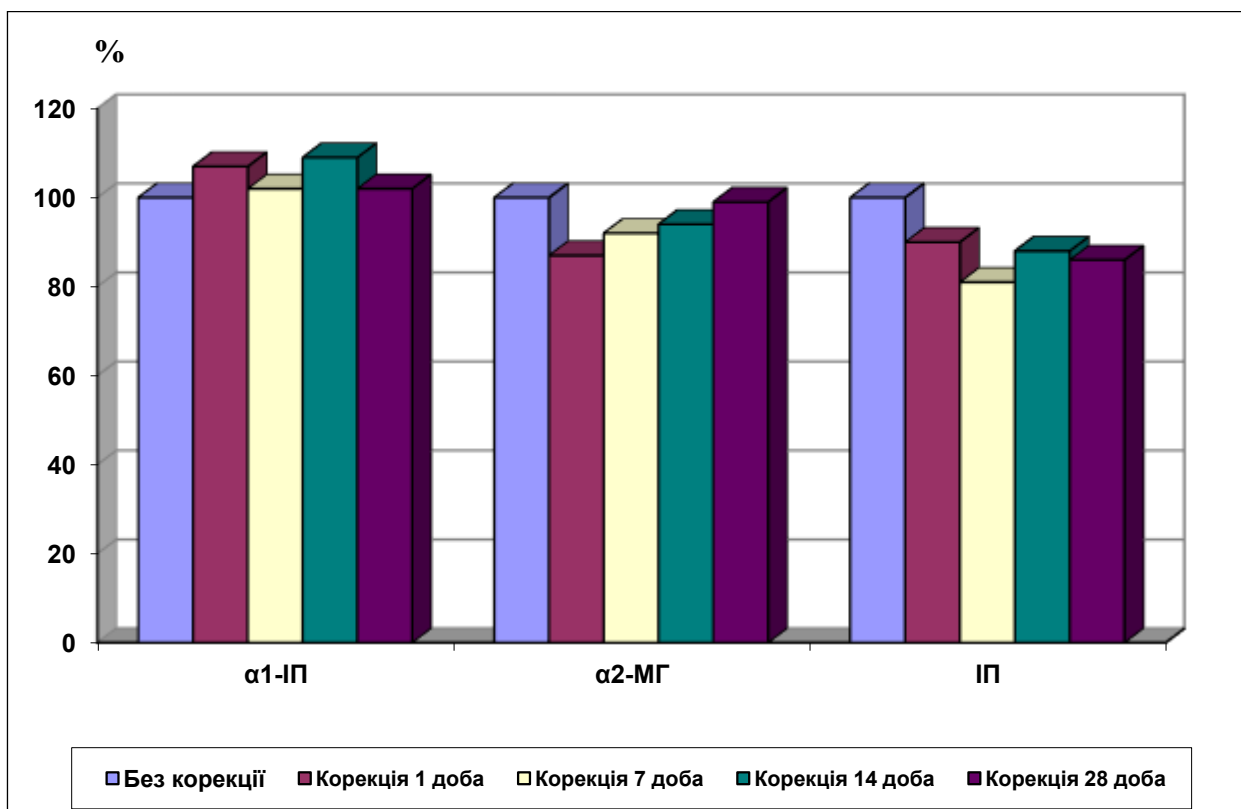


Рисунок 3.52 – Динаміка змін показників антипротеазної системи та індекса протеолізу за умови механічної травми рогівки та корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації

Така динаміка відобразилась і на показнику індекса протеолізу. У тварин з механічною травмою рогівки на 3-тю добу він складав 133,6 % від норми, а у подальшому знижувався і становив на 7-му добу 119,7 %, 14-ту – 113,9 % а на 28-му добу – 116,8 % від аналогічного показника тварин, яким травму не моделювали. У тварин, яким проводили хірургічну корекцію на 3-тю добу експерименту індекс перевищував аналогічний показник тварин без змодельованої патології на 20,4 % і був на 13,2 % нижчим, ніж у тварин з

механічною травмою, яким корекції не проводили. На 7-му добу відбулося суттєве зниження індекса протеолізу порівняно з попереднім терміном спостереження – він склав 108,8 % від норми, що на 10,9 ніж у тварин без корекції. До 14-ої доби показник залишався на тому ж рівні, а до 28-ої доби суттєво не відрізнявся від норми і був на 16,1 % меншим, ніж у тварин з травмою рогівки без корекції.

Отже, моделювання механічної непроникаючої травми рогівки в ранні терміни супроводжується підвищенням протеолітичної активності крові та збільшенням концентрації факторів антипротеазного захисту –  $\alpha_1$ -ІІІ та  $\alpha_2$ -макроглобуліну, що вказує на посилення антипротеолітичного потенціалу для стримування розвитку деструкції. Такі зміни можна розглядати як адаптивну реакцію організму. Хірургічна корекція механічної травми із застосуванням еквівалента строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, супроводжується менш інтенсивним зростанням факторів протеолізу та нормалізацією співвідношення протеази/інгібітори протеаз, на що вказує достовірно менше зростання індекса протеолізу на початкових етапах патологічного процесу і нормалізація його до завершення експерименту.

Наступним етапом нашої роботи було вивчення показників ендогенної інтоксикації за умов механічної травми рогівки і застосуванні еквівалента строми рогівки, отриманої методом децелюляризації (табл. 3.6).

На 3-тю добу експерименту вміст  $\text{MCM}_1$  у сироватці крові збільшився на 66,3 % ( $p < 0,05$ ) відносно тварин без змодельованої патології (рис. 3.53).

На 7-му добу спостереження цей показник достовірно зменшився порівняно з 3-ою добою, а на 14-ту добу зафіксовано подальше зниження вмісту  $\text{MCM}_1$ , однак він був достовірно вищим, ніж у контролі і склав 138,6 % від їх рівня. До 28-ої доби спостереження вміст на 11,5 % перевищував норму.

Як видно з таблиці 3.6, вміст  $\text{MCM}_2$  у сироватці крові кролів у посттравматичному періоді змінювався аналогічно до вмісту  $\text{MCM}_1$ , проте менш виразно.

Таблиця 3.6 – Показники синдрому ендогенної інтоксикації кролів у механічною травмою рогівки та при проведенні хірургічної корекції ( $M \pm m$ )

Група тварин		Показник		
		МСМ <sub>1</sub> , ум. од	МСМ <sub>2</sub> , ум. од.	ЕП, %
Без змодельованої патології, (n=10)		407,34 ± 9,42	271,68 ± 7,56	30,72 ± 1,22
Механічна травма рогівки, (n=10)	3-тя доба	677,65 ± 1,17	424,37 ± 9,73*	48,18 ± 1,65*
	7-ма доба	614,73 ± 10,48	376,47 ± 8,64	43,87 ± 1,61*
	14-та доба	564,79 ± 10,23	315,22 ± 8,35*	39,16 ± 1,28*
	28-ма доба	454,69 ± 9,78	296,54 ± 8,12*	34,52 ± 0,99*
Механічна травма рогівки+ хірургічна корекція, (n=10)	3-тя доба	584,42 ± 9,31	385,23 ± 8,22	41,56 ± 0,98*
	7-ма доба	558,96 ± 9,48	363,75 ± 7,74	38,16 ± 1,00*#
	14-та доба	465,22 ± 8,53	311,44 ± 7,23#	33,06 ± 1,12*#
	28-ма доба	427,36 ± 9,05	283,23 ± 7,67#	29,86 ± 1,05#

На 3-тю добу експерименту вміст МСМ<sub>2</sub> у сироватці крові збільшився на 56,4 % ( $p < 0,05$ ) відносно контрольної групи кролів. З 7-ої доби спостереження цей показник зменшувався і складав 138,4 %, 116,2 % та 109,3 % у відповідні терміни спостереження (рис. 3.53).

Ще одним важливим і достовірним показником синдрому ендогенної інтоксикації є ЕП. На 3-тю добу експерименту ЕП у крові зріс на 56,8 % ( $p < 0,05$ ) відносно контрольної групи кролів (див. табл. 3.6). На 7-му добу спостереження цей показник достовірно зменшився і склав 142,4 % від рівня

тварин без змодельованої патології, на 14-ту – 127,5 % а до 28-ої доби 112,4 % (рис. 3.53)

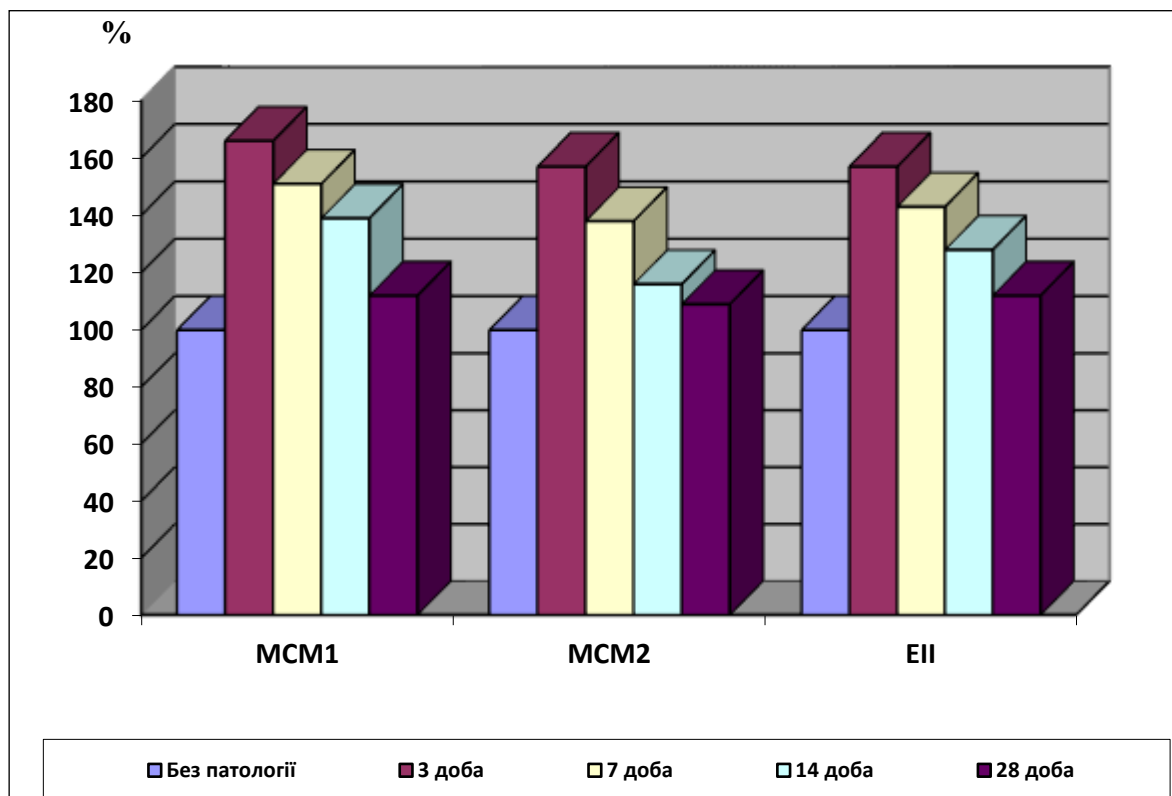


Рисунок 3.53 – Динаміка змін показників ендогенної інтоксикації у крові за умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки

Використання коригуючого чинника позитивно вплинуло на показники ендогенної інтоксикації (рис. 3.54). На 3-тю добу спостереження вміст МСМ<sub>1</sub> у сироватці крові збільшився 43,4 % ( $p < 0,05$ ) відносно контрольної групи кролів (див. табл. 3.6), що на 22,9 % менше, ніж у тварин з механічною травмою рогівки, яким корекцію не проводили. На 7-му добу спостереження показник склав 137,1 % від норми і був на 13,7 % меншим, ніж у тварин без корекції. У більш пізні терміни спостереження зниження було ще більш виразним і на 14-ту добу рівень МСМ<sub>1</sub> становив 114,2 %, а на 28-мму – 104,9 % від показників тварин без змодельованої патології, що відповідно на 24,4 та 6,6 % менше, ніж у тварин з травмою рогівки без корекції.

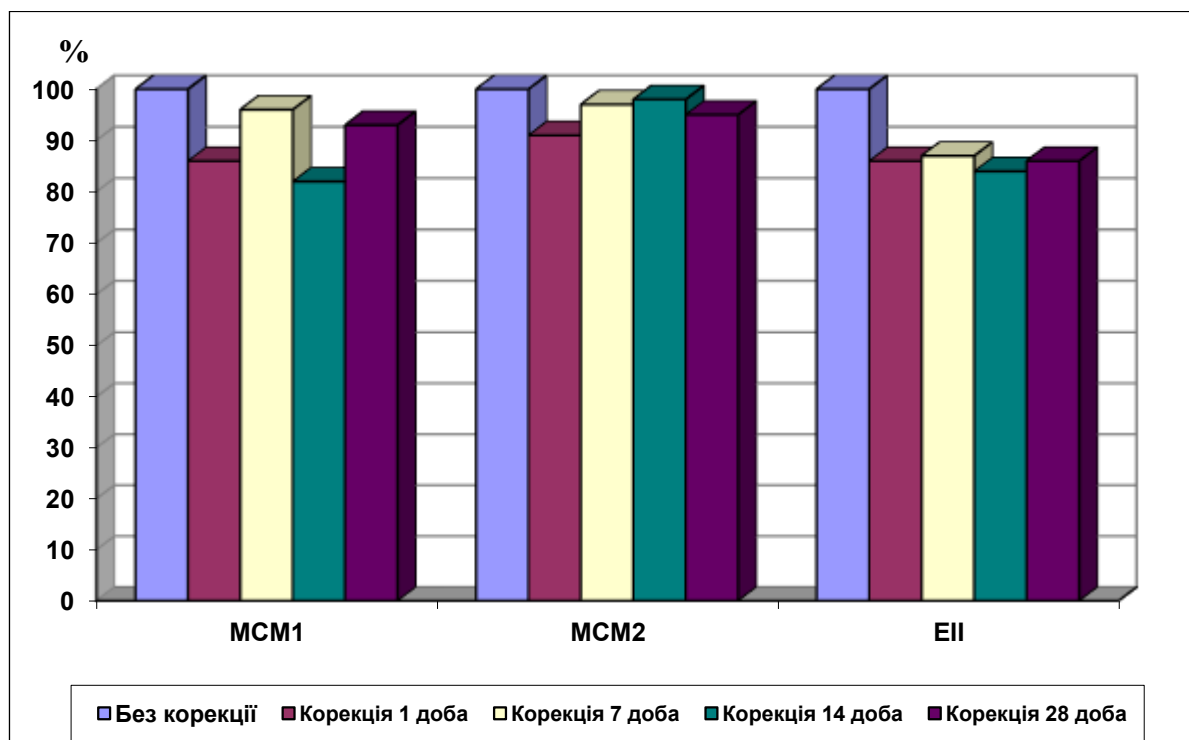


Рисунок 3.54 – Динаміка змін показників ендотоксикозу за умови механічної травми рогівки та корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації

Як видно з таблиці 3.6, на 3-тю добу вміст MCM<sub>2</sub> у сироватці кро кролів у посттравматичному періоді після проведення хірургічної корекції збільшився на 42,1 % ( $p < 0,05$ ) відносно контрольної групи кролів, що на 14,3 % менше, ніж у тварин без корекції. На 7-му добу спостереження показник зменшився порівняно з 3-ою добою і склав 133,9 % (на 4,5 % менше, ніж без корекції). На 14-ту добу зафіксовано більш виразне зменшення показника – він склав 114,8 % від норми, а на 28-му добу – 106,6 % від рівня тварин без патології (див. рис. 3.54).

ЕІІ у тварин, яким проводили хірургічну корекцію також був значно нижчим, ніж у тварин без корекції. Зокрема, на 3-тю добу спостереження був на 21,5 % меншим ніж у групі некорегованих тварин і скла 135,3 % від норми. На 7-му добу перевищення стосовно тварин без патології склало 24,2 %, що на 18,6 % менше, ніж у тварин без корекції, на 14-ту – 107,6 % стосовно норми

(на 19,9 % менше, ніж без проведення корекції), а до 28-мої доби показник був навіть дещо меншим, ніж у тварин без змодельованої патології (див. рис. 3.54).

Отже, моделювання непроникаючої механічної травми рогівки, призводило до статистично вірогідного зростання ендогенної інтоксикації, що проявлялось збільшенням вмісту МСМ в сироватці крові. Накопичення токсичних продуктів призводить до розвитку запальної реакції, яка неодноразово рецидивує, до різкого гальмування регенераторних процесів, утворення грубих рубцевих помутнінь і втрати зору [261, 314, 328, 372, 478]. Проведення хірургічної корекції з використанням строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації, позитивно впливало на рівень ендотоксикозу, достовірно зменшуючи показники стосовно тварин, яким корекції не проводили.

У роботах ряду науковців вказується на важливу роль імунної системи у патогенезі запального процесу травмованого ока. Аналіз динаміки концентрації основних класів імуноглобулінів сироватки крові у посттравматичному періоді після моделювання непроникаючої механічної травми рогівки дозволив установити суттєві зміни у всі терміни спостереження (табл. 3.7).

Уже на 3-тню добу спостереження ми зафіксували статистично значиме підвищення рівнів IgA у 1,6 раза, IgM – у 2,1 раза, IgG – у 1,3 раза стосовно контролю. У подальші терміни спостереження ми зафіксували менш виразну концентрацію імуноглобулінів IgA був вищим у 1,8 раза, IgM та більш інтенсивне зростання концентрації IgG. Зокрема, на 7-му добу після змодельованої травми концентрація IgA перевищувала показник тварин без змодельованої патології у 1,4 раза, IgM – у 1,9 раза. У подальшому ці показники знижувались ще більше і до 28-мої доби достовірно не відрізнялись від аналогічних показників тварин без змодельованої патології. Концентрація IgG на 7-му добу суттєво зростала і склала 186,51 % від норми, а на 14-ту добу – 244,9 від рівня тварин без змодельованої патології (рис. 3.55).

Таблиця 3.7 – Показники гуморальної ланки імунного захисту у сироватці крові кролів з механічною травмою рогівки та корекцією з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації (M ± m)

Група тварин		Показник		
		Ig A, пг/мл	Ig M, пг/мл	Ig G, пг/мл
Без змодельованої Патології, (n=10)		1,12 ± 0,04	2,27 ± 0,06	2,96 ± 0,05
Механічна травма рогівки, (n=10)	3-тя доба, (n=10)	1,84 ± 0,07*	4,62 ± 0,11*	3,85 ± 0,06*
	7-ма доба, (n=10)	1,56 ± 0,08*	4,48 ± 0,09*	5,51 ± 0,07*
	14-та доба, (n=10)	1,35 ± 0,05	3,57 ± 0,08*	7,25 ± 0,11*
	28-ма доба, n=10)	1,23 ± 0,06	2,34 ± 0,09*	5,72 ± 0,09*
Механічна травма рогівки+ хірургічна, (n=10) корекція	3-тя доба, (n=10)	3,22 ± 0,09*#	5,70 ± 0,12*#	8,35 ± 0,11*#
	7-ма доба, (n=10)	2,88 ± 0,07*#	2,98 ± 0,07*#	9,79 ± 0,12*#
	14-та доба, (n=10)	1,53 ± 0,05*#	2,57 ± 0,05*#	7,26 ± 0,10*
	28-ма доба, n=10)	1,12 ± 0,03*	2,26 ± 0,04	4,67 ± 0,09*#

До 28-ої доби показник зменшувався, однак усе ж на 93,1 % перевищував рівень норми. Зростання концентрації основних класів імуноглобулінів свідчить про активізацію гуморального та місцевого імунітету, спричинену змодельованою травмою рогівки. Збільшення кількості впродовж перебігу травматичного періоду Ig G указує на виразну активацію імунних реакцій в організмі в процесі захворювання [11].

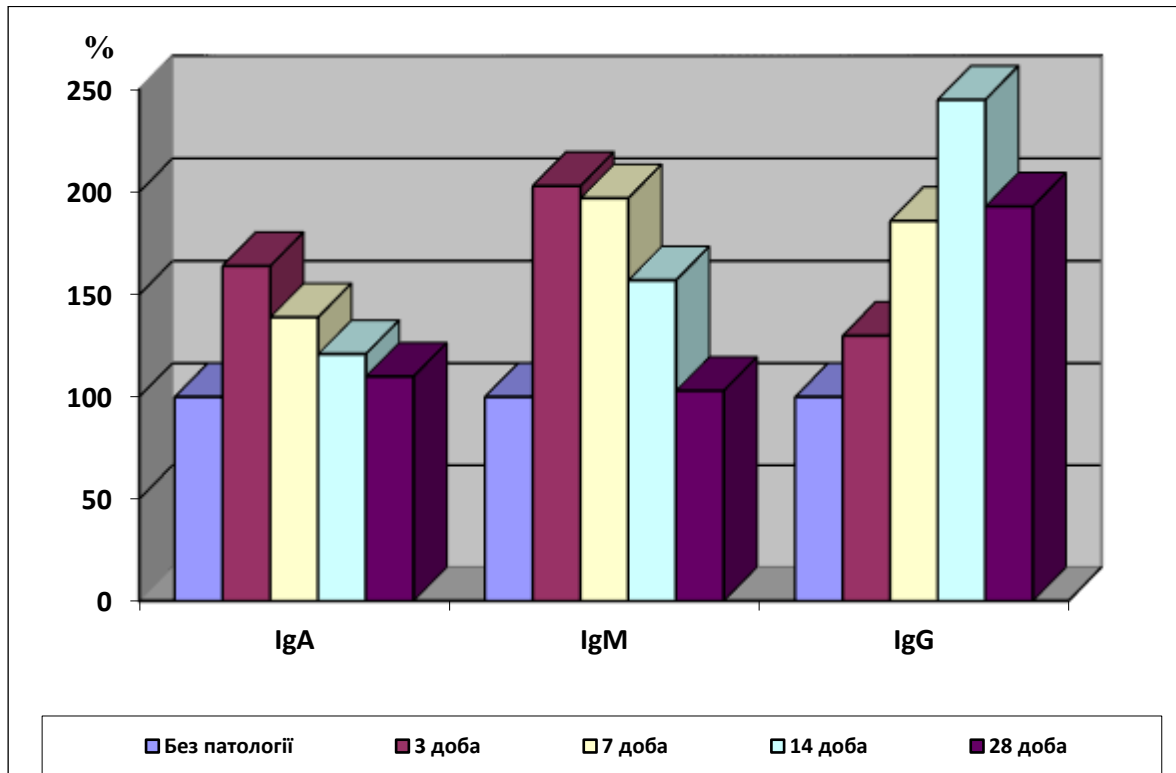


Рисунок 3.55 – Динаміка змін показників гуморального імунітету у крові кролів за умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки

Хірургічна корекція експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки з використанням строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, супроводжувалася дещо іншою динамікою вмісту сироваткових імуноглобулінів. Вона зумовлювала активацію неспецифічної резистентності організму вже через 3 доби, яка проявлялась достовірно вищою концентрацією імуноглобулінів основних класів проти даних 3-ої доби у тварин без корекції. Зокрема, рівень IgA перевищував у 2,9 раза показник тварин без змодельованої патології і був на 75,1 % вищим, від рівня тварин без корекції, IgM перевищував показник норми у 2,5 раза, а IgG – у 2,8 раза, що було також вищим від показників тварин з механічною травмою без корекції відповідно на 12,3 та 116,0 %. У подальші терміни спостереження рівень факторів гуморального імунітету зазнавав неоднотипних змін. Так,



починаючи з 7-ої доби IgA та IgM суттєво знижувалась і до 28-ої доби не перевищувала норми. , Концентрація IgG на 7-му добу й надалі зростала і склала 330,7 % стосовно тварин без патології і була на 77,7 % вищою, ніж у тварин без корекції. У подальшому показник IgG у цій групі також знижувався однак і на 28-му добу на 57,8 % перевищував рівень групи тварин без патології, однак був нижчим на 22,5 % ніж у тварин з травмою рогівки без корекції ( $p < 0,05$ ) (рис. 3.56).

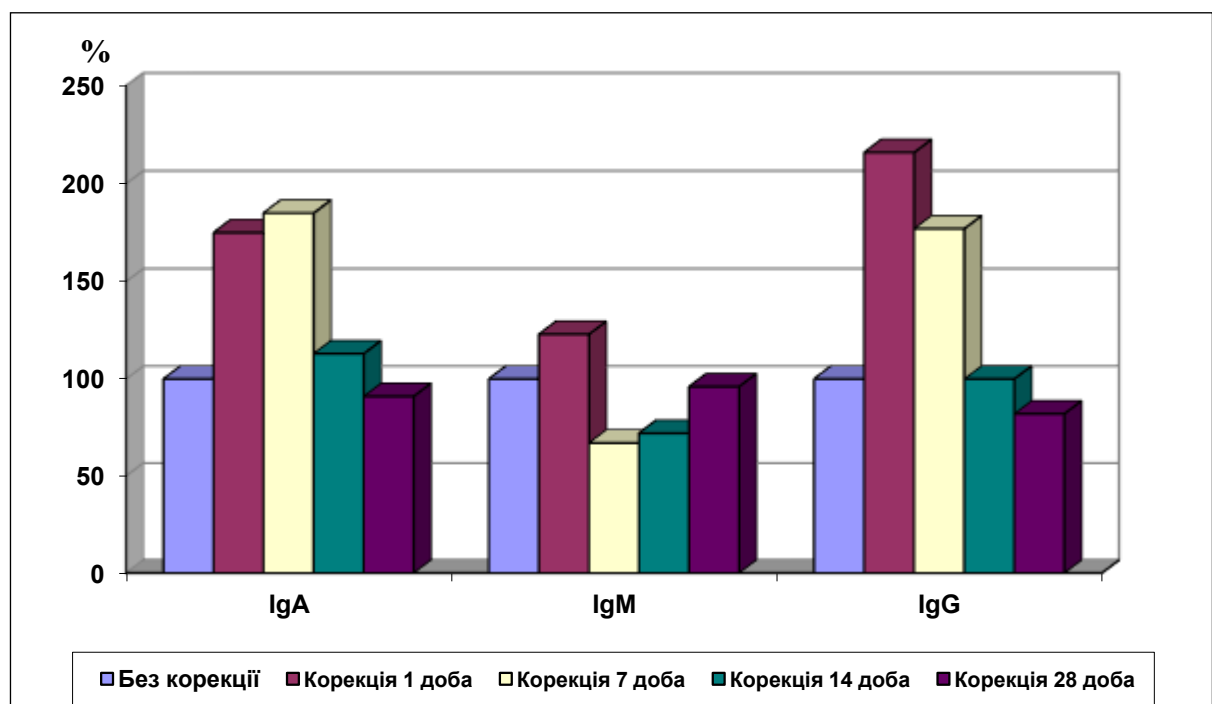


Рисунок 3.56 – Динаміка змін показників гуморального імунітету за умови механічної травми рогівки та корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації

Результати дослідження основних показників клітинного імунітету у крові кроликів за умови механічної непроникаючої травми рогівки представлені у табл. 3.8. Рівень Т-хелперів на 3-тю добу експерименту зріс на 46,4 % що достовірно вище, ніж у тварин без патології. На 7-му добу спостереження цей показник залишався майже на тому ж рівні – (зростання на 41,1 % ( $p < 0,05$ )). З 14-ої доби рівень Т-хелперів почав знижуватись, однак

залишаючись на 29,8 % вищим за показник тварин без патології ( $p < 0,05$ ). На 28-му добу спостереження досліджуваний показник залишався достовірно вищим рівня від норми на 21,5 % (рис. 3.57).

Таблиця 3.8 – Динаміка показників клітинної ланки імунного захисту у сироватці крові кролів за умови механічної непроникаючої травми рогівки ( $M \pm m$ )

Група тварин		Показник		
		CD4+, %	CD8+, %	CD4+/CD8+
Без змодельованої патології (n=10)		22,16 ± 0,46	12,57 ± 0,19	1,62 ± 0,08
Механічна травма рогівки, n=10	3-тя доба	32,44 ± 0,63*	16,55 ± 0,26*	1,96 ± 0,08*
	7-ма доба	31,25 ± 0,48*	17,07 ± 0,21*	1,83 ± 0,08*
	14-та доба	28,77 ± 0,44*	16,53 ± 0,25*	1,74 ± 0,06*
	28-ма доба	26,93 ± 0,46*	16,02 ± 0,22*	1,68 ± 0,07
Механічна травма рогівки+ хірургічна, n=10) корекція	3-тя доба	39,82 ± 0,76*#	15,06 ± 0,34*	2,64 ± 0,09*#
	7-ма доба	38,33 ± 0,58*#	15,17 ± 0,41*	2,53 ± 0,07*#
	14-та доба	30,47 ± 0,52*#	16,74 ± 0,25*	1,82 ± 0,06*#
	28-ма доба	24,93 ± 0,42	15,11 ± 0,26*	1,65 ± 0,05

Динаміка змін Т-супресорів – клітин, що пригнічують активацію клітинного і гуморального імунітету, впливаючи на механізми міжклітинної взаємодії, а також регулюють якісний склад популяцій лімфоцитів [11] була аналогічною за спрямованістю, проте менш виразною. Так, досліджуваний показник на 3-тю добу спостереження достовірно зріс на 31,7 %, на 7-му добу – на 35,8 %, 14-ту – 35,1 % відносно тварин без змодельованої патології ( $p < 0,05$ ). На 28-му добу спостереження рівень Т-супресорів, знижувався ще більше і склав 127,5 % від норми ( $p < 0,05$ ) (рис. 3.57).

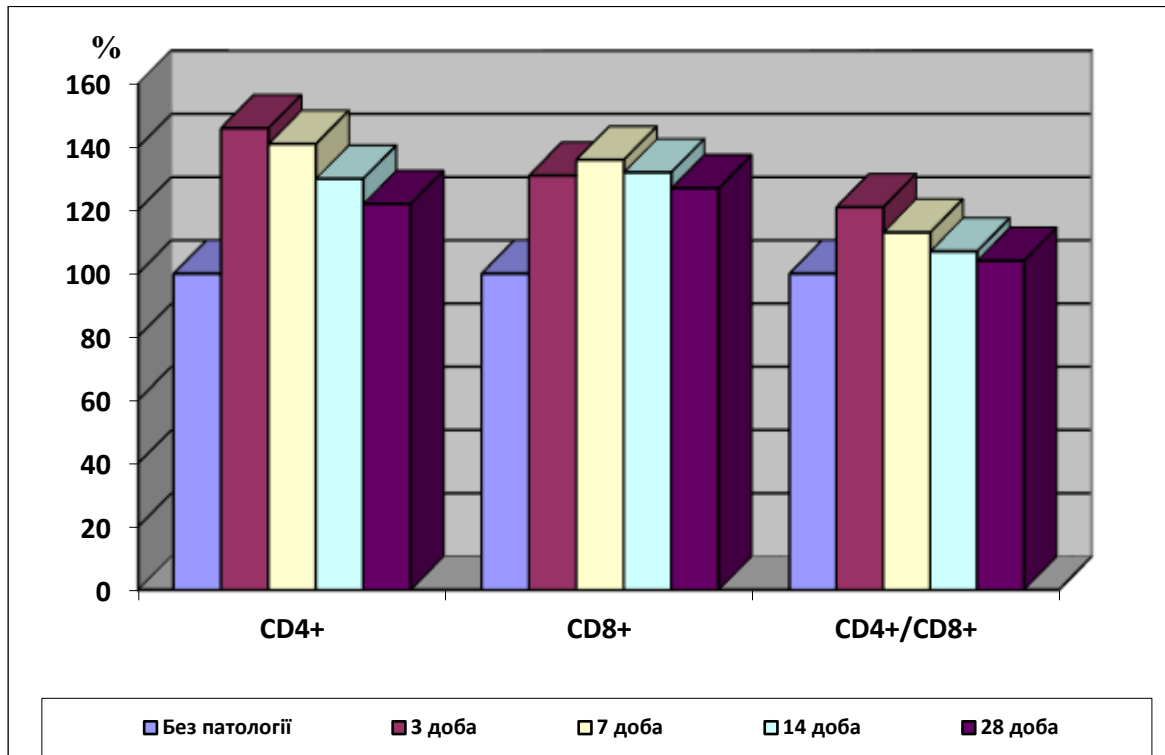


Рисунок 3.57 – Динаміка змін показників клітинного імунітету у крові кролів за умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки

Імунорегуляторний індекс на 3-тю добу експерименту достовірно зріс на 21,0 %. У подальші терміни спостереження показник знижувався, порівняно з 3-ою добою і до завершення терміну експерименту достовірно не відрізнявся від норми.

Проведення хірургічної корекції супроводжувалось більш виразними змінами досліджуваних показників на початкових етапах експерименту. Зокрема, на 3-тю добу від моменту проведення хірургічної корекції рівень Т-хелперів зріс на 79,9 % стосовно тварин без змодельованої патології, що також склало 122,7 % відносно тварин без проведеної корекції. На 7-му добу показник суттєво не змінився, а з 14-ої доби почалось його зниження: на 14-ту добу він на 37,5 % перевищував показник норми, а на 28-му – на 12,5 % що було навіть на 8,1 % менше, ніж у тварин без корекції. Стосовно Т-супресорів ми зафіксували значно менш виразні зміни, ніж у випадку з Т-хелперами. На 3-тю добу

зафіксовано зростання на рівня Т-супресорів на 19,8 % стосовно тварин без патології, що було менше на 9,1 %, ніж у тварин без корекції. До 7-мої доби суттєвих змін не відбулося, а на 14-ту добу рівень Т-супресорів зріс більш суттєво – на 33,2 %. До 28-мої доби показник знизився і склав 120,2 % від норми і суттєво не відрізнявся від аналогічного показника тварин без корекції (рис. 3.58).

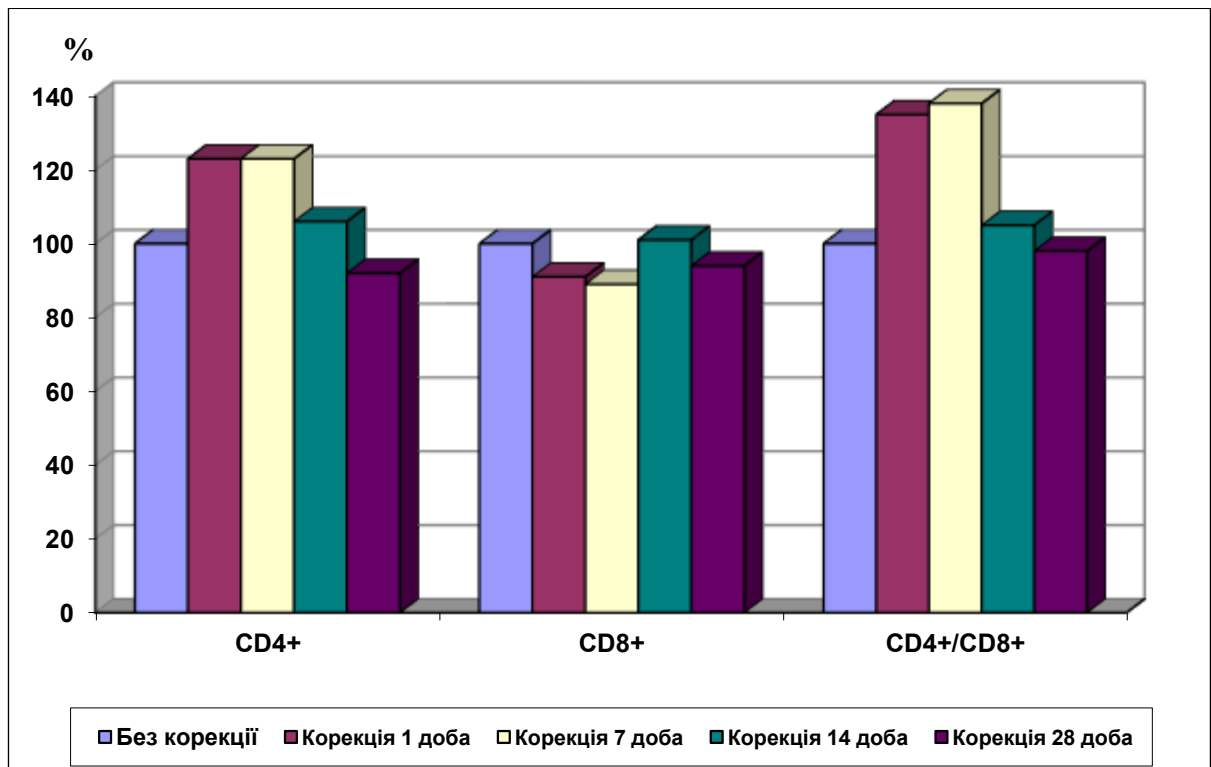


Рисунок 3.58 – Динаміка змін показників клітинного імунітету за умови механічної травми рогівки та корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації

Більш значні зміни ми отримали при розрахунку імунорегуляторного індекса. На 3-тю добу він зріс на 62,9 % від рівня тварин без патології, що на 34,7 % більше, ніж у тварин без корекції. На 7-му добу відбулось незначне зниження ІРІ порівняно з попереднім терміном спостереження, однак він на 38,2 % перевищував показник тварин без корекції. Більш суттєве зниження ІРІ відбулось на 14-ту добу коли він склав 112,3 % від норми, а до 28-ої доби

показник досяг рівня тварин без змодельованої патології (див. рис. 3.58). У ці терміни достовірної різниці з показниками тварин без корекції не було.

Отже, моделювання механічної травми рогівки призводить до активування факторів гуморального імунітету у ранній посттравматичний період у крові кролів з подальшою нормалізацією до 28-ої доби та виразне порушення клітинного імунітету у вигляді дисбалансу субпопуляційного складу Т-лімфоцитів з переважним зростанням Т-хелперів і прогресивним збільшенням імунорегуляторного індексу.

Проведення хірургічної корекції травми рогівки з використанням строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації зумовлює активацію неспецифічної резистентності організму у перші 7 днів експерименту, яка проявляється достовірно вищою концентрацією IgA, IgM, IgG та факторів клітинного імунітету з подальшою їх нормалізацією до 28-ої доби.

Наступним етапом нашої роботи було вивчення цитокінового профілю досліджуваних тварин. Результати проведеного дослідження вказують на відмінності динаміки рівня цитокінів у кролів, яким моделювали механічну непроникну травму рогівки, і тих тварин, яким проводили хірургічну корекцію з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. Зокрема, через 3 доби після моделювання патологічного процесу вміст TNF- $\alpha$  у сироватці крові кролів, яким не виконували хірургічної корекції, перевищував аналогічний показник тварин без змодельованої патології в 1,6 рази ( $p < 0,05$ ). У подальші терміни спостереження рівень зростання концентрації досліджуваного цитокіна був дещо меншим, однак на 28-му добу перевищував показник тварин без патології в 1,3 рази. У кролів, яким проводили хірургічну корекцію, збільшення концентрації TNF- $\alpha$  було менш вираженим, ніж у тварин, яким її не виконували. Зокрема, на 3-тю добу рівень становив 141 % порівняно з кролями без патології і був на 16,2 % нижчим порівняно з тваринами, яким хірургічної корекції не проводили. Ще більше

зниження відносно показника кролів без корекції ми зафіксували на 7-му добу – 37,6 %. У подальші терміни спостереження концентрація TNF- $\alpha$  у кролів, яким виконували хірургічну корекцію, достовірно не відрізнялась від показника тварин, яким травми не моделювали, водночас була достовірно меншою, ніж у кролів із травмою рогівки без проведення корекції (табл. 3.9; рис. 3.59).

Таблиця 3.9 – Концентрація цитокінів у сироватці крові кролів з механічною травмою рогівки та при проведенні хірургічної корекції ( $M \pm m$ )

Група тварин		Показник				
		TNF- $\alpha$ пг/мл	IL-1 $\beta$ , пг/мл	IL-4, пг/мл	IL-6, пг/мл	ІЗА
Без змодельованої патології, (n=10)		11,49 $\pm$ 0,43	1,70 $\pm$ 0,09	26,69 $\pm$ 1,34	1,64 $\pm$ 0,08	0,56 $\pm$ 0,03
Механічна травма рогівки, n=10)	3-тя доба	18,66 $\pm$ 0,20*	2,33 $\pm$ 0,08*	30,26 $\pm$ 0,93*	2,33 $\pm$ 0,10	0,77 $\pm$ 0,05*
	7-ма доба	17,69 $\pm$ 0,51*	2,05 $\pm$ 0,07	23,87 $\pm$ 0,68*	2,07 $\pm$ 0,08	0,72 $\pm$ 0,05*
	14-та доба	13,18 $\pm$ 0,28*	1,94 $\pm$ 0,06*	19,15 $\pm$ 0,58*	1,86 $\pm$ 0,06*	0,65 $\pm$ 0,04*
	28-ма доба	14,63 $\pm$ 0,54*	1,85 $\pm$ 0,09*	20,52 $\pm$ 0,99*	1,94 $\pm$ 0,07*	0,68 $\pm$ 0,05*
Механічна травма рогівки+ хірургічна корекція, n=10)	3-тя доба	16,05 $\pm$ 0,60*#	2,18 $\pm$ 0,13	30,56 $\pm$ 0,98*	1,97 $\pm$ 0,08	0,66 $\pm$ 0,04*#
	7-ма доба	12,86 $\pm$ 0,66*#	1,90 $\pm$ 0,06	30,16 $\pm$ 1,00*#	1,80 $\pm$ 0,09	0,55 $\pm$ 0,03#
	14-та доба	11,76 $\pm$ 0,60#	1,84 $\pm$ 0,07#	26,06 $\pm$ 1,35*#	1,71 $\pm$ 0,09*	0,59 $\pm$ 0,04#
	28-ма доба	11,55 $\pm$ 0,74#	1,78 $\pm$ 0,13#	26,86 $\pm$ 1,35#	1,67 $\pm$ 0,10*	0,56 $\pm$ 0,03#

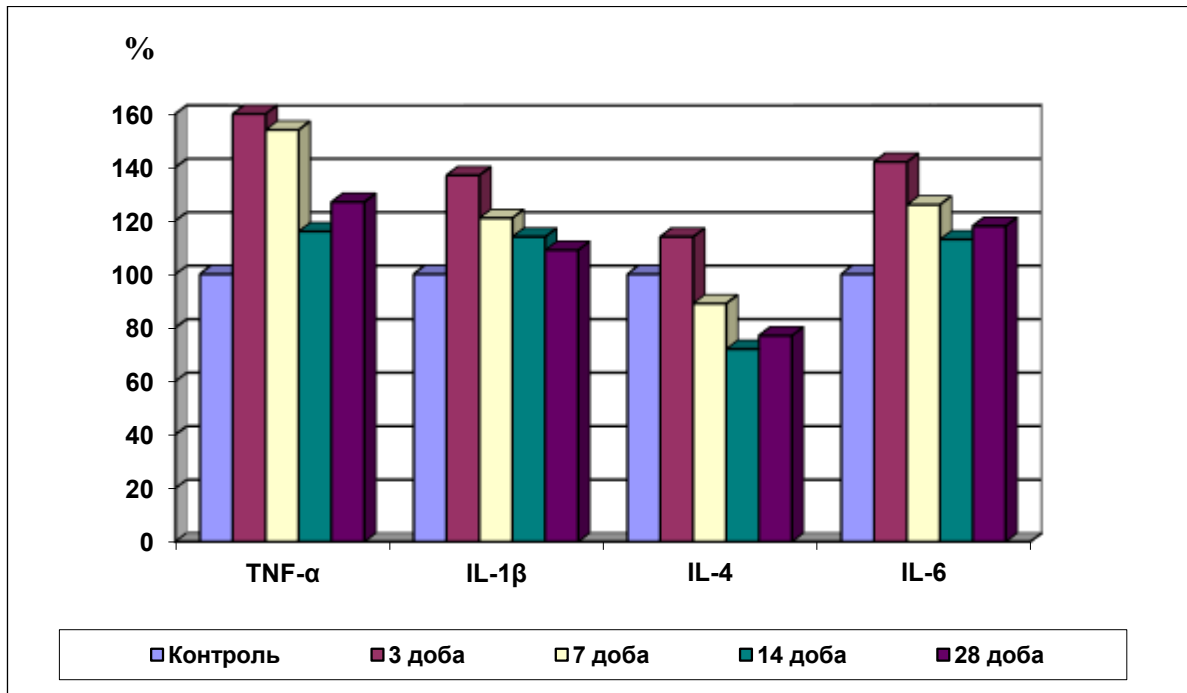


Рисунок 3.59 – Динаміка змін показників цитокінів у крові кролів за умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки

Аналізуючи динаміку концентрації IL-1 $\beta$  у сироватці крові, встановили, що у кролів, яким не проводили хірургічної корекції, показник був достовірно вищим порівняно з інтактними тваринами. На 3-тю добу спостереження вона зросла на 37,1 % стосовно кролів без змодельованої патології. У подальші терміни посттравматичного періоду рівень цього цитокіна зменшувався і до 28-ї доби перевищував показник норми на 8,6 %. Хірургічна корекція з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації, супроводжувалась менш інтенсивним збільшенням вмісту IL-1 $\beta$ , ніж у тварин, яким корекції не проводили. Зокрема, на 3-тю добу спостереження рівень IL-1 $\beta$  перевищував аналогічний показник тварин без змодельованої патології на 21,1 % і був на 10,4 % нижчим, ніж у кролів із травмою рогівки, яким хірургічної корекції не виконували. На 7-му добу він зменшувався порівняно з попереднім терміном спостереження, однак на 11,8 % перевищував рівень норми та був на 7,9 % нижчим, ніж у групі тварин без хірургічної корекції. На 14-ту і 28-му доби концентрація IL-1 $\beta$  у цій групі достовірно не перевищувала

показника кролів без патології і була меншою, ніж у тварин 2-ї групи (див. табл.3.9, рис. 3.59).

Аналогічними за динамікою були зміни ще одного прозапального цитокіна – ІЛ-6. Його концентрація також максимально зростала на 3-тю добу від моменту моделювання травми рогівки і становила 141,8 % від його рівня. Подальше зниження в наступні терміни спостереження було менш вираженим, ніж це відзначено стосовно ІЛ-1 $\beta$ , і навіть на 28-му добу показник становив 118,3 % відносно норми. Хірургічна корекція також сприяла менш інтенсивному його зростанню, ніж це мало місце у групі тварин без корекції, до 28-ї доби достовірних змін зафіксовано не було (див. рис. 3.59).

Узагальнюючи отримані результати дослідження рівня прозапальних цитокінів, можна стверджувати, що хірургічна корекція із застосуванням ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, зменшує системну запальну реакцію організму порівняно з групою тварин, яким моделювали травму рогівки і корекції не проводили (див. табл. 3.9).

Поряд із пригніченням зростання активності прозапальних цитокінів нанесення механічної травми рогівки спричинило підвищення на 13,4 % концентрації протизапального цитокіна – ІЛ-4 на 3-тю добу спостереження з подальшим зниженням цього показника до 28-ї доби, коли він склав 76,9 % від рівня тварин без змодельованої патології. Застосування строми ксенорогівки мало нормалізуючий вплив на вміст цього цитокіна. Зокрема, на 3-тю добу показник також зростав аналогічно до показника тварин, яким корекції не проводили. Однак із 7-ї доби спостереження відзначили суттєву різницю: якщо у кролів без хірургічної корекції концентрація ІЛ-4 знижувалась, то при її виконанні цього не відбувалось. Відповідно, на 7-му добу показник був на 13,1 % вищим, ніж у тварин без корекції, на 14-ту – на 13,6 %, на 28-му – на 10,9 %, перебуваючи фактично на рівні кролів без змодельованої патології (рис. 3.60). Таке зростання рівня протизапального ІЛ-4 свідчить, на нашу думку, про активацію гуморального імунітету.



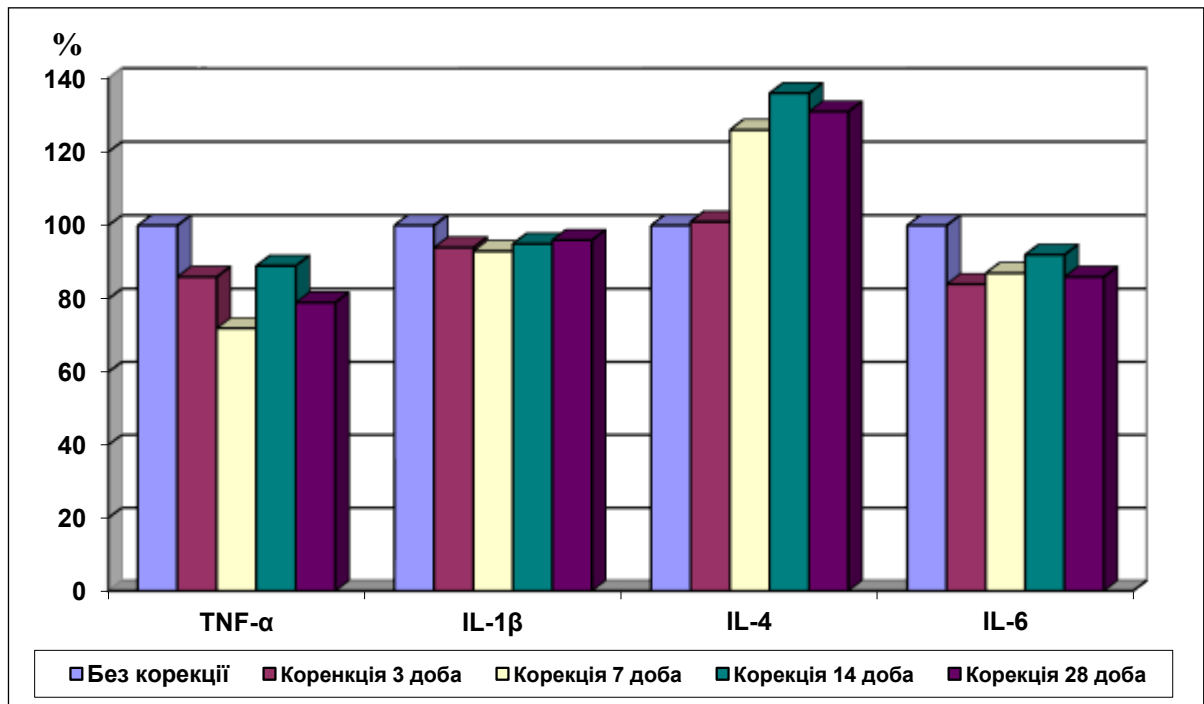


Рисунок 3.60 – Динаміка змін показників цитокінів у крові за умови хірургічної корекції експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки

Аналіз ІЗА показав гіперреактивний тип імунної реакції протягом усього експерименту в кролів, яким хірургічної корекції не проводили, з дисбалансом цитокінової продукції в бік переважання рівня прозапальних інтерлейкінів. При цьому максимальні зміни зафіксовано на 3-тю і 7-му доби – зростання, відповідно, в 1,4 та 1,3 раза порівняно з тваринами, яким хірургічної корекції не виконували. Хірургічна корекція супроводжувалась активацією компенсаторних механізмів, про що свідчила позитивна динаміка ІЗА. Так, уже із 7-ї доби він достовірно не відрізнявся від показника тварин без змодельованої патології, досягаючи максимально наближених до норми значень через 28 діб спостереження. Отримані результати вказують на відмінність типу імунної відповіді після нанесення механічної травми рогівки: у тварин, яким моделювали механічну травму рогівки і хірургічної корекції не проводили, він був гіперреактивним, а за умов хірургічної корекції з

використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації, – компенсаторним (див. табл. 3.9).

Отже, за умови експериментальної непроникної механічної травми рогівки зростає концентрація прозапальних цитокінів з максимумом на 3-тю добу після нанесення травми. Поряд із цим спостерігають фазові зміни вмісту протизапального цитокіна – інтерлейкіну-4: збільшення на 3-тю добу та зменшення в інші терміни спостереження. У тварин, яким моделювали механічну травму рогівки і корекції не проводили, має місце гіперреактивний тип імунної відповіді, а за умов хірургічної корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації, – компенсаторний.

Результати розділу відображено у статтях [49–53] і тезах [6–9 Додатку А] автора.

## РОЗДІЛ 4

### АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

На сьогодні, за даними ряду долідників, понад 10 мільйонів людей у всьому світі страждають від сліпоти, викликаної патологією рогівки. Як свідчать результати проведеного нами аналізу закономірності поширеності патології органа зору, частка хворих із травмами рогівки буде прогресивно зростати, тому необхідно вирішувати питання оптимізації надання медичної допомоги, у тому числі і спеціалізованої, цій категорії пацієнтів [22, 23, 195].

Як показує досвід практикуючих офтальмологів, загальноприйняте консервативне лікування у цих випадках часто не ефективне. Безуспішність консервативних методів лікування часто запізніле хірургічне втручання часто призводить до того, що репаративно-регенеративні процеси в ураженому оці не достатні для відновлення ушкодженої рогівки, а це може спричинитися до порушення зору, а іноді й до втрати ока [24, 87, 98, 175]. Беручи до уваги те, що рогівка має високий регенеративний потенціал, було запропоновано хірургічні втручання з виконанням операцій з накладання на рогівку біологічного покриття [13, 20, 22, 23, 62, 67, 86, 95, 107, 106, 124, 159, 179]. Для цього було запропоновано використовувати різноманітні донорські матеріали, зокрема ало- чи ксенорогівку, амніотичну оболонку, фасції тощо [20, 22, 23, 62, 67, 86, 95, 107, 179]. Ряд дослідників повідомляли про успішні оперативні втручання, однак вказували і на проблеми, наявність якісного донорського матеріалу, недосконалість деяких технічних аспектів пересадки тощо. Однією з найбільших проблем виявилась так звана «хвороба трансплантата», суть якої полягає у несумісності біологічного матеріалу донора з реципієнтом [74, 84, 90, 160, 164]. Окрім цього, отримання донорського матеріалу у багатьох країнах є досить складною проблемою, позаяк законодавство цих країн не дозволяє проводити такі процедури. Донедавна такі законодавчі обмеження були і в Україні. І хоча зараз

трансплантологія розвивається досить активно, деякі питання залишаються остаточно не вирішеними [59, 122, 152-155, 162, 164, 166, 212].

Поглиблене вивчення біологічних властивостей рогівки, а також вражаючий прогрес мікрохірургічної техніки, у поєднанні з використанням сучасних протизапальних препаратів, безсумнівно покращили наслідки кератопластики. Тому, на сьогодні кератопластика є найкращим способом попередження сліпоти, викликаного травмами та іншою патологією рогівки [63, 139, 183, 189, 190, 195, 202, 208, 209, 223].

Таким чином, аналіз літератури свідчить про те, що травма та захворювання рогівки можуть спричинити незворотні порушення нормальної структури та фізіології рогівки, що часто призводить до необхідності трансплантації рогівки. Однак у цьому питанні є й ряд невирішених вагомих правових, організаційних, методичних і медичних проблем. Труднощі з отриманням алогенного трансплантаційного матеріалу, за умови постійного зростання попиту, вимагають пошуку нових підходів, серед яких одним з найбільш перспективних є перехід на альтернативний забір від інших біологічних видів, власне, ксеногенний матеріал [152-155, 164]. Дослідники, що працюють у галузі експериментальної та клінічної офтальмології вказують на ефективність методики ксенотрансплантації з використанням рогівки свині, зважаючи на генетичну спорідненість, а також так звану «імунову привілейованість ока», що зменшує ймовірність відторгнення. Однак пересадка цілісної рогівки має ризик відторгнення, враховуючи, що як  $\alpha$ Gal, так і не- $\alpha$ Gal (наприклад, N-гліколілнейрамінова кислота) експресуються в клітинах рогівки свиней [6]. Оскільки клітинні компоненти рогівки свиней є основним джерелом ксеноантигенів [113], децелюляризована рогівка має перевагу у зниженні імунної відповіді після трансплантації [5, 61, 113, 125, 126, 134, 136, 139, 228].

Ряд дослідників в останні роки покращили можливість синтезу еквівалентів строми рогівки шляхом утворення хімічних зв'язків між

молекулами колагену I або III типів [146, 167, 176, 207, 229]. Експериментальними дослідженнями показано, що такий колагеновий матрикс був добрим субстратом для проліферації *in vivo* та *in vitro* рогівкового епітелію і нервів [139]. Крім того, аналог рогівкової строми, синтезований з колагену свиней, не викликав реакції відторгнення при його трансплантації у рогівку кроликів [136].

З огляду на вище наведене, виконане дослідження покликане обґрунтувати доцільність застосування строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації, для корекції механічної непроникаючої травми рогівки.

Гістологічні дослідження рогівки свині після проведення децелюляризації показали відсутність у ній як переднього, так і заднього епітеліїв. Виявлялися залишки Боуменової мембрани, а власна речовина рогівки була деструктуризованою. Сполучнотканинні пластинки у складі строми розшаровані. За великого збільшення мікроскопа спостерігали сітку колагенових фібрил, що утворилася внаслідок розволокнення колагенових волокон. На світлооптичному рівні у власній речовині рогівки свині не виявлено кератоцитів чи інших клітин фібробластичного диферону, що свідчить про ефективність проведеної децелюляризації.

Проведення патоморфологічних досліджень показало, що за умов моделювання механічної непроникаючої травми до 14-ої доби досліду у рогівці кролів мікроскопічно встановлено активацію проліферації клітин у збережених ділянках епітелію, що наближені до лімба та, як наслідок, формування епітеліального регенерату; набряк сполучної тканини, розвиток запальної реакції у ній з подальшим формуванням грануляцій. Гістологічно у епітеліальному пласті не прослідковувалась виражена клітинна диференціація, мембрана Боумена неструктурована, а контакт зі сполучною тканиною був слабким, що зумовлювало значні відшарування. Морфометрично досліджено динамічне наростання товщини переднього

епітелію у маргінальних зонах на 14-ту добу досліду, що більше у 1,44 раза ( $p < 0,001$ ) у порівнянні з показником норми, а товщини рогівки, з максимальним значенням у цей же термін, перевищувало інтактний показник у 2,39 раза ( $p < 0,001$ ).

На 28-му добу експерименту за умов моделювання механічної травми на мікроскопічному рівні виявлено закриття дефекту епітелієм з нерівним рельєфом базальної поверхні та ділянками відшарування від власної речовини рогівки. У верхніх шарах строми мікроскопічно виявлені ознаки дозрівання молоді сполучної тканини з наявністю клітин фібробластичного та лейкоцитарного ряду, капілярів та невпорядкованою орієнтацією колагенових волокон. Морфометрично на 28-му добу товщина власної речовини рогівки тварин з механічною травмою була достовірно ( $p < 0,001$ ) більшою від показника норми, проте в 1,56 раза менша у порівнянні з 14-ою добою експерименту.

Мікроскопічно та морфометрично встановлено, що застосування децелюляризованої рогівки свині для корекції механічної травми рогівки покращує динаміку регенерації, пришвидшує дозрівання грануляційної тканини, загоєння дефекту, сприяє структурованості та відновленню морфології рогівки з максимальною наближеністю до норми. На 3-тю та 7-му доби після корекції у стромі рогівки наявна виражена реакція запалення, на що вказує масивна лейкоцитарна інфільтрація, як у центральних, так і периферійних ділянках рогівки, що зумовлено хірургічним втручанням. Для цих же термінів характерно наростання товщини епітелію маргінальних ділянок та товщини власної речовини рогівки з піковим значенням на 7-му. На 14-ту добу після хірургічної корекції виявлялась гіперплазія епітелію крайових ділянок, результатом чого було закриття дефекту добре структурованим епітеліальним регенератом без ділянок відшарувань. Ці морфометричні параметри достовірно ( $p < 0,001$ ) перевищували аналогічні у рогівці групи тварин без корекції. У цей же термін зафіксовано зменшення

товщини власної речовини рогівки у 1,19 раза у порівнянні з 7-ою добою експерименту, домінування у грануляційній тканині клітин фібробластичного ряду та відсутність морфологічних проявів запалення.

Через 28 діб після корекції спостерігається відновлення типової структури рогівки з наближенням морфометричних показників до групи інтактних тварин. На відміну від групи кролів, яким корекція не проводилася, оновлений передній епітелій центральної зони рогівки тварин третьої групи мав чітку диференціацію на шари, рівний рельєф базальної поверхні та контуровану мембрану Боумена, а його товщина суттєво не відрізнялась від показника норми. У цей термін досліду при застосуванні корекції у стромі гістологічно виявлено зрілу сполучну тканину та поодинокі капіляри в стані редукції, тоді як у рогівці тварин без корекції ще часто прослідковувались явища дозрівання сполучнотканинних компонентів. Мікроскопічно, у власній речовині пучки колагенових фібрил були орієнтовані паралельно, що є одним з факторів, які забезпечують прозорість рогівки.

Електронномікроскопічні дослідження рогівки, показали, що за умов змодельованої механічної непроникаючої травми спостерігаються зміни у складових частинах рогівки, які проявляються порушенням електронної щільності у епітеліоцитах, пошкодженням і подальшим руйнуванням міжклітинних контактів, прогресуванням некротичних змін. Відбуваються значні дегенеративні зміни у власній речовині рогівки, що проявляються деструкцією колагенових волокон у складі сполучнотканинних пластинок, значних дистрофічних змін зазнають фіброласти, кератиноцити.

Встановлено, що проведення хірургічної корекції механічної травми рогівки сприяє активації та покращенню регенераторних процесів у всіх структурних компонентах рогівки. У багат шаровому епітелії відзначається впорядковане розташування епітеліоцитів із збереженням їх ультраструктури, що проявляється відновленням цілісності органел, збільшенням кількості тонофіламентів, міжклітинних контактів, появою ядерців і переважанням

еухроматину у каріоплазмі ядер. У власній речовині виявлено посилення функціональної та синтетичної активності клітин фібробластичного диферону і відповідно структурованістю міжклітинної речовини із чітким розташуванням сполучнотканинних пластинок.

З метою вивчення ефективності корекції непроникаючої механічної травми роівки з використанням еквівалента строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації, було досліджено також ряд біохімічних та імунологічних показників. Зокрема, досліджувалась роль процесів ліпідної пероксидації у патогенезі механічної травми рогівки та вплив на ці процеси проведеної нами хірургічної корекції.

Одним із провідних механізмів розвитку патологічного процесу за умов нанесення механічної травми рогівки активізація оксидативного стресу внаслідок порушення у в системі прооксиданти-антиоксиданти. Ми встановили, що за умов моделювання експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки відбувається інтенсифікація процесів ліпопереокищення з підвищенням концентрації ГПЛ, рівнів ТБК-реактивів і основ Шиффа у крові експериментальних тварин ( $p < 0,05$ ). Як вказують ряд дослідників, оксидативний стрес є однією з патогенетичних ланок розвитку та прогресування таких захворювань очей як катаракта, глаукома, діабетична ретинопатія тощо [19, 193]. Наші дослідження показали, що за умови модельованої травми також відбувається інтенсивна активація оксидативних процесів, що призводить до зростання початкових (ГПЛ), проміжних (ТБП) і кінцевих (ШО) продуктів пероксидного окиснення ліпідів на початкових етапах розвитку патологічного процесу, що є інтегральними його маркерами, які залежать від важкості перебігу травми ока і системної відповіді організму на цю травму.

Проведення тваринам, яким моделювали механічну травму рогівки хірургічної корекції із використанням строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації позитивно впливало на показники ліпопероксидації.



Так, концентрація ГПЛ на 3-тю добу спостереження у тварин цієї групи зростала, однак менш виразно, ніж у тварин без корекції – на 28 %. На 7-му добу зростання також було меншим, ніж у тварин без корекції і до 14-ої доби показник майже не змінювався, а до 28-ої доби показник склав 115,2 %, що на рівні показника тварин без корекції.

Менш виразно, порівняно з тваринами, яким корекцію не проводили, зростала також концентрація ТБК-активних продуктів. На 3-тю добу показник був на 41,2 % меншим, ніж у групі без корекції. На 7-му добу зростання було на 10,6 % менше, ніж без корекції, а до 28-ої доби показник ТБП достовірно не відрізнявся від аналогічного показника тварин без патології, що, однак, було на 19,3 % меншим, ніж у тварин, яким корекцію не проводили.

Стосовно кінцевого продукту ліполпероксидації – основ Шиффа, то їхня динаміка була подібною до початкових і проміжних продуктів. Зокрема, на 3-тю добу показник був на 38,9 % меншим, ніж у тварин з механічною травмою рогівки, яким корекцію не проводили, на 7-му добу – на 22,3 % меншим. Нормалізація рівня ШО наступила на 28-му добу спостереження, проте стосовно тварин без корекції цей показник був меншим на 19,4 %.

Аналізуючи попередній досвід науковців нашого університету щодо встановлених сорбційно-антитоксичного, пластичного, метаболічного та окисно-відновного потенціалів кріоліофілізованого ксеноімплантата рогівки свині [22, 30-46], можна припустити, що власне якісний склад кріоліофілізованого кератоксеноімплантата попереджує в організмі ліполпероксидацію біологічних мембран.

Отже, застосування строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації було ефективнішим на початкових етапах патологічного процесу щодо рівня продуктів ліполпероксидації, однак і до завершення терміну спостереження ми спостерідали більш низькі показники ПОЛ, ніж у тварин, яким корекцію не проводили.

З даних літератури відомо, що система антиоксидантного захисту організму регулює усі етапи вільнорадикальних реакцій. Нами досліджено ферментну ланку антиоксидантної системи, а саме активність ензимів I лінії антиоксидного захисту – СОД і каталази, а також неферментні компоненти – концентрацію церулоплазміну та відновленого глутатіону як ключового компонента глутатіонової системи.

Основним ензимом першої ланки антирадикального захисту є СОД, яка здатна нейтралізувати пероксидні аніон-радикали шляхом їх дисмутації [1].

Згідно отриманих нами результатів, супероксиддисмутаза та каталазна активність у супернатанті гемолізатів еритроцитів на 3-тю добу після моделювання механічної травми рогівки достовірно зростала, що можна вважати адаптивною реакцією на ініціацію продукування активних радикалів кисню. У подальшому спостерігалось достовірне зниження ензимної активності СОД і каталази, що, на наш погляд, може вказувати на виснаження пулу необхідних факторів для їх синтезу. Зміни активності цих ензимів, можуть сприяти тому, що травма рогівки та патогенні мікроорганізми у виразці ще у більшій мірі індукуватимуть процеси вільнорадикального окиснення [19, 34, 36, 41].

Запальний процес, зумовлений моделюванням механічної травми рогівки, супроводжується зростанням радикал-продукувальної активності лейкоцитів периферійної крові та подальшою їх міграцією в зону травми. Активні форми кисню (супероксид-радикал, пероксид водню, гідроксил-радикал, синглетний кисень, гіпохлорит) необхідні для видалення бактерій і продуктів розпаду біомолекул в зоні пошкодження. Однак, при цьому зростає загроза негативного впливу вільних радикалів на здорові клітини і тканини організму.

В нормі СОД забезпечує підтримку стаціонарної концентрації супероксидних радикалів, що важливо для захисту клітинних структур від їх пошкоджувального впливу. Однак, коли число вільних радикалів зростає,

навантаження на цей ензим різко збільшується і баланс може бути порушений. Основними шляхами зміни активності ензимів у клітині у відповідь на дію пошкоджувальних чинників є збільшення або зменшення їх кількості в клітині, або конформаційні перебудови, що виникають під впливом зовнішніх і внутрішніх факторів [1, 18, 193].

Отже, можна констатувати, що токсичний вплив продуктів ліпідної пероксидації за умови механічної непроникаючої травми рогівки посилюється за рахунок недостатньої ефективності антиоксидного захисту, який проявляється в інгібуванні активності СОД та каталази.

За умов непроникаючої травми рогівки та оксидативного стресу важливим є визначення концентрації церулоплазміну – білка, який має антиоксидантні властивості. Церулоплазмін, як відомо з даних літератури, синтезується у печінці за участю мембранозв'язаних полісом гепатоцитів і бере участь у багатьох фізіологічних процесах [12, 48]. Функціонально церулоплазмін пов'язаний із СОД, проте, на відміну від останнього, діє у сироватці крові, а СОД і каталаза – це внутрішньоклітинні ензими. Церулоплазмін знешкоджує ОН-радикали у сироватці крові у ранні терміни розвитку процесів ліпопероксидації.

В цих експериментальних умовах у сироватці крові концентрація церулоплазміну на 3-тю добу розвитку патологічного процесу достовірно зростає з подальшим зниженням до 28-ої доби.

Важливою ланкою захисту клітини від переокиснення є глутатіонова система, яка включає ензим глутатіонредуктазу та глутатіонпероксидазу, а також неферментативний комплекс – відновлений глутатіон. Травма рогівки викликала зниження вмісту відновленого глутатіону в сироватці крові кролів.

Отже, отримані експериментальні результати свідчать про те, що механічна травма рогівки у ранні терміни спостереження (3-тя доба) супроводжується підвищенням активності показників ензимної і неензимної

ланок антиоксидантної системи, що вказує мобілізацію факторів антиоксидантного захисту для гальмування розвитку оксидативного стресу.

Застосування строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації, покращувало антиоксидантний потенціал, особливо у більш пізні терміни спостереження. Зокрема, супероксиддисмутазна активність у ранні терміни спостереження зростала ще більш виразно, ніж у тварин без корекції (на 14,2 % на 3-тя і 59,7 % на 7-му добу). Така ж тенденція спостерігалась і на 14-ту добу – зростання на 47,6 % порівняно з тваринами без проведення хірургічної крекції. До 28-ої доби показник СОД фактично досягав рівня тварин без змодельованої патології, а у порівнянні з тваринами без корекції був на 21,9 % вищим.

Аналогічні за спрямованістю результати ми отримали і щодо каталазної активності, проте більш виразне зростання щодо тварин без корекції ми зафіксували у більш пізні терміни спостереження, зокрема на 28-му добу показник каталази перевищував рівень тварин, яким корекції не проводили на 55,9 %.

Зростання рівня антиоксидантного захисту можна констатувати і стосовно показників другої лінії. Зокрема, концентрація церулоплазміну за умов хірургічної корекції на 3-тю добу спостереження на 32 % перевищувала рівень тварин з травмою без корекції. На 7-му добу це зростання складало 45,1 %, а на 14-ту – 86,3 % від тварин, яким корекцію не проводили. Навіть до 28-мої доби концентрація церулоплазміну була вищою на 54,2 %, ніж у тварин без корекції.

Стосовно концентрації відновленого глутатіону ми отримали менш значимі значення зростання, як це було у випадку церулоплазміну. Зокрема, на 3-тю добу показник фактично перебував на рівня тварин без змодельованої патології і достовірно не відрізнявся від аналогічного показника тварин з травмою рогівки без корекції. На 7-му та 14-ту доби показники були вищими, ніж у тварин без корекції відповідно на 11,7 та 13,8 %. До 28-ої доби рівень

відновленого глутатіону нормалізувався, а стосовно тварин без корекції склав 111,3 %.

Важливе значення у процесі деградації компонентів сполучної тканини, а строма рогівки є власне типовим представником сполучної тканини, належить ензимам протеолізу. Результатом цього процесу є відторгнення уражених елементів тканин, що необхідне для нормальної репарації у подальшому. У той же час надмірна активація протеолітичних процесів може спричинитися до ушкодження нативних тканин і розповсюдження запального процесу на оточуючі тканини. Посилення запального процесу є особливо небезпечним для рогівки, адже на відміну від інших тканин, таке посилення може спричинитися до істотного погіршення її оптичних властивостей, а у деяких випадках навіть призвести до її перфорації. У ранньому посттравматичному періоді після нанесення механічної травми рогівки активність процесів протеолізу суттєво зростає. Зокрема, на 3-тю добу спостереження ми зафіксували виразне зростання в плазмі крові лізису азоальбуміну на 46,4 %, азоказеїну – на 51,7 %, азоколу – на 73,1 % від рівня тварин, яким травми не моделювали. У подальшому показники загальної протеолітичної активності як стосовно дрібнодисперсних і великодисперсних білків, так і основної речовини сполучної тканини – колагену знижувались, однак буди достовірно вищими від норми

У тварин, яким проводили хірургічну корекцію з використанням еквівалента строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації активність процесів протеолізу була меншою, ніж у тварин, яким корекцію не проводили. Зокрема, на 3-тю добу спостереження показник лізису азоальбуміну був на 19,6 % менше, ніж у тварин, яким корекцію не проводили. Показник лізису азоказеїну дещо перевищував рівень тварин без корекції (на 10,1 %), а лізис азоколу був меншим, ніж у тварин без корекції на 20,8 %. На 7-му добу показники зменшились ще більше, а до 14-ої доби показники лізису азоальбуміну та азоказеїну і надалі знижувались, а показник азоклолу зріс

порівняно з попереднім терміном спостереження і склав 152,5 % від норми. До 28-ої доби показники азоальбуміну та азоколу перебували на рівня тварин без змодельованої патології, а рівень лізису азоказеїну був вищим на 9,3 %, причому стосовно показників тварин без корекції показники були достовірно нижчими.

Відомо, що травматичний процес спричиняється до розвитку запальної відповіді, що передбачає інфільтрацію тканин активованими нейтрофілами, що є основними ефекторними клітинами запалення [15, 34, 44]. Їхня активація та подальша дегрануляція супроводжується викиданням у позаклітинний простір гідролітичних ензимів, в тому числі і протеїназ, з широкою субстратною специфічністю. Це призводить до збільшення проникності судин, змін в самих тканинах у відповідь на пошкодження. Все це зумовлює порушення співвідношення активності протеолізу і системи контролю цього процесу, за допомогою інгібіторів протеолітичних ферментів [2, 34, 44].

Наслідком ушкодження епітелію рогівки та розвитку запального процесу є суттєве зниження активності компонентів антиоксидного захисту рогівкового епітелію, що може спричинити до надмірної генерації АФК, наслідком чого є виникнення і прогресування оксидативного стресу [17]. Вільні радикали, що генеруються макрофагами крові, проникають у тканину рогівки і започатковують процеси ліпідної та білкової пероксидації з подальшим ушкодженням тканини рогівки, зокрема стромальні глікозаміноглікани, що призводить до подальшого порушення їх властивостей, та, у кінцевому результаті, зумовлює руйнування тканини рогівки і утворення виразок. Стромальні глікозаміноглікани, внаслідок атаки активними формами кисню, змінюють свою структуру, а тому вони менш стійкі до дії факторів протеолізу – тканинних ферментів і фагоцитуючих клітин. Якщо у нормальних умовах спіральна третинна структура колагену, що є основною структурною речовиною рогівки, резистентна до дії більшості протеаз і не зазнає деградації під їх впливом, то під впливом активних форм

кисню, згенерованих активованими макрофагами та/або ксантиноксидазою, відбувається окиснювальна деструкція колагенових фібрил першого типу, а це є початковим етапом руйнування колагену. Під час наступного етапу ці окиснено-модифіковані молекули зазнають ензимного протеолізу [15].

Зважаючи на те, що ми зафіксували достовірне зростання протеолітичної активності, наступним етапом нашого дослідження було проаналізувати зміни вмісту інгібіторів протеолізу –  $\alpha_1$ -ІІІ та  $\alpha_2$ -МГ, а також розрахувати індекс протеолізу.

На 3-тю добу від моменту нанесення травми вміст у плазмі крові  $\alpha_1$ -ІІІ зріс на 12,2, а  $\alpha_2$ -МГ на 41,8 % ( $p < 0,05$ ) відносно показників тварин без змодельованої патології. На 7-му добу спостереження показник  $\alpha_1$ -ІІІ залишався майже на тому ж рівні, а  $\alpha_2$ -МГ дещо знизився порівняно з попереднім терміном і до 14-ої доби зафіксовано подальше зниження антипротеаз, яке, проте достовірно перевищувало півень тварин без змодельованої патології, однак до 28-ої доби експерименту показники не відрізнялись від рівня тварин без змодельованого патологічного процесу.

Отже, під дією протеїназ активованих гранулоцитів і макрофагів активуються процеси гідролізу компонентів сполучної тканини, що призводить до її деструкції, а також відбувається активація медіаторів запалення, що в кінцевому результаті, спричиняється до виснаження захисного інгібіторного резерву [10, 15, 44].

За умов хірургічної корекції з використанням еквівалента строми рогівки, отриманої методом децелюляризації антипротеазна активність крові на 3-тю добу від проведення оперативного втручання зростала і у порівнянні з тваринами із травмою рогівки без корекції рівень  $\alpha_1$ -ІІІ був вищим на 6,9 %, а  $\alpha_2$ -МГ нижчим на 21,7 %. У подальші терміни спостереження показники антипротеазної активності поступово знижувались і до 28-ої доби перебували нарівні тварин без змодельованої патології.

Така динаміка відобразилась і на показнику індекса протеолізу. У тварин з механічною травмою рогівки він достовірно зростав з максимумом на 3-тю добу, а у подальшому знижувався і становив на 7-му добу 119,7 %, 14-ту – 113,9 % а на 28-му добу – 116,8 % від аналогічного показника тварин, яким травму не моделювали. У тварин, яким проводили хірургічну корекцію на 3-тю добу експерименту індекс був меншим від аналогічного показника тварин без корекції на 13,2 %. На 7-му добу відбулося суттєве зниження індекса протеолізу порівняно з попереднім терміном спостереження – він склав 108,8 % від норми, що на 10,9 ніж у тварин без корекції. До 14-ої доби показник суттєво не змінювався, а до 28-ої доби суттєво не відрізнявся від норми і був на 16,1 % меншим, ніж у тварин з травмою рогівки без корекції.

Підвищення вмісту показників антипротеазної системи у ранні терміни спостереження за умов хірургічної корекції непроникаючої механічної травми рогівки вказує на посилення антипротеолітичного потенціалу для стримування розвитку деструкції. Такі зміни можна розглядати як адаптивну реакцію організму [6].

Подальше зниження вмісту антипротеаз в більш пізні терміни спостереження може бути спричинене різними чинниками, зокрема відбувається інтенсивним зв'язуванням протеїназ, що, як ми бачили раніше значно активізуються, елімінацією комплексів протеїназа/інгібітор протеїназ з подальшим розщепленням білкової молекули, окисненням активних центрів інгібіторів протеїназ (так звана окиснювальна денатурація) АФК [66, 44]

Отже, моделювання механічної непроникаючої травми рогівки в ранні терміни супроводжується підвищенням протеолітичної активності крові та збільшенням концентрації факторів антипротеазного захисту –  $\alpha_1$ -ІІІ та  $\alpha_2$ -макроглобуліну, що вказує на посилення антипротеолітичного потенціалу для стримування розвитку деструкції. Такі зміни можна розглядати як адаптивну реакцію організму. Хірургічна корекція механічної травми із застосуванням еквівалента строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації,



супроводжується менш інтенсивним зростанням факторів протеолізу та нормалізацією співвідношення протеази/інгібітори протеаз, на що вказує достовірно менше зростання індекса протеолізу на початкових етапах патологічного процесу і нормалізація його до завершення експерименту.

Є численні дані про взаємопов'язане функціонування протеїназ, їх інгібіторів та активних форм кисню. Ці дві системи діють кооперативно як при фізіологічних, так і при патологічних процесах, в тому числі пов'язаних з пошкодженням власних тканин організму [2, 6]. Крім того, активація процесів ліпопероксидації – це важливий патофізіологічний механізм ендотоксикозу, адже продукти ліпідної і білкової пероксидації пошкоджують мембрани структури клітин та внутрішньоклітинних органел, що призводить до деструктивних змін тканин, розвитку гіперферментемії та накопичення токсичних речовин [10, 15, 44].

Тому наступним етапом нашої роботи було вивчення показників ендогенної інтоксикації за умов механічної травми рогівки і застосуванні кератоксеноімплантата.

Отримані нами результати вказують, що моделювання непроникаючої механічної травми рогівки, призводило до статистично вірогідного зростання ендогенної інтоксикації, що проявлялось збільшенням вмісту МСМ в сироватці крові та ЕП. Токсичний ефект середньомолекулярних пептидів зумовлений їх здатністю змінювати проникність клітинних мембран, транспорт іонів через мембрани. За дії ендотоксинів пригнічуються також процеси біосинтезу білка, знижується активність ряду ензимів, ці сполуки можуть спричинятися до роз'єднання процесів тканинного дихання і окисного фосфорилування. Крім того, за дії ряду компонентів, з пулу МСМ можуть порушуватись механізми. Що задіяні у регуляції синтезу аденілових нуклеотидів, вони також можуть впливати на мікроциркуляцію, лімфодинаміку, активність еритропоезу, фагоцитозу, що може призвести до вторинної імунодепресії [21, 25, 38, 39].

Збільшення вмісту МСМ, очевидно, свідчить про інтенсифікацію деструктивних процесів та пригнічення процесів детоксикації в організм, що може стати причиною порушення знешкодження ендотоксинів і, відповідно, нагромадження проміжних продуктів метаболізму. Ушкодження органа зору завжди є серйозними щодо ускладнень і прогнозу. У посттравматичному періоді можливе прогресування деструктивних процесів, у біологічних структурах переднього відділу ока. Деструктивні зміни першочергово розвиваються у самій рогівці, зокрема виникають порушення її архітекtonіки та метаболічних процесів. Водночас ці зміни супроводжуються розладами кровообігу органа зору та розладами мікроциркуляторного русла, що в свою чергу спричинює гіпоксію уражених тканин. Гіпоксія, надалі поглиблює метаболічні порушення. У кінцевому підсумку процес набуває каскадного характеру, формується «хибне коло». Накопичення токсичних продуктів призводить до розвитку запальної реакції, до різкого гальмування регенераторних процесів, утворення грубих рубцевих помутнінь і втрати зору [38, 39].

Одночасно з нагромадженням молекул середньої маси, наростав їх сумарний токсичний вплив на еритроцитарні мембрани, на що вказує зростання ЕП. Позаяк мембрани еритроцитів можна розглядати як прототип плазматичних мембран всіх клітин організму [28], зростання ЕП, що є наслідком підвищення їх проникності, дозволяє стверджувати про те, що у цьому випадку мають місце значні порушення структурної організації та функціональних можливостей клітинних мембран. Окрім цього, розвиток деструктивних у мембранних структурах різних рівнів може спричинитися до зростання надходження у кров токсичних речовин.

Використання коригуючого чинника позитивно вплинуло на показники ендогенної інтоксикації. На 3-тю добу спостереження вміст МСМ<sub>1</sub> у сироватці крові збільшився 43,4 % ( $p < 0,05$ ) відносно контрольної групи кролів (див. табл. 5.10), що на 22,9 % менше, ніж у тварин з механічною травмою рогівки,

яким корекцію не проводили. На 7-му добу спостереження показник склав 137,1 % від норми і був на 13,7 % меншим, ніж у тварин без корекції. У більш пізні терміни спостереження зниження було ще більш виразним і на 14-ту добу рівень МСМ<sub>1</sub> становив 114,2 %, а на 28-мму – 104,9 % від показників тварин без змодельованої патології, що відповідно на 24,4 та 6,6 % менше, ніж у тварин з травмою рогівки без корекції.

На 3-тю добу вміст МСМ<sub>2</sub> у сироватці крові кролів у посттравматичному періоді після проведення хірургічної корекції збільшився на 42,1 % ( $p < 0,05$ ) відносно контрольної групи кролів, що на 14,3 % менше, ніж у тварин без корекції. На 7-му добу спостереження показник зменшився порівняно з 3-ою добою і склав 133,9 % (на 4,5 % менше, ніж без корекції). На 14-ту добу зафіксовано більш виразне зменшення показника – він склав 114,8 % від норми, а на 28-му добу – 106,6 % від рівня тварин без патології.

ЕП у тварин, яким проводили хірургічну корекцію також був значно нижчим, ніж у тварин без корекції. Зокрема, на 3-тю добу спостереження був на 21,5 % меншим ніж у групі некорегованих тварин і скла 135,3 % від норми. На 7-му добу перевищення стосовно тварин без патології склало 24,2 %, що на 18,6 % менше, ніж у тварин без коекції, на 14-ту – 107,6 % стосовно норми (на 19,9 % менше, ніж без проведення корекції), а до 28-ої доби показник був навіть дещо меншим, ніж у тварин без змодельованої патології.

Отже, моделювання непроникаючої механічної травми рогівки, призводило до статистично вірогідного зростання ендогенної інтоксикації, що проявлялось збільшенням вмісту МСМ в сироватці крові. Накопичення токсичних продуктів призводить до розвитку запальної реакції, яка неодноразово рецидивує, до різкого гальмування регенераторних процесів, утворення грубих рубцевих помутнінь і втрати зору [261, 314, 328, 372, 478]. Проведення хірургічної корекції з використанням строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації, позитивно впливало на рівень

ендотоксикозу, достовірно зменшуючи показники стосовно тварин, яким кореції не проводили.

У роботах ряду науковців вказується на важливу роль імунної системи у патогенезі запального процесу травмованого ока, зокрема доведено, що виникнення і динаміка реакцій клітинного імунітету тісно пов'язані з характером перебігу захворювання [55, 78, 144].

В імунних реакціях важливу роль відіграють Т-лімфоцити, які здатні розпізнавати антигени за рахунок клітинних рецепторів. У популяції Т-лімфоцитів різні уклітини мають свої сфери прикладання. Зокрема, Т-хелпери є індукторами імунної відповіді, вони здатні регулювати силу імунної відповіді організму на сторонній антиген [12, 187, 188].

Рівень Т-хелперів на 3-тю добу експерименту зріс на 46,4 % що достовірно вище, ніж у тварин без патології. На 7-му добу спостереження цей показник залишався майже на тому ж рівні – (зростання на 41,1 % ( $p < 0,05$ )). З 14-ої доби рівень Т-хелперів почав знижуватись, однак залишаючись на 29,8 % вищим за показник тварин без патології ( $p < 0,05$ ). На 28-му добу спостереження досліджуваній показник залишався достовірно вищим рівня від норми на 21,5 %.

Динаміка змін Т-супресорів – клітин, роль яких зводиться до пригнічення активації клітинної і гуморальної ланок імунної системи, шляхом впливу на механізми міжклітинної взаємодії, а також регуляції якісного складу популяцій лімфоцитів була аналогічною за спрямованістю, проте менш виразною. Так, досліджуваній показник на 3-тю добу спостереження достовірно зріс на 31,7 %, на 7-му добу – на 35,8 %, 14-ту – 35,1 % відносно тварин без змодельованої патології ( $p < 0,05$ ). На 28-му добу спостереження рівень Т-супресорів, знижувався ще більше і склав 127,5 % від норми ( $p < 0,05$ ).

Імунорегуляторний індекс на 3-тю добу експерименту достовірно зріс на 21,0 %. У подальші терміни спостереження показник знижувався, порівняно з

3-ьою добою і до завершення терміну експерименту достовірно не відрізнявся від норми.

Проведення хірургічної корекції супроводжувалось більш виразними змінами досліджуваних показників на початкових етапах експерименту. Зокрема, на 3-тю добу від моменту проведення хірургічної корекції рівень Т-хелперів зріс на 79,9 % стосовно тварин без змодельованої патології. що також склало 122,7 % відносно тварин без проведеної корекції. На 7-му добу показник суттєво не змінився, а з 14-ої доби почалось його зниження: на 14-ту добу він на 37,5 % перевищував показник норми, а на 28-му – на 12,5 % що було навіть на 8,1 % менше, ніж у тварин без корекції. Стосовно Т-супресорів ми зафіксували значно менш виразні зміни, ніж у випадку з Т-хелперами. На 3-тю добу зафіксовано зростання на рівня Т-супресорів на 19,8 % стосовно тварин без патології, що було менше на 9,1 %, ніж у тварин без корекції. До 7-мої доби суттєвих змін не відбулося, а на 14-ту добу рівень Т-супресорів зріс більш суттєво – на 33,2 %. До 28-мої доби показник знизився і склав 120,2 % від норми і суттєво не відрізнявся від аналогічного показника тварин без корекції.

Більш значні зміни ми отримали при розрахунку імунорегуляторного індекса. На 3-тю добу він зріс на 62,9 % від рівня тварин без патології, що на 34,7 % більше, ніж у тварин без корекції. На 7-му добу відбулось незначне зниження ІРІ порівняно з попереднім терміном спостереження, однак він на 38,2 % перевищував показник тварин без корекції. Більш суттєве зниження ІРІ відбулось на 14-ту добу коли він склав 112,3 % від норми, а до 28-ої доби показник досяг рівня тварин без змодельованої патології. У ці терміни достовірної різниці з показниками тварин без корекції не було.

Незважаючи на те, що при ушкодженнях переднього відділу очного яблука об'єм ушкодження відносно малий, для цього виду ураження характерні такі особливості: зміни в імунній системі, властиві механічній травмі загалом, незалежно від її локалізації; специфічні зміни, пов'язані з

анатомо-фізіологічними особливостями органу зору, зокрема з імунною привілейованістю органу зору; порушення з боку клітинної ланки імунної системи з активацією поглинальних функцій та супресією мікробіоцидного потенціалу фагоцитуючих клітин. Пошкодження переднього відділу очного яблука супроводжуються порушеннями в імунній системі як на рівні самого пошкодженого органу, так і системного імунітету у відповідь на травму та перенесений стрес [7]. Ці порушення, в свою чергу, впливають на перебіг травматичного періоду і формування ускладнень.

За даними Н.Я. Козарійчука, корнеосклеральні пошкодження викликають поєднані, місцеві і системні дисфункції в імунній системі: гіперпродукцію прозапальних цитокінів, порушення фагоцитозу, зрушення в рівнях Т- і В-лімфоцитів, аутоімунні реакції [12].

Отже, моделювання механічної травми рогівки призводить до активування факторів гуморального імунітету у ранній посттравматичний період у крові кролів з подальшою нормалізацією до 28-ої доби та виразне порушення клітинного імунітету у вигляді дисбалансу субпопуляційного складу Т-лімфоцитів з переважним зростанням Т-хелперів і прогресивним збільшенням імунорегуляторного індексу.

Проведення хірургічної корекції з використанням еквівалента строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації, на початкових етапах патологічного процесу спричиняється до більш виразних порушень з боку імунної системи, спричинених, з одного боку, травмою рогівки, а з іншого – наявністю стороннього субстрату. Однак, вже через 14 днів спостерігається нормалізація імунної відповіді, що свідчить про нормальне приживлення еквівалента строми рогівки, отриманого методом децелюляризації.

Порушення імунітету при механічних травмах ока можна розглядати в аспекті загальної концепції імунного реагування при стресі. Імунна відповідь на травму типова для постстресових «реакцій тривоги» на етапі «термінової адаптації» [56, 101, 198].

Крім того, відомо, що око як «забар'єрний» орган володіє «імуниним привілеєм». За даними Труфанова С.В., «імуна привілейованість ока» – це комплекс регіональних імуних клітинно опосередкованих і гуморальних реакцій, спрямованих на запобігання розвитку запальних і дистрофічних процесів в оболонках і рідких середовищах ока при широкому колі офтальмологічних захворювань [29]. «Імуна привілейованість» забезпечується низкою чинників, які поділяють на пасивні (гематофтальмологічний бар'єр, відсутність інтраокулярної лімфатичної системи, слабка експресія молекул МНС I і II класів на поверхні стромальних клітин ока або її відсутність) і активні (наявність речовин з імуносупресивними властивостями у волозі передньої камери, конститутивна експресія мембранних молекул, що беруть участь у запобіганні комплементзалежного лізису тканин на інтраокулярних клітинах тощо). Особливу роль відіграє феномен АСАІD (від англ. «Anterior chamber associated immune deviation») – імуна відхилення, яке проявляється при потрапленні розчинних антигенів в передню камеру ока. Це призводить (шляхом ланцюга сигнальних «цитокінових» ефектів, що проходять через фільтруючу зону трабекули, сягаючи селезінки) до селективної антигенспецифічної супресії системної Th1-клітинної імуної відповіді і гіперчутливості уповільненого типу, а також редукції комплементзалежних антитіл (IgG субкласу 2), запобігаючи тим самим розвитку активного запалення. Вироблення комплементнезалежних антитіл (IgG субкласів 1, 3, 4) і активність цитотоксичних клітин при цьому не пригнічуються, в результаті чого формується певний рівень захисту. Крім того, імунодефіцитний стан у осіб з травмами і опіками ока може бути зумовлений надлишком простагландинів, що пригнічують секрецію ІL-2 – одного з головних індукторів імуної відповіді [143, 194, 212].

Вивчення концентрації імуноглобулінів сироватки крові основних класів – А, М і G у посттравматичному періоді непроникаючої механічної

травми рогівки виявило їх суттєві зміни у всі терміни спостереження. Аналіз динаміки концентрації основних класів імуноглобулінів сироватки крові у посттравматичному періоді після моделювання непроникаючої механічної травми рогівки дозволив установити суттєві зміни у всі терміни спостереження (табл. 1). Уже на 3-тю добу спостереження ми зафіксували статистично значиме підвищення рівнів IgA у 1,6 раза, IgM – у 2,1 раза, IgG – у 1,3 раза стосовно контролю. У подальші терміни спостереження ми зафіксували менш виразне зростання концентрації імуноглобулінів IgA був вищим у 1,8 раза, IgM та більш інтенсивне зростання концентрації IgG. Зокрема, на 7-му добу після змодельованої травми концентрація IgA перевищувала показник тварин без змодельованої патології у 1,4 раза, IgM – у 1,9 раза. У подальшому ці показники знижувались ще більше і до 28-мої доби достовірно не відрізнялись від аналогічних показників тварин без змодельованої патології. Концентрація IgG на 7-му добу суттєво зростала і склала 186,51 % від норми, а на 14-ту добу – 244,9 від рівня тварин без змодельованої патології. До 28-ої доби показник зменшувався, однак усе ж на 93,1 % перевищував рівень норми. Зростання концентрації основних класів імуноглобулінів свідчить про активізацію гуморального та місцевого імунітету, спричинену змодельованою травмою рогівки. Збільшення кількості впродовж перебігу травматичного періоду Ig G указує на виразну активацію імунних реакцій в організмі в процесі захворювання [149].

Хірургічна корекція експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки з використанням строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, супроводжувалася дещо іншою динамікою вмісту сироваткових імуноглобулінів. Вона зумовлювала активацію неспецифічної резистентності організму вже через 3 доби, яка проявлялась достовірно вищою концентрацією імуноглобулінів основних класів проти даних 3-ої доби у тварин без корекції. Зокрема, рівень IgA перевищував у 2,9 раза показник тварин без змодельованої патології і був на 75,1 % вищим, від рівня тварин без



корекції, IgM перевищував показник норми у 2,5 раза, а IgG – у 2,8 раза, що було також вищим від показників тварин з механічною травмою без корекції відповідно на 12,3 та 116,0 %. У подальші терміни спостереження рівень факторів гуморального імунітету зазнавав неоднотипних змін. Так, починаючи з 7-ої доби IgA та IgM суттєво знижувалась і до 28-ої доби не перевищувала норми. Концентрація IgG на 7-му добу й надалі зростала і склала 330,7 % стосовно тварин без патології і була на 77,7 % вищою, ніж у тварин без корекції. У подальшому показник IgG у цій групі також знижувався однак і на 28-му добу на 57,8 % перевищував рівень групи тварин без патології, однак був нижчим на 22,5 % ніж у тварин з травмою рогівки без корекції ( $p < 0,05$ ).

Отже, моделювання механічної травми рогівки призводить до активування факторів гуморального імунітету у ранній посттравматичний період у крові кролів з подальшою нормалізацією до 28-ої доби та виразне порушення клітинного імунітету у вигляді дисбалансу субпопуляційного складу Т-лімфоцитів з переважним зростанням Т-хелперів і прогресивним збільшенням імунорегуляторного індексу.

Проведення хірургічної корекції травми рогівки з використанням строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації зумовлює активування факторів, що забезпечують неспецифічну резистентність організму у перші 7 діб експерименту, що проявляється достовірним зростанням концентрації IgA, IgM, IgG та факторів клітинного імунітету з подальшою їх нормалізацією до 28-ої доби.

Відомо, що розвиток будь-якого патологічного процесу супроводжується підвищенням концентрації TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  і IL-6 [6]. Продукція цитокінів носить активаційний характер і забезпечує інформаційний обмін між клітинами, які залучені у запальний процес. При протективних варіантах запального процесу цитокіни переважно утворюються у вогнищі запалення, а їх надходження у системний кровотік обумовлене

гострофазною відповіддю, стрес-реакцію нейроендокринної системи, лейкоцитозом та іншим [43, 46]. Результати проведеного дослідження вказують на відмінності динаміки рівня цитокінів у кролів, яким моделювали механічну непроникну травму рогівки, і тих тварин, яким проводили хірургічну корекцію з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. Зокрема, через 3 доби після моделювання патологічного процесу вміст TNF- $\alpha$  у сироватці крові кролів, яким не виконували хірургічної корекції, перевищував аналогічний показник тварин без змодельованої патології в 1,6 раза ( $p < 0,05$ ). У подальші терміни спостереження рівень зростання концентрації досліджуваного цитокіна був дещо меншим, однак на 28-му добу перевищував показник тварин без патології в 1,3 раза. У кролів, яким проводили хірургічну корекцію, збільшення концентрації TNF- $\alpha$  було менш вираженим, ніж у тварин, яким її не виконували. Зокрема, на 3-тю добу рівень становив 141 % порівняно з кролями без патології і був на 16,2 % нижчим порівняно з тваринами, яким хірургічної корекції не проводили. Ще більше зниження відносно показника кролів без корекції ми зафіксували на 7-му добу – 37,6 %. У подальші терміни спостереження концентрація TNF- $\alpha$  у кролів, яким виконували хірургічну корекцію, достовірно не відрізнялась від показника тварин, яким травми не моделювали, водночас була достовірно меншою, ніж у кролів із травмою рогівки без проведення корекції.

Аналізуючи динаміку концентрації IL-1 $\beta$  у сироватці крові, встановили, що у кролів, яким не проводили хірургічної корекції, показник був достовірно вищим порівняно з інтактними тваринами. На 3-тю добу спостереження вона зросла на 37,1 % стосовно кролів без змодельованої патології. У подальші терміни посттравматичного періоду рівень цього цитокіна зменшувався і до 28-ї доби перевищував показник норми на 8,6 %. Хірургічна корекція з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації, супроводжувалась менш інтенсивним збільшенням вмісту IL-1 $\beta$ , ніж у тварин,

яким корекції не проводили. Зокрема, на 3-тю добу спостереження рівень IL-1 $\beta$  перевищував аналогічний показник тварин без змодельованої патології на 21,1 % і був на 10,4 % нижчим, ніж у кролів із травмою рогівки, яким хірургічної корекції не виконували. На 7-му добу він зменшувався порівняно з попереднім терміном спостереження, однак на 11,8 % перевищував рівень норми та був на 7,9 % нижчим, ніж у групі тварин без хірургічної корекції. На 14-ту і 28-му доби концентрація IL-1 $\beta$  у цій групі достовірно не перевищувала показника кролів без патології і була меншою, ніж у тварин 2-ї групи.

Аналогічними за динамікою були зміни ще одного прозапального цитокіна – IL-6. Його концентрація також максимально зростала на 3-тю добу від моменту моделювання травми рогівки і становила 141,8 % від його рівня. Подальше зниження в наступні терміни спостереження було менш вираженим, ніж це відзначено стосовно IL-1 $\beta$ , і навіть на 28-му добу показник становив 118,3 % відносно норми. Хірургічна корекція також сприяла менш інтенсивному його зростанню, ніж це мало місце у групі тварин без корекції, до 28-ї доби достовірних змін зафіксовано не було.

Узагальнюючи отримані результати дослідження рівня прозапальних цитокінів, можна стверджувати, що хірургічна корекція із застосуванням ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, зменшує системну запальну реакцію організму порівняно з групою тварин, яким моделювали травму рогівки і корекції не проводили.

Поряд із пригніченням зростання активності прозапальних цитокінів нанесення механічної травми рогівки спричинило підвищення на 13,4 % концентрації протизапального цитокіна – IL-4 на 3-тю добу спостереження з подальшим зниженням цього показника до 28-ї доби, коли він склав 76,9 % від рівня тварин без змодельованої патології. Застосування строми ксенорогівки мало нормалізуючий вплив на вміст цього цитокіна. Зокрема, на 3-тю добу показник також зростав аналогічно до показника тварин, яким корекції не проводили. Однак із 7-ї доби спостереження відзначили суттєву різницю:

якщо у кролів без хірургічної корекції концентрація ІЛ-4 знижувалась, то при її виконанні цього не відбувалось. Відповідно, на 7-му добу показник був на 13,1 % вищим, ніж у тварин без корекції, на 14-ту – на 13,6 %, на 28-му – на 10,9 %, перебуваючи фактично на рівні кролів без змодельованої патології. Таке зростання рівня протизапального ІЛ-4 свідчить, на нашу думку, про активацію гуморального імунітету.

Аналіз ІЗА показав гіперреактивний тип імунної реакції протягом усього експерименту в кролів, яким хірургічної корекції не проводили, з дисбалансом цитокинової продукції в бік переважання рівня прозапальних інтерлейкінів. При цьому максимальні зміни зафіксовано на 3-тю і 7-му доби – зростання, відповідно, в 1,4 та 1,3 раза порівняно з тваринами, яким хірургічної корекції не виконували.

Хірургічна корекція супроводжувалась активацією компенсаторних механізмів, про що свідчила позитивна динаміка ІЗА. Так, уже із 7-ї доби він достовірно не відрізнявся від показника тварин без змодельованої патології, досягаючи максимально наближених до норми значень через 28 діб спостереження.

Отримані результати вказують на відмінність типу імунної відповіді після нанесення механічної травми рогівки: у тварин, яким моделювали механічну травму рогівки і хірургічної корекції не проводили, він був гіперреактивним, а за умов хірургічної корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації, – компенсаторним.

## ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукового завдання, що полягає експериментальному обґрунтуванні ймовірності і доцільності застосування еквівалента строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, для корекції непроникаючої механічної травми роівки. У результаті вирішення наукового завдання зроблено такі висновки:

1. Гістологічні дослідження роівки свині після проведення децелюляризації показали відсутність у ній переднього і заднього епітелію. Виявлялися залишки Боуменової мембрани, а власна речовина роівки була деструктуризованою. Сполучнотканинні пластинки у складі строми розшаровані. У власній речовині роівки не виявлено кератоцитів чи інших клітин фібробластичного диферону, що свідчить про ефективність проведеної децелюляризації.

1. Клінічне спостереження за реакцією ока кроля на трансплантацію еквівалента строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації показало, що до завершення терміну спостереження (28 діб) роівка реципієнта була прозорою, за виключенням відносно невеликих ділянок помутніння, роівковий рефлекс відновлювався.

2. Гістологічними дослідженнями встановлено, що за умов механічної травми роівки значно порушується структурна організація переднього епітелію, пограничної пластинки та власної речовини. Ступінь деструктивних змін залежить від тривалості патологічного процесу. Застосування децелюляризованої роівки свині для корекції механічної травми роівки покращує динаміку регенерації, пришвидшує дозрівання грануляційної тканини, загоєння дефекту, сприяє відновленню морфології роівки з максимальною наближеністю до норми. Електронномікроскопічні дослідження роівки показали, що за умов змодельованої механічної

непроникаючої травми спостерігаються зміни у складових частинах рогівки, які проявляються порушенням електронної щільності у епітеліоцитах, пошкодженням і подальшим руйнуванням міжклітинних контактів, прогресуванням некротичних змін. Відбуваються значні дегенеративні зміни у власній речовині рогівки, що проявляються деструкцією колагенових волокон у складі сполучнотканинних пластинок, значних дистрофічних змін зазнають фібробласти, кератиноцити. Проведення хірургічної корекції сприяє активації та покращенню регенераторних процесів у всіх структурних компонентах рогівки. У багатошаровому епітелії відзначається впорядковане розташування епітеліоцитів із збереженням їх ультраструктури, у власній речовині наявне посилення функціональної та синтетичної активності клітин фібробластичного диферону і відповідно структурованістю міжклітинної речовини із чітким розташуванням сполучнотканинних пластинок.

3. За умови експериментальної непроникаючої механічної травми рогівки спостерігається інтенсифікація вільнорадикальних процесів (підвищення рівнів ГПЛ, ТБК–активних продуктів і шифових основ) у крові з максимальним зростанням на 3-тю добу. Застосування строми рогівки, отриманої методом децелюляризації позитивно впливало на показники вільнорадикального окиснення: зменшувалась активність процесів ліпопероксидації та нівелює пік зростання показників пероксидного окиснення ліпідів за умови досліджуваної патології – на 3-тю і добу.

4. Проведення хірургічної корекції механічної травми рогівки запропонованим нами методом супроводжується мобілізацією компонентів першої (супероксиддисмутаза, каталаза) та другої (церулоплазмін, відновлений грутатіон) ліній антиоксидного захисту, що особливо виразно проявляється у ранні терміни патологічного процесу на тлі надмірної активації процесів ліпідної пероксидації.

5. У ранньому посттравматичному періоді після нанесення механічної травми рогівки суттєво зростає активність процесів протеолізу з одночасним

збільшенням концентрації факторів антипротеазного захисту –  $\alpha_1$ -ІІ та  $\alpha_2$ -макроглобуліну, що вказує на посилення антипротеолітичного потенціалу для стримування розвитку деструкції. Хірургічна корекція механічної травми із застосуванням еквівалента строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, супроводжується менш інтенсивним зростанням факторів протеолізу та нормалізацією співвідношення протеази/інгібітори протеаз, на що вказує достовірно менше зростання індекса протеолізу на початкових етапах патологічного процесу і нормалізація його до завершення експерименту.

6. Змодельована непроникаюча травма рогівки спричинилася до статистично вірогідного зростання ендогенної інтоксикації, що проявлялось збільшенням вмісту молекул середньої маси в сироватці крові та еритроцитарного індекса інтоксикації. Проведення хірургічної корекції з використанням строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації, позитивно впливало на рівень ендотоксикозу, достовірно зменшуючи показники стосовно тварин, яким корекції не проводили.

7. Механічна травма рогівки призводить до активування у крові кролів факторів гуморального імунітету у ранній посттравматичний період з подальшою нормалізацією до 28-ої доби та виразного порушення клітинного імунітету у вигляді дисбалансу субпопуляційного складу Т-лімфоцитів з переважним зростанням Т-хелперів і прогресивним збільшенням імунорегуляторного індексу. Проведення хірургічної корекції з використанням строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації, зумовлює активацію неспецифічної резистентності організму у перші 7 діб експерименту, яка проявляється достовірно вищою концентрацією IgA, IgM, IgG та факторів клітинного імунітету з подальшою їх нормалізацією до 28-ої доби.

8. За умови експериментальної непроникної механічної травми рогівки зростає концентрація прозапальних цитокінів з максимумом на 3-тю добу

після нанесення травми. Поряд із цим спостерігають фазові зміни вмісту протизапального інтерлейкіну-4 – збільшення на 3-тю добу та зменшення в інші терміни спостереження. Аналіз індексу запальної активності показав гіперреактивний тип імунної реакції протягом усього експерименту у кролів, яким моделювали травму рогівки, з дисбалансом цитокінової продукції в бік переважання рівня прозапальних інтерлейкінів. Хірургічна корекція супроводжувалась активацією компенсаторних механізмів, про що свідчила позитивна динаміка індексу запальної активності – уже із 7-ої доби він достовірно не відрізнявся від показника тварин без змодельованої патології, досягаючи максимально наближених до норми значень через 28 діб спостереження. Отримані результати вказують на відмінність типу імунної відповіді після нанесення механічної травми рогівки: у тварин, яким моделювали механічну травму рогівки і хірургічної корекції не проводили, він був гіперреактивним, а за умов хірургічної корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації – компенсаторним



## СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Беленічев ІФ, Левицький ЄЛ, Губський ЮІ. Антиоксидантна система захисту організму (огляд). *Совр. пробл. токсикол.* 2002;3:24-9.
2. Веремеенко КН, Голобородько ОП, Кизим АІ. Протеоліз в нормі и при патології. Київ: Здоров'є; 1988. с. 173-6.
3. Влізло ВВ, Федорук РС, Ратич ІБ. Лабораторні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині: довідник. Львів: Сполом; 2012. 764 с.
4. Габриэлян НИ, Липатова ВИ. Опыт использования показателя средних молекул в крови для диагностики нефрологических заболеваний у детей. *Лаб. дело.* 1984;3(138):40.
5. Деклараційний патент на корисну модель № 101707. Коган БМ, Пасечнікова НВ, Насінник ІО, Коломійчук СГ, винахідники; Державна установа “Інститут очних хвороб і тканинної терапії ім. В. П. філатова НаМН України”, патентовласник. Спосіб отримання еквівалента строми рогівки для кератопластики. 2015 вер. 25.
6. Дивоча ВА, Дерібон ЕЛ. Роль інгібіторів протеїназ в патогенезі захворювань людини (обзор літератури и собственных исследований, часть 1). *Актуальні проблеми транспортної медицини: навколишнє середовище; професійне здоров'я; патологія.* 2013(2):127-37.
7. Дубинина ЕЕ, Ефимова ЛФ, Ефимова ЛЯ. Методи определения активности каталазы . *Лабораторное дело.* 1988;8:16-9.
8. Дудин ВИ. Колориметрическое определение перекиси водорода при измерении активности каталазы в крови. *Проблемы биологии продуктивных животных.* 2008;(2):96-9.
9. Зорин НА, Зорина ВН, Зорина РМ, Левченко ВГ. Универсальный регулятор –  $\alpha 2$ -макроглобулин Клиническая лабораторная диагностика. 2004;11:18-21.

10. Карягина ИЮ, Зарембский РА, Балябина МД. Использование метода комплексного определения активности трипсиноподобных протеиназ,  $\alpha$ 1-антитрипсина и  $\alpha$ 2-макроглобулина в гастроэнтерологической клинике. Лаб. дело. 1990;2:10-3.

11. Кожем'якін ЮМ, Хромов ОС, Філоненко МА, Сайфетдінова ГА. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. К.: Авіцена; 2002. 156 с.

12. Козарийчук НЯ. Современные данные о механизмах иммунной дисфункции при повреждении переднего отдела глазного яблока (обзор литературы). Клінічна та експериментальна патологія. 2016;2(56):210-14.

13. Колб ВБ, Колб ВГ, Камышников ВС. Определение активности церулоплазмина в крови. Справочник по клинической химии. Минск: Беларусь; 1982. с. 290-1.

14. Колесова ОЕ, Маркин АА, Федорова ТН. Перекисное окисление липидов и методы определения продуктов липопероксидации в биологических средах. Лаб. дело. 1984;9:540-6.

15. Криницька ІЯ. Стан протеїназо-інгібіторної системи крові та бронхоальвеолярного змиву у щурів з модельованим гепатопульмональним синдромом. Загальна патологія та патологічна фізіологія. 2012;7(4):92-7.

16. Лапач СН, Чубенко АВ, Бабич ПН. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel. К.: Морион; 2001. 408 с.

17. Лаповець ЛЄ, Луцик БД, Лебедь ГБ, Порохнавець ЛЄ, Андрушевська ОЮ, Акімова ВМ, та ін. Клінічна лабораторна діагностика. Практикум (3-є видання). Львів; 2011. 252 с.

18. Макаревич ОП, Голиков ПП. Активность супероксиддисмутазы крови в острый период различных заболеваний. Лаб. дело. 1983;6:24-7.

19. Меньщикова ЕБ, Ланкин ВЗ, Зенков НК, Бондарь ИА, Круговых НФ, Труфакин ВА. Окислительный стресс. Проксиданты и антиоксиданты. М.: Слово; 2006. 556 с.

20. Новицький ІЯ. Вплив трансплантації амніотичної оболонки для реконструкції поверхні ока на неоваскуляризацію рогівки. Офтальмологічний журнал. 2003;(3):70-3.

21. Оська ВВ, Чекалина КИ, Габриэлян НИ, Малеев ВВ. Среднемолекулярные пептиды спинномозговой жидкости при гнойных менингитах. Лабораторное дело. 1987(2):23-5.

22. Пасечникова НВ, Якименко СА, Турчин НВ, Бузник АИ, Костенко ПО. Применение "Кератоксеноимплантата" для лечебной и лечебно-тектонической кератопластики при тяжелых ожогах глаз и изъязвлениях роговицы различной этиологии. Офтальмологічний журнал. 2015;5(466):13-7.

23. Пасечникова НВ. Результаты работы по созданию эквивалента донорской роговицы человека. Проблеми екологічної та медичної генетики і клінічної імунології. 2011;(3):370-4.

24. Пасечникова НВ, Якименко СА, Бігуняк ВВ, Турчин МВ, Бузник ОІ, Насінник ІО. Клініко-експериментальні результати застосування амніотичної оболонки та кріоліофілізованої рогівки свині в якості матеріалу для кератопластики. Медицина сьогодні і завтра. 2011;(1-2):226-8.

25. Радченко ОМ, Кондратюк МО. Синдром ендогенної інтоксикації в клініці внутрішніх хвороб (огляд літератури та власні спостереження). Медична гідрологія та реабілітація. 2009;7(3):25-32.

26. Стадников АА, Канюков ВН, Трубина ОМ, Горбунов АА, Подопригора РН, Ломухина ЕА, и др. Гистологическое и иммуноцитохимическое изучение донорского материала для целей пластической офтальмохирургии. Вестник Оренбургского государственного университета. 2010;(12(118-2)):217-8.

27. Стальная ИД, Гаришвили ТГ. Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. Современные методы в биохимии. 1977;2(3):66-8.

28. Тогайбаев АА, Кургузкин АВ, Рикун ИВ. Метод определения эндогенной интоксикации. Лаб. дело. 1988;9:22-4.

29. Труфанов СВ, Суббот АМ, Маложен СА, Крахмалева ДА. Гипотеза иммунной привилегии роговицы и патофизиология отторжения кератотрансплантата. Вестник офтальмологии. 2016;132(5):117-24.

30. Турчин МВ, Бігуняк ВВ, Козачок СС. Амінокислотний та елементний склад кріоліофілізованої рогівки свині. Фітотерапія. 2016;1:60-3.

31. Турчин МВ, Волков КС, Кліщ ІМ, Борис РМ. Гістологічне і електронно-мікроскопічне дослідження кератоксеноімплантата при різних видах консервації. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2016;(1):73-7.

32. Турчин МВ, Кліщ ІМ, Борис РМ. Морфологічні зміни рогівки за умови експериментальної механічної непроникаючої травми та її корекції кератоксеноімплантатом. Вісник наукових досліджень. 2016;(1):105-7.

33. Турчин МВ, Кліщ ІМ. Динаміка показників антиоксидного захисту крові та водянистої вологи за умови експериментальної механічної непроникної травми рогівки. Медична хімія. 2014;16(4):78-84.

34. Турчин МВ, Кліщ ІМ. Динаміка показників оксидативного стресу за умови експериментальної механічної непроникаючої травми рогівки та її корекції кератоксеноімплантатом. Вісник проблем біології і медицини. 2015;3(2):239-43.

35. Турчин МВ, Кліщ ІМ. Особливості імунологічної реактивності за умови експериментальної механічної непроникаючої травми рогівки при консервативному і хірургічному лікуванні. Journal of Health Sciences. 2014;4(11):397-402.

36. Турчин МВ, Кліщ ІМ. Особливості процесів вільнорадикального окиснення крові та водянистої вологи за умов експериментальної механічної непроникаючої травми рогівки. Вісник наукових досліджень. 2014(4):103-7.

37. Турчин МВ, Пасечнікова НВ. Експериментальне обґрунтування і досвід використання ксенорогівки при лікувально-тектонічній кератопластиці у хворих із виразками рогівки різної етіології. Шпитальна хірургія. Журнал імені ЛЯ Ковльчука. 2017;(3):43-8.

38. Турчин МВ. Динаміка показників синдрому ендогенної інтоксикації крові та водянистої вологи за умови експериментальної механічної непроникної травми рогівки. Медична та клінічна хімія. 2015;17(1):51-6.

39. Турчин МВ. Динаміка показників синдрому ендогенної інтоксикації крові та водянистої вологи за умови експериментальної механічної непроникної травми рогівки та її корекції кератоксеноімплантатом. Медична та клінічна хімія. 2015;3(64):84-9.

40. Турчин МВ. Особливості гуморальної ланки імунітету за умови експериментальної механічної непроникаючої травми рогівки та її корекції кератоксеноімплантатом. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2014(2):183-7.

41. Турчин МВ. Роль активних форм кисню у процесах ініціації апоптичної загибелі клітин за умови механічної непроникаючої травми рогівки в експерименті. Шпитальна хірургія. 2014;(4):59-62.

42. Турчин МВ. Технологія виготовлення кератоксеноімплантату для використання в офтальмологічній практиці. Офтальмологічний журнал. 2011;(6):47-8.

43. Турчин МВ. Цитокіновий профіль крові та водянистої вологи за умови експериментальної механічної непроникної травми рогівки. Медична хімія. 2014;16(3):85-9.

44. Турчин НВ, Клищ ИН, Криницкая ИЯ. Динамика показателей протеиназоингибиторной системы крови и водянистой влаги при

экспериментальной механической непроникающей травме роговицы. Офтальмология. Восточная Европа. 2015;(1):43-50.

45. Турчин НВ. Динамика показателей клеточного иммунитета крови и водянистой влаги при экспериментальной механической непроникающей травме роговицы. Офтальмология. Восточная Европа. 2015(4):35-41.

46. Турчин НВ. Особенности цитокинового профиля слезной жидкости больных язвой роговицы при условии разных методов хирургической коррекции. Oftalmologiya. 2015;(2):47-52.

47. Хышиктуев БС, Хышиктуева НА, Иванов ВН. Методы определения продуктов перекисного окисления липидов в конденсате выдыхаемого воздуха и их клиническое значение. Клиническая лабораторная диагностика. 1996(3):13-5.

48. Чевари С, Чаба И, Секей Й. Роль супероксиддисмутазы в окислительных процессах клетки и метод определения ее в биологических материалах. Лаб. дело. 1985;11(678-681):316.

49. Шмир СМ, Крамар СБ. Морфологічні зміни рогівки кролів у пізні терміни після моделювання механічної непроникаючої травми рогівки та за умов її корекції децелюляризованою стромою ксенорогівки. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2023;22(2):37-48.

50. Шмир СМ, Кліщ ІМ. Стан клітинної та гуморальної ланок імунної системи кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2023;(2):149-55.

51. Шмир СМ, Кліщ ІМ. Цитокіновий статус сироватки крові кролів з механічною непроникною травмою рогівки та корекція з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. Медична та клінічна хімія. 2023;(2):20-5.

52. Шмир СМ, Кліщ ІМ. Стан протеїназо-інгібіторної системи крові кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням стромы ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. Вісник проблем біології і медицини. 2023;3(170):339-48.

53. Шмир СМ., Огінська НВ Субмікроскопічні зміни рогівки при її змодельованій механічній непроникаючій травмі. Шпитальна хірургія. Журнал ім. Л.Я. Ковальчука. 2023;3:69-76.

54. Abalovich A, Matsumoto S, Wechsler CJ, Carulla ME, Siciliano ME, Sznaider D, Denner J, Elliott RB. Level of acceptance of islet cell and kidney xenotransplants by personnel of hospitals with and without experience in clinical xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2017 Jul;24(4):e12315.

55. Abou-El-Enein M, Schneider CK. Deciphering the EU clinical trials regulation. *Nature biotechnology*. 2016 Mar;34(3):231-3.

56. Abud TB, Di Zazzo A, Kheirkhah A, Dana R. Systemic immunomodulatory strategies in high-risk corneal transplantation. *Journal of Ophthalmic & Vision Research*. 2017 Jan;12(1):81.

57. Adam D. Special report: The simulations driving the world's response to COVID-19. *Nature*. 2020 Apr 1;580(7802):316-9.

58. Ahearne M, Yang Y, Then KY, Liu KK. An indentation technique to characterize the mechanical and viscoelastic properties of human and porcine corneas. *Annals of biomedical engineering*. 2007 Sep;35:1608-16.

59. Almeida HG, Kara-José N, Hida RY, Kara-Junior N. A 15-year review of corneal transplant in Brazil. *Eye & Contact Lens*. 2018 Nov 1;44:S376-81.

60. Amano S, Shimomura N, Kaji Y, Ishii K, Yamagami S, Araie M. Antigenicity of porcine cornea as xenograft. *Current eye research*. 2003 Jan 1;26(6):313-8.

61. Amano S, Shimomura N, Yokoo S, Araki-Sasaki K, Yamagami S. Decellularizing corneal stroma using N<sub>2</sub> gas. *Molecular vision*. 2008;14:878.

62. Anderson M. Xenotransplantation: a bioethical evaluation. *Journal of Medical Ethics*. 2006 Apr 1;32(4):205-8.
63. Appel III JZ, Alwayn IP, Cooper DK. Xenotransplantation: the challenge to current psychosocial attitudes. *Progress in Transplantation*. 2000 Dec;10(4):217-25.
64. Ayalew M, Tilahun Y, Holsclaw D, Indaram M, Stoller NE, Keenan JD, Rose-Nussbaumer J. Penetrating keratoplasty at a tertiary referral center in Ethiopia: indications and outcomes. *Cornea*. 2017 Jun;36(6):665.
65. Bigan G, Puyraveau M, Saleh M, Gain P, Martinache I, Delbosc B, Gauthier AS. Corneal transplantation trends in France from 2004 to 2015: a 12-year review. *European Journal of Ophthalmology*. 2018 Sep;28(5):535-40.
66. Bittmann I, Mihica D, Plesker R, Denner J. Expression of porcine endogenous retroviruses (PERV) in different organs of a pig. *Virology*. 2012 Nov 25;433(2):329-36.
67. Bloom ET. Xenotransplantation: regulatory challenges. *Current Opinion in Biotechnology*. 2001 Jun 1;12(3):312-6.
68. Bloom ET. Xenotransplantation – Federal regulatory considerations. *Xenotransplantation*. 2003 Jan 1:239-51.
69. Bobba S, Di Girolamo N, Munsie M, Chen F, Pebay A, Harkin D, Hewitt AW, O'Connor M, McLenachan S, Shadforth AM, Watson SL. The current state of stem cell therapy for ocular disease. *Experimental eye research*. 2018 Dec 1;177:65-75.
70. Bock F, Maruyama K, Regenfuss B, Hos D, Steven P, Heindl LM, Cursiefen C. Novel anti (lymph) angiogenic treatment strategies for corneal and ocular surface diseases. *Progress in retinal and eye research*. 2013 May 1;34:89-124.
71. Boisgérault F, Liu Y, Anosova N, Ehrlich E, Dana MR, Benichou G. Role of CD4+ and CD8+ T cells in allorecognition: lessons from corneal transplantation. *The Journal of Immunology*. 2001 Aug 15;167(4):1891-9.



72. Bourne RR, Flaxman SR, Braithwaite T, Cicinelli MV, Das A, Jonas JB, Keeffe J, Kempen JH, Leasher J, Limburg H, Naidoo K. Magnitude, temporal trends, and projections of the global prevalence of blindness and distance and near vision impairment: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*. 2017 Sep 1;5(9):e888-97.

73. Brunette I, Roberts CJ, Vidal F, Harissi-Dagher M, Lachaine J, Sheardown H, Durr GM, Proulx S, Griffith M. Alternatives to eye bank native tissue for corneal stromal replacement. *Progress in retinal and eye research*. 2017 Jul 1;59:97-130.

74. Byrne GW. Does human leukocyte antigens sensitization matter for xenotransplantation? *Xenotransplantation*. 2018 May;25(3):e12411.

75. Cai S, Chandraker A. Cell therapy in solid organ transplantation. *Current Gene Therapy*. 2019 Apr 1;19(2):71-80.

76. Chakrabarty K, Shetty R, Ghosh A. Corneal cell therapy: with iPSCs, it is no more a far-sight. *Stem cell research & therapy*. 2018 Dec;9(1):1-5.

77. Chan JL, Mohiuddin MM. Heart xenotransplantation. *Current Opinion in Organ Transplantation*. 2017 Dec 1;22(6):549-54.

78. Chang DH, Kittleson MM, Kobashigawa JA. Immunosuppression following heart transplantation: prospects and challenges. *Immunotherapy*. 2014 Feb;6(2):181-94.

79. Chatel MA, Larkin DF. Sirolimus and mycophenolate as combination prophylaxis in corneal transplant recipients at high rejection risk. *American journal of ophthalmology*. 2010 Aug 1;150(2):179-84.

80. Chauhan SK, Saban DR, Lee HK, Dana R. Levels of Foxp3 in regulatory T cells reflect their functional status in transplantation. *The Journal of Immunology*. 2009 Jan 1;182(1):148-53.

81. Cheng M. Islet Xenotransplantation and the risk of contagion: local responses from Canada and Australia to an emerging global technoscience. *Life Sciences, Society and Policy*. 2015 Dec;11:1-23.

82. Choi HJ, Hyon JY, Lee HK, Song JS, Chung TY, Mo H, et al. Standardization of the proceedings for preparing clinical trials of corneal xenotransplantation in South Korea. *Xenotransplantation*. 2019 Jan;26(1):e12448.

83. Choi HJ, Kim J, Kim JY, Lee HJ, Wee WR, Kim MK, Hwang ES. Long term safety from transmission of porcine endogenous retrovirus after pig to non human primate corneal transplantation. *Xenotransplantation*. 2017 Jul;24(4):e12314.

84. Choi HJ, Kim MK, Lee HJ, Jeong SH, Kang HJ, Park CS, et al. Effect of  $\alpha$ Gal on corneal xenotransplantation in a mouse model. *Xenotransplantation*. 2011 May;18(3):176-82.

85. Choi HJ, Kim MK, Lee HJ, Ko JH, Jeong SH, Lee JI, et al. Efficacy of pig-to-rhesus lamellar corneal xenotransplantation. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011 Aug 1;52(9):6643-50.

86. Choi HJ, Lee JJ, Kim DH, Kim MK, Lee HJ, Ko AY, et al. Blockade of CD40–CD154 costimulatory pathway promotes long-term survival of full-thickness porcine corneal grafts in nonhuman primates: clinically applicable xenocorneal transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2015 Mar 1;15(3):628-41.

87. Choi HJ, Yoon CH, Hyon JY, Lee HK, Song JS, Chung TY, et al. Protocol for the first clinical trial to investigate safety and efficacy of corneal xenotransplantation in patients with corneal opacity, corneal perforation, or impending corneal perforation. *Xenotransplantation*. 2019 Jan;26(1):e12446.

88. Choi SH, Yoon CH, Lee HJ, Kim HP, Kim JM, Che JH, et al. Long-term safety outcome of systemic immunosuppression in pig-to-nonhuman primate corneal xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2018 Jul;25(4):e12442.

89. Claerhout I, Kestelyn P, Debacker V, Beele H, Leclercq G. Role of natural killer cells in the rejection process of corneal allografts in rats. *Transplantation*. 2004 Mar 15;77(5):676-82.

90. Cohen D, Miyagawa Y, Mehra R, Lee W, Isse K, Long C, et al. Distribution of non-gal antigens in pig cornea: relevance to corneal xenotransplantation. *Cornea*. 2014 Apr 1;33(4):390-7.
91. Cooper DK. Clinical xenotransplantation – how close are we?. *The Lancet*. 2003 Aug 16;362(9383):557-9.
92. Cooper DK, Gollackner B, Sachs DH. Will the pig solve the transplantation backlog?. *Annual review of medicine*. 2002 Feb;53(1):133-47.
93. Cooper DK, Matsumoto S, Abalovich A, Itoh T, Mourad NI, Gianello PR, et al. Progress in clinical encapsulated islet xenotransplantation. *Transplantation*. 2016 Nov;100(11):2301.
94. Cooper DK, Satyananda V, Eksler B, van der Windt DJ, Hara H, Ezzelarab MB, Schuurman HJ. Progress in pig-to-non-human primate transplantation models (1998–2013): a comprehensive review of the literature. *Xenotransplantation*. 2014 Sep;21(5):397-419.
95. Cooper DK, Gaston R, Eckhoff D, Ladowski J, Yamamoto T, Wang L, et al. Xenotransplantation – the current status and prospects. *British Medical Bulletin*. 2018 Mar;125(1):5.
96. Costa J, Benvenuto LJ, Sonett JR. Long-term outcomes and management of lung transplant recipients. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*. 2017 Jun 1;31(2):285-97.
97. Dai Y, Vaught TD, Boone J, Chen SH, Phelps CJ, Ball S, et al. Targeted disruption of the  $\alpha 1, 3$ -galactosyltransferase gene in cloned pigs. *Nature biotechnology*. 2002 Mar 1;20(3):251-5.
98. Deanna HD, Kamran MR, Dimitrios K. Treatment of Non-Infectious Corneal Injury: Review of Diagnostic AIInts, Therapeutic Medications, and Future Targets. *Drugs*. 2022;82:145-67.
99. Denner J. Recombinant porcine endogenous retroviruses (PERV-A/C): a new risk for xenotransplantation? *Archives of virology*. 2008 Aug;153:1421-6.

100. Denner J, Scobie L, Schuurman HJ. Is it currently possible to evaluate the risk posed by PERVs for clinical xenotransplantation? *Xenotransplantation*. 2018 Aug 18;25(4):e12403.
101. Dhanasekaran R. Management of immunosuppression in liver transplantation. *Clinics in liver disease*. 2017 May 1;21(2):337-53.
102. Di Zazzo A, Kheirkhah A, Abud TB, Goyal S, Dana R. Management of high-risk corneal transplantation. *Survey of ophthalmology*. 2017 Nov 1;62(6):816-27.
103. Dong X, Hara H, Wang Y, Wang L, Zhang Y, Cooper DK, et al. Initial study of  $\alpha 1, 3$ -galactosyltransferase gene-knockout/CD 46 pig full-thickness corneal xenografts in rhesus monkeys. *Xenotransplantation*. 2017 Jan;24(1):e12282.
104. Drozhzhyna GI, Gaidamaka TB, Cursiefen C, Bachmann BO, Ivanovska OV, Ostashevsky VL, et al. Emergency keratoplasty with porcine xenografts in necrotizing keratitis. *Klinische Monatsblätter für Augenheilkunde*. 2017 Jul 6;234(11):1387-95.
105. Du L, Wu X. Development and characterization of a full-thickness acellular porcine cornea matrix for tissue engineering. *Artificial organs*. 2011 Jul;35(7):691-705.
106. Du L, Wu X, Pang K, Yang Y. Histological evaluation and biomechanical characterisation of an acellular porcine cornea scaffold. *British journal of ophthalmology*. 2011 Mar 1;95(3):410-4.
107. Ekser B, Ezzelarab M, Hara H, van der Windt DJ, Wijkstrom M, Bottino R, et al. Clinical xenotransplantation: the next medical revolution?. *The lancet*. 2012 Feb 18;379(9816):672-83.
108. Ekser B, Li P, Cooper DK. Xenotransplantation: past, present, and future. *Current opinion in organ transplantation*. 2017 Dec;22(6):513.
109. Ellman GL. Tissue sulfhydryl groups. *Archives of biochemistry and biophysics*. 1959 May 1;82(1):70-7.

110. Elsheikh A, Alhasso D, Rama P. Biomechanical properties of human and porcine corneas. *Experimental eye research*. 2008 May 1;86(5):783-90.
111. Faber C, Wang M, Scherfig E, Sørensen KE, Prause JU, Ehlers N, Nissen MH. Orthotopic porcine corneal xenotransplantation using a human graft. *Acta ophthalmologica*. 2009 Dec;87(8):917-9.
112. FDA. 2016. Available from: <https://www.fda.gov/media/87251/download> (accessed 20 May 2020).
113. Fernández-Pérez J, Ahearne M. Decellularization and recellularization of cornea: Progress towards a donor alternative. *Methods*. 2020 Jan 15;171:86-96.
114. Fishman JA. Infection in organ transplantation. *American Journal of Transplantation*. 2017 Apr 1;17(4):856-79.
115. Fishman JA. Infectious disease risks in xenotransplantation. *American Journal of Transplantation*. 2018 Aug 1;18(8):1857-64.
116. Fishman JA. Infection in xenotransplantation: opportunities and challenges. *Current opinion in organ transplantation*. 2019 Oct;24(5):527.
117. Fishman JA, Scobie L, Takeuchi Y. Xenotransplantation-associated infectious risk: a WHO consultation. *Xenotransplantation*. 2012 Mar;19(2):72-81.
118. Flaxman SR, Bourne RR, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV, et al. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990–2020: a systematic review and meta-analysis. *The Lancet Global Health*. 2017 Dec 1;5(12):e1221-34.
119. Flockerzi E, Maier P, Böhringer D, Reinshagen H, Kruse F, Cursiefen C, et al. Trends in corneal transplantation from 2001 to 2016 in Germany: a report of the DOG–section cornea and its keratoplasty registry. *American journal of ophthalmology*. 2018 Apr 1;188:91-8.
120. Forrester JV, Steptoe RJ, Klaska IP, Martin-Granados C, Dua HS, Degli-Esposti MA, Wikstrom ME. Cell-based therapies for ocular inflammation. *Progress in retinal and eye research*. 2013 Jul 1;35:82-101.

121. Fujita M, Mehra R, Lee SE, Roh DS, Long C, Funderburgh JL, et al. Comparison of proliferative capacity of genetically-engineered pig and human corneal endothelial cells. *Ophthalmic research*. 2013 Mar 1;49(3):127-38.
122. Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, Thuret G. Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA ophthalmology*. 2016 Feb 1;134(2):167-73.
123. Garkavenko O, Dieckhoff B, Wynyard S, Denner J, Elliott RB, Tan PL, Croxson MC. Absence of transmission of potentially xenotic viruses in a prospective pig to primate islet xenotransplantation study. *Journal of medical virology*. 2008 Nov;80(11):2046-52.
124. George JF. Xenotransplantation: an ethical dilemma. *Current opinion in cardiology*. 2006 Mar 1;21(2):138-41.
125. Gonzalez-Andrades M, Carriel V, Rivera-Izquierdo M, Garzon I, Gonzalez-Andrades E, Medialdea S, et al. Effects of detergent-based protocols on decellularization of corneas with sclerocorneal limbus. Evaluation of regional differences. *Translational Vision Science & Technology*. 2015 Mar 1;4(2):13-.
126. Gonzalez-Andrades M, de la Cruz Cardona J, Ionescu AM, Campos A, del Mar Perez M, Alaminos M. Generation of bioengineered corneas with decellularized xenografts and human keratocytes. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011 Jan 1;52(1):215-22.
127. Griffith M, Alarcon EI, Brunette I. Regenerative approaches for the cornea. *Journal of internal medicine*. 2016 Sep;280(3):276-86.
128. Han Z, Aglyamov SR, Li J, Singh M, Wang S, Vantipalli S, et al. Quantitative assessment of corneal viscoelasticity using optical coherence elastography and a modified Rayleigh–Lamb equation. *Journal of biomedical optics*. 2015 Feb 1;20(2):020501-.
129. Hara H, Cooper DK. The immunology of corneal xenotransplantation: a review of the literature. *Xenotransplantation*. 2010 Sep;17(5):338-49.

130. Hara H, Cooper DK. Xenotransplantation—the future of corneal transplantation? *Cornea*. 2011 Apr;30(4):371.

131. Hara H, Koike N, Long C, Piluek J, Roh DS, SundarRaj N, et al. Initial in vitro investigation of the human immune response to corneal cells from genetically engineered pigs. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2011 Jul 1;52(8):5278-86.

132. Hara H, Witt W, Crossley T, Long C, Isse K, Fan L, et al. Human dominant-negative class II transactivator transgenic pigs—effect on the human anti-pig T-cell immune response and immune status. *Immunology*. 2013 Sep;140(1):39-46.

133. Hargrave SL, Mayhew E, Hegde S, Niederkorn J. Are corneal cells susceptible to antibody-mediated killing in corneal allograft rejection? *Transplant Immunology*. 2003 Jan 1;11(1):79-89.

134. Hashimoto Y, Funamoto S, Sasaki S, Honda T, Hattori S, Nam K, et al. Preparation and characterization of decellularized cornea using high-hydrostatic pressurization for corneal tissue engineering. *Biomaterials*. 2010 May 1;31(14):3941-8.

135. Hashimoto Y, Funamoto S, Sasaki S, Negishi J, Honda T, Hattori S, et al. Corneal regeneration by deep anterior lamellar keratoplasty (DALK) using decellularized corneal matrix. *PLoS One*. 2015 Jul 10;10(7):e0131989.

136. Hashimoto Y, Hattori S, Sasaki S, Honda T, Kimura T, Funamoto S, et al. Ultrastructural analysis of the decellularized cornea after interlamellar keratoplasty and microkeratome-assisted anterior lamellar keratoplasty in a rabbit model. *Scientific Reports*. 2016 Jun 13;6(1):27734.

137. Hawthorne WJ, Cowan PJ, Bühler LH, Yi S, Bottino R, Pierson RN, et al. Third WHO global consultation on regulatory requirements for xenotransplantation clinical trials, Changsha, hunan, China december 12-14, 2018:" the 2018 Changsha communique" the 10-year anniversary of the international consultation on xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2019 Apr;26(2):e12513.

138. He YG, Ross J, Niederkorn JY. Promotion of murine orthotopic corneal allograft survival by systemic administration of anti-CD4 monoclonal antibody. *Investigative ophthalmology & visual science*. 1991 Sep 1;32(10):2723-8.
139. He Z, Forest F, Bernard A, Gauthier AS, Montard R, Peoc'h M, et al. Cutting and decellularization of multiple corneal stromal lamellae for the bioengineering of endothelial grafts. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2016 Dec 1;57(15):6639-51.
140. Higginbotham L, Ford ML, Newell KA, Adams AB. Preventing T cell rejection of pig xenografts. *International Journal of Surgery*. 2015 Nov 1;23:285-90.
141. Higuchi R, Streilein JW. CD8+ T cell-mediated delayed rejection of orthotopic guinea pig cornea grafts in mice deficient in CD4+ T cells. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2003 Jan 1;44(1):175-82.
142. Roberts CJ, Dupps WJ, Downs JC, editors. *Biomechanics of the Eye*. Kugler publications; 2018 Apr 20.
143. Hori J, Yamaguchi T, Keino H, Hamrah P, Maruyama K. Immune privilege in corneal transplantation. *Progress in retinal and eye research*. 2019 Sep 1;72:100758.
144. Hos D, Matthaei M, Bock F, Maruyama K, Notara M, Clahsen T, et al. Immune reactions after modern lamellar (DALK, DSAEK, DMEK) versus conventional penetrating corneal transplantation. *Progress in retinal and eye research*. 2019 Nov 1;73:100768.
145. Inoue K, Amano S, Kimura C, Sato T, Fujita N, Kagaya F, et al. Long-term effects of topical cyclosporine A treatment after penetrating keratoplasty. *Japanese journal of ophthalmology*. 2000 May 1;44(3):302-5.
146. Isidan A, Liu S, Li P, Lashmet M, Smith LJ, Hara H, et al. Decellularization methods for developing porcine corneal xenografts and future perspectives. *Xenotransplantation*. 2019 Nov;26(6):e12564.



147. Jie Y, Liu L, Pan Z, Wang L. Survival of pig-to-rhesus corneal xenografts prolonged by prior donor bone marrow transplantation. *Molecular Medicine Reports*. 2013 Mar 1;7(3):869-74.
148. Jones GL, Ponzin D, Pels E, Maas H, Tullo AB, Claerhout I. European eye bank association. *Eye Banking*. 2009;43:15-21.
149. Jordan SC, Toyoda M, Kahwaji J, Vo AA. Clinical aspects of intravenous immunoglobulin use in solid organ transplant recipients. *American Journal of Transplantation*. 2011 Feb 1;11(2):196-202.
150. Ju C, Gao L, Wu X, Pang K. A human corneal endothelium equivalent constructed with acellular porcine corneal matrix. *The Indian journal of medical research*. 2012 Jun;135(6):887.
151. Kawai T, Andrews D, Colvin RB, Sachs DH, Cosimi AB. Thromboembolic complications after treatment with monoclonal antibody against CD40 ligand. *Nature medicine*. 2000 Feb;6(2):114-.
152. Kim DH, Kim J, Jeong HJ, Lee HJ, Kim MK, Wee WR. Biophysico-functional compatibility of Seoul National University (SNU) miniature pig cornea as xenocorneal graft for the use of human clinical trial. *Xenotransplantation*. 2016 May;23(3):202-10.
153. Kim JM, Kim J, Choi SH, Shin JS, Min BH, Jeong WY, et al. Tacrolimus-induced asymptomatic thrombotic microangiopathy diagnosed by laboratory tests in pig-to-rhesus corneal xenotransplantation: a case report. *Xenotransplantation*. 2018 Sep;25(5):e12404.
154. Kim MK. Commentary: current status and future of corneal xenotransplantation. *Transplantation Technologies & Research*. 2016;6(3):1000163.
155. Kim MK. Current progress in corneal xenotransplantation. *Xenotransplantation-New Insights*. IntechOpen; London. 2017 Jul 12:25-46.
156. Kim MK, Choi HJ, Kwon I, Pierson III RN, Cooper DK, Soullillou JP, et al. The International Xenotransplantation Association consensus statement on

conditions for undertaking clinical trials of xenocorneal transplantation. *Xenotransplantation*. 2014 Sep;21(5):420-30.

157. Kim MK, Hara H. Current status of corneal xenotransplantation. *International Journal of Surgery*. 2015 Nov 1;23:255-60.

158. Kim MK, Lee JJ, Choi HJ, Kwon I, Lee H, Song JS, et al. Ethical and regulatory guidelines in clinical trials of xenocorneal transplantation in Korea; the Korean xenocorneal transplantation consensus statement. *Xenotransplantation*. 2013 Jul;20(4):209-18.

159. Kim MK, Miyagawa S. *Xenotransplantation*. London: IntechOpen; 2017. p. 25-46.

160. Kim YG, Oh JY, Gil GC, Kim MK, Ko JH, Lee S, et al. Identification of  $\alpha$ -Gal and non-Gal epitopes in pig corneal endothelial cells and keratocytes by using mass spectrometry. *Current Eye Research*. 2009 Oct 1;34(10):877-95.

161. Kimelman M, Brandacher G. Trends in immunosuppression after pancreas transplantation: what is in the pipeline? *Current opinion in organ transplantation*. 2013 Feb 1;18(1):76-82.

162. Lamm V, Hara H, Mammen A, Dhaliwal D, Cooper DK. Corneal blindness and xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2014 Mar;21(2):99-114.

163. Larkin DF, Williams KA. The host response in experimental corneal xenotransplantation. *Eye*. 1995 Mar;9(2):254-60.

164. Lee HI, Kim MK, Oh JY, Ko JH, Lee HJ, Wee WR, Lee JH. Gal $\alpha$  (1-3) Gal expression of the cornea in vitro, in vivo and in xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2007 Nov;14(6):612-8.

165. Lee JK, Ryu YH, Ahn JI, Kim MK, Lee TS, Kim JC. The effect of lyophilization on graft acceptance in experimental xenotransplantation using porcine cornea. *Artificial Organs*. 2010 Jan;34(1):37-45.

166. Lee SE, Mehra R, Fujita M, Roh DS, Long C, Lee W, et al. Characterization of porcine corneal endothelium for xenotransplantation.

In Seminars in ophthalmology 2014 May 1 (Vol. 29, No. 3, pp. 127-135). Taylor & Francis.

167. Lee W, Miyagawa Y, Long C, Cooper DK, Hara H. A comparison of three methods of decellularization of pig corneas to reduce immunogenicity. *International journal of ophthalmology*. 2014;7(4):587.

168. Lee W, Miyagawa Y, Long C, Eksler B, Walters E, Ramsoondar J, et al. Expression of NeuGc on pig corneas and its potential significance in pig corneal xenotransplantation. *Cornea*. 2016 Jan;35(1):105.

169. Li A, Pan Z, Jie Y, Sun Y, Luo F, Wang L. Comparison of immunogenicity and porcine-to-rhesus lamellar corneal xenografts survival between fresh preserved and dehydrated porcine corneas. *Xenotransplantation*. 2011 Jan;18(1):46-55.

170. Li Q, Wang H, Dai Z, Cao Y, Jin C. Preparation and biomechanical properties of an acellular porcine corneal stroma. *Cornea*. 2017 Nov 1;36(11):1343-51.

171. Li S, Deng Y, Tian B, Huang H, Zhang H, Yang R, et al. Healing characteristics of acellular porcine corneal stroma following therapeutic keratoplasty. *Xenotransplantation*. 2020 Mar;27(2):e12566.

172. Li S, Li M, Gu L, Peng L, Deng Y, Zhong J, et al. Risk factors influencing survival of acellular porcine corneal stroma in infectious keratitis: a prospective clinical study. *Journal of Translational Medicine*. 2019 Dec;17(1):1-0.

173. Li S, Waer M, Billiau AD. Xenotransplantation: role of natural immunity. *Transplant immunology*. 2009 Jun 1;21(2):70-4.

174. Lim MA, Kohli J, Bloom RD. Immunosuppression for kidney transplantation: Where are we now and where are we going?. *Transplantation Reviews*. 2017 Jan 1;31(1):10-7.

175. Lin XC, Hui YN, Wang YS, Meng H, Zhang YJ, Jin Y. Lamellar keratoplasty with a graft of lyophilized acellular porcine corneal stroma in the rabbit. *Veterinary ophthalmology*. 2008 Mar;11(2):61-6.

176. Lin Y, Zheng Q, Hua S, Meng Y, Chen W, Wang Y. Cross-linked decellularized porcine corneal graft for treating fungal keratitis. *Scientific Reports*. 2017 Aug 30;7(1):9955.

177. Liu Z, Hu W, He T, Dai Y, Hara H, Bottino R, et al. Pig-to-primate islet xenotransplantation: past, present, and future. *Cell transplantation*. 2017 Jun;26(6):925-47.

178. Loss M, Arends H, Winkler M, Przemec M, Steinhoff G, Rensing S, et al. Analysis of potential porcine endogenous retrovirus (PERV) transmission in a whole-organ xenotransplantation model without interfering microchimerism. *Transplant international*. 2001 Feb;14:31-7.

179. Luo H, Lu Y, Wu T, Zhang M, Zhang Y, Jin Y. Construction of tissue-engineered cornea composed of amniotic epithelial cells and acellular porcine cornea for treating corneal alkali burn. *Biomaterials*. 2013 Sep 1;34(28):6748-59.

180. Mathews PM, Lindsley K, Aldave AJ, Akpek EK. Etiology of global corneal blindness and current practices of corneal transplantation: a focused review. *Cornea*. 2018 Sep 1;37(9):1198-203.

181. Matsumoto S, Tan P, Baker J, Durbin K, Tomiya M, Azuma K, et al. Clinical porcine islet xenotransplantation under comprehensive regulation. *InTransplantation proceedings 2014 Jul 1 (Vol. 46, No. 6, pp. 1992-1995)*. Elsevier.

182. Matsumoto S, Tomiya M, Sawamoto O. Current status and future of clinical islet xenotransplantation. *Journal of Diabetes*. 2016 Jul;8(4):483-93.

183. Mehta JS, Kocaba V, Soh YQ. The future of keratoplasty: cell-based therapy, regenerative medicine, bioengineering keratoplasty, gene therapy. *Current Opinion in Ophthalmology*. 2019 Jul 1;30(4):286-91.

184. Miyagava S *Xenotransplantation – New Insite*. London: IntechOpen; 2017. Available from: <https://www.intechopen.com/books/1007>

185. Michel SG, Madariaga ML, Villani V, Shanmugarajah K. Current progress in xenotransplantation and organ bioengineering. *International Journal of Surgery*. 2015 Jan 1;13:239-44.

186. Négrel A-D, Thylefors B. The global impact of eye injuries. *Ophthalmic epidemiology*. 1998;5(3):143-69.
187. Niederkorn JY, Stevens C, Mellon J, Mayhew E. CD4+ T-cell-independent rejection of corneal allografts. *Transplantation*. 2006 Apr 27;81(8):1171-8.
188. Niederkorn JY, Stevens C, Mellon J, Mayhew E. Differential Roles of CD8\* and CD8\* T Lymphocytes in Corneal Allograft Rejection in 'High Risk' Hosts. *American journal of transplantation*. 2006 Apr 1;6(4):705-13.
189. Oh JY, Kim MK, Ko JH, Lee HJ, Kim Y, Park CS, et al. Acute cell-mediated rejection in orthotopic pig-to-mouse corneal xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2009 Mar;16(2):74-82.
190. Oh JY, Kim MK, Ko JH, Lee HJ, Lee JH, Wee WR. Rat allogeneic mesenchymal stem cells did not prolong the survival of corneal xenograft in a pig-to-rat model. *Veterinary Ophthalmology*. 2009 Nov;12:35-40.
191. Oh JY, Kim MK, Ko JH, Lee HJ, Park CG, Kim SJ, et al. Histological differences in full-thickness vs. lamellar corneal pig-to-rabbit xenotransplantation. *Veterinary ophthalmology*. 2009 Mar;12(2):78-82.
192. Oh JY, Kim MK, Wee WR. Lamellar corneal pig-to-rabbit xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2008 May;15(3):198-9.
193. Ore A, Akinloye OA. Oxidative stress and antioxidant biomarkers in clinical and experimental models of non-alcoholic fatty liver disease. *Medicina*. 2019 Jan 24;55(2):26.
194. Paunicka K.J, Mellon J, Robertson D, Petroll M, Brown JR, Niederkorn JY. Severing corneal nerves in one eye induces sympathetic loss of immune privilege and promotes rejection of future corneal allografts placed in either eye. *Am. J. Transplant*. 2015;15:1490-501..
195. Park CG, Shin JS, Min BH, Kim H, Yeom SC, Ahn C. Current status of xenotransplantation in South Korea. *Xenotransplantation*. 2019 Jan;26(1):e12488.

196. Perkel J.M. Xenotransplantation makes a comeback. *Nat. Biotechnol.* 2016;34:3–4.
197. Porth JM, Deiotte E, Dunn M, Bashshur R. A review of the literature on the global epidemiology of corneal blindness. *Cornea.* 2019 Dec 1;38(12):1602-9.
198. Qian Y, Dana MR. Molecular mechanisms of immunity in corneal allotransplantation and xenotransplantation. *Expert Reviews in Molecular Medicine.* 2001 Jul;3(18):1-21.
199. Riau AK, Liu YC, Yam GH, Mehta JS. Stromal keratophakia: corneal inlay implantation. *Progress in Retinal and Eye Research.* 2020 Mar 1;75:100780.
200. Romano M, Fanelli G, Albany CJ, Giganti G, Lombardi G. Past, present, and future of regulatory T cell therapy in transplantation and autoimmunity. *Frontiers in immunology.* 2019 Jan 31;10:43.
201. Ross JR, Sanfilippo FP, Howell DN. Histopathologic features of rejecting orthotopic corneal xenografts. *Current eye research.* 1994 Jan 1;13(10):725-30.
202. Sachs DH. Transplantation tolerance through mixed chimerism: From allo to xeno. *Xenotransplantation.* 2018 May;25(3):e12420.
203. Schwartzkopff J, Schlereth SL, Berger M, Bredow L, Birnbaum F, Böhringer D, Reinhard T. NK cell depletion delays corneal allograft rejection in baby rats. *Molecular Vision.* 2010;16:1928.
204. Sgroi A, Bühler LH, Morel P, Sykes M, Noel L. International human xenotransplantation inventory. *Transplantation.* 2010 Sep 27;90(6):597-603.
205. Shao Y, Tang J, Zhou Y, Qu Y, He H, Liu Q, Tan G, Li W, Liu Z. A novel method in preparation of acellular porcine corneal stroma tissue for lamellar keratoplasty. *American Journal of Translational Research.* 2015;7(12):2612.
206. Sharifi R, Yang Y, Adibnia Y, Dohlman CH, Chodosh J, Gonzalez-Andrades M. Finding an optimal corneal xenograft using comparative analysis of corneal matrix proteins across species. *Scientific Reports.* 2019 Feb 12;9(1):1876.

207. Shi Y, Bikkuzin T, Song Z, Jin X, Jin H, Li X, Zhang H. Comprehensive evaluation of decellularized porcine corneal after clinical transplantation. *Xenotransplantation*. 2017 Nov;24(6):e12338.
208. Shimoda M, Matsumoto S. Update regarding xenotransplantation in Japan. *Xenotransplantation*. 2019 Jan;26(1):e12491.
209. Smetanka C, Cooper DK. The ethics debate in relation to xenotransplantation. *Revue scientifique et technique (International Office of Epizootics)*. 2005 Apr 1;24(1):335-42.
210. Snellingen T, Rao GN, Shrestha JK, Huq F, Cheng H. Quantitative and morphological characteristics of the human corneal endothelium in relation to age, gender, and ethnicity in cataract populations of South Asia. *Cornea*. 2001 Jan 1;20(1):55-8.
211. Sobbrío P, Jorqui M. An overview of the role of society and risk in xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2014 Nov;21(6):523-32.
212. Streilein JW, Okamoto S, Sano Y, Taylor AW. Neural control of ocular immune privilege. *Ann. NY. Acad. Sci.* 2000;917:297-306.
213. Tan DT, Dart JK, Holland EJ, Kinoshita S. Corneal transplantation. *The Lancet*. 2012 May 5;379(9827):1749-61.
214. Terán-Escandón D, Terán-Ortiz L, Ormsby-Jenkins C, Evia-Viscarra ML, White DJ, Valdés-González-Salas R. Psychosocial aspects of xenotransplantation: survey in adolescent recipients of porcine islet cells. In: *Transplantation proceedings*. 2005 Jan 1;37(1):521-4.
215. Turchyn M, Marushchak M, Krynytska I, Klishch I. Clinical efficacy of therapeutic keratoplasty using corneal xenografts in patients with corneal ulcers. *Romanian Journal of Ophthalmology*. 2019 Jul;63(3):257.
216. Thylefors B, Negrel A-D, Pararajasegaram R. Global data on blindness. *Bulletin of the world health organization*. 1995;73(1):115.
217. Thylefors B, Négreel A-D, Pararajasegaram R. Epidemiologic aspects of global blindness prevention. *Current opinion in ophthalmology*. 1992;3(6):824-34.

218. Van der Windt DJ, Bottino R, Kumar G, Wijkstrom M, Hara H, Ezzelarab M, et al. Clinical islet xenotransplantation: how close are we?. *Diabetes*. 2012 Dec;61(12):3046.

219. Vaidyanathan U, Hopping GC, Liu HY, Somani AN, Ronquillo YC, Hoopes PC, Moshirfar M. Persistent corneal epithelial defects: a review article. *Medical Hypothesis, Discovery and Innovation in Ophthalmology*. 2019;8(3):163.

220. Vellara HR, Patel DV. Biomechanical properties of the keratoconic cornea: a review. *Clinical and Experimental Optometry*. 2015 Jan 1;98(1):31-8.

221. Vincenti F, Larsen C, Durrbach A, Wekerle T, Nashan B, Blacho G, et al. Costimulation blockade with belatacept in renal transplantation. *New England Journal of Medicine*. 2005 Aug 25;353(8):770-81.

222. Wang W, Mo Z, Ye B, Hu PA, Liu S, Yi S. A clinical trial of xenotransplantation of neonatal pig islets for diabetic patients. *Zhong nan da xue xue bao. Yi xue ban= Journal of Central South University. Medical Sciences*. 2011 Dec 1;36(12):1134-40.

223. Wijkstrom M, Iwase H, Paris W, Hara H, Ezzelarab M, Cooper DK. Renal xenotransplantation: experimental progress and clinical prospects. *Kidney international*. 2017 Apr 1;91(4):790-6.

224. Wong KH, Kam KW, Chen LJ, Young AL. Corneal blindness and current major treatment concern-graft scarcity. *International journal of ophthalmology*. 2017;10(7):1154.

225. Wu Z, Zhou Y, Li N, Huang M, Duan H, Ge J, et al. The use of phospholipase A2 to prepare acellular porcine corneal stroma as a tissue engineering scaffold. *Biomaterials*. 2009 Jul 1;30(21):3513-22.

226. Wynyard S, Nathu D, Garkavenko O, Denner J, Elliott R. Microbiological safety of the first clinical pig islet xenotransplantation trial in New Zealand. *Xenotransplantation*. 2014 Jul;21(4):309-23.



227. Xu YG, Xu YS, Huang C, Feng Y, Li Y, Wang W. Development of a rabbit corneal equivalent using an acellular corneal matrix of a porcine substrate. *Molecular vision*. 2008;14:2180.

228. Yoeruek E, Bayyoud T, Maurus C, Hofmann J, Spitzer MS, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Decellularization of porcine corneas and repopulation with human corneal cells for tissue-engineered xenografts. *Acta ophthalmologica*. 2012 Mar;90(2):e125-31.

229. Yoeruek E, Bayyoud T, Maurus C, Hofmann J, Spitzer MS, Bartz-Schmidt KU, Szurman P. Reconstruction of corneal stroma with decellularized porcine xenografts in a rabbit model. *Acta ophthalmologica*. 2012 May;90(3):e206-10.

230. Yoon CH, Choi SH, Choi HJ, Lee HJ, Kang HJ, Kim JM, et al. Long-term survival of full-thickness corneal xenografts from  $\alpha 1$ , 3-galactosyltransferase gene-knockout miniature pigs in non-human primates. *Xenotransplantation*. 2020 Jan;27(1):e12559.

231. Yoon CH, Choi SH, Lee HJ, Kang HJ, Kim MK. Predictive biomarkers for graft rejection in pig-to-non-human primate corneal xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2019 Jul;26(4):e12515.

232. Zhang C, Nie X, Hu D, Liu Y, Deng Z, Dong R, et al. Survival and integration of tissue-engineered corneal stroma in a model of corneal ulcer. *Cell and tissue research*. 2007 Aug;329(2):249-57.

233. Zhang MC, Liu X, Jin Y, Jiang DL, Wei XS, Xie HT. Lamellar keratoplasty treatment of fungal corneal ulcers with acellular porcine corneal stroma. *American Journal of Transplantation*. 2015 Apr 1;15(4):1068-75.

234. Zheng J, Huang X, Zhang Y, Wang Y, Qin Q, Lin L, et al. Short-term results of acellular porcine corneal stroma keratoplasty for herpes simplex keratitis. *Xenotransplantation*. 2019 Jul;26(4):e12509.

235. Zheng MH, Chen J, Kirilak Y, Willers C, Xu J, Wood D. Porcine small intestine submucosa (SIS) is not an acellular collagenous matrix and contains

porcine DNA: possible implications in human implantation. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials: An Official Journal of The Society for Biomaterials, The Japanese Society for Biomaterials, and The Australian Society for Biomaterials and the Korean Society for Biomaterials*. 2005 Apr;73(1):61-7.

236. Zheng X, Zhang D, Li S, Zhang J, Zheng J, Du L, Gao J. An experimental study of femto-laser in assisting xenograft acellular cornea matrix lens transplantation. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*. 2018;24:5208.

237. Zhou H, Hara H, Cooper DK. The complex functioning of the complement system in xenotransplantation. *Xenotransplantation*. 2019 Jul;26(4):e12517.

238. Zhou Y, Wu Z, Ge J, Wan P, Li N, Xiang P, et al. Development and characterization of acellular porcine corneal matrix using sodium dodecylsulfate. *Cornea*. 2011 Jan 1;30(1):73-82.

## ДОДАТОК А

1. Шмир СМ, Крамар СБ. Морфологічні зміни рогівки кролів у пізні терміни після моделювання механічної непроникаючої травми рогівки та за умов її корекції децелюляризованою стромою ксенорогівки. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2023;22(2):37-48. DOI: 10.24061/1727-0847.22.2.2023.16

2. Шмир СМ, Кліщ ІМ. Стан клітинної та гуморальної ланок імунної системи кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2023;(2):149-55. DOI: 10.11603/1811-2471.2023.v.i2.13908

3. Шмир СМ, Кліщ ІМ. Цитокіновий статус сироватки крові кролів з механічною непроникною травмою рогівки та корекція з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. Медична та клінічна хімія. 2023;(2):20-5. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2023.i2.13968

4. Шмир СМ, Кліщ ІМ. Стан протеїназо-інгібіторної системи крові кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. Вісник проблем біології і медицини. 2023;3(170):339-48. DOI: 10.29254/2077-4214-2023-3-170-339-348

5. Шмир СМ, Огінська НВ. Субмікроскопічні зміни рогівки при її змодельованій механічній непроникаючій травмі. Шпитальна хірургія. Журнал ім. Л.Я. Ковальчука. 2023;3:69-76.

6. Шмир СМ. Стан клітинної ланки імунної системи у кролів з механічною травмою рогівки та використанні строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, для її корекції. В: Матеріали XXVII Міжнародного медичного конгресу студентів і молодих вчених; 2023 квіт. 10-12; Тернопіль. Тернопіль; 2022. с. 249.

7. Шмир СМ. Показники прозапальних цитокінів у крові кролів з механічною травмою рогівки та використанні строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації для її корекції. В: Матеріали підсумкової LXVI науково-практичної конференції Здобутки клінічної та експериментальної медицини; 2023 черв. 16-17; Тернопіль. Тернопіль, 2023. с. 144.

8. Шмир СМ. Динаміка змін показників ліпідної пероксидації у крові за умови непроникаючої механічної травми рогівки та корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації. В: Матеріали II міжнародної наукової конференції Розвиток наук в умовах нової реальності: проблеми та перспективи; 2023 жовт. 20; Луцьк. Луцьк; 2023. с. 122.

9. Шмир СМ. Застосування строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, для корекції механічної травми рогівки. В: Матеріали III міжнародної наукової конференції Стратегічні напрями розвитку науки: фактори впливу та взаємодії; 2023 жовт. 27; Тернопіль. Тернопіль; 2023. с. 201.

## ДОДАТОК Б

### **Відомості про апробацію результатів дисертації:**

- підсумкова LXVI науково-практична конференція «Здобутки клінічної та експериментальної медицини» (м. Тернопіль, 16-17 червня 2023 р.) – *публікація*;
- XXVII Міжнародний медичний конгрес студентів і молодих вчених (м. Тернопіль, 10-12 квітня 2023 р.) – *публікація*;
- II міжнародна наукова конференція «Розвиток наук в умовах нової реальності: проблеми та перспективи» (м. Луцьк, 20 жовтня 2023 р.) – *публікація*;
- III міжнародна наукова конференція «Стратегічні напрями розвитку науки: фактори впливу та взаємодії» (м. Тернопіль, 27 жовтня 2023 р.) – *публікація*.

## ДОДАТОК В.1

«ЗАТВЕРДЖУЮ»

Проректор закладу вищої освіти «науково-педагогічної роботи  
Тернопільського національного медичного  
університету імені І.Я. Горбачевського» МОЗ України  
д-р мед. наук, проф. А.Г. Шульгай  
2023р.



## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Матеріалів наукових досліджень аспірантки Шмир С.М. кафедри патологічної фізіології ТНМУ імені І.Я. Горбачевського в науково-педагогічний процес.

1. **Назва пропозиції для впровадження:** результати дисертаційної роботи на здобуття наукового ступеня доктора філософії «Експериментальне обґрунтування застосування стромі ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації, для корекції механічної травми рогівки»
2. **Ким запропоновано:** Шмир С.М. аспірант кафедри патологічної фізіології ТНМУ ім. І. Я. Горбачевського м.Тернопіль, Майдан Волі І.
3. **Джерела інформації:**
  1. С. М. Шмир, С. Б. Крамар (2023) Морфологічні зміни рогівки кролів у пізні термини після моделювання механічної непроникаючої травми рогівки та за умов її корекції децелюляризованою стромі ксенорогівки. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія* – Т. 22, (2) 37-48. DOI: 10.24061/1727-0847.22.2.2023.16
  2. Шмир, С. М., & Кліш, І. М. (2023). Стан клітинної та гуморальної ланок імунної системи кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням стромі ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*, (2), 149–155. DOI: 10.11603/1811-2471.2023.v.2.13908
  3. Шмир, С. М., & Кліш, І. М. (2023). Цитокиновий статус сироватки крові кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та корекція з використанням стромі ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. *Медицина та клінічна хімія*, (2), 20–25. DOI: 10.11603/med.2410-681X.2023.v2.13968
  4. Шмир С.М., Кліш І. М.(2023) Стан протеїназо-інгібіторної системи крові кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням стромі ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. *Вісник проблем біології і медицини* - № 3 (170), С. 339–348. DOI: 10.29254/2077-4214-2023-3-170-339-348
  5. Шмир С.М., Огіньська Н.В.(2023). Субмікроскопічні зміни рогівки при її змодельованій механічній непроникаючій травмі. *Шпитальна хірургія Журнал ім.Л.Я. Ковалюка* - № 3, С.69-76.
4. **Де впроваджено:** кафедра отоларингології, офтальмології та нейрохірургії національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України.
5. **Форма впровадження:** науково-педагогічний процес
6. **Результати впровадження:** застосування результатів наукових досліджень Шмир С.М. дозволить розширити наукова знання та методичні підходи щодо корекції механічної травми рогівки за новою технологією, а саме методом децелюляризації, стромі ксенорогівки свині.
7. **Зауважень та пропозицій :** немає.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри отоларингології, офтальмології та нейрохірургії, протокол № 9 від « 27 » 10 2023р.  
Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри отоларингології, офтальмології та нейрохірургії  
Тернопільського національного медичного університету  
Імені І.Я. Горбачевського МОЗ України  
д-р. мед. наук, професор

доц. М.І. Герасименко

О.І Яшан

## ДОДАТОК В.2

**ЗАТВЕРДЖУЮ»**  
 Проректор закладу вищої освіти та науково-педагогічної роботи  
 Тернопільського національного медичного  
 університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України  
 д-р мед. наук, професор А.Г.Шульгай  
 2023р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Матеріалів наукових досліджень аспірантки Шмир С.М. кафедри патологічної фізіології ТНМУ імені І.Я. Горбачевського в науково-педагогічний процес.

1. **Назва пропозиції для впровадження:** результати дисертаційної роботи на здобуття наукового ступеня доктора філософії «Експериментальне обґрунтування застосування строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації, для корекції механічної травми рогівки»
2. **Ким запропоновано:** Шмир С.М. аспірант кафедри патологічної фізіології ТНМУ ім. І. Я. Горбачевського м.Тернопіль, Майдан Волі І.
3. **Джерела інформації:**
  1. С. М. Шмир, С. Б. Крамар (2023) Морфологічні зміни рогівки кролів у пізні терміни після моделювання механічної непроникаючої травми рогівки та за умов її корекції децелюляризованою стромою ксенорогівки. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія* – Т. 22, (2) 37-48. DOI: 10.24061/1727-0847.22.2.2023.16
  2. Шмир, С. М., & Кліш, І. М. (2023). Стан клітинної та гуморальної ланок імунної системи кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*, (2), 149–155. DOI: [10.11603/1811-2471.2023.v.i2.13908](https://doi.org/10.11603/1811-2471.2023.v.i2.13908)
  3. Шмир, С. М., & Кліш, І. М. (2023). Цитокиновий статус сироватки крові кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та корекція з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. *Медицина та клінічна хімія*, (2), 20–25. DOI: [10.11603/mcch.2410-681X.2023.i2.13968](https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2023.i2.13968)
  4. Шмир С.М., Кліш І. М.(2023) Стан протеїназо-інгібіторної системи крові кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. *Вісник проблем біології і медицини* - № 3 (170), С. 339–348. DOI: [10.29254/2077-4214-2023-3-170-339-348](https://doi.org/10.29254/2077-4214-2023-3-170-339-348)
  5. Шмир С.М., Огінецька Н.В.(2023). Субмікроскопічні зміни рогівки при її змодельованій механічній непроникаючій травмі. *Штитазьна хірургія. Журнал ім.Л.Я. Ковальчука* - № 3, С.69-76.
6. **Де впроваджено:** кафедра фізіології з основами біотетики та біобезпеки національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України.
7. **Форма впровадження:** науково-педагогічний процес
8. **Результати впровадження:** застосування результатів наукових досліджень Шмир С.М. дозволить розширити науковий знання та методичні підходи щодо корекції механічної травми рогівки за новою технологією, а саме методом децелюляризації, строми ксенорогівки свині.
9. **Зауважень та пропозицій :** немає.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри фізіології з основами біотетики та біобезпеки, протокол № 11 від « 2 » листопада 2023р

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри фізіології з основами біотетики та біобезпеки  
 Тернопільського національного медичного університету  
 імені І.Я. Горбачевського - МОЗ України  
 д-р. мед. наук, професор

  
 С.Н. Вадюк

## ДОДАТОК В.3


  
 «ЗАТВЕРДЖУЮ»  
 Проректор закладу вищої освіти з науково-педагогічної роботи  
 Тернопільського національного медичного  
 університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України  
 д-р мед.наук, проф. А.Ф. Шельгай  
 « 01 » 2023р.

## АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

Матеріалів наукових досліджень аспірантки Шмир С.М. кафедри патологічної фізіології ТНМУ імені І.Я. Горбачевського в науково-педагогічний процес.

1. **Назва пропозиції для впровадження:** результати дисертаційної роботи на здобуття наукового ступеня доктора філософії «Експериментальне обґрунтування застосування стромы ксенорогівки, отриманої методом денудляризації, для корекції механічної травми рогівки»
2. **Ким запропоновано:** Шмир С.М. аспірант кафедри патологічної фізіології ТНМУ ім. І. Я. Горбачевського м.Тернопіль, Майдан Волі 1.
3. **Джерела інформації:**
  1. С. М. Шмир, С. Б. Крамар (2023) Морфологічні зміни рогівки кролів у пізні терміни після моделювання механічної непроникаючої травми рогівки та за умов її корекції денудляризованою стромою ксенорогівки. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія* – Т. 22, (2) 37-48. DOI: 10.24061/1727-0847.22.2.2023.16
  2. Шмир, С. М., & Кліш, І. М. (2023). Стан клітинної та гуморальної ланок імунної системи кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням стромы ксенорогівки, отриманої методом денудляризації. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*, (2), 149–155. DOI: 10.11603/1811-2471.2023.v.i2.13908
  3. Шмир, С. М., & Кліш, І. М. (2023). Цитокіновий статус сироватки крові кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та корекція з використанням стромы ксенорогівки, отриманої методом денудляризації. *Медицина та клінічна хімія*, (2), 20–25. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2023.i2.13968
  4. Шмир С.М., Кліш І. М.(2023) Стан протеїназо-інгібіторної системи крові кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням стромы ксенорогівки, отриманої методом денудляризації. *Вісник проблем біології і медицини* - № 3 (170), С. 339-348. DOI: 10.29254/2077-4214-2023-3-170-339-348
  5. Шмир С.М., Огіньська Н.В.(2023). Субмікроскопічні зміни рогівки при її змодельованій механічній непроникаючій травмі. *Шпитальна хірургія Журнал ім.Л.Я. Ковальчука* - № 3, С.69-76.
4. **Де впроваджено:** кафедра гістології та ембріології національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України.
5. **Форма впровадження:** науково-педагогічний процес
6. **Результати впровадження:** застосування результатів наукових досліджень Шмир С.М. дозволить розширити наукові знання та методичні підходи щодо корекції механічної травми рогівки за новою технологією, а саме методом денудляризації, стромы ксенорогівки свині.
7. **Зауважень та пропозицій :** немає.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри гістології та ембріології, протокол № 9 від « 01 » лютого 2023р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувачка кафедри гістології та ембріології  
 Тернопільського національного медичного університету  
 імені І.Я. Горбачевського МОЗ України  
 д-р. біол. наук, професорка



З.М. Небесна



## ДОДАТОК В.4

**«ЗАТВЕРДЖУЮ»**

Проректор закладу вищої освіти з науково-педагогічної роботи  
Тернопільського національного медичного  
університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України  
д-р мед.наук, проф. *А.І. Шмель*  
«*23*» *листопада* 2023р.


**АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ**

Матеріалів наукових досліджень аспірантки Шмир С.М., кафедри патологічної фізіології ТНМУ імені І.Я. Горбачевського в науково-педагогічний процес.

1. **Назва пропозиції для впровадження:** результати дисертаційної роботи на здобуття наукового ступеня доктора філософії «Експериментальне обґрунтування застосування стромни ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації, для корекції механічної травми рогівки»
2. **Ким запропоновано:** Шмир С.М., аспірант кафедри патологічної фізіології ТНМУ ім. І. Я. Горбачевського м. Тернопіль, Майдан Волі І.
3. **Джерела інформації:**
  1. С. М. Шмир, С. Б. Крамар (2023) Морфологічні зміни рогівки кролів у пізні терміни після моделювання механічної непроникаючої травми рогівки та за умов її корекції децелюляризованою стромою ксенорогівки. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія* – Т. 22, (2) 37-48. DOI: 10.24061/1727-0847.22.2.2023.16
  2. Шмир, С. М., & Кліш, І. М. (2023). Стан клітинної та гуморальної ланок імунної системи кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням стромни ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*, (2), 149–155. DOI: 10.11603/1811-2471.2023.v.i2.13908
  3. Шмир, С. М., & Кліш, І. М. (2023). Цитокіновий статус сироватки крові кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та корекція з використанням стромни ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. *Медицина та клінічна хімія*, (2), 20–25. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2023.i2.13968
  4. Шмир С.М., Кліш І. М.(2023) Стан протеїназо-інгібіторної системи крові кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням стромни ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. *Вісник проблем біології і медицини* - № 3 (170), С. 339–348. DOI: 10.29254/2077-4214-2023-3-170-339-348
  5. Шмир С.М., Огіньська Н.В.(2023). Субмікроскопічні зміни рогівки при її змодельованій механічній непроникаючій травмі. *Штитовидна хірургія. Журнал ім.Л.Я. Ковальчука* - № 3, С.69-76.
4. **Де впроваджено:** кафедра функціональної та лабораторної діагностики національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України.
5. **Форма впровадження:** науково-педагогічний процес
6. **Результати впровадження:** застосування результатів наукових досліджень Шмир С.М. дозволить розширити наукова знання та методичні підходи щодо корекції механічної травми рогівки за новою технологією, а саме методом децелюляризації стромни ксенорогівки свині.
7. **Зауважень та пропозицій:** немає.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри функціональної та лабораторної діагностики, протокол № 9 від «23» листопада 2023р.

Відповідальний за впровадження: *проф. Кришницька І.Я.*

Завідувачка кафедри функціональної та лабораторної діагностики  
Тернопільського національного медичного університету  
Імені І.Я. Горбачевського МОЗ України  
д-р. мед. наук, професорка



І.Я. Кришницька

## ДОДАТОК В.5



Проректор закладу вищої освіти з науково-педагогічної роботи  
Тернопільського національного медичного  
університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України  
д-р мед.наук, проф. О.Е. Шульгай  
« 28 » жовтня 2023р.

## АКТ ВИПРОВАДЖЕННЯ

Матеріалів наукових досліджень аспірантки Шмир С.М. кафедри патологічної фізіології ТНМУ імені І.Я. Горбачевського в науково-педагогічний процес.

1. **Назва пропозиції для впровадження:** результати дисертаційної роботи на здобуття наукового ступеня доктора філософії «Експериментальне обґрунтування застосування стромы ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації, для корекції механічної травми рогівки»
2. **Ким запропоновано:** Шмир С.М. аспірант кафедри патологічної фізіології ТНМУ ім. І. Я. Горбачевського м. Тернопіль, Майдан Волі 1.
3. **Джерела інформації:**
  1. С. М. Шмир, С. Б. Крамар (2023) Морфологічні зміни рогівки кролів у пізні терміни після моделювання механічної непроникаючої травми рогівки та за умов її корекції децелюляризованою стромою ксенорогівки. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія* – Т. 22, (2) 37-48. DOI: 10.24061/1727-0847.22.2.2023.16
  2. Шмир, С. М., & Кліш, І. М. (2023). Стан клітинної та гуморальної ланок імунної системи кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням стромы ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. *Здобутки клінічної і експериментальної медицини*, (2), 149–155. DOI: [10.11603/1811-2471.2023.v.2.13908](https://doi.org/10.11603/1811-2471.2023.v.2.13908)
  3. Шмир, С. М., & Кліш, І. М. (2023). Цитокиновий статус сироватки крові кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та корекція з використанням стромы ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. *Медицина та клінічна хімія*, (2), 20–25. DOI: [10.11603/mcch.2410-681X.2023.i2.13968](https://doi.org/10.11603/mcch.2410-681X.2023.i2.13968)
  4. Шмир С.М., Кліш І. М.(2023) Стан протеїназо-інгібіторної системи крові кролів з механічною непроникаючою травмою рогівки та за її корекції з використанням стромы ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації. *Вісник проблем біології і медицини* - № 3 (170), С. 339-348. DOI: 10.29254/2077-4214-2023-3-170-339-348
  5. Шмир С.М., Огіньська Н.В.(2023). Субмікроскопічні зміни рогівки при її змодельованій механічній непроникаючій травмі. *Штатська хірургія. Журнал ім.Л.Я. Ковальчука* - № 3, С.69-76.
4. **Де впроваджено:** кафедра патологічної фізіології національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України.
5. **Форма впровадження:** науково-педагогічний процес
6. **Результати впровадження:** застосування результатів наукових досліджень Шмир С.М. дозволить розширити наукова знання та методичні підходи щодо корекції механічної травми рогівки за новою технологією, а саме методом децелюляризації, стромы ксенорогівки свині.
7. **Зауважень та пропозицій :** немає.

Обговорено та затверджено на засіданні кафедри патологічної фізіології, протокол № 9 від « 31 » жовтня 2023р.

Відповідальний за впровадження:

Завідувачка кафедри патологічної фізіології  
Тернопільського національного медичного університету  
Імені І.Я. Горбачевського МОЗ України  
д-р. мед. наук, професорка

О.В. Денефіль