

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ

Кваліфікаційна наукова праця
на правах рукопису

Шупик Олександр Васильович

УДК 602:639.09:617.7: 636.09

ДИСЕРТАЦІЯ

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ЗМІНИ В УШКОДЖЕНИХ ТКАНИНАХ
ОКА ТВАРИН ТА АКТИВНІСТЬ РЕПАРАТИВНИХ ПРОЦЕСІВ ЗА
ВПЛИВУ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН

16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин»
(ветеринарні науки)

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата наук

Дисертація містить результати власних досліджень.
Використання ідей, результатів і текстів інших авторів мають посилання на
відповідне джерело О. В. Шупик

Науковий керівник:
Мазуркевич Анатолій Йосипович,
доктор ветеринарних наук, професор,
академік НААН України,
Заслужений діяч науки і техніки України

Київ -2021

АНОТАЦІЯ

Шупик О. В. Морфофункціональні зміни в ушкоджених тканинах ока тварин та активність репаративних процесів за впливу стовбурових клітин. – Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук за спеціальністю 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин» – Національний університет біоресурсів і природокористування України, Київ, 2021.

В дисертації експериментально обґрунтовано вплив алогенних мезенхімних стовбурових клітин та застосування техніки поширової трансплантації амніотичної оболонки на перебіг репаративних процесів у оці кролів за експериментального увеїту/кератиту, а також у собак за спонтанного походження.

Дисертаційна робота виконувалась як складова частина науково-дослідних робіт навчально-наукової лабораторії «Центр клітинних технологій у ветеринарній медицині» (кафедра хірургії та патофізіології імені академіка І. О. Поваженка) Національного університету біоресурсів і природокористування України за темою №:110/3 – пр. – 2018 «Розробити нові способи стимуляції процесів відновлення ушкоджених тканин опорно-рухового апарату домашніх тварин методами клітинної терапії» (номер державної реєстрації 0118U000307, 2018–2020 рр.).

В досліджах використано 90 кролів породи Шиншила віком 3,5 місяця з масою тіла в середньому 2,5–3 кг, а також 10 собак із спонтанним увеїтом/кератитом. Умови утримання дослідних тварин та використання їх в експериментах відповідали вимогам чинних вітчизняних нормативно-правових документів та Директиви №2010/63/ЄС «Про захист тварин, що використовуються з науковою метою».

Експериментальний увеїт/кератит у кролів моделювали УФ лампою ДРТ-240 довгохвильовими променями UVA та інсталяцією патогенного штаму *Staphylococcus aureus* 105 КУО в 1 мл на пошкоджене око. Було проведено

чотири серії досліджень. Перша серія досліджень тварин із експериментальним увеїтом, яких розподілили на сім дослідних груп. Тваринам першої групи застосовували одноразове введення 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в тенонівий простір; тваринам другої дослідної групи проводили одноразове введення 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в субкон'юнктивальний простір; тваринам третьої дослідної групи проводили одноразове введення 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин інтравітреально; тваринам четвертої дослідної групи вводили одноразово 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в передню камеру ока; п'ята дослідна група – традиційне лікування (щоденне закапування гентайну 0,4%, і ципроном 4–6 разів на добу); Крім того, в досліді від початку і до закінчення знаходилась також шоста група кролів – інтактні тварини (група порівняння, загальна група) та нульова контрольна група (загальна група), де застосовували закапування ізотонічного розчину 4–6 разів на добу.

Друга серія досліджень тварини із експериментальним кератитом, яких розподілили на шість дослідних груп. Тваринам першої дослідної групи застосовували техніку пошарової трансплантації амніотичної оболонки; тваринам другої дослідної групи застосовували техніку біологічного покриття амніотичної оболонки; тваринам третьої дослідної групи застосовували екстракт амніотичної оболонки з очною лінзою; тваринам четвертої дослідної групи традиційне лікування (щоденне закапування гентайну 0,4 %, і ципроном 4–6 разів на добу) – загальна група; тваринам п'ятої дослідної групи інтактні тварини (група порівняння, загальна група) та нульова контрольна група (загальна група), де застосовували закапування ізотонічного розчину 4–6 разів на добу.

Третя та четверта серія досліджень проводилась на клінічних випадках в собак, яка характеризувалася виявлення ефективності відновлення функціональної здатності ока за допомогою трансплантованих алогенних

мезенхімальних стовбурових клітин за увеїту та алогенної амніотичної оболонки за кератиту.

На 7, 14, 30 добу досліду тварин із експериментальною патологією ока виводили із досліду шляхом евтаназії, щоб отримати зразки тканин для аналізів.

Упродовж всього періоду досліджень під спостереженням знаходилась група – інтактні тварини, у яких в установлений період також фіксували клінічні показники та відбирали необхідний матеріал для лабораторних досліджень.

Матеріалом для лабораторних досліджень були гістологія та клінічні дослідження (тест Шиммера, біомікроскопія щілинною лампою, флюоресцеїновий тест Зейделя, тонометрія, сонографія). Крім того, для отримання проб зразків тканини ока для морфологічних і гістологічних досліджень із кожної дослідної групи по три тварини виводили із досліду шляхом евтаназії (після глибокого наркотизування). Отримані результати клінічних та лабораторних досліджень реєстрували у спеціальному журналі.

За результатами комплексних досліджень встановлено позитивний вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на відновлення структури і функції ушкодженої тканини ока; вивчені показники клінічних і лабораторних досліджень, які чітко відображають інтенсивність відновлювальних процесів у оці після застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на всіх етапах відновлення її функціональної здатності від вихідного стану (7 доба моделювання експериментального увеїту та кератиту) та впродовж 30 діб після застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин.

Встановлено залежність активності відновлювальних процесів у тварин за експериментального увеїту/кератиту від способу введення мезенхімальних стовбурових клітин. Найвища активність регенеративних процесів за показниками гістологічних та клінічних змін спостерігається після введення мезенхімальних стовбурових клітин безпосередньо в теновний простір, інтравітреально та передню камеру ока; вона нижча ніж введення субкон'юнктивально, а також за традиційного методу лікування.

У кролів контрольної групи після закапування ізотонічного розчину NaCl не призводило до покращення структури ока. Натомість, зареєстровано прогресування мікроскопічних змін в цьому органі.

Використано комплексний підхід щодо використання хірургічних технік трансплантації амніотичної оболонки (пошарової трансплантації, біологічного покриття) та застосування екстракту амніотичної оболонки у формі гелю.

Встановлено, що за експериментального увеїту/кератиту у кролів після введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин взаємності від локалізації патологічного процесу вже на 7 добу відмічається зниження інтенсивності запального процесу, що значно зменшує терміни репаративних процесів в тканинах ока, де на 30 добу спостерігається повне відновлення пошкоджених тканин ока.

Виявлено, що найефективнішим способом регенерації пошкоджених поверхневих шарів рогівки за кератиту у кролів та собак, являється хірургічна техніка біологічного покриття та застосування екстракту гомогенізованої амніотичної оболонки у формі гелю, про що свідчить повна епітелізація поверхні рогівки, де не виявляли клінічних і морфологічних ознак запальної інфільтрації вже на 30 добу.

Відзначено, що відновлювальні процеси найефективніше проходили в групі тварин, яким алогенні мезенхімальні стовбурові клітини вводили безпосередньо в епіцентр запального процесу. Традиційний метод лікування показав достовірно нижчі результати.

У вихідному стані виявлені значні деструктивні зміни в оці, які після трансплантації алогенних мезенхімальних стовбурових клітин поступово зникали, і на 30 добу експерименту структура ока відновлювалась.

Так, у вихідному стані (7 доба моделювання увеїту/кератиту) встановлені виразні зміни мікроскопічної будови кролів, яка зберігала притаманну їй будову.

В стромі значного набряку не спостерігалось, зроговіння верхнього шару не спостерігалось, але зустрічались сегментоядерні лейкоцити, ближче до лімбу

видно колагенові волокна, макрофаги та поодинокі лімфоцити, трохи нижче лімба зібрані в пучок колагенові волокна між якими містились фібробласти.

Вже на сьому добу після введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин відзначали повну епітелізацію поверхні рани. Шар епітелію був нерівномірної товщини і складався з 2–3 шарів епітеліальних клітин, цитоплазма частини яких набрякла. Порушена диференціація епітеліоцитів по верствам передня погранична пластинка, що розташована під покривним епітелієм немає чітких кордонів розмежування, між строною, і місцями має ознаки розслоювання щільної сітки колагенових фібрил, що вказує на запальний процес в середині шарів рогівки ока.

На чотирнадцяту добу при світловій мікроскопії гістологічного препарату, відзначався фокальний набряк строми рогової оболонки і незначний мукоїдний набряк її колагенових пластин. Поверхня рогової оболонки повністю епітелізована. При цьому місцями зберігається витончення епітеліального покриву. В інших місцях відзначається збільшення кількості клітин епітелію до 5–6 шарів. У цих місцях відзначається їх диференціація по шарам і наближення епітеліального шару до нормальної. Ознак запальної інфільтрації рогової оболонки не виявлено. Присутнє збереження набряку строми рогової оболонки, але у меншій кількості тварин і в меншій мірі інтенсивності. Поверхня рогової оболонки повністю покрита шаром епітеліальних клітин.

На тридцяту добу відзначалася повна епітелізація поверхні рани, але при цьому диференціація по шарам була присутня тільки в центральних ділянках рогової оболонки.

Таким чином, за експериментального увеїту/кератиту виникають виразні гістологічні зміни в оці кролів, які призводять до значного порушення функціональної активності клітин та тканини вцілому, оскільки майже не залишається неушкоджених клітин, здатних продукувати та підтримувати сталий баланс нових.

Встановлено, що патогенез спонтанного увеїту/кератиту у собак збігається з патогенезом експериментального увеїту та кератиту в кролів, на що вказують результати дослідження клінічних проявів.

Зокрема в клінічних випробуваннях на 10 собаках (6 – застосування амніотичної оболонки та 4 – введення аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин) віком 3–8 років з середньою масою 10–15 кг. із кератитом/увеїтом досліджували ефективність застосування аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин на відновлення функціонального стану ока.

На тридцять добу після трансплантації аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин собакам за увеїту безпосередньо в тенозовий простір, субкон'юнктивально, інтравітреально та в переню камеру ока в кількості $1,5 \times 10^6$ де найефективніший спосіб був введення в тенозовий простір та впередню камеру ока. Спостерігалась відсутність запального процесу, васкуляризації роівки, помутніння вологи передньої камери ока, яка підтверджувалась ультразвуковою діагностикою та зниженням до фізіологічних параметрів внутрішньоочного тиску. Менш ефективним було введення інтравітреально, де відзначався кон'юнктивальний набряк та помітна васкуляризація і субкон'юнктивальний – відображались зміни покращень незначні порівняно з методом в тенозовий простір та впередню камеру ока і традиційним методом лікуванням.

За кератиту у собак доведена ефективність застосування екстракту амніотичної оболонки у формі гелю в порівнянні з традиційним методом, що був достовірно ефективніший, який може використовуватися, як основний або допоміжний матеріал при лікування важких патології ока спонтанного характеру.

Клінічне випробування ефективності досліджуваного методу клітинної терапії з використанням аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин в собак за кератитів/увеїтів підтвердив результати експериментальних досліджень на кролях.

За результатами імунологічних досліджень в різних фазах запального процесу в оці не відмічались зміни зниження чи підвищення рівня імуноглобулінів відносно фізіологічних показників до та після введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в тканинах ока, що підтверджує відсутність будь-яких алергічних реакцій.

Таким чином, у дослідах на собаках із клінічними проявами та експериментальними проявами увеїту/кератиту у кролів застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин стимулювало відновлення структурнофункціонального стану ока тварини, що підтверджується клінічними ознаками до і після введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин та ще гістологічними за експериментальної патології ока в кролів.

Ключові слова: алогенні мезенхімні стовбурові клітини, око, амніотична оболонка, кон'юктива, васкуляризація рогівки, гіперемія кон'юктиви, гіфема, тонометрія, запальна інфільтрація, сонографія.

ANNOTATION

Shupyk O. V. Morphofunctional changes in damaged tissues of the eye of animals and the activity of reparative processes under the influence of stem cells.
- Qualifying scientific work on the rights of the manuscript.

The dissertation on competition of a scientific degree of the candidate of veterinary sciences on a specialty 16.00.02 "Pathology, oncology and morphology of animals" – National university of bioresources and nature management of Ukraine, Kiev, 2021.

In the dissertation the influence of allogeneic mesenchymal stem cells on the course of reparative processes in the eye of rabbits with experimental uveitis keratitis, as well as in dogs with spontaneous origin is experimentally substantiated.

The dissertation was performed as an integral part of research work of the educational and scientific laboratory "Center of Cell Technologies in Veterinary Medicine" (Department of Surgery and Pathophysiology named after Academician IO Povazhenko) of the National University of Life and Environmental Sciences of Ukraine on the topic №: 110/3 – pr – 2018 "Develop new ways to stimulate the

recovery of damaged tissues of the musculoskeletal system of domestic animals by methods of cell therapy" (state registration number 0118U000307, 2018 – 2020).

The experiments used 60 rabbits of the Chinchilla breed aged 3.5 months with an average body weight of 2,5–3 kg, as well as 10 dogs with spontaneous uveitis keratitis. Conditions for keeping experimental animals and their use in experiments met the requirements of current domestic regulations and Directive №2010 / 63 / EC "On the protection of animals used for scientific purposes".

Experimental uveitis / keratitis in rabbits was simulated with a UV lamp DRT-240 long-wave UVA rays and installation of the pathogenic strain *Staphylococcus aureus* 105 KUO in 1 ml. on the damaged eye for 7 days. Two series of studies were conducted. The first series of studies of animals with experimental uveitis, which were divided into six experimental groups. Animals of the first group were administered a single injection of 1×10^6 million allogeneic mesenchymal stem cells into the tenon space; animals of the second experimental group were administered a single injection of 1×10^6 million allogeneic mesenchymal stem cells into the subconjunctival space; animals of the third experimental group were administered a single injection of 1×10^6 million allogeneic mesenchymal stem cells intravitreal; animals of the fourth experimental group were injected once 1×10^6 million allogeneic mesenchymal stem cells in the anterior chamber of the eye; the fifth experimental group - traditional treatment (daily instillation of Gentiline 0,4 %, and cipronorm 4–6 times a day); In addition, in the experiments from beginning to end there was also a sixth group of rabbits - intact animals (comparison group) and zero control group, which used instillation of isotonic solution 4–6 times a day.

The second series of studies of animals with experimental keratitis, which were divided into five experimental groups. Animals of the first group used the technique of layer-by-layer transplantation of the amniotic membrane; animals of the second experimental group used the technique of biological coating of the amniotic membrane; animals of the third experimental group used amniotic membrane extract with an eye lens; animals of the fourth experimental traditional treatment (daily instillation of 0,4 % gentiline, and cipronorm 4–6 times a day); animals of the fifth

experimental group intact animals (comparison group) and the zero control group, which used instillation of isotonic solution 4–6 times a day.

The third and fourth series of studies were performed on clinical cases in dogs, which was characterized by elucidation of the effectiveness of restoring the functional capacity of the eye with transplanted allogeneic mesenchymal stem cells for uveitis and allogeneic amniotic membrane for keratitis.

On days 7, 14, and 30 of the experiment, animals with experimental eye pathology were removed from the experiment by euthanasia to obtain tissue samples for analysis.

It was found that the activity of regenerative processes in animals with experimental keratitis / uveitis depends on the method of introduction of mesenchymal stem cells. The highest activity of regenerative processes in terms of sonographic research methods, slit light biomicroscopy and tonometry, which are confirmed histologically observed for introduction into the anterior chamber of the eye and into the tenon space for anterior uveitis. Slightly lower activity of regenerative processes in the tissues of the anterior chamber of the eye was observed with intravitreal and subconjunctival administration, and the lowest - with traditional treatment. It was found that in experimental uveitis / keratitis in rabbits after the introduction of allogeneic mesenchymal stem cells, depending on the localization of the pathological process for 7 days there is a decrease in the intensity of the inflammatory process, which significantly reduces the duration of reparative processes in eye tissues, where 30 days eye.

The influence of allogeneic mesenchymal stem cells on the activity of regenerative processes in the eyes of rabbits and dogs has been established; the dependence of the effectiveness of allogeneic mesenchymal stem cells on the method of their introduction (tenon space, subconjunctival, intravitreal, anterior chamber of the eye) was tested. A comprehensive approach to the use of surgical techniques of amniotic membrane transplantation (layer-by-layer transplantation, biological coating) and the use of amniotic membrane extract in the form of a gel is used. Changes in the eye of rabbits in experimental and spontaneous course in dogs with

uveitis / keratitis on indicators (Schimmer test, biomicroscopy with a slit lamp, fluorescein Seidel test, tonometry, sonography) and macroscopic and histological changes in the eye, which allowed to obtain results all stages of reparative regeneration. The effectiveness of allogeneic mesenchymal stem cell transplantation by methods (tenon space, subconjunctival, intravitreal, anterior chamber of the eye) was studied for the first time.

Throughout the study period, a group of intact animals was observed, in which clinical parameters were also recorded during the established period and the necessary material was selected for laboratory tests.

The material for laboratory tests were histology and clinical studies (Schimmer test, slit lamp biomicroscopy, fluorescent Seidel test, tonometry, sonography). In addition, to obtain samples of eye tissue samples for morphological and histological studies from each experimental group, three animals were removed from the experiment by euthanasia (after deep anesthesia). The results of clinical and laboratory studies were recorded in a special journal.

According to the results of complex studies, a positive effect of allogeneic mesenchymal stem cells on the restoration of the structure and function of damaged eye tissue; studied indicators of clinical and laboratory studies that clearly reflect the intensity of regenerative processes in the eye after the use of halogen mesenchymal stem cells at all stages of recovery of its functional capacity from baseline (7 days of modeling experimental uveitis and keratitis) and for 30 days after allogeneic mesenchyme .

The dependence of the activity of regenerative processes in animals with experimental uveitis / keratitis on the method of introduction of mesenchymal stem cells was established. The highest activity of regenerative processes in terms of histological and clinical changes is observed after the introduction of mesenchymal stem cells directly into the tenon space, subconjunctival, intravitreal and anterior chamber of the eye; it is lower than subconjunctival administration as well as traditional treatment.

In rabbits of the control group after the introduction (instillation) of isotonic NaCl solution did not improve the structure of the eye. Instead, progression of microscopic changes in this organ has been registered.

A comprehensive approach to the use of surgical techniques of amniotic membrane transplantation (layer-by-layer transplantation, biological coating) and the use of amniotic membrane extract in the form of a gel is used.

It was found that in experimental uveitis / keratitis in rabbits after the introduction of allogeneic mesenchymal stem cells, depending on the localization of the pathological process for 7 days there is a decrease in the intensity of the inflammatory process, which significantly reduces the duration of reparative processes in eye tissues, where 30 days eye.

It was found that the most effective way to regenerate the damaged surface layers of the cornea with keratitis in rabbits and dogs is a surgical technique of biological coating and application of homogenized amniotic membrane extract in the form of a gel, as evidenced by complete epithelization of the corneal surface for 30 days.

It was noted that the regenerative processes were most effective in the group of animals to which allogeneic mesenchymal stem cells were injected directly into the epicenter of the inflammatory process. The traditional method of treatment showed significantly lower results.

At baseline, significant destructive changes in the eye were detected, which gradually disappeared after transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells, and on the 30th day of the experiment, the structure of the eye was restored.

Thus, in the initial state (7 days of modeling uveitis / keratitis) there were clear changes in the microscopic structure of rabbits, which retained its inherent structure. No significant edema was observed in the stroma, keratinization of the upper layer was not observed, but segmental leukocytes were found, collagen fibers, macrophages and single lymphocytes were seen closer to the limb, collagen fibers between fibroblasts were collected in a bundle just below the limb.

Already on the seventh day after the introduction of allogeneic mesenchymal stem cells noted complete epithelialization of the wound surface. The epithelial layer was of uneven thickness and consisted of 2–3 layers of epithelial cells, the cytoplasm of which was swollen. Impaired epitheliocyte differentiation by layers of the anterior border plate, located under the integumentary epithelium, there are no clear boundaries between the stroma, and in places has signs of stratification of a dense network of collagen fibrils, indicating an inflammatory process in the middle layers of the cornea.

On the fourteenth day under light microscopy of the histological preparation, there was focal edema of the stroma of the cornea and a slight mucoid edema of its collagen plates. The surface of the cornea is completely epithelialized. At the same time thinning of an epithelial cover remains in places. Elsewhere, there is an increase in the number of epithelial cells to 5–6 layers. In these places their differentiation on layers and approach of an epithelial layer to normal is noted. No signs of inflammatory infiltration of the cornea were detected. There is a preservation of edema of the stroma of the cornea, but in fewer animals and to a lesser extent. The surface of the cornea is completely covered with a layer of epithelial cells.

On the thirtieth day there was complete epithelialization of the wound surface, but the differentiation by layers was present only in the central areas of the cornea.

Thus, in experimental uveitis / keratitis there are pronounced histological changes in the eye of rabbits, which lead to a significant violation of the functional activity of cells and tissue as a whole, as there are almost no intact cells capable of producing and maintaining a constant balance of new ones.

It was found that the pathogenesis of spontaneous uveitis / keratitis in dogs coincides with the pathogenesis of experimental uveitis and keratitis in rabbits, as indicated by the results of the study of clinical manifestations.

In particular, in clinical trials on 10 dogs (6 - the use of the amniotic membrane and 4 – the introduction of allogeneic mesenchymal stem cells) aged 3–8 years with an average weight of 10–15 kg. with keratitis / uveitis investigated the effectiveness of allogeneic mesenchymal stem cells to restore the functional state of the eye.

On the thirtieth day after transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells in dogs with uveitis directly into the tenon space, subconjunctival, intravitreal and into the pen of the eye chamber in the amount of $1,5 \times 10^6$ where the most effective method was introduction into the tenon space and the anterior chamber of the eye. There was no inflammatory process, corneal vascularization, turbidity of the anterior chamber of the eye, which was confirmed by ultrasound diagnosis and reduction to physiological parameters of intraocular pressure. Intravitreal administration was less effective, with conjunctival edema and marked vascularization and subconjunctival, with no slight improvement compared to the tenon space and anterior chamber and traditional treatment.

Keratitis in dogs has proven the effectiveness of using amniotic membrane extract in the form of a gel in comparison with the traditional method, which was significantly more effective, which can be used as a primary or auxiliary material in the treatment of severe spontaneous eye pathology.

A clinical trial of the efficacy of the studied method of cell therapy using allogeneic mesenchymal stem cells in dogs with keratitis / uveitis confirmed the results of experimental studies in rabbits.

According to the results of immunological studies in different phases of the inflammatory process in the eye there were no changes in the decrease or increase in immunoglobulin levels relative to physiological parameters before and after the introduction of allogeneic mesenchymal stem cells in eye tissues, which confirms the absence of any allergic reactions.

Thus, in experiments on dogs with clinical manifestations and experimental manifestations of uveitis / keratitis in rabbits, the use of allogeneic mesenchymal stem cells stimulated the restoration of the structural and functional state of the animal's eye, as evidenced by clinical signs before and after administration of allogeneic mesenchymal stem cells. rabbits.

Key words: allogeneic mesenchymal stem cells, eye, amniotic membrane, conjunctiva, corneal vascularization, conjunctival hyperemia, hyphema, tonometry, inflammatory infiltration, sonography.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України,

у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних

1. **Шупик О. В.**, Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Бокотько Р. Р., Данілов В. Б. Морфофункціональні зміни в тканинах рогівки ока тварин за наявності дегенеративних процесів та їх корекція за допомогою стовбурових клітин, які містяться в амніотичній мембрані. Вісник сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». 2018. Випуск 11. № 43. С. 40–45. *(Здобувачем проведено дослідження, підготовлено матеріали для статті).*

2. **Шупик О. В.**, Мазуркевич А. Й., Бокотько Р. Р., Дудус Т. В. Ефективність застосування різних технік трансплантації амніотичної оболонки за дегетивних процесів рогівки. Теорія і практика у ветеринарній медицині. 2020. Вип. 8. № 3. С. 219–225. *(Здобувачем проведено аналіз наукових джерел з проблеми досліджень).*

3. **Шупик О. В.**, Мазуркевич А. Й., Бокотько Р. Р. Моделювання експериментального кератиту та увеїту Теорія і практика у ветеринарній медицині. 2020. Вип. 8. № 4. С. 276–282 *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, підготовлено матеріали для публікації).*

4. **Shupyk O. V.**, Masurkevych A. Y., Bokotko R. R., Savchuk T. L., Pasnichenko O. S., Krystyniak Y. M. The effectiveness of amniotic membrane depending on the cause of corneal damage in dogs. Ukrainian journal of veterinary sciences. 2020. Vol. 11. № 4. P.132-145 *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, підготовлено матеріали для публікації).*

5. **Шупик О. В.**, Мазуркевич А.Й., Бокотько Р. Р., Савчук Т. Л., Данілов В. Б., Кладницька Л. В., Харкевич Ю. О., Пасніченко О. С., Р. С. Благий, Н. І. Граборенко, Ю. М. Кристиняк. Ефективність застосування мезенхімальних стовбурових клітин за увеїту в собак, в залежності від способу їх введення. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології

тварин. 2021. Вип. 2. № 1. С. 222–233. *(Здобувачем проведено дослідження, підготовлено матеріали для статті).*

**Стаття у науковому виданні,
включеному до міжнародної наукометричної бази даних Scopus**

6. Nemtinov P., Ustymenko A., Lobyntseva G., Panchenko L., **Shupyk O.**, Sokolov M., Salyutin R., Palianytsia S. Optimization of the selection criteria for cord blood units for transplantation in recipients of the different age groups. Cell and Organ Transplantology. 2020; 8(2):in press. DOI: 10.22494/cot.v8i2.114. Посилання на сайт: <http://transplantology.org/2020-8-2-en/article-06/>. *(Здобувачем проведено аналіз наукових джерел з проблеми досліджень).*

Патент України на корисну модель

7. **Шупик О. В.**, Мазуркевич А. Й., Харкевич Ю. О., Бокотько Р. Р., Пасніченко О. С., Данілов В. Б. Патент України на корисну модель № 139673 МПК А61D1/00 (2020.01). Спосіб відновлення рогівки ока у собак та котів за ерозій, виразок, та хімічних опіків, за допомогою амніотичної оболонки плода; заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. № у 201907514; заявлено 05.07.2019; опубліковано 10.01.2020. Бюл. № 1. *(Здобувачем взято участь у розробленні принципу корисної моделі, проведено експериментальні дослідження, підготовлено матеріали до патентування).*

8. **Шупик О. В.**, Мазуркевич А. Й., Харкевич Ю. О., Бокотько Р. Р., Пасніченко О. С., Данілов В. Б. Патент України на корисну модель № 141623 МПК А61K35/545 (2020.01). Спосіб застосування мезенхімальних стовбурових клітин для репаративних процесів ока у собак та котів за різного перебігу увеїту; заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. № у 201908123; заявлено 15.07.2019; опубліковано 27.04.2020. Бюл. № 8. *(Здобувачем взято участь у розробленні принципу корисної моделі, проведено експериментальні дослідження, підготовлено матеріали до патентування).*

Тези наукових доповідей:

9. Шупик О. В. Репаративні процеси в ушкоджених тканинах ока за впливу стовбурових клітин. Науково-практична конференція молодих вчених. Стан і перспективи розвитку та інновації в тваринництві, актуальні питання ветеринарної медицини:, м. Новомосковськ, 25 квітня 2018 року: тези доповідей. Н. 2018. С 125. *(Здобувачем проведено дослідження на кролях, здійснено аналіз результатів, підготовлено тези до друку).*

10. Шупик О. В. Застосування стовбурових клітин в тварин за увеїту. Конференція підготовка фахівців ветеринарної медицини. Практична складова. смт. Немішаєве, ВСП «Немішаєвський агротехнічний коледж» НУБіП України 30-31 травня 2018 року: тези доповідей. Н., 2018. С. 119. *(Здобувачем проведено дослідження на кролях, здійснено аналіз результатів, підготовлено тези до друку).*

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ.....	16
ВСТУП.....	18
РОЗДІЛ 1 ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ.....	25
1.1. Увеїт та кератит у тварин.....	25
1.1.1. Патогенез увеїту та кератиту.....	28
1.1.2. Етіологія увеїту та кератиту.....	31
1.1.3. Основні клінічні симптоми і синдроми увеїту та кератиту.....	39
1.1.4. Сучасні методи лікування кератиту та увеїту.....	50
1.2. Стовбурові клітини <i>in vivo</i> , <i>in vitro</i> та після трансплантації.....	54
1.3. Висновки до розділу 1	63
РОЗДІЛ 2 ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	64
2.1. Висновки до розділу 2.....	77
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ.....	78
3.1. Динаміка основних клінічних показників за експериментального увеїту та кератиту.....	78
3.1.1. Моделювання експериментального увеїту та кератиту у кролів.....	79
3.1.2. Особливості змін мікроскопічної структури тканин ока за експериментального кератиту та увеїту у кролів.....	98
3.1.3. Застосування амніотичної оболонки у тварин за експериментального кератиту.....	108
3.1.4. Дослідження ефективності трансплантації амніотичної оболонки в залежності від складності патологічного процесу за клінічних випадків кератиту у собак.....	119

3.1.5. Ефективність трансплантованих алогенних мезенхімальних стовбурових клітин за різних методів введення та імунна відповідь на їх застосування.....	128
3.2. Висновки до розділу 3.....	139
РОЗДІЛ 4 АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ.....	141
ВИСНОВКИ.....	148
ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ.....	151
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	152
ДОДАТКИ.....	177

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, ОДИНИЦЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

RADWAG – ваги електронні лабораторні

в/в – внутрішньовенно

АО –амніотична оболонка

в/м – внутрішньом'язово

г. – грам

ГСК – гемопоетичні стовбурові клітини

КМ – кістковий мозок

КРТ – клітинно-регенеративна терапія

мл. – мілілітр

МО – міжнародні одиниці

МСК – мезенхімні стовбурові клітини

АМСК – алогенні мезенхімальні стовбурові клітини

Середовище ДМЕМ – середовище Ігла модифіковане Дюльбекко

СК – стовбурові клітини

СНР – стан навколишньої рогівки

САМ – стан амніотичної мем брани

Ек. А О – екстракт амніотичної оболонки

ЕМСК – ембріональні мезенхімальні стовбурові клітини

ФБР – фосфатно буферний розчин

ФТ – флуоресцеїновий тест

УЗД – ультразвукова діагностика або сонографія

ЧКМ – червоний кістковий мозок

СК – стан кон'юнктиви

Вид-к – виділення в кон'юнктивальній порожнині

Н-ст-р – набряк строми рогівки

З-І – запальна інфільтрація

РОГ – стан навколишньої рогівки

БП – техніка біологічного покриття

П. тр – техніка пошарової трансплантації

ЩЛ – щілинна лампа

Т– тонометрія

Г– гіфема

ГК– гіперемія кон'юктиви

Реф. – рефлекс

Пом. СТ – помутніння склоподібного тіла

В. Екс – внутрішня ексудація

ПСО – потовщення судинної оболонки

ФТ – флюоресциїновий тест

Т– тонометрія

ВИД – виділення в кон'юнктивальній порожнині

ПОМ – помутніння рогівки

ВАС – васкуляризація рогівки

ТШ – тест Шиммера

in vitro – біологічний процес, який відбувається поза організмом

in vivo – біологічний процес, який відбувається в організмі

ВСТУП

Актуальність теми. Використання досягнень біотехнології для підвищення ефективності лікування тварин за хвороб очей різного походження одне із найперспективніших завдань ветеринарної науки і практики. Якісно новим вирішенням проблеми репаративних процесів у оці тварин є використання диференційованих чи недиференційованих клітин аутологічного або алогенного походження, отриманих з використанням клітинних технологій. У літературі наведено результати експериментальних досліджень щодо лікування тварин за аутоімунного увеїту та кератиту шляхом трансплантації алогенних мезенхімальних стовбурових клітин [68, 69, 70, 71, 72, 73].

Увеїти та кератити – це поширені захворювання, небезпечні через втрату зору очей, так, як і кератити, що включають кілька гетерогенних клінічних видів. Поширеність різних видів увеїту та кератиту залежить від багатьох чинників, таких як вік, стать, географічний розподіл, вплив навколишнього середовища, генетика та звички домашніх улюбленців. Епідеміологічне дослідження увеїтів та кератитів необхідне для розуміння етіології та імунопатогенезу цих груп захворювань. Захворюваність і поширеність увеїтів та кератитів відрізняються залежно від етіології (інфекційна, неінфекційна), віку, статі, анатомічного розміщення запального процесу (передній, середній, задній увеїт, панувеїт), гістопатології (гранулематозний, негранулематозний), типу запального процесу (гострий, хронічний, рецидивуючий). Поширеність відрізняється за географічним розташуванням. Інфекційна етіологія увеїтів є поширеною серед собак та котів. Герпес і токсоплазмоз є провідними етіологічними чинниками увеїту та кератиту. Увеїти неінфекційної етіології, як правило, частіше трапляються в котів чим у собак [36,136,173].

Застосування мезенхімних (мезенхімальних, стромальних) стовбурових клітин у ветеринарній медицині за хвороб очей у тварин базується на достатній науково-методичній базі. Розроблені методи відбору кісткового мозку тварин і виділення з нього фракції моноклеарних клітин з високою проліферативною активністю дозволяють якнайшвидше отримати необхідну кількість

мезенхімних стовбурових клітин та використати їх з метою стимуляції репаративних процесів у патологічно змінених тканинах та органах тварин. [31,39,45].

Встановлено, що останні, завдяки своїм імуномодуючим властивостям і здатності диференціюватися у багатьох напрямках, є найперспективнішим джерелом клітинного матеріалу. [147,148,149]. Разом з тим залишаються мало вивченими питання клінічного використання стовбурових клітин за хвороб очей, не з'ясовано особливості реакції організму реципієнта на введення чужорідних клітин, не визначено дози та шляхи їх введення в кожному конкретному випадку (за увеїту/кератиту), показання та протипоказання до їх застосування. [156,168,171].

З огляду на це, вивчення біологічних властивостей мезенхімних стовбурових клітин за їх культивування та використання для стимуляції репаративних процесів за хвороб очей у тварин є актуальним завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є складовою частиною науково-дослідної роботи кафедри фізіології, патофізіології та імунології тварин (нині – кафедра хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка) Національного університету біоресурсів і природокористування України за темами: «Дослідити особливості коригуючої дії введених стовбурових клітин на патологічно змінені структури і функції тканин в організмі тварин-реципієнтів» (номер державної реєстрації 0115U003476, 2015–2017 рр.).

Мета та завдання дослідження. Мета дослідження – виявити динаміку морфофункціональних змін в тканинах ока тварин за експериментального ушкодження тканин очного яблука та за різних видів патології спонтанного походження; дослідити вплив трансплантованих алогенних МСК і АО, а також їх продуктів, на активність відновлювальних процесів ушкоджених чи патологічно змінених тканин очного яблука, залежно від способу застосування; порівняти ефективність цього методу клітинної терапії із методами традиційного лікування.

Для досягнення мети необхідно було вирішити такі завдання:

- вдосконалити модель експериментального кератиту/увеїту у кролів;
- дослідити особливості структурних і функціональних змін в ушкоджених тканинах ока за експериментального кератиту і увеїту за показниками: клінічних проявів кератиту/увеїту; макроскопічних змін у оці; мікроскопічних досліджень;
- дослідити активність регенеративних процесів в експериментально ушкоджених тканинах ока за впливу трансплантованих алогенних МСК залежно від способу їх застосування;
- вивчити активність регенеративних процесів в експериментально ушкоджених тканинах ока за впливу трансплантованих алогенної АО залежно від способу її застосування;
- провести імунологічні тести на сумісність трансплантованих алогенних МСК в організмі тварин-реципієнтів з експериментальним кератитом/увеїтом;
- порівняти з традиційним методом лікування експериментального кератиту/увеїту у тварин ефективність застосування: алогенних мезенхімальних стовбурових клітин; алогенної амніотичної оболонки; екстракту амніотичної оболонки у формі гелю;
- провести клінічні випробування ефективності застосування алогенних МСК та АО для відновлення структури і функції тканин ока собак за спонтанного увеїту/кератиту.

Об'єкт дослідження – морфофункціональні зміни тканин ока за експериментального кератиту/увеїту кролів та активність відновлювальних процесів за впливу алогенних МСК і АО.

Предмет дослідження – показники морфофункціонального стану ока у тварин-реципієнтів за експериментального та спонтанного кератиту/увеїту до та після введення алогенних МСК і АО.

Методи дослідження. Клінічні (огляд тварин, тест Шиммера, біомікроскопія щілинною лампою, флюоресцеїновий тест Зейделя, тонометрія,

сонографія), гістологічні (виготовлення та фарбування зрізів, мікроскопія), імунологічні, фотофіксація, статистичні.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше досліджено характер морфофункціональних змін тканин ока у кролів за експериментального кератиту/увеїту та активність відновлювальних процесів за впливу алогенних МСК та АО.

Вперше використано в доклінічних випробуваннях ефективність застосування алогенних МСК та АО для лікування кератиту/увеїту спонтанного походження.

Вперше порівняно ефективність різних способів трансплантації алогенних МСК, а саме: введення в тенозовий простір, субкон'юнктивально, інтравітреально та передню камеру ока. Доведено, що застосування МСК шляхом введення їх в тенозовий простір та передню камеру ока, тобто безпосередньо в епіцентр запального процесу, або місце лімбальної зони, дає найвищий результат: вже на сьому добу спостерігається зниження запальної інфільтрації, процеси відновлення на всіх етапах регенерації проходять більш інтенсивно, ніж після трансплантації їх іншими методами (субкон'юнктивально та інтравітреально).

Вперше в Україні використаний розроблений автором комплексний метод моделювання експериментального увеїту, який дозволяє отримувати модель кератиту/увеїту з типовими для них змінами в тканинах ока дослідних тварин.

Доведено, що трансплантація алогенних МСК для лікування кератитів/увеїтів не викликає імунної відповіді з боку організму тварини-реципієнта, що засвідчує безпечність використання алогенних (донорських) клітинних і тканинних матеріалів з лікувальною метою.

Встановлено, що застосування хірургічної техніки біологічного покриття та застосування екстракту гомогенізованої амніотичної оболонки у формі гелю дає можливість досягти найвищих результатів у відновленні патологічно змінених поверхневих шарів рогівки за кератиту у кролів та собак, про що

свідчить повна епітелізація поверхні рогівки ока та зникнення клінічних і морфологічних ознак запальної інфільтрації вже на 30 добу.

Наукова новизна дисертаційної роботи підтверджена патентами на корисну модель (номер державної реєстрації 141623) «Спосіб застосування мезенхімальних стовбурових клітин для репаративних процесів ока у собак та котів за різного перебігу увеїту» та «Спосіб відновлення рогівки ока у собак та котів за ерозій, виразок та хімічних опіків, за допомогою амніотичної оболонки» (номер державної реєстрації 139673).

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати можуть бути використані в експериментальній роботі для подальшого вивчення властивостей алогенних та ксеногенних МСК, трансплантованих в організм тварин-реципієнтів, та в клінічній практиці як один із альтернативних методів лікування тварин за патології ока.

Результати експериментальних досліджень з використання алогенних МСК та АО для відновлення функціональної здатності ока у тварин за кератиту/ увеїту підтверджуються позитивними наслідками лікування у собак з кератитами/увеїтами спонтанного походження; використовуються в навчальному процесі та наукових дослідженнях кафедр вищих навчальних закладів України: кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка і кафедри анатомії, гістології і патоморфології тварин імені академіка В. Г. Касьяненка Національного університету біоресурсів і природокористування України; кафедри нормальної і патологічної анатомії та фізіології тварин Полтавської державної аграрної академії; кафедра нормальної і патологічної фізіології тварин Харківської державної зооветеринарної академії; кафедри фізіології та біохімії сільськогосподарських тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету; кафедра нормальної і патологічної фізіології тварин Одеського державного аграрного університету; кафедри анатомії, нормальної та патологічної фізіології тварин Сумського національного аграрного університету.

Особистий внесок здобувача. Здобувачем самостійно проведено пошук і аналіз літературних джерел за темою дисертаційної роботи, виконано увесь обсяг експериментальних досліджень (моделювання експериментального стану ока у кролів, формування груп дослідних тварин для проведення експериментів на лабораторних тваринах; випробування ефективності методу на собаках за хвороб очей спонтанного походження; отримання алогенних стовбурових клітин і трансплантація їх тваринам-реципієнтам різними шляхами; відбір зразків ока для аналізів), проведено статистичну обробку цифрових показників, підготовлено ілюстративні матеріали.

Спільно з науковим керівником визначено мету, завдання роботи, схему дослідів та способи їх вирішення, аналіз одержаних результатів і формулювання висновків. Із результатів досліджень і публікацій із співавторами, за їх згодою, використано лише ті результати, які одержано особисто здобувачем. Внесок автора зазначено у наведеному списку публікацій.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було апробовано та одержали позитивні відгуки на: XIV Міжнародний конгрес спеціалістів ветеринарної медицини (Охорона здоров'я дрібних домашніх тварин, м. Бровари, 2016); Міжнародний семінар з питань аграрної освіти, особливостей підготовки ветеринарних лікарів та основних сучасних проблем ветеринарної медицини у Франції (Дні аграрної освіти і науки Франції в Україні, м. Київ, 2017); Науково-практична конференція молодих вчених. Стан і перспективи розвитку та іновації в тваринництві, актуальні питання ветеринарної медицини (м. Новомосковськ, 2018 р.); Конференція підготовка фахівців ветеринарної медицини. Практична складова. (сmt. Немішаєве, 2018 р.); Міжнародна науково-практична конференція. Кліматичні зміни та сільське господарство. Виклики для аграрної науки та освіти (м. Київ, 2018); XIX Інтернаціональний практичний ветеринарний семінар. Здоров'я тварин. (м. Київ, 2019); семінар XVI Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу, аспірантів і студентів «Актуальні проблеми ветеринарної медицини» (м. Київ, 2019 р.); XVII Міжнародний

конгрес спеціалістів ветеринарної медицини (Охорона здоров'я коней, 2019); Практичний семінар здоров'я тварин (м. Ганновер, Німеччина 2019); Міжвідомчі навчально-методичні збори спеціалістів ветеринарної медицини, кінологічних підрозділів органів державної влади сектору безпеки та оборони України (м. Хмельницький, 2020).

Публікації. За результатами досліджень опубліковано 10 наукових праць, з яких 5 статей у наукових фахових виданнях України, у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних, стаття у науковому виданні, включеному до міжнародних наукометричних баз даних Scopus, 2 патенти України на корисну модель, 2 тези наукових доповідей.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається з анотації, вступу, 4 розділів, пропозицій виробництву, списку використаних джерел і додатків. Дисертацію викладено на 189 сторінках. Матеріали дисертації проілюстровані 9 таблицями, 3 схемами та 102 рисунками. Список використаних джерел містить 233 джерела, зокрема 96 латиницею.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Увеїт та кератит у тварин

Офтальмологічна патологія ока продовжує залишатися актуальною в науковому та клінічному аспектах, так як займає одне з провідних місць у структурі загальної захворюваності очей серед тварин [50, 61, 62]. Патологія очей становлять майже половину від усіх випадків, що призводить до погіршення загального стану здоров'я тварин та пригнічення (апатії) [81, 82, 84].

Слід зазначити, що кінцевим результатом більшості захворювань очей – остаточне ушкодження даного органа, яке призводить до розвитку його гіпофункціонального стану зору. Загальна розповсюдженість хвороб очей серед собак становить біля 60 % та переважає в старшій віковій групі [49, 85, 89, 105, 107, 91]. В Україні за останні 6 років (з 2015 по 2021 роки) кількість випадків хвороб очей у тварин значно зросла, порівняно з іншими роками [29].

Зорова функція ока життєво необхідна для підтримки загального стану всього організму. При тривалому зниженні функції ока або зниження його біологічної активності на тканинному рівні розвивається тяжке захворювання – очей (увеїти та кератити). Термін увеїт та кератит традиційно використовується для характеристики найбільш важких форм, що означає, що в тварини виявляється переважно помутнінням рогівки ока, утворенням виразки, бодем і почервонінням [132, 149]. Kocher в 1882р. і Reverdin в 1883р. незалежно один від одного, вперше описали це захворювання, розвиток якого спостерігали після експериментально патологічно зміненої тканини ока [108].

За різними літературними даними розповсюдження патології ока серед тварин перше місце займають собаки, рідше коти, потім коні, свині, ВРХ, кролі і екзотичні тварини, хоча ступінь і частота захворювання залежатиме від способу життя тварини і способу харчування. При цьому самки у 10 раз частіше страдають від хвороб очей, чим самці і особливо субклінічними формами захворювання [112, 140]. В останні роки в літературних даних з'явилося ще

більше публікацій про захворювання субклінічними ознаками саме самок чим самців. Патологія ока являє собою клінічний симптомокомплекс, що викликаний певними патологічними станами, зумовленою травмами, інфекціями, активністю тварини, паразитарними хворобами організму (бабезіозний кератит та увеїт), що призводить до загального сповільнення обмінних процесів і розвитку інтерстиціального набряку в результаті відкладення у оці, м'язах та інших тканинах фібронектину і гідрофільних глікозаміногліканів. При вторинних і третинних кератитів симптоми, як правило, менш виражені, ніж при первинному кератиті, проте можуть розвиватися ознаки недостатності інших частин організму (необхідно звертати увагу на симптоми та синдроми за патології ока), симптоми нецукрового діабету або інші, безпосередньо пов'язані з гіпопітуїтаризмом. Хвороба ока може виникати також як складова аутоімунного полігландулярного синдрому [117]. Треба відмітити, що пік захворювання приходить на період старшого віку тварин [118]. У 95% хворих тварин на патологію очей є первинним. Він може бути природженим або набути. Природжений розвивається при аплазії або гіпоплазії ока внаслідок порушень внутрішньо очного тиску або як результат генетичних дефектів синтезу гормонального стану в самки.

Таким чином, можна припустити, що тенденція росту захворюваності в тварин на патологію очей різної етіології в подальшому зберігатиметься [155, 162, 205].

Первинний набутий кератит виникає з ряду причин. На даний час найбільш поширений кератит та увеїт внаслідок якоїсь хронічної недостатності. При цьому внаслідок наростання титру циркулюючих ауто антитіл до тканини ока відбувається реакція з клітинними антигенами із подальшим розвитком деструктивних і проліферативних процесів. У результаті відбувається зниження функціональної здатності ока. Як ускладнення лікувальних заходів, після: а) оперативного лікування (субтотальної або тотальної резекції ока) – складає третю частину всіх хвороб ока; б) лікування радіоактивним йодом; в) погано контрольованого неадекватного або тривалого лікування тиреостатиками

(мерказоліл, препарти літію, тирокин); г) використання надмірних доз йодвмістимих препаратів, зокрема рентгенконтрастних засобів; д) променевої терапії злоякісних новоутворень органів, які розташовані на шиї; е) тривалого прийому гормональних препаратів (глюкокортикоїдів, статевих гормонів) або сульфаніламідів [186, 212]. Деструктивні ураження ока відбуваються при доброякісних та злоякісних пухлинах, гострі та хронічні інфекції (абсцес, туберкульоз, бруцельоз, токсоплазмоз, актиномікоз, саркоїдоз) та внаслідок недостатнього надходження в організм поживних речовин (мікро, макро елементів та вітамінів). У основі розвитку вторинного увеїту та кератиту лежить нестача функціональної здатності ока до відновлення, а третинного – нестача утворення нових клітин (у тому числі стовбурових), що призводить до зниження секреторної функції ока вцілому [119, 137].

При патології очей у тварин будуть пригнічуватися всі види обмінів та погіршуватися самопочуття, відмічатиметься дратівливий стан та агресивність [113, 138, 148]. Вони нерідко завершуються сліпотою, що робить тварину майже безпомічною, нездатною орієнтуватися в навколишньому середовищі, тому вивчення хвороб органа зору, їх ефективне лікування є актуальними, особливо враховуючи те велике значення, якого надають у сучасній ветеринарній медицині дрібним тваринам [44, 80, 134]. На механізм затримки в тканинах води і натрію може також впливати на функцію ока та очний тиск [146].

До недавнього часу в дослідженні захворювань очей основна увага була зосереджена на вивченні уражень повік (дислокація, дермоїди тощо), кон'юнктиви (кон'юнктивіти, кератокон'юнктивіти), рогівки (кератити). [158].

Встановлено, що в Україні значного поширення набули масові ураження судинної оболонки ока у різних видів тварин. Хворіє, в основному, молодняк собаки, коти, коні та велика рогата худоба. Причиною хвороби частіше є інфікування *Rickettsia conjunctivae bovis*, рідше *Moraxella bovis*. Нерідко хвороби очей зумовлюються паразитарними чинниками, зокрема *Thelazia rhodesi*.

Ураження з кон'юнктиви переходить на інші частини очного яблука. Даний тип ураження зустрічається і у овець. [151, 164].

У жуйних і свиней ураження очей виникають внаслідок інфікування хламідіями, мікоплазмами. [195].

Важливу роль у виникненні хвороб органа зору мають алергічні процеси. Різні фактори зовнішнього і внутрішнього середовища викликають своєрідну реакцію, пов'язану з імунологічними змінами – очну алергію. Ступінь алергічної реакції зумовлюють хворобливі явища різної сили, у той час як реакція у відповідь є гіперергічною. Алергічні ураження очей у тварин зустрічаються часто, але ветеринарно-медичними працівниками майже не діагностуються. [86, 87, 138, 164].

1.1.1. Патогенез увеїту та кератиту

В 90 % випадків причин хвороб ока являється пошкодження самої рогівки ока (первинний кератит та увеїт), а 1 % розриви, прокола (вторинний і третинний увеїт та кератит) і периферійний кератит та увеїт, тканинна патологія [31, 51]. Гіпофункція ока може носити вроджений або набутий характер. Крім цього, первинний увеїт та кератит ділиться по ступені важкості на латентний (або субклінічний) і маніфестний (компенсований, некомпенсований, ускладнений), який явно виражений [63, 166].

Первинний увеїт та кератит – розвивається внаслідок ураження самої тканини ока, найбільш частий варіант. Також має властивість зменшуватися кількість функціонуючої тканини ока:

1. Патологія ока зумовлена порушенням ембріонального розвитку (вроджений кератит та увеїт).
2. Післяопераційний кератит та увеїт.
3. Пострадіаційний кератит та увеїт.
4. Кератит та увеїт, обумовлений автоімунним враженням ока (автоімунний кератит та увеїт, результат дифузного токсичного захворювання очей).
5. Хвороби очей, обумовлений вірусним ураженням ока.

6. Хвороби очей на тлі новоутворень.

Обумовлений порушенням живленням рогівки:

1. Йодна недостатність, оклюзія, патологічна неоваскуляризація судин та запалення власної судинної оболонки.
2. Дефекти біосинтеза гормонів на різних рівнях.
3. Медикаментозний увеїт та кератит (застосування тиреостатиків та багато інших препаратів, які пригнічують чи стимулюють функціональну напруженість ока).
4. Увеїт та кератит, який розвивається в результаті вживання корму, де міститься струмогени.
5. Діабет різної етіології.

У собак, як і в інших тварин, переважно діагностуються і піддаються лікуванню хвороби переднього відрізка очного яблука – кон'юнктиви і рогівки. В Україні захворюванням більш глибоких частин ока, у тому числі й судинної оболонки, приділялось і приділяється недостатньо уваги, а між іншим, патологія судинної оболонки (*tractus uveus*) очного яблука призводить до таких важких ускладнень як катаракта і глаукома. Виняток складають роботи присв'ячені вивченню увеїтів у великої рогатої худоби, а також матеріали сучасного посібника з ветеринарно медичної офтальмології.

Первинний увеїт та кератит – обумовлений пошкодженням самої робочої тканини ока.

1. Вроджений:

- a) гіпоплазія або аплазія ока.
- b) генетично обумовлені дефекти біосинтеза гормонів (вроджені дефекти ферментних систем, дефекти біосинтеза тиреоглобуліна)

2. Набутий:

- a) післяопераційний.
- b) лікування радіоактивним йодом і іонізуючим випромінюванням (пострадіаційний кератит та увеїт).
- c) запальні захворювання ока (автоімунний кератит та увеїт).

d) недостаттнє надходження кисню, поживних речовин в організм, різні ендемічні хвороби

e) дія лікарських препаратів (тиреостатиків, аміодарона).

f) неопластичні процеси в самій тканині ока.

Вторинні патології ока – внаслідок дисфункції гіпофіза, порушення регулюючого і стимулюючого ефекту гіпофізарного тиротропіну.

a) ішемія хвороби ока внаслідок великої крововтрати.

b) запальні процеси в області ока;

c) пухлина вихідна із синтезуючих клітин ока;

d) тиреотропні препарати (часті лікування великими дозами резерпіна, леводопа, парлодела та іншими похідними);

e) автоімунні ураження ока.

Третинні хвороби ока – спостерігається при важких захворюваннях ока і зниженням секреції:

a) запальні процеси в області гіпоталамуса;

b) черепно мозкові травми;

c) пухлини головного мозку;

d) лікування препаратами серотоніна.

Периферичні хвороби ока – обумовлені порушенням обміном на периферії. Можливе зниження чутливості рецепторів тканини, резистентність до гормонів. Найбільш часта причина – нефротичний синдром, пухлини та патологія вагітності.

a) інактивація антитілами в процесі циркуляції;

b) значне зниження чутливості рецепторів периферичних тканин ока;

c) порушення живлення рогівки та всіх оболонок ока;

d) вибіркова резистентність до рецепторів ока (дефект транспорту через плазмову мембрану в цитозоль клітини).

Субклінічний стан ока – клінічний синдром, обумовлений стійким пограничним порушенням балансу ока в організмі, при якому рівень секреції помірно підвищений. Клінічні ознаки відсутні.

Транзиторний увеїт та кератит – спостерігається при спонтанних випадках від супутніх хвороб ока [47, 96, 99, 166, 207].

1.1.2. Етіологія увеїту та кератиту

В етіології набутого первинного увеїту та кератиту, як маніфестного так субклінічного, розрізняють цілий ряд різних причин: гострі і хронічні запальні процеси в паренхімі очі, іонізуюче випромінювання (пострадіаційний кератит та увеїт), непластичний (рак, аденома, саркома) і дегенеративний (ендемичний і спорадичний, кісти, крововиливи, фіброз), процеси в очі, токсична дія (тиреостатики і інші медикаменти, перхлорат калію), хірургічні операції (післяопераційний увеїт та кератит). В деяких випадках генез залишається не відомий (ідіоматичний кератит та увеїт) [111, 198, 214].

На даний час в тварин має велике поширення автоімунне захворювання ока – основна причина первинного увеїту та кератиту, що підтверджує в діагностованих тварин 80-90 %. В першу чергу мова йде про автоімунний кератит. В залежності від патологічного стану і клінічної картини розрізняють атрофічний і гіпертрофічний кератит та увеїт. Для постановки діагнозу важливо наявність у тварини маніфестного або субклінічного патології ока, збільшення об'єму ока, присутність антитіл до клітин ока в діагностичних значимих титрах або ультразвукові ознаки автоімунного пошкодження ока [93, 111, 195, 207].

В ряду випадків у самок можливий розвиток наслідкового кератиту та увеїту в подальшому який переходить в глибокі тканини ока, частота таких випадків складає до 48 % [212].

Субклінічний кератит та увеїт у молодняку може розглядатися, як мінімальне пошкодження (mild insult) на око, а відсутність клінічних проявів є як результат перебудови гомеостазу, тобто утворюється новий рівень стабільної компенсації тканин ока, який досягається ціною хронічного підвищення внутрішнього очного тиску [142, 230]. Різні морфологічні форми рака очей дуже рідко являються причиною первинного увеїту та кератиту тварин. Разом з тим причини розвитку раку ока до кінця не вивчені, але немало роль відіграє радіоактивне опромінення. В старих тварин це 86 %, а в молодих 66 %. [3].

Також значне значення має радикальні операції на оці, які і являються частою причиною захворювання. [79].

За результатами різних літературних даних, а особливо зарубіжних є численні дослідження, які свідчать що серед всіх випадків первинного увеїту та кератиту не менше третини приходить на гострі форми у тварин, які розвивається після хірургічної операції або після терапії лікарськими засобами. Різноманітна етіологія цих захворювань, роль системних механізмів і вплив зовнішнього середовища в розвитку та перебігу, визначають комплексний характер і складність проблеми увеїту та кератиту, яка безпосередньо пов'язана з недостатнім вивченням пускових механізмів, що призводять до розвитку запалень судинної оболонки ока. Незважаючи на поширеність даної патології у тварин, ще не визначені чітко патогенез, фактори ризику, виникнення та розвиток ускладнень у ранньому періоді захворювання, а також при його хронічному перебігу. Лікування увеїту та кератиту, дотепер, засновано на окремих спостереженнях. Не визначені схеми, дози, тривалість застосування різних фармакологічних препаратів, їх ефективність. Свідченням цьому є незадовільні результати лікування, що призводять найчастіше до сліпоти тварини. Все вищевикладене диктує необхідність розробки системи науково обґрунтованого підходу до питань діагностики, лікування увеїтів та кератитів більш сучасними методами – стовбуровими клітинами. У цьому разі є досить актуальним вивчення механізмів виникнення запалень судинної оболонки ока, контролю над їх станом і цільоспрямованим впливом на профілактику ускладнень [57, 83, 86].

Існує припущення, що на розвиток післяопераційного увеїту та кератиту впливають два основні фактори: препарат який застосовують та методика по якій проводиться консервативне лікування [6, 28].

Г. А. Плешк виявив чітку закономірність між об'ємом ока у тварин та кількістю випадків захворювань очей на увеїт та кератит [108]. До недавнього часу основна увага в дослідженні захворювань очей була зосереджена на

вивченні уражень повік (дислокація, дермоїди тощо), кон'юнктиви (кон'юнктивіти, кон'юнктиво-кератити), рогівки (кератити) [18,19,53].

Встановлено, що в Україні значного поширення набули масові ураження судинної оболонки ока у тварин різних видів, які можуть призводити до сліпоти. Хворіє, в основному, собаки, коти, коні та молодняк великої рогатої худоби. Причиною хвороби частіше є інфікування *Rickettsia conjunctivae bovis*, рідше *Moraxella bovis*. Нерідко хвороби очей зумовлюються паразитарними чинниками, зокрема *Thelazia rhodesi*. Ураження з кон'юнктиви переходить на інші частини очного яблука. Даний тип ураження зустрічається і у овець[5,12,13].

У жуйних і свиней масові ураження очей виникають також внаслідок інфікування хламідіями, мікоплазмами[4,14].

В останній час в літературі як ветеринарній так медичній широко обговорюється проблема післяопераційного увеїту, який виникає в результаті операційного втручання або хірургічного корегування, де є системне захворювання і розвивається внаслідок вироблення антитіл до рецепторів тканин ока. При цьому око представляє собою один із органів мішеней для антитіл імунної системи. У зв'язку з цим оперативне лікування і радіоїодтерапія не являється етіотропним підходом, а розуміється тільки видалення з організму ока [105, 172, 174]. В ряді випадків після часткового видалення частин ока у собак може розвиватися складні неповоротні ускладнення, але прогнозувати такий ефект вкрай важко [120]. Таким чином доведено, що єдиним одночасно і ефективним і прогнозованим виходом і ціллю оперативного лікування за пухлин ока та імунного статусу являється видалення очного яблука[121, 123]. Також можливий розвиток ускладнення після оперативного втручання у вигляді перманентного увеїту та кератиту, яке обумовлене не тільки пошкодженням чи видаленням, але і також крововиливи в них з розвитком фіброзного процесу в післяопераційний період [133, 172].

У зв'язку з цим необхідно зазначити, що в наш час появилася велика кількість тварин, які страдають одночасно і післяопераційним увеїтом та

кератитом, які є резистентними до традиційної замінної терапії за імунного статусу, а це потребує пошуку в сучасний наш час більш ефективних способів компенсації функціональної здатності очного яблука.

Важливу роль у виникненні хвороб органа зору мають алергічні процеси [15]. Різні фактори зовнішнього і внутрішнього середовища викликають своєрідну реакцію, пов'язану з імунологічними змінами очну алергію. Ступінь алергічної реакції зумовлюють хворобливі явища різної сили, у той час як реакція у відповідь є гіперергічною. Алергічні ураження очей у тварин зустрічаються часто, але ветеринарними лікарями майже не діагностуються.

Щодо собак та котів, то поглиблені дослідження офтальмологічних хвороб у цього виду тварин виконуються рідко [180, 181].

Незважаючи на значну частоту уражень органа зору у собак, як і в інших видів тварин, переважно діагностуються і піддаються лікуванню хвороби переднього відрізка очного яблука кон'юнктиви і рогівки [199]. В Україні захворюванням більш глибоких частин ока, у тому числі судинної оболонки, приділялось і приділяється недостатньо уваги, а між іншим, патологія судинної оболонки (*tractus uveus*) очного яблука призводить до таких важких ускладнень як катаракта і глаукома [183]. Виняток складають роботи В. О.Дорощука [18,19], присвячені вивченню увеїтів у великої рогатої худоби, а також матеріали сучасного посібника з ветеринарно-медичної офтальмології [175]. Різноманітна етіологія цього захворювання, роль системних механізмів і вплив зовнішнього середовища в розвитку та перебігу, визначають комплексний характер і складність проблеми увеїту та кератиту, яка безпосередньо пов'язана з недостатнім вивченням пускових механізмів, що призводять до розвитку запалень судинної оболонки ока. [161]. Патогенез більшості цих захворювань невідомий і донині [212].

Достатньо рідкою причиною кератиту та увеїту у тварин є не патологія а захворювання головних ланок головного мозку, які призводять до зниженого чутливості зорового нерва та його провідності [183].

Незважаючи на поширеність даної патології у тварин, ще не визначені патогенез, фактори ризику, виникнення та розвиток ускладнень у ранньому періоді захворювання, а також при його хронічному перебігу увеїту та кератиту різних видів тварин [230]. Лікування увеїту, дотепер, засновано на окремих спостереженнях. Не визначені схеми, дози, тривалість застосування препаратів, їх ефективність. Свідченням цьому є незадовільні результати лікування, що призводять найчастіше до сліпоти тварини. Все вищевикладене диктує необхідність розробки системи науково обґрунтованого підходу до питань діагностики, лікування стовбуровими клітинами та профілактики увеїту та кератиту. У цьому разі є досить актуальним вивчення механізмів виникнення запалень судинної оболонки ока, контролю над їх станом і цільоспрямованим впливом на профілактику ускладнень. [197].

Етіологічними факторами також можуть бути запальні захворювання головного мозку (менінгіти, енцефаліти), хірургічні і променеві дії на гіпофіз та гіпоталамус [150, 222].

Також в інших випадках до числа рідких причин слід віднести синдром периферичної резистентності [194]. До нашого часу описано біля 200 випадків даного синдрому в собак та котів, при цьому його поширеність становить десь 1 випадок на 5000 тварин [101, 122]. Периферичний увеїт та кератит зв'язаний з несприйняттям до гормонів на рівні тканин організму тварин в основі, якої лежить патологія зв'язана з гормональними рецепторами або резистентності рецепторів (пострецепторна патологія) порушення конверсії гормональної активності [130].

З'ясовано, що бабезіозний увеїт та кератит у собак виникає у східноєвропейських вівчарок (27,8 %) і, рідко, у безпородних собак (16,7 %), найчастіше - собак після 12-місячного віку (58,8 %), вірогідно зумовленому посиленням сенсibiliзації з віком. У разі слабого прояву запалення війкового тіла виявлено міоз, світлобоязнь, слъозотечу та незначні зміни райдужки та рогівки, преципітати у передній камері ока, за тяжкого ступеня цилиарного запалення має місце перикорнеальна ін'єкція судин, гіфема, сильний біль у

ділянці війкового тіла, фібрин у передній камері ока, задні синехії, глаукома. Вміст у крові еритроцитів, гемоглобіну, лейкоцитів, показників лейкограми, вміст білка, його фракцій, білірубину, АСТ і АЛТ, сечовини, креатиніну та бабезіозу, неускладненого увеїтом, ідентичні таким показникам ускладненого увеїтом бабезіозу, що доводить патогенетичну роль інших чинників у виникненні запалення війкового тіла. Відзначено, що кількість лейкоцитів, Т- і В-лімфоцитів, Т-хелперів, Т-супресорів, показник імунорегуляторного індексу, вміст IgG, М у разі бабезіозу, ускладненого увеїтом, більші у порівнянні з цими показниками за умов базіозу, неускладненого увеїтом, що зумовлює патогенетичну роль імунологічних порушень у виникненні запалення війкового тіла. Відзначено, що лікування бабезіозного увеїту раціональне у разі застосування на тлі базіозної терапії мідріатів (найчастіше 1 % розчину атропіну), нестероїдних протизапальних препаратів, зокрема, диклофенаку за дози 0,5 мг/кг маси тіла, а також тималіну (як імуномодулятора та стимулятора фагоцитозу) за дози 5 - 20 мг/ кг маси тіла тварин залежно від тяжкості перебігу запалення судинної оболонки очного яблука [90, 109]. Увеїт часто є причиною значного зниження зору і сліпоти (близько 25%). Головними симптомами захворювання є «пелена» перед очима, погіршення зору (можлива навіть повна сліпота), почервоніння очей. [76, 127]. Увеїт – це поєднане запалення рогівки і судинної оболонки очного яблука. Запалення судинної оболонки можливе внаслідок інфекції, травми, загального аутоімунного захворювання (яке змушує організм атакувати свої власні тканини) або внаслідок невідомих причин. Під невідомими причинами часто ховаються психотравми і сумні переживання тварини, які запускають аутоімунні реакції проти самих себе[59, 65].

До основних симптомів відносяться болючість очей, світлобоязнь і погіршення зору. Також характерні почервоніння, запалення передньої камери, кератит, погіршення чутливості рогівки й часткова або секторальна атрофія райдужки. Також може підвищуватися внутрішньоочний тиск. [59, 65].

В ветеринарній клінічній практиці описані випадки коли у тварин діагностуються ознаки захворюваності на кератит і увеїт, незважаючи на

нормальний клінічний стан ока, що може вказувати на наявність периферійного кератиту та увеїту [58, 77]. Але до широкого впровадження в клінічну практику надчутливих імунометричних методів говорити про причину розповсюдження периферійного кератиту та увеїту в тварин передчасно [54].

Особливо левову частину захворюваності припадає саме на самок, які ризикують захворіти на кератит та увеїт у три рази швидше чим самці [38, 40].

В зарубіжній літературі описується достовірний зв'язок розвитку синдрому кератиту та увеїту у собак та котів з цукровим діабетом першого типу, де були виявлені антитіла до тиреоглобуліну і тиреопероксидази, а рівень гормонів набагато більше від норми [216].

У багатьох хворих, які страждають на увеїт та кератит тварин, є також захворювання, які вражають органи в інших частинах організму. До таких запальних захворювань відносяться синдром Бехчета, анкілозивний спондиліт, ювенільний ідіопатичний артрит, саркоїдоз, реактивний артрит, запальні захворювання кишківника (хвороба Крона і виразковий коліт). Офтальмологи так і говорять: «Прийшли з увеїтом – очікуйте, що заболять суглоби». [139]. Є також описані літературні дані, які вказують на можливість виникнення увеїту та кератиту внаслідок прийому більшості препаратів, що застосовуються при аритмії серця у тварин, при цьому фіксується зниження рівня загальних гормонів, таким чином у таких тварин рекомендується оцінювати патологію ока два рази в рік [193].

На сьогодні існує значна кількість досліджень, що зосереджують свою увагу на епідеміології увеїту та кератиту у тварин [210]. Більшість досліджень, пов'язаних з епідеміологією увеїту та кератиту, були проведені в розвинутих країнах світу. У цих дослідженнях частота увеїту оцінювалася в межах від 15 до 62 на 20 тис. тварин на рік, а поширеність – від 30 до 900 випадків на кожних 20 тис. тварин різних етіологічних груп [185, 224].

Тоді як щорічна захворюваність на увеїти в Україні становить від 20 до 45 випадків на 1000 тис. тварин [8]. Увеїти та кератити є причиною сліпоти у 25 % випадків у породистих тварин чистої лінії [59, 225]. Увеїт – це загальний

термін, що використовується для опису запалення судинної оболонки ока. Це може бути запалення однієї або більше структур судинного тракту. Виділяють різні чинники, що призводять до виникнення увеїту, – інфекційні та неінфекційні. Вивчення увеїту вимагає систематичної ідентифікації його характеристик. Розрізняють передній, периферичний та задній увеїт, також увеїт класифікують залежно від клінічного перебігу (гострий, хронічний, рецидивуючий), етіології (інфекційний, неінфекційний), гістопатології (гранулематозний, негранулематозний) та латеральності (односторонній, двосторонній). У 2019 році в США з метою вироблення уніфікованих критеріїв діагностики та лікування увеїту у собак та котів було сплановане та проведене широкомасштабне дослідження інтернаціональною групою із 500 експертів з увеїтів з 100 країн та 458 клінічних центрів, за результатами якого були розроблені критерії зі стандартизації номенклатури увеїтів та кератитів – Standartisation of Uveitic Nomenclature Working Group (SUN Working Group). SUN Working Group не лише розподілила запалення за локалізацією, а й визначила критерії активності запального процесу, створила розподіл форм увеїту та кератиту за типом перебігу та визначила алгоритм лікувальної тактики [172]. Найпоширенішою формою є передній увеїт. У більшості випадків переднього увеїту не виявлено жодної основної причини (ідіопатичний увеїт оцінюється в межах від 40 до 96 % переднього увеїту) [95, 114]. В наш час ряд зарубіжних авторів обговорюють аспекти контртіреоїдної дії на тварин електромагнітних полів різних частот, а також повітря приміщення, які обладнані з надлишком комп'ютерної техніки де живуть та проводять увесь свій час тварини [41, 79]. Щодо інфекційної етіології переважною причиною передніх увеїтів є герпесвіруси [41, 79]. Периферичний увеїт є найменш поширеною формою увеїтів порівняно з переднім або заднім увеїтом та панувеїтом (близько 40 % всіх увеїтів), як це повідомлялося раніше в дослідженнях, що проводяться в усьому світі. Більшість периферичних увеїтів є ідіопатичними (80–99 %). Перелік інфекційних етіологій, пов'язаних із

периферичним увеїтом, включає HTLV-1 (Т-клітинний лімфотропний вірус людини типу 1), сифіліс, хвороба Лайма [61, 89].

Задній увеїт є другою за поширеністю формою увеїту в більшості досліджень (33–45 % випадків увеїту та кератиту). Що стосується етіології, більшість випадків задніх увеїтів також є ідіопатичними, далі – токсоплазмозний хоріоретиніт. В Австралії показники становлять 27 % та 22 % відповідно, а в Азії – 14–78 % та 2,5–28 % відповідно [18, 21–24, 26, 28]. Токсоплазмозний хоріоретиніт відносно поширений у США та Європі [13–15, 17]. В Африці та в країнах Південної Америки, як повідомлялося, є найчастішою причиною увеїту та кератиту, що становить 25–90 % від загальної кількості випадків увеїту з подальшим ускладненням глаукомою та катарактом [4, 18, 19]. Інші поширені етіологічні чинники для задніх увеїтів у розвинутих країнах включають цитомегаловірус (CMV), токсокароз та гострий некроз сітківки [10, 38, 69].

Все це вказує на необхідність особливо уважного відношення до тварин з увеїтом та кератитом для призначення і використання деяких лікарських препаратів і корму, володіючих значним пролонгованим ефектом і здатних погіршити перебіг захворювання.

1.1.3. Основні клінічні симптоми і синдроми увеїту та кератиту

Захворювання розвивається повільно, зазвичай виявити перші ознаки хвороби у тварини вкрай важко, а початкові прояви можуть характеризуватися мізерною і неспецифічною симптоматикою, тому хворих тварин можуть тривалий час і безуспішно лікувати з приводу різних захворювань. Швидкість розвитку і вираженість симптомів патологій ока в тварин залежать від причини захворювання, ступеня важкості та індивідуальних особливостей хворих тварин (вік, порода, стать, вид, тощо). Основна причина увеїту та кератиту зазвичай не ідентифікується, і тоді запалення називають ідіопатичним. Причина залишається невідомою у більше ніж 40–90 % тварин. Такий стан частіше спостерігається в самок [42, 43, 78, 110].

Інфекційні увеїти здебільшого діагностують у котів, до 48–50 % усіх випадків увеїту. Інфекційний увеїт переважно маніфестує як задній увеїт та панувеїт у цих тварин. Основними інфекційними чинниками є: токсоплазмоз [23, 48], туберкульоз [99, 112, 156], онхоцеркоз [44], цистицеркоз [19], проказа [30], герпес [22, 38], лептоспіроз та інші паразитарні захворювання [19, 41, 154]. Порушення обміну глікозаміногліканів (мукополісахариди) призводить до інфільтрації слизових оболонок, шкіри і підшкірної клітковини, м'язів, міокарда, водно електrolітний дисбаланс ускладнюється надлишком вазоприсина і недостатністю передсердного натрійуретичного фактора [35, 170, 198].

Особливість кератиту та увеїту в собак та котів являється, ще й те, що клінічна картина хвороби не завжди має рішуче значення для постановки більш детального діагнозу захворювання і залежить від вираженості і тривалості функціонального дефіцита патологічного ока, а також і від віку тварини і наявності в неї супутніх захворювань очей [34, 180]. Чим швидше розвивається увеїт та кератит в тварин тим більш явними клінічними ознаками він супроводжується. Почервоніння, блідість, апатія, зміна апатії на агресивність, особливо в котів з соскоподібним чи мармуровим відтінком через уповільнення периферичного кровообігу і анемії, які часто супроводжуються синдромом [110, 137, 197]. Можлива жовтушність слизових оболонок ока, особливо у собак, внаслідок залишку β -каротину, який повільно трансформується в печінці у вітамін А.

Епідеміологія інфекційних увеїтів та кератитів неоднорідна й залежить від географічного регіону. В Африці, Південній Америці та Індії інфекційний увеїт та кератит у собак становить близько 20 % а котів 60% з усіх випадків. Найпоширенішим етіологічним чинником захворювання є *Toxoplasma gondii*, у Саудівській Аравії – герпетична інфекція, у Китаї – поєднана інфекція, в Індії – туберкульоз тварин особливо великих і старих тварин [27, 30, 37].

Токсоплазмоз є основною причиною заднього увеїту в усьому світі з вираженими географічними розбіжностями щодо його поширеності. Харчові та

соціальні чинники, ймовірно, впливають на географічну різноманітність цієї інфекції у тварин [26]. Широко відомо, що свині інфікуються *Toxoplasma gondii*, а кішки є остаточним хазяїном паразита. Зниження частоти одомашнення кішок може бути причиною низької поширеності токсоплазмозного хоріоретиніту, що виникає в країнах Азії. Навпаки, у країнах Заходу у кішок та собак яких тримають у приміщенні захворюваність на кератит та увеїт становить 90% від усіх наявних випадків [9, 39, 211].

Крім того, споживання сирової або недостатньо термічно обробленої зараженої свинини, яку згодовують котам та собакам може призвести до інфікування всіх видів тварин, які є поруч, що може викликати складні патологічні ускладнення увертів та кератитів [6, 7].

Епідеміологія інфекційного увеїту в розвинутих країнах характеризується поширеністю токсоплазмозної та герпетичної етіології. Найчастіше це проявляється як передній герпетичний увеїт (4,5–18,6 %) або некротичний герпетичний ретиніт, увеїт та кератит (0,8–6,9 %) [172].

З іншого боку, туберкульоз та сифіліс мають низьку поширеність (< 3 %) Типові набряки кінцівок, особливо кистей і стоп. Кінцівки потовщені у тварини і справляють враження коротких. Можливі дійсні гідростатичні набряки на гомілкях, тулубі внаслідок затримки виведення натрію. Волосся сухе, ламке, рідке. Виявляється часто в тварин випадіння вії, шерсті в зовнішній частині бедрів [110].

Однак нещодавно було повідомлено про збільшення поширеності туберкульозу в Японії та Нідерландах в собак та котів, що збільшилась захворюваність тварин на кератит та увеїт [133].

Прориви у фармакології також сприяли змінам у розподілі увеїтів. Цитомегаловірусний (ЦМВ) ретиніт продемонстрував різноманітність у захворюваності та розподілі протягом останніх 20 років. ЦМВ-ретиніт з'явився одночасно з епідемією вірусу імунодефіциту як тварини так і людини. Це стало однією з найпоширеніших причин заднього увеїту, що становило 21–88 % усіх випадків заднього увеїту у собак. [88, 97, 98, 101]. ЦМВ-ретиніт оцінювався в

той час, коли він виникав у 10–15 % хворих на синдром імунного дефіциту в тварин [36]. Унаслідок цього ЦМВ-ретиніт став найважливішою причиною увеїту та кератиту в усьому світі серед тварин. Однак у західному світі частота ЦМВ-інфекції різко знизилася після введення високоактивної антиретровірусної терапії (ВААРТ) для хворих тварин з імунодефіцитними станами із середини 2000-х років. З іншого боку, використання ВААРТ призвело до появи нового виду увеїтів – «увеїт імунного відновлення» [37,67,134,149]. Останнім часом було зазначено, що доступ до ефективної ВААРТ також є причиною зменшення ЦМВ-ретиніту в Південній Африці.

Онхоцерціаз є ендемічним у деяких регіонах Африки, Центральної та Південної Америки [144], найпоширенішим етіологічним чинником для панувеїту в Сьєрра-Леоне, відомим як «річна сліпота». Ця причина становить 50–60 % випадків сліпоти в Нігерії і є третьою причиною двобічної сліпоти в Центральноафриканській Республіці [16, 34]. Однак використання ларвіцидів в Африці має зменшити поширеність цього типу увеїту серед домашніх тварин.

Т-клітинний лімфотропний вірус типу 1 (HTLV-1) – асоційований увеїт собак та котів, що проявляється переважно в Японії. HTLV-1 є ретровірусом котів, відповідальним за розвиток периферичного увеїту. HTLV-1, незважаючи на його глобальний розподіл [4], характеризується географічною «пристрастю» до певних областей, переважно в Південно-Західній Японії і меншою мірою на островах Карибського басейну, частинах Центральної Африки та Південної Америки [200, 210, 233]. Характерна млявість, підвищена втомлюваність, зниження рухливості і бадьорості тварини, з'являється апатія, відсутність інтересу до всього, що оточує тварину.

Синдром хронічного очного гістоплазмозу (POHS) спостерігається в США, зокрема в долинах річок Огайо та Міссісіпі, де є поширеним гістоплазмоз на фоні увеїту та кератиту собак та котів [1, 10, 37]. Погіршується пам'ять, такі тварини погано піддаються дресируванню, або взагалі не сприймають команди, із-за неможливості тварини концентрувати увагу на завданні. Типове перекручення формули сну – сонливість вдень, безсоння

вночі. Часто спостерігається наполегливий головний біль, від чого тварина скулить та скаржить, шум у вухах. При вираженому хронічних глибоких порушеннях тканин ока розвивається важкий хронічний психосиндром, що набуває рис психозів у собаки з депресивним синдромом, тварина стає агресивною. Знижений слух внаслідок набряку слизової оболонки середнього вуха [2, 8].

Увеїт може проявлятися в будь-якій віковій групі серед більшості тварин. У країнах, що розвиваються, інфекційний увеїт собак та котів часто спостерігається серед молодих тварин, які поїдають сире м'ясо. Автори наголошують, що котів у 30- 60 % випадків реєструється паразитарне ураження. Паразитарний передній увеїт відзначається у 39,6 %, у 12 % – ендoftальміт, у 6,5 % – лептоспіроз, у 3,7-12,5 % – токсоплазмоз [24]. Найпоширенішою причиною переднього увеїту в собак є герпетична інфекція. Здебільшого етіологією заднього увеїту є токсоплазмозний хоріоретиніт. Менш часто трапляється задній увеїт, спричинений очним токсокарозом, туберкульозом, сифілісом, хворобою Лайма, хворобою котячих подряпин, дифузним однобічним підгострим нейроретинітом, вірусом краснухи, некротичний ретиніт унаслідок вірусів оперізуючого та простого герпесу або цитомегаловірусної інфекції [198, 199, 203, 216, 222]. У котів увеїт та кератит також пов'язаний із тенденцією до хронізації хвороби, високого рівня ускладнень та, відповідно, тяжкого зниження зору. Близько третини собак та котів з увеїтом страждають на втрату зору [188, 199, 200,]. У тварин можлива задишка при хронічних формах увеїту та кератиту і навіть при мінімальному ураженні рогівки та оболонок ока запальними процесами. Болі у області очей, заґрудинні, не пов'язані з фізичним навантаженням, як правило, не усуваються прийомом лікарських препаратів а потренбують більш глибокої діагностики та сильнодіючих фармакологічних препаратів чи хірургічного втручання [100,123,167,189].

У собак та котів середньої вікової групи загальноприйнятою етіологією є лептоспіроз (11,5 %), туберкульоз (6,9 %) та герпес (2,5 %). У старшій віковій

групі найпоширенішою причиною інфекційного увеїту визначають герпес (13, %), лепру (1,6 %), а також лептоспіроз (2,4 %) [60]. За різними даними, вперше виявлений епізод увеїту в собак старшого віку 15-18 років становить серед тварин 8–31,9 % [24, 35]. Донедавна увеїт, що вперше розвивався у котів віком понад 7 років, вважався проявом маскарадного синдрому. Однак останнім часом відповідні дослідження показали, що увеїт у собак та котів старше 10 років зазвичай ідіопатичний або зумовлений запальною реакцією. Інтраокулярна лімфома становить лише 2–8,3 % випадків [99, 233]. На відміну від молодших вікових груп серед тварин, поширеність переднього увеїту оцінювалася на рівні 28–95 %, периферичних – 4,7–9,8 %, задніх – 5,3–55,9 %, а панувеїт – 13,2–71,7 %. Найпоширенішою інфекційною причиною, яка призводить до увеїту в собак та котів після 10 років життя є герпетична інфекція, особливо *aricella-zoster* [56, 228,229,231,232].

У розвинутих країнах самці та самки приблизно однаково страждають від увеїту та кератиту [14]. Нещодавно the Pacific Ocular Inflammation Study засвідчило, що не було суттєвих відмінностей у показниках захворюваності між статями, але з більшою поширеністю спостерігається в самок[26]. У США, Європи та Японії не показують чіткої різниці у загальних кількостях: 40– 90 % випадків захворювання спостерігаються в котів (самок) порівняно з котами (самцями) [126].

У хворих на увеїт та кератит, особливо в тварин старшого віку, часто, як супутнє захворювання, розвивається ішемічна хвороба серця, атеросклероз, гіпертонічна хвороба, і особливо недостатність кровообігу [60].

Зарубіжними авторами описані накопичення рідини в перикарді хворих на хронічний увеїт у 80 % собак. Рідина накопичується поступово, повільно і може досягати об'єму від 14 до 160 мл, проте тампонада серця в тварин зустрічається у край рідко. Вважають, що наявність перикардіального випота певною мірою корелює із ступенем тяжкості патологій ока. Це підтверджує той факт, що адекватне лікування дозволяє зменшити кількість рідини в перикарді. Іноді травми ока у собак та котів – єдиний симптом увеїту та кератиту. При

вираженому полісерозиті інша симптоматика патологічного ока може бути мало виражена. Увеїт та кератит в тварин може поєднуватися з іншими проявами порушення функціонування робочої тканини ока вкрай до повної сліпоти ока [130].

Може також відбуватися при увеїтах та кератитах тварин, особливо старшого віку, враження кісткової тканини. Кісткові ураження, як правило, нетипові, виявляються лише при тривалому і тяжкому перебігу. Може розвинути помірний остеопороз, обумовлений зниженням вмісту мінеральних речовин і недостатнім синтезом білків [127]. Нерідкі артралгії, артропатії, артроз, синовіти. Можливі постійні болі в поперечному відділі хребта тварини, що усуваються при компенсації гормонального обміну. Тварини з некомпенсованим увеїтом та кератитом мають дефекти епіфізарного окостеніння, кістковий вік відстає від хронологічного, лінійний ріст уповільнений, кінцівки набрякають – це фіксується вже як синдромокомплекс у собак та котів, які старше 10 років [89].

При враженні шлунково-кишкового тракту у тварин із синдромом увеїту та кератиту язик збільшений у об'ємі, на боковій поверхні вм'ятини від зубів, обкладений сіруватим нальотом, смакові відчуття і апетит знижені [33].

Внаслідок збільшення розмірів язика можливі епізоди апное уві сні, порушена артикуляція, голос тварини уповільнений, нечіткий та хрипкий [103].

Секреторна і екскреторна функції шлунку знижені, що супроводжується зниженням апетиту, нудотою, можливі болі живота, блювота [103]. Уповільнена моторика кишечника, що призводить до розвитку атонічних запорів, іноді спостерігається клінічна картина динамічної непрохідності кишечника. Знижена всмоктувальна функція кишечника, що призводить до стійкого метеоризму у тварин [108]. Знижена дезінтоксикаційна та синтетична функція печінки. Нерідко зустрічається дискінезія жовчних шляхів по гіпомоторному типу. Зниження тонуусу і моторики жовчовивідних шляхів веде до порушення жовчовидільної функції печінки, застою жовчі, сприяє розвитку

жовчнокам'яної хвороби, апатії та поступове згасання основних функцій на тлі хронічного увеїту та кератиту у тварин [116].

При тривалих дисфункції у тварин також буде спостерігатися ураження функції нирок і сечовивідних шляхів, але несуттєво. Проте внаслідок порушення периферичної гемодинаміки, порушення балансу вазопресину знижується і нирковий кровотік, зменшується клубочкова фільтрація, що призводить до зниження виведення сечі нирками, затримці натрію і води в організмі [115]. Можлива легка протеїнурія. Атонія сечовивідних шляхів сприяє розвитку у тварин супутніх захворювань, такі, як розвиток урогенітальних інфекцій на тлі увеїту та кератиту [124].

Дисфункція органів дихання в тварин може проявлятися несуттєвим порушенням дихання. Через набухання слизової оболонки носа затруднюється носове дихання, з'являються виділення із носа і ока, тягучих непрозорих тяжів. Явища вазомоторного риніту, спричиненого ускладненням, які ведуть за собою гормональні порушення спостерігаються протягом всього періоду хвороби, але більш виражені в суху погоду [126]. Набряк і потовщення голосових зв'язок супроводжується зміною голосу в собаки, та сприяє появі більш низького, грубого голосу [129]. Типовий набряк слизової оболонки дихальних шляхів [128]. Внаслідок дискоординації м'язових скорочень, порушення центральної регуляції спостерігається альвеолярна гіповентиляція легень з гіпоксією, гіперкапнією. Життєва ємкість легень дещо знижена через слабкість міжреберних м'язів або пригнічення дихального центру [125].

Такі тварини схильні до респіраторних захворювань – бронхітів, пневмоній, як правило, із млявим затяжним перебігом, без вираженої температурної реакції у тварин [130].

Тирогенна анемія за кератиту обумовлена ахлоргідрією, зниженим всмоктуванням Fe, вітамінів B₁₂, PP, пригніченням обмінних процесів у кістковому мозку. Можливі анемії аутоімунного генезу. В деяких випадках анемію виявляють до появи клінічних ознак увеїту та кератиту. Анемії можуть бути нормохромні, гіпо – і гіперхромні [131].

Стать, як з'ясувалося, впливає на тип запалення. Характерними прикладами переваги в самців є сифілітичний увеїт у хворих імунний статус (головним чином через захворюваність на імунному характері у самців) [222, 228, 233]. На відміну від результатів розвинутих країн, у країнах, що розвиваються, собаки та коти частіше страждають на увеїт (2 : 1). Соціально-економічні умови можуть призвести до більшого ризику виникнення в самців певних видів інфекційних увеїтів, таких як лептоспіроз [114, 123, 124]. Однак дослідження в Індії показує, що ця тенденція упереджена, оскільки в країнах, що розвиваються, самці більш стійкі ніж самки [144, 150, 187]. Різниця запальної реакції залежно від статі була ретельно досліджена. Встановлено, що самки надають іншу імунну відповідь на травму й інфекцію порівняно з чоловіками [75, 87, 167, 289]. У самок спостерігається порушення оваріально-менструального циклу, менорагії, метрорагії, рідше – аменорея. Здібність до зачаття зберігається, але часто буває у тварин з синдромом хронічного увеїту та кератиту. Нерідко відбувається ускладнення вагітності, особливо у породистих собак, яке характеризується токсикозом, викидні на різних термінах вагітності, передчасні роди. У самців знижується тяга до самок або взагалі відсутня, що часто проявляється останнім часом при важких формах увертів та кератитів собак та котів [128].

Особливість увеїту і кератиту являється і те, що клінічна картина захворюваності не завжди має вирішальне значення для постановки діагнозу і залежить від тривалості перебігу хвороби, а також від віку тварини і наявності в неї супутніх хвороб [135]. Чим швидше розвивається увеїт та кератит у тварини тим більш явні ознаки його супроводжують [128].

Разом з тим навіть при одній і тій же ступені тяжкості і тривалості увеїту та кератиту, клінічна картина буде індивідуальна, тобто з однієї сторони абсолютно явний кератит чи увеїт може не мати ніяких клінічних проявів і діагностуватися випадково, а з другої деякі тварини з субклінічним кератитом можуть мати багато характерних для увеїту ознак захворюваності [31]. Але тим не менше, знання всіх можливих клінічних проявів і "масок" кератиту та увеїту

дрібних тварин, дозволяє запідозрити його прихованого характеру та його чіткою наявністю і призначення необхідної діагностики та лікування [97, 200, 201, 210].

Гострі, однобічні та негранулематозні форми увеїтів є найпоширенішими типами увеїтів у всьому світі серед усіх видів тварин. Гострий увеїт частіше розвивається, ніж хронічний. Проте показники гострих форм, як правило, вищі в ветеринарних клініках світу загальної практики [114,188,190]. Хронічні форми здебільшого діагностують у третинних центрах надання ветеринарної допомоги [156]. Наприклад, в одному порівняльному дослідженні гострий увеїт становив 93,3 % випадків у загальній практиці і лише 44,3 % в ветеринарній університетській клініці [144, 149, 166, 177]. В іншому дослідженні випадки гострого увеїту були пов'язані з вищою частотою інфекційних причин переднього увеїту [230, 231]. Крім того, відмінності клінічного перебігу гострого та хронічного увеїтів впливали на той факт, що гострий увеїт зазвичай потребував частішого відвідування тварин лікувального центру, тому мав вищу частоту зафіксованих звернень. Це може пояснити поширеність різних форм увеїтів у третинній і загальній ветеринарній практиці [195].

У кожної конкретно хворої тварини можуть бути один, або декілька синдромів очної патології в різних поєднаннях і різного ступеня вираженості [94].

Клінічні прояви і перебіг суттєво відрізняються у тварин різних вікових груп і порід, тому у хворих молодого і середнього віку увеїт та кератит зазвичай протікає в класичній формі з характерними суб'єктивними і об'єктивними проявами, які описані в дисертації вище [96]. В старих тварин клініка може бути стерта, але при цьому на перше місце в клінічній картині виходять симптоми інших соматичних захворювань і в першу чергу ознаки пошкодження функціональної здатності ока тварини. Наявність даних симптомів визначає необхідність диференціальної діагностики увеїтів та кератитів серед дрібних тварин з ішемічними хворобами і порокома серця, артеріальною гіпертензією та недостатністю живлення рогівки ока [93].

В молодому віці клініка увеїту та кератиту в тварин залежить від часу виникнення захворювання. Вроджений кератит проявляється такими симптомами: почервоніння, болючість та світлобоязкість. Потому з'являється знижений апетит, апатія, поганий приріст маси тіла, метеоризм і запори, гіпотермія, ламка і суха шерсть, м'язова гіпотонія [99]. Нормальний розвиток та психічний стан залежить від глибини патологічного стану ока в фетальному періоді і на протязі перших двох років життя. В регіонах з вираженим дефіцитом макро та мікроелементів в собак та котів увеїт та кератит проявляється зниженням слухового апарату, нервово-м'язові порушення [98]. При увеїтах та кератитах в собак порід німецьких вівчарок та Чивава розвивається порушення статевого розвитку на фоні неправильного або відсутнього лікування офтальмологічних патологій ока [47]. При цьому у самок можливий розвиток макромастії, галактореї та затримці кісткового росту в ранньому віці, що несе небезпеку народження неповцінного плода. Однобічні увеїти, як повідомляється, більш поширені порівняно з двобічними. Це спостерігається як у розвинутих країнах, так і в країнах, які розвиваються, що дуже важливо для показників у собак та котів [14]. Що стосується однобічного інфекційного увеїту, то найпоширенішим у розвинутих країнах є увеїт, пов'язаний з герпетичним переднім увеїтом [111, 123, 133.177]. Загальними причинами однобічного процесу є інфекційні захворювання, такі як герпес, токсоплазмоз і лептоспіроз. Крім того важливу роль відіграє також і травматичний увеїт. Двобічний увеїт переважно пов'язаний із туберкульозом. Двобічні інфекційні увеїти та кератити можуть реєструватися як поодинокі випадки у деяких географічних місцях країн. Наприклад, онхоцерціоз, який виявлений винятково в певних регіонах Африки, а також у Центральній та Південній Америці [34, 187, 198, 200, 216, 290]. Іншим видом двобічного інфекційного увеїту є лептоспірозний увеїт серед тварин. Негранулематозний увеїт припадає на більшість випадків увеїту (55–88 %) [24]. Причини гранулематозного увеїту та кератиту собак та котів є туберкульоз (0,1– 20 %) і

лепра (0,3–3,2 %). Даним видом увеїту та кератиту хворіють в основному коти [34, 188, 199, 202, 204, 209].

1.1.4. Сучасні методи лікування кератиту та увеїту

Існуючий на сьогоднішній день дефіцит спеціальних лабораторних тестів і низька інформованість клініцистів не сприяє ранньої і точної діагностики синдрому увеїту та кератиту у собак, котів та інших тварин [32]. Клінічні прояви вкрай різноманітні від порушення почервоніння до деструктивних пошкоджень тканин ока, але в більшості випадків може спостерігатись і незначне крапкове почервоніння [95]. Увеїт часто є причиною значного зниження зору і сліпоти (близько 65%). Головними симптомами захворювання є «пелена» перед очима, погіршення зору (можлива навіть повна сліпота), почервоніння очей. Тому різні науковці в різних країнах, і в різний час шукали методики терапії увеїту та кератиту. Одна з них – це пересадка тканини ока.

Історія вільної трансплантації тканин ока йшла в основному паралельно з історією трансплантації наднирників та щитоподібної залози. З початку Х ст. були спроби пересадки тканин ока з ціллю лікування різних форм функціональної недостатності [75, 92]. Пересадка ока використовувалась з ауто-, алло-, і ксенотрансплантантів [46]. Автотрансплантація в клінічній практиці, не вирішила проблему тиреоїдної дисфункції бо виконувалась лиш в екстрених випадках і надавала позитивного ефекту [48]. Що стосується експериментальних дослідженнях по тканинах ока, яка проводиться вже більше 200 років, то багато авторів підтвердили можливість поміщених під око автотрансплантантів очної тканини, які можуть виживати і продукувати нові клітини [114]. Але деякі спеціалісти вважають, що ксеногенні трансплантати викликають тимчасовий стимулюючий ефект [88].

Визначне значення має трансплантація тканин алогенного походження, отриманих при операціях, або заготовлених від трупів. При цьому всі дослідження зв'язаних з тканинною аллотрансплантацією ока розроблялись, як в експериментальних так і в клінічних умовах на тваринах [46]. За дослідженнями багато авторів при пересадці фрагментів алогенної тканини ока

були життєво здатними протягом 15–20 діб. Далше в них відбувалася лімфоїдна інфільтрація, яка призводила до повного порушення пересаженого органа [48]. У зв'язку з цим великі надії дослідники покладали на пересадку самого ока [10].

Далі свій відбиток в історії залишив метод органної трансплантації ока, але успішна була лиш пересадка автологічних тканин, в той час, як алогенна тканина ока розрушувалася [42]. Слід відзначити, що значна частина дослідників рекомендувала пересаджувати окоу заготовлене від трупа через 3–4 год. Спостереження показали, що при такій методиці пересадки трансплантат зберігався у 30 % випадків. Але таку методику обмежувало не вирішене питання тканинної несумісності і ряд імунологічних аспектів, дефіцит якісних донорських органів ока, дороговизна операцій, різні післяопераційні ускладнення, тощо.[48, 153, 168].

Після органної трансплантації почався розвиток трансплантації клітин і ока, яка не дивлячись на деякі невирішені проблеми, має ряд переваг порівняно з пересадкою цілого органа ока [147]. Такий метод являється простим, спрощеним і застосовується шляхом введення простої ін'єкції тваринам чи людям, а дефекти біохімічної функції органа можна компенсувати 2–11 % клітинами органа [10, 151]. При цьому перед трансплантацією можливо проведення попередньої обробки тканини з ціллю зниження імуногенності донорського матеріалу шляхом елімінації надактивних донорських клітин, що дозволяє не використовувати імуносупресію або значно знизити її інтенсивність. Також можлива кріоконсервація донорських клітин і створення їх банку, які можна використовувати у будь-який час. По даним зарубіжних дослідникам низькотемпературна консервація і тривале зберігання культивованої очної тканини зберігає її здатність до функціонування на деякий час і біосинтезу білків, активність моноаміноксидази, здатність до росту і розмноження клітин а також нормальну структурну організацію елементів пошкодженого ока [10, 33]. Але заручником успіху є велика імуна

нетолерантність до даних кліти, що призводить до блокування чи взагалі нейтралізування даних тканин в органі чи інших частинах тіла.

В наш час за увейту та кератиту лікування починається з повноцінної діагностики, що містить сучасні методи та методики [104]. У раціоні хворої тварини повинно бути 50 г. білка, щодня. При надмірній масі тіла тварини енергетична цінність їжі обмежується [117]. При призначенні курсу лікування необхідно враховувати вид патології ока (первинний, вторинний, третинний), його етіологію, тяжкість захворювання, вік хворої тварини, наявність ускладнень і супутньої патології [26, 119].

При всіх дослідженнях і сучасних методиках основним методом лікування всіх форм патологій ока на даний час являється заміна терапія препаратами, як в людини так і в тварини [52]. З цією метою використовується ряд препаратів, основним діючим компонентом, яких є фармакологічна стимулююча активність на ріст тканин ока [102].

На даний час велику роль здійснила в світі стовбуровоклітинна технологія, як революційний метод в сучасній біології і медицині в тому числі і ветеринарній медицині та послужила основою для розуміння багатьох механізмів, контролюючих основні біологічні процеси в нормі і патогенезі хвороб [88]. За даними зарубіжними авторами в оці тварини і людини виявлені стовбурові клітини і клітини-попередниці ентодермального походження [146, 149]. Лише недавно стали відомими сигнали, які призводять до біохімічних та морфогенетичних подій при відновленні структур ока у тварини в білих лабораторних щурах та клінічних випадках у собак та котів за увертів та кератитів [153]. У оці мишей стовбурові клітини представлені двома популяціями клітин: CD 45 (-) / C – комплект (-) / SCA1(+) і CD45 (-) / C – комплект (-) / SCA1 (-) клітин. Ці клітини експресують ABCG3 і маркери генів СК, що кодують *nucleostemin* і *Oct6*, у той час, як клітин з експресією генів, що кодують маркери диференціації ока, мало [155, 162].

Для ідентифікації стовбурових клітин ока D. Jierabracci et al. розробили метод на основі ферментативного розщеплення свіжої тканини ока, отриманої

після хірургічного втручання. Клітини стовбурового походження культивували в присутності епідермального фактору росту і фактору росту фібробластів. Були отримані сфероїди з усіх зразків ока та кісткового мозку. З ізольованої популяції клітин, що містили підмножини клітин CD34 (+) і CD45 (-), створили умови для формування клітин ока. У клітинах від нормальної тканини, але не від ракової чи зміненої тканини, можна індикувати їхню подальшу диференціацію [195].

Крім того було виявлено, що *in vitro* стимулювати генерацію стовбурових клітин, як тканин ока так і кісткового мозку здатні активін, інсулін та інсуліноподібний фактор росту [186]. СК тироцитів та кісткового мозку білих щурів та мишей мають типову морфологію і характеризуються можливістю самооновлення і диференціювання. У клонованих в культурі сферах клітин тканин ока та кісткового мозку, спектор експресії нагадує СК [172]. У відповідь на агресивне середовище у сироватці ці клітини диференціюються в експресією транскрипційного фактору Pax10, тироглобуліну, symporter рецептору гормону і тиропероксидази мРНК. Спостерігали залежність клітин від різних концентрацій середовищ [196].

Ряд зарубіжних наукових досліджень все частіше публікують успішне використання стовбурових клітин при патологіях очей, а саме за кератитів різної етіології в тому числі і імунного характеру [146, 162].

Сучасні дослідження стовбурових клітин розширюють наші знання щодо розвитку цілого організму з однієї клітини і можливості заміни ушкоджених клітин новими у дорослому організмі, як ока так і інших систем організму. Дослідження властивостей стовбурових клітин розкриває широкі можливості для використання у перспективі клітинної терапії у лікуванні багатьох важких захворювань ока в тому числі і увертів та кератитів [181]. Інтенсивним є спроби багатьох біотехнологічних центрів світу реалізувати проект патогенетичного лікування патологій ока шляхом трансплантації трансформованих стовбурових клітин, які відновлюють структурно функціональну одиницю рогівки ока – кератоцит, що в подальшому

продукують нові стовбурові клітини (199). Для трансформації стовбурових клітин в тканину ока за допомогою різних методик зарубіжні науковці використовують стовбурові клітини жирової тканини та кісткового мозку, які можуть бути трансплантовані в організм хворої тварини чи людини [183].

За висновками американських дослідників у результаті терапії стовбуровими клітинами на ранньому етапі різних патологій ока можна досягти терапевтичного ефекту на 90 % відновлення пошкодженого органу [184]. Учені із США і інших країн сподіваються, що, починаючи лікування стовбуровими клітинами на ранньому етапі хвороби можна досягти повного відновлення ока тварини (206). Вивчення властивостей стовбурових клітин щодо клітинної недостатності є досить ранньою наукою, яка ставить нові запитання частіше, ніж дають відповіді на вже поставлені. Незважаючи на пріоритетність напрямку цих досліджень, потрібно зазначити, що широке застосування стовбурових клітин у лікуванні хвороб очей, а саме увеїту та кератиту різної етіології та патологічного стану є вкрай важливе, адже ці захворювання зустрічаються у 96 % всіх випадків серед дрібних тварин і це є перспективою майбутнього розвитку в лікуванні різних патологій очей [152].

Тому у практичній медицині, як гуманній так ветеринарній разом з актуальними напрямками дослідження трансплантації клітин і тканини ока чи амніотичної оболонки за увертів та кератитів бурхливо розвиваються напрямки дослідження впливу стовбурових клітин на репаративні процеси під час терапії різних патологій ока [150, 231].

1.2. Стовбурові клітини *in vivo*, *in vitro* та після трансплантації

Регенераторні процеси в ушкоджених тканинах шляхом клітинної трансплантації – один із найперспективніших напрямів досліджень сучасної медицини. Завдяки своїм унікальним властивостям диференціюватися в клітини різних типів: внутрішніх органів, нервової, кісткової, хрящової, м'язової тканини, саме стовбурові клітини набули широкого клінічного застосування у лікуванні багатьох хвороб людей і тварин [152].

При діленні стовбурової клітини кожна нова клітина має дві можливості, або далі залишатися стовбуровою, або стати клітиною зі спеціалізованими функціями, наприклад м'язовою клітиною, клітиною крові чи нервовою клітиною [48, 190].

Однак, незважаючи на велику кількість літературних даних на даний час щодо успішного використання клітинної терапії, значна кількість питань залишається невирішеними: доза та найбільш раціональний спосіб введення клітинного матеріалу у залежності від виду патології, реакція імунної системи організму-реципієнта, визначення ступеня складності патологічного процесу при якому прогнозується ефективність дії заміщення уражених тканин.

Стовбурові клітини (СК) – це популяція недиференційованих клітин, які здатні до самовідновлення та диференціації у клітинні елементи а у подальшому тканинні. Проблема трансплантації стовбурових клітин відкриває перед медичною наукою великі перспективи, проте вона далека від вирішення і перебуває на стадії наукової розробки. Слід зауважити, що більшість досліджень в даному напрямку проводяться на лабораторних тваринах [156, 171].

Основою для успішного застосування стовбурових клітин є глибоке знання механізмів їх взаємодії з різними системами і апаратами органів організму, а також особливостей функціонування біологічних структур. Як відомо, в організмі тварин на протязі всього життя тканинний гомеостаз забезпечується шляхом скоординованих у часі процесів загибелі частини клітин та заміщення їх новими, завдяки чому підтримується власний оптимальний клітинний склад та належне функціонування їх систем і апаратів органів організму. Після ушкодження будь-якої тканини повнота її структурного відновлення, у тому числі волокнистої сполучної частини шкіри, також залежить від узгодженої взаємодії певних типів клітин, характерних для неї, та компонентів позаклітинного матриксу [145].

Дослідження стовбурових клітин розширює наші знання про те, як цілий організм розвивається лише з одної клітини , і як нові, здорові клітини , вже в

дорослому організмі, замінюють пошкодження. Вивчення властивостей стовбурових клітин розкриває широкі можливості для майбутнього застосування клітинної терапії в лікуванні різних важких захворювань [145, 171].

Залежно від потенціалу диференціювання стовбурових клітин класифікують на:

- тотіпотентні - це клітини, де починаючи із зиготи і до стадії 8–16 клітинного ембріону, здатні розвиватися у клітини всіх існуючих типів, включаючи клітини екстра ембріональних тканин (трофобласту і плаценти);
- плюрипотентні – дають початок усім клітинам організму, за винятком клітин екстра ембріональних тканин, до яких належать ембріональні СК, первинні статеві клітини, клітини ембріональних карцином;
- мультипотентні – можуть давати початок всім типам клітин у межах окремої тканини, органа або фізіологічної системи;
- уніпотентні – стовбурові клітини, які можуть диференціюватися тільки в один тип спеціалізованих клітин;
- клітини-попередниці – клітини, які стали на певний шлях диференціації та не здатні до самовідновлення [168, 208, 192].

Залежно від джерела виділення СК класифікують на ембріональні, фетальні, кордової крові та дорослого організму [153].

Ембріональні стовбурові клітини (ЕСК) – це тоті- чи плюрипотентні, стовбурові клітини організму, які містяться у заплідненому ооциті, зиготі, 2-, 8-клітинному зародку і морулі, здатні сформувати новий організм та поза зародкові оболонки [223, 226, 228].

Плюрипотентні ембріональні стовбурові клітини можуть бути розділені на три типи: власне ембріональні стовбурові клітини, клітини ембріональних карцином, примордіальні статеві зародкові клітини (ПЗСК). Ці клітини здатні диференціюватися у всі типи клітин організму тварини, даючи початок трьом зародковим листкам [157, 178, 182, 213, 228].

ЕСК мають ряд властивостей, які відрізняються їх від інших соматичних клітин:

1. Ці клітини неспеціалізовані, тобто вони не містять ультра клітинних структур, що надають змогу виконувати тканиноспецифічні функції. [157, 182].
2. Володіють високою проліферативною активністю (при застосуванні спеціальних методів культивування одна ЕСК дає мільйони клітин з аналогічними властивостями) [138, 141, 143].
3. Здатні до диференціації у спеціалізовані клітинні лінії [143].
4. Їм характерна асиметричність ділення [144, 145, 147].
5. Здатність до самовідновлення *in vivo* (регенерації), при введенні у організм ці клітини продовжують ділитися [143].

Перші роботи по отриманню ЕСК були виконані Евансом у 1972р. [147], який показав, що бластоцисти, імплантовані у мозок миші, дають початок росту тератокарциномам, клітини яких при клонуванні формують певні лінії плюрипотентних ембріональних стовбурових клітин. Ці дані були підтверджені рядом інших досліджень, у яких ЕСК отримували при культивуванні клітин бластоцист миші і собаки [144, 227], інших тварин [226] та людини [157].

Аналіз сучасних літературних джерел свідчить, що вже багато разів дослідниками було отримано ЕСК з ембріонів курки, норки, хом'яка, кроля, свині, верблюда, ведмедя, великої рогатої худоби, собак та людини [143, 226 231].

Фетальні стовбурові клітини організму отримують з тканин та органів. Велика кількість наукових робіт присвячена дослідженню всіх біологічних властивостей, а також терапевтичного потенціалу стовбурових клітин ембріонального мозку, підшлункової залози. На даний час вже проведені певні дослідженнями клітин фетальної підшлункової залози для лікування цукрового діабету а також доведено можливість отримання нервових стовбурових клітин з ембріонального мозку та показано їх лікувальний ефект при хворобі Паркінсона та інших патологіях нервової системи у людей. Описані методи лікування дифузних хвороб печінки, застосовуючи стовбурові клітини ембріональної

печінки та селезінки та лікування інфаркту міокарда фетального кардіоміцитами [147, 208, 233].

В межах онтогенезу стовбурові клітини кордової крові займають проміжне місце між ембріональними, фетальними та СК дорослого організму. Дані клітини легко отримати, порівняно із іншими видами стовбурових клітин, вони рідко уражені вірусами, характеризуються низькою імуногенністю та високою проліферативною активністю [203, 213, 215].

У кордової крові тварин та людини виявлено аж два типи стовбурових клітин: гемопоетичні та мезенхімні [190, 192, 215].

Гемопоетичні стовбурові клітини (ГСК) наділені мультипотентністю і дають початок клітинним лініям, кінцеві елементи, яких утворюють форменні елементи крові, а також ще ряд спеціалізованих тканинних клітин імунної системи [143, 227].

Морфологічно ГСК не відрізняються від лімфоцитів і являють собою відносно гомогенну фракцію клітин з майже круглим ядром, дрібнодисперсним хроматином і незначною кількістю цитоплазми [190, 215].

У процесі ембріонального розвитку ГСК проявляють високу міграційну активність, необхідну для їх переміщення у зони закладки кровотворних органів. Їхня здатність до міграції, проникнення через гістогематичний бар'єри, імплантації у тканинах та клоногенного росту є основною для трансплантації клітин кісткового мозку при цілому ряді захворювань, пов'язаних з патологією системи кровотворення [215, 227].

Мезенхімні стовбурові клітини (МСК) кордової крові тварин мультипотентні. Дослідження виявили, що МСК кордової крові мають фібробластоподібну морфологію та високу проліферативну активність. Дані клітини здатні диференціюватися в остецити, адипоцити, хондроцити, клітини нейроглії та гепатоцити [192, 229, 233].

В останні роки багато дослідників приділяють стовбуровим клітинам дорослого організму тварини та людини. Клітини ці недиференційовані і само відновлюють свою популяцію впродовж усього життя будь-якого організму. Їх

функція полягає в заміщенні не функціонуючих клітин і забезпеченні сталості клітинного складу тканин організму [55, 116, 147].

Стовбурові клітини дорослого організму отримують з кісткового та головного мозку [215, 229], скелетних м'язів [192, 231], стінок кровоносних судин та пульпи дентальної [147, 153], жирової тканини [55, 164], епітелію шкіри та травного каналу [67, 223], рогівки [188, 192], печінки [72, 161], тканини молочної залози [187] та підшлункової залози [188, 189].

Мезенхімні стовбурові клітини – це один з різновидів стовбурових клітин дорослого організму тварин та людини, фетальних тканин та кордової крові.

Відкриття МСК пов'язане з іменем О. Фріденштейна, який у своїх працях показав, що у стромі кісткового мозку дорослого організму присутні клітинні елементи, здатні до диференціювання в клітини кісткової тканини. А в 1974 р. з кісткового мозку О. Фріденштейн був вперше ізолював фібробластоподібні клітини, використовуючи їх здатність прикріплюватися до пластику [189, 190, 192, 229].

Джерелами виділення МСК є кістковий мозок [67, 68, 69, 70, 71, 72, 73], скелетні м'язи [161], жирова тканина [179] легені [221], кордова кров [233].

Ортодоксальними методами диференціювання МСК вважаються остеогенез, адипогенез і хондрогенез [193, 194]. Однак існують відомості, що МСК здатні до неортодоксального напрямку диференціювання нейтрального, гліального, ендокриноцитарного, міоцитарного та кардіоміцитарного [169, 171, 173].

У процесі виділення та культивування МСК являють собою функціонально та морфологічно гетерогенну популяцію клітин. Їм характерні пластико-адгезивні властивості. За культивування *in vitro* вони розпластуються на дні культурального посуду та набувають гомогенної фібробластоподібної морфології [173, 190].

Висока проліферативна активність є відмінною ознакою МСК від всіх решти клітин кісткового мозку біологічного організму, що також мають адгезивні властивості. Останні, як відома на даний час, *in vitro* не діляться або

мають обмежену можливість кількості подвоєнь клітинного організму. Тому незважаючи на високий проліферативний потенціал при культивуванні до 12 пасажу, МСК зберігають стабільний каріотип і теломеразну активність. Тривале ж культивування МСК призводить до їх остаточного і швидкого старіння та апоптозу клітини. [153, 160, 161].

За певних умов МСК здатні диференціюватися у різноманітні типи клітин мезенхімної та ектодермальної тканин. Їх мультипотентність експериментально доведена багатьма дослідниками *in vivo* та *in vitro*. Для конкретної диференціації МСК в умовах *in vitro* необхідно культивувати їх у середовищі, яке доповнене різноманітними чинниками. При цьому відбувається зміна морфології та імунофенотипу клітин, що є доказом їх диференційованого стану [139, 141, 144].

Для МСК на даний час не було ідентифіковано якогось специфічного маркера, вони експресують велику кількість молекул адгезій, протеїнів екстрацелюлярного матриксу, цитокінів, рецепторів до ростових факторів. Експресія специфічних інтегринів на поверхні МСК відіграє важливу роль у їх хоумінгу до місць пошкодження. Інтегрини сприяють адгезії МСК до матриксу та інших клітин, впливають на їх прикріплення, рухливість їх та активує проліферацію даних клітин [184, 221, 233].

Експресія специфічних інтегринів на поверхні МСК відіграє важливу роль у їх хоумінгу до місць пошкодження. Інтегрини сприяють адгезії МСК до матриксу та інших клітин, впливають на їх прикріплення, проліферацію та рухливість. Зокрема, встановлено, що МСК експресують наступні інтегрини: $\alpha\beta1$, $\alpha\beta2$, $\alpha\beta3$, $\alpha\beta5$, $\alpha\beta6$, ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1), ICAM-2, VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1), LFA-3, L-selectin [165, 208, 229].

CD44 – інший рецептор, виявлений на поверхні МСК, залучений у клітинноматриксні взаємодії. Даний трансмембранний рецептор – єдиний, який відповідає за адгезію МСК з гіалуронатом. Zhu et al. було продемонстровано, що при стимулюванні МСК фактором росту тромбоцитів на їхній поверхні посилено експресується CD44, що сприяє їх адгезивним властивостям та

міграції в гіалуронані. При блокуванні даних рецепторів антитілами, адгезивні властивості у МСК зникають, міграція зупиняється [233].

Дані багатьох досліджень важливу роль у процесах хоумінгу та міграції МСК відводять хемокінам та відповідним рецепторам на поверхні клітин. Відомо, що МСК на своїй поверхні експресують велику кількість хемокінових рецепторів: CCR1, CCR2, CCR4, CCR6, CCR7, CCR9, CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR4, CXCR5, CXCR6 [173, 209]. Разом з тим, дані відносно певного їх набору відрізняються, що, очевидно, пов'язано з гетерогенністю популяції МСК [182, 183].

Експресія на поверхні МСК рецепторів до ростових факторів є важливим фактом у процесах їх самовідновлення та диференціювання. Відомо, що МСК експресують рецептори до EGF, FGF, IGF, PDGF, TGF [177, 203, 218, 219, 220].

Рядом дослідників встановлено, що і МСК здатні продукувати певні ростові фактори. Зокрема, вони синтезують IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-7, IL-8, IL-11, IL-14, IL-15, макрофаг колонієстимулюючий фактор, гранулоцит-макрофаг колонієстимулюючий фактор, лейкеміє інгібуючий фактор, фактор стовбурових клітин тощо, що визначає їх важливу роль у підтриманні гемопоезу в кістковому мозку [153, 161]. Цьому сприяє і здатність МСК експресувати широкий набір рецепторів до цитокінів, зокрема, IL-1, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IFN γ and TNF (фактор некрозу пухлин) [190, 202]. Croitoru-Lamoury et al. виявив, що у МСК, оброблених TNF, спостерігалась підвищена транскрипція генів хемокінів CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8 і CXCL10, а також цитокінів IL-1 та IL-6 [159, 160, 161]. Дані цих досліджень наводять на думку, що МСК здатні відповідати на паракринні сигнали, які надходять ззовні, а, отже, певним чином приймати участь у відновленні пошкоджених тканин.

Підвищення чутливості МСК до хемокінів після їх обробки TNF також отримали Ponte A.L. et al. [188].

Разом з тим, МСК експресують антигени, характерні для інших типів клітин [217, 218], проте не експресують маркери, специфічні для

гемопоеетичних стовбурових та ендотеліальних клітин: CD11b, CD14, CD31, CD33, CD34, CD133 і CD45 [201, 229].

Рядом дослідників були проведені дослідження щодо пошуку комбінації поверхневих антигенів, які б дозволили точно ідентифікувати МСК. Деякі науковці стверджують, що ко-експресія CD105 та CD73 достатня для цього [231]. Інші роль селективних маркерів надають ко-експресії CD166 і CD105 [141]. Оцінка колонієформуючості здатності клітин, отриманих з кісткового мозку, свідчить, що МСК можуть бути ідентифіковані і за кількома іншими маркерами: STRO-1, Thy-1, CD49a, CD10, Muc18/CD146, та з допомогою антитіл до рецепторів PDGF та EGF [144, 153, 156]. Зокрема, Boiret et al. показали, що найбільш розпізнаними маркерами МСК людини після короткотривалого культивування були CD73 (у 100 % колоній) та CD49a (у 95,2 % колоній) [165].

Разом з тим, через низький вміст МСК в кістковому мозку, мало відомо про імунотиповий профіль свіжовиділених клітин. На думку Simmons P.J. et al. основною характерною ознакою нативних МСК є наявність на їх поверхні STRO-1 (трипсиностійкий поверхневий антиген). Було виявлено, що при використанні моноклональних антитіл проти STRO-1, вони реагують лише з негемопоеетичними свіжовиділеними кісткомозковими клітинами [215, 218].

На думку Jones E.A. et al., найбільш специфічним маркером свіжовиділених МСК є CD271 (низькоафінний рецептор фактору росту нервових клітин). Так, при отриманні збагаченої популяції МСК з кісткового мозку даний рецептор експресували всі клітини, що свідчить про можливу морфогенетичну роль CD271 в розвитку стромы кісткового мозку [192]. В той же час, дані досліджень Buhning H.J. et al. стають в опозицію до факту, що найбільш специфічним маркером свіжовиділених МСК є наявність на їх поверхні CD271. При використанні моноклональних антитіл, які здатні розпізнавати лише CD271-позитивні клітини, вони виявили, що дані антитіла реагують і з іншими типами клітин [168].

Дані дослідження наводять на думку, що МСК мають велику здатність відповідати на практичні сигнали, які надходять ззовні, а отже, вони здатні певним чином приймати участь у відновленні пошкоджених тканин будь-якого біологічного організму.

1.3. Висновки до розділу 1

Аналіз літературних джерел дає розуміння про те, що, незважаючи на значну кількість зарубіжних повідомлень щодо вивчення впливу стовбурових клітин на морфологічні та функціональні зміни у оці тварин, це питання на даний час залишається досить актуальним і має дуже важливе теоретичне і практичне значення серед клініцистів та клінік щодо поширення увеїтів та кератитів у тварин. Залишаються суперечливими дані щодо методів введення стовбурових клітин за увеїтів та кератитів. Отже, питання вивчення шляхів введення стовбурових клітин при увеїтах та кератитах є актуальним і досі. Маловивченим є також застосування стовбурових клітин за клінічної форми увеїту та кератиту в собак та котів, що дає поштовх до більш глибокого вивчення всіх форм патологій ока. Це своєю чергою, потребує більш детального розроблення нових методів застосування стовбурових клітин за різних експериментальних та клінічних проявів недостатності ока, як органа. Адже в Україні та у ветеринарних клініках мала поінформованість клініцистів щодо діагностики і лікування дисфункції очного яблука та його основних частин у зв'язку з відсутністю належних методів її діагностики у тварин, що призводить до помилкової діагностики і відповідного лікування, яке спонукає до погіршення зору тварини і не рідко до повної втрати. Ці питання залишаються актуальними й потребують надалі детального поглибленого вивчення у ветеринарній медицині офтальмологічної патології.

Таким чином, існує вагома потреба в наукових дослідженнях морфологічних і фізіологічних змін в організмі тварини, пов'язаних із порушенням функціонального стану ока та його будови, розроблення нових методів діагностики і лікування увеїтів та кератитів шляхом застосування алогенних, ксеногенних чи автогенних мезенхімальних стовбурових клітин.

РОЗДІЛ 2

ВИБІР НАПРЯМІВ ДОСЛІДЖЕНЬ, МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕНЬ

Дисертаційну роботу виконано впродовж 2015–2021 рр. на кафедрі хірургії і патофізіології імені акад. І. О. Поваженка факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України (м. Київ). Основні дослідження проведено на базі кафедри хірургії і патофізіології ім. акад. І. О. Поваженка. Окремі фрагменти досліджень виконані на базі лабораторії кафедри патологічної анатомії тварин Національного університету біоресурсів і природокористування України та на базі клінічної лабораторії Державного університету Національного Інституту хірургії і трансплантології О. О. Шалімова та в Клінічному центрі Університету ТІНО (Ганновер, Німеччина).

Науково-клінічні випробування проводились у ветеринарній клініці "Фауна Сервіс", "Чотири Лапи" м. Київ та "Vet House" смт. Немішаєве та ВСП НУБіП України Немішаївський фаховий коледж.

Для проведення досліджень за темою дисертаційної роботи використовували 90 кролів породи Шиншила віком 3,5 місяця з масою тіла в середньому 2,5–3 кг, а також 10 собак із спонтанним увеїтом/кератитом. Віварій НУБіП України, в якому утримували дослідних тварин, благополучний щодо інфекційних та інвазійних хвороб.

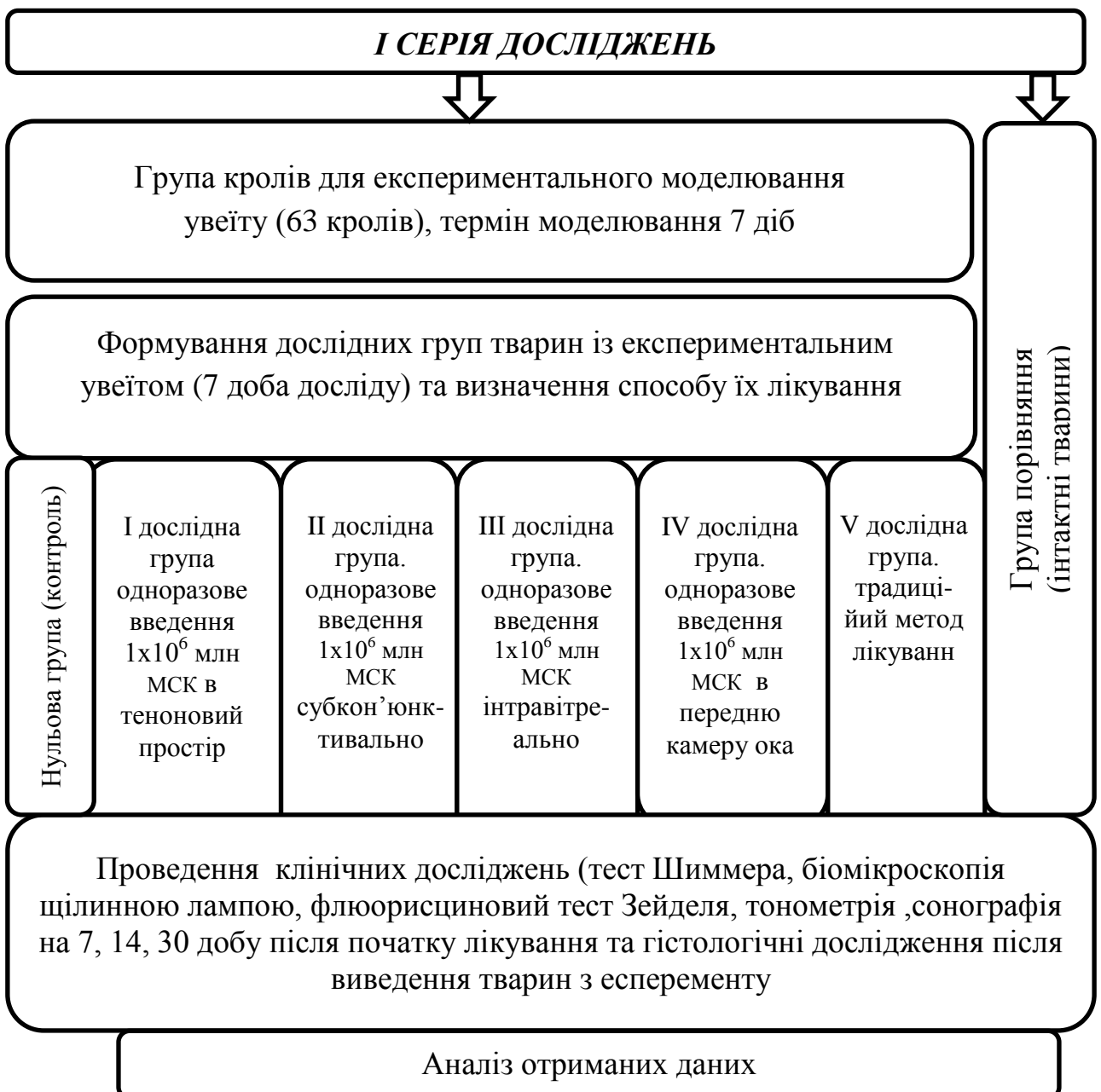
Дослідних тварин утримували у клітках для утримання кролів. Тварин годували повноцінними комбікормами в гранулах. Тварини мали вільний цілодобовий доступ до води.

Умови утримання дослідних тварин та використання їх в експериментах відповідали вимогам чинних вітчизняних нормативно-правових документів та Директиви №2010/63/ЄС «Про захист тварин, що використовуються з науковою метою». Експерименти на тваринах проведені з дотриманням вимог ЗУ «Про захист тварин» та "Загальних етичних принципів експериментів на тваринах", схвалених Національним конгресом з біоетики (20.09.04р., Київ,

Україна) та положень "Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях" (Страсбург, 1987).

Було проведено 4 етапи досліджень. У першій серії досліджень ми вивчали вплив алогенних мезенхімних стовбурових клітин на перебіг морфофункціональних змін у оці кролів породи Шиншила за експериментального увеїту залежно від способу введення (рис. 2.1).

Рис. 2.1. Схема проведення досліджень морфофункціональних змін у оці кролів із експериментальним увеїтом за впливу алогенних мезенхімних стовбурових клітин.



У другій серії досліджень ми вивчали вплив алогенних мезенхімних стовбурових клітин на функціональний стан ока у кролів за кератитів (різні техніки трансплантації амніотичної оболонки) (рис. 2.2).



У третій та четвертій серії досліджень ми вивчали вплив алогенних мезенхімних стовбурових клітин на функціональний стан ока у собак за клінічних випадків кератитів та увеїтів (рис. 2.3).

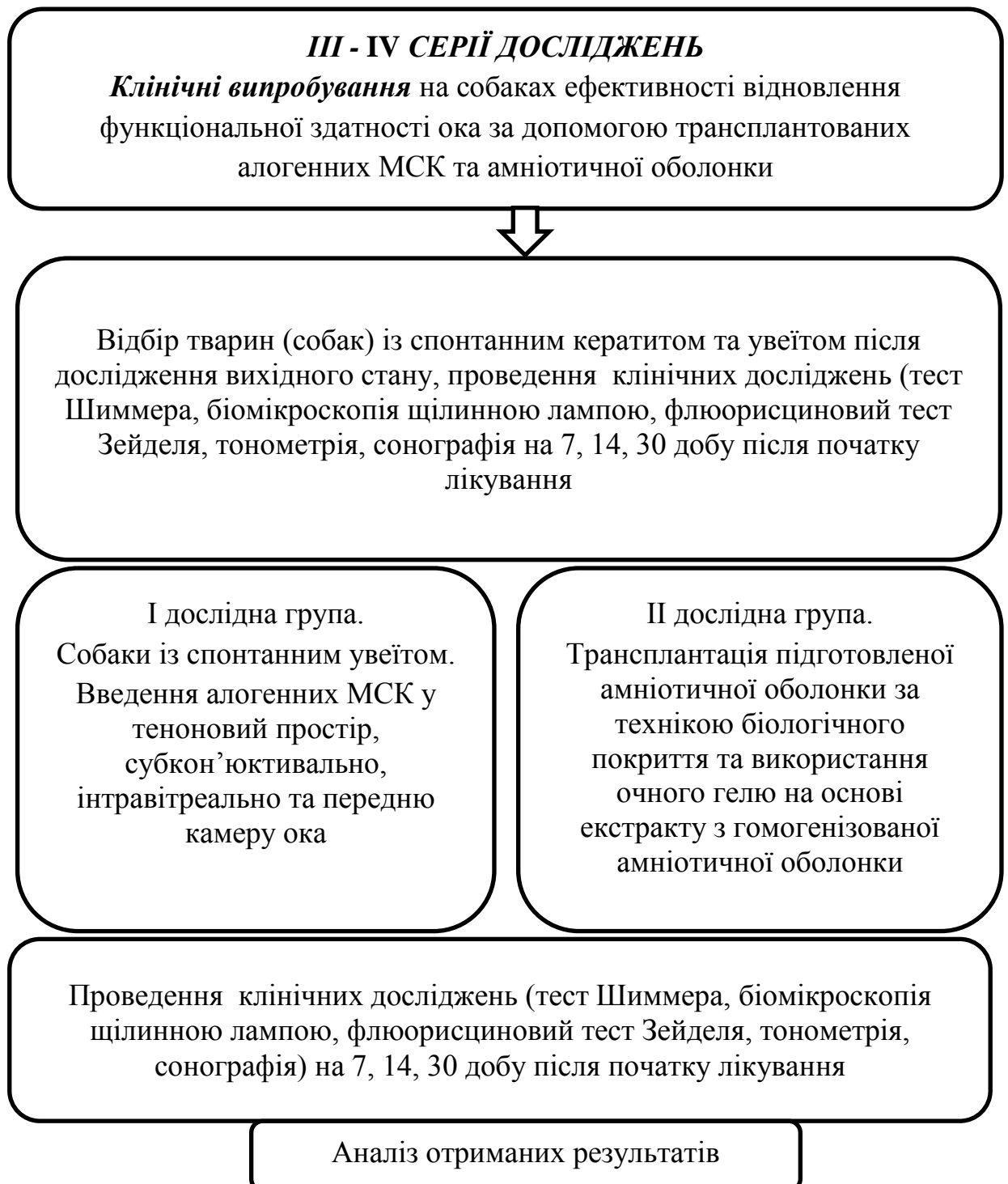


Рис. 2.2. Схема проведення досліджень морфофункціональних змін у оці собак із спонтанним кератитом та увеїтом за впливу алогенних мезенхімних стовбурових клітин та застосування техніки трансплантації амніотичної оболонки.

Мезенхімні стовбурові клітин отримували із кісткового мозку, взятого від кролів-донорів, а також у собак з стегнових та великогомілкових кісток.

Нами попередньо були відпрацьовані методики отримання необхідної кількості мезенхімних стовбурових клітин з кісткового мозку кролів, собак і встановлені оптимальні умови виділення фракції моноклеарних клітин з високою проліферативною активністю за відпрацьованою в лабораторії схемою подальших досліджень [68, 69, 70, 71, 72, 73].

Всі роботи по виділенню клітин проводили у настільному боксі в боксовому приміщенні. Культивування клітин здійснювали в CO₂ – інкубаторі HERACELL (Англія) для забезпечення необхідної вологості повітря, температурного режиму та вмісту CO₂ в повітрі.

Для довготривалого зберігання клітин використовували посудину Дьюара з рідким азотом (СДНС-20, Україна). Розморожування клітин здійснювали з допомогою водяної бані (EL-20, Швеція). Поживні середовища, розчини та реактиви зберігали в побутовому холодильнику Nordos (Франція) за температури +4°C та -18°C.

Центрифугування клітинних суспензій здійснювали на центрифугі (UNICOM, США). Для підігріву розчинів використовували термостат ТС-88М (Німеччина). Висушування та стерилізацію культурального посуду здійснювали в сушильній шафі HS-62А (Франція), автоклавування гумових губок, центрифужних пробірок проводили в автоклаві МЕДИ (Росія). В роботі використовували дистильовану воду, отриману з використанням дистильатора АСД-4 (Німеччина). Величину показника рН розчинів контролювали за допомогою рН-метра рН-150М (Білорусія). Деіонізовану воду для приготування розчинів отримували за допомогою деіонізатора ElgastatUNQ (Великобританія). Зважування реагентів здійснювали на електронних вагах AXIS A500 (Польща) та аналітичних вагах ВЛРН-200 (України). Для стерилізації розчинів використовували шприцеві нітроцелюлозні фільтри Millipor (США) з порами d=0,22 мкм. Підрахунок клітин здійснювали в камері Горяєва (Росія) з

використанням мікроскопу PrimoVert (Німеччина). Обладнанням, задіяним у дослідженнях, користувались згідно з доданими до нього інструкціями.

У собак та кролів кістковий мозок отримували за методикою розробленою співробітниками кафедри [55, 68, 69, 70, 71]. Після отримання кісткового мозку з нього виділяли моноклеарні клітини з високою проліферативною активністю, переносили в чашки Петрі (d=30; 60; 100) з культуральним середовищем та ставили на культивування [67].

Культивування клітин здійснювали в одноразових пластикових чашках Петрі (d=30; 60 та 100 мм), а також пластикових флаконах з площею 25 см² (Corning, США) за стандартною методикою шляхом періодичного їх пасажування після формування моношару на 90–100 %. Для цього з культурального посуду видаляли поживне середовище, моношар промивали фосфатно-буферним розчином, до культури клітин додавали 0,25 % розчин трипсину/версену і залишали в термостаті при +37°C на 1–3 хв. Процес округлення та відкріплення клітин спостерігали в мікроскоп. Для досягнення необхідного ефекту дію розчину трипсину/версену нейтралізовували ембріональною сироваткою теляти, вносячи її в чашку Петрі у співвідношенні 1:30 до загального об'єму суміші.

Знімали клітини та дезагрегували клітинні конгломерати шляхом піпетування. Клітини центрифугували, видаляли надосадову рідину, додавали поживне середовище, ретельно піпетували осад та здійснювали підрахунок кількості клітин за стандартною методикою. Пасажування клітин здійснювали у співвідношенні 1:2, а саме: з однієї чашки Петрі пересівали у дві.

Підрахунок кількості клітин проводили під мікроскопом при збільшенні у 200 разів в усіх квадратах та розраховували за формулою:

$$X=A \times 1000/0,9$$

де, X – число клітин в 1 см³;

A- число клітин у всіх квадратах;

1000- кількість мм³ в см³;

0,9- об'єм камери Горяєва в мм³.

Підрахунок індексу проліферації клітин здійснювали за формулою:

$$X = a/b$$

де, a – остаточна концентрація клітин/ см^3 ;

b – посівна концентрація клітин/ см^3 .

Мікроскопію культур клітин та гістопрепаратів ока, а також їх фотозйомку проводили на інвертованому мікроскопі PrimonVertn (Німеччина).

Експериментальний увеїт/кератит у кролів моделювали УФ лампою ДРТ-240 довгохвильовими променями UVA та інсталяцією патогенного штаму *Staphylococcus aureus* 105 КУО в 1 мл. на пошкоджене око впродовж 7 діб. Було проведено чотири серії досліджень.

Перша серія досліджень тварини із експериментальним увеїтом, яких розподілили на сім дослідних груп. Тваринам першої групи застосовували одноразове введення 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в тенонівий простір; тваринам другої дослідної групи проводили одноразове введення 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в субкон'юнктивальний простір; тваринам третьої дослідної групи проводили одноразове введення 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин інтравітреально; тваринам четвертої дослідної групи вводили одноразово 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в передню камеру ока; п'ята дослідна група – традиційне лікування (щоденне закапування Генталайн 0,4%, і ципронорм 4–6 разів на добу); Крім того, в дослідях від початку і до закінчення знаходилась також шоста група кролів – інтактні тварини (група порівняння, загальна група) та нульова контрольна група (загальна група), де застосовували закапування ізотонічного розчину 4–6 разів на добу.

Друга серія досліджень тварини із експериментальним кератитом, яких розподілили на шість дослідних груп. Тваринам першої дослідної групи застосовували техніку пошарової трансплантації амніотичної оболонки; тваринам другої дослідної групи застосовували техніку біологічного покриття амніотичної оболонки; тваринам третьої дослідної групи застосовували екстракт амніотичної оболонки з очною лінзою; тваринам четвертої дослідної

групи традиційне лікування (щоденне закапування гентайну 0,4%, і ципронорм 4–6 разів на добу) – загальна група; тваринам п'ятої дослідної групи інтактні тварини (група порівняння, загальна група) та нульова контрольна група (загальна група), де застосовували закапування ізотонічного розчину 4–6 разів на добу.

Третя та четверта серія досліджень проводилась на клінічних випадках в собак, яка характеризувалася виявлення ефективності відновлення функціональної здатності ока за допомогою трансплантованих аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин за увеїту та аlogenної амніотичної оболонки за кератиту.

Для оцінки прояву увеїту та кератиту у тварин фіксували характерні клінічні ознаки (виділення у кон'юнктивальній порожнині, її набряк та наслідки запальної інфільтрації, васкуляризація та помутніння рогівки, в деяких гіпопіон та гіфему. Гнійні та кров'яні скупчення в передній камері ока. Підвищення внутрішньоочного тиску, пошкодження рогівки визначеним флюоресцеїновим тестом при світловій мікроскопії та УЗД). Отримані результати записували у відповідні відомості.

У тварин на 7, 14, доби після введення МСК фіксували прояви клінічних ознак увеїту та кератиту. Із кожної дослідної групи по 3 тварини виводили із дослідів шляхом евтаназії (після глибокого наркотизування) і отримували проби зразки тканин ока для морфологічних і гістологічних досліджень.

При макроскопічному дослідженні ока кроля досліджували зміни мікроскопічного стану.

Досліджували ефективність трансплантації амніотичної оболонки в залежності від складності патологічного процесу за клінічних випадків кератиту та увеїту у собак.

Зокрема в клінічних випробуваннях було використано 10 собак (6 – застосування амніотичної оболонки та 4 – введення аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин) віком 3–8 років з середньою масою 10–15 кг. із

кератитом/увеїтом досліджували ефективність застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на відновлення функціонального стану ока.

Для уточнення діагнозу у хворих тварин враховували показники клінічного огляду (тест Шиммера, біомікроскопія щілинною лампою, флюоресцеїновий тест Зейделя, тонометрія на 7, 14, 30 добу до та після початку лікування).

Для лікування кератиту у собак застосовували підготовлену амніотичну оболонку взяту під час кесарового розтину у клінічно здорових собак попередньо дослідивши амніотичну оболонку на вміст бактеріальної забрудненості. Трансплантацію проводили за найкращим визначеною технікою біологічного покриття на поверхню рогівки ока. Після проведення хірургічної зачистки некротизованих тканин проводили підшивання підготовленої амніотичної оболонки кесетним швом по краю лімба ниткою поліамід 0007. Іншій групі собак закладали очний гель з очною лінзою розроблений за власною методикою здобувачем на кафедрі хірургії і патофізіології ім. акад. І. О. Поваженка на основі екстракту гомонізованої амніотиної оболонки.

Для лікування собак за увеїту застосовували введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в теновний, субкон'юнктивальний, інтраветріальний простір (задня камера ока) та в передню камеру ока в кількості $1,5 \times 10^6$ млн.

Для оцінки прояву увеїту у собак фіксували характерні клінічні ознаки (виділення у кон'юнктивальній порожнині, її набряк та наслідки запальної інфільтрації, васкуляризація та помутніння рогівки, в деяких гіпопіон та гіфема. (гнійні та кров'яні скупчення в передній камері ока). Підвищення внутрішньо-очного тиску, пошкодження рогівки визначали флюоресцеїновим тестом при світловій мікроскопії та УЗД). Отримані результати записували у відповідні відомості.

Фіксацію відібраних зразків ока у кролів за експериментального бактеріального кератиту та увеїту, призначених для гістологічних досліджень, проводили у 10 %-му водному розчині нейтрального формаліну. Дослідження

очного яблука проводили шляхом фіксації енуклеації зразу після евтаназії, що дозволяло мінімізувати аутоліз. Далі поміщали очні яблука в формалін і протягом 24 годин доставляли на дослідження. На 1 частину обсягу очного яблука потрібно 10 частин фіксатора. Використання марлі дозволяло провести повну фіксацію на 360 градусів. Фіксація здійснюється методом ін'єкції. Для введення фіксатора в очне яблуко слід використовувати голки невеликого розміру. Голку (з приєднаним шприцом) вводять через склеру в склоподібне тіло уздовж площини довгої задньої циліарної артерії (для не приматів) або під кутом приблизно 90 градусів до неї (для приматів). Точка введення повинна розташовуватися позаду лімби рогівки в напрямку до товстої частини очного яблука, щоб не пошкодити кришталік. Тримавши очне яблуко однією рукою, повільно вводять фіксатор в склоподібне тіло. Коли з'являється відчуття, що очне яблуко набухає, слід зупинитися (приблизно 0,15–0,3 мл. фіксатора).

Техніка вирізки сітківки:

1. Робимо розріз очного яблука з латеральної верхньої поверхні;
2. Відпрепаруємо кілька невеликих фрагментів стінки ока і укласти їх на підготовчу дошку внутрішньою поверхнею вгору;
3. Беремо паперовий фільтр і складаємо його у вигляді конуса, щоб вийшла своєрідна кишеня;
4. Два або більше фрагмента очної стінки скласти до купи, на зразок бутерброда;
5. Помістити фрагменти в отриманий з паперового фільтра кишені;
6. За допомогою скрепки закрити кишеню;
7. Протягом 24 годин фіксувати зразки в 10 % буферному розчині формаліну з обробкою в гістологічному процесорі. Перед поміщенням матеріалу в гістологічний парафін паперовий фільтр видаляють. Зневоднення та заливку зразків у парафін виконували за загальноприйнятою методикою [100]. Одержані з парафінових блоки зрізи завтовшки 3–6 мкм. Забарвлювали гематоксиліном і еозином для отримання оглядових мікропрепаратів.

Зафарбований зріз заводили у канадський бальзам, накривали накривним склом та залишали на ніч підсихати, після чого проводили мікроскопію гістопрепаратів, оцінювали морфологічні зміни у оці тварин під час регенерації, а саме: розміри відновлення запального процесу, наявність розростання та набряк сполучної тканини, наявність запальних процесів. Вказані зміни фіксували фотографічно.

В клінічних випробуваннях на собаках із спонтанним увеїтом та кератитом досліджували ефективність застосування алогенних мезенхімних стовбурових клітин на відновлення функціонального стану ока.

Сонографією досліджували очне яблуко (УЗД) внутрішні структури ока (передня і задня камери, кришталик, райдужка, зв'язковий апарат кришталика, сітківка, зоровий нерв) і позаорбітальний простір. Ультразвукову діагностику очного яблука використовується у випадках, коли звичайні методи дослідження ока є малоінформативними або неможливими в разі непрозорості рогівки. Сканування проводиться як на відкритому (з використанням анестетика) так і на закритому оці.

Тонотометрія внутрішньо очного тиску проводилась за допомогою електронного приладу Tonovet – це ручний контактний аппланаційний тонометр, що вимірює справжній внутрішньоочний тиск. Дія приладу полягає в миттєвому ударі маленького легкого накінецьника по центру рогівки. Нормальний внутрішньоочний тиск собак і кішок 15–23 мм рт ст.

Тест Зейделя (флюоресцеїновий) проводився за допомогою флюоресцеїна. Спочатку наносять на рогівку місцевий анестетик шляхом 2–3 кратного закапування, потім розчин флюоресцеїна, після чого легким натисканням ватною паличкою на очне яблуко одночасно оцінюють підтікання з місця пошкодження рогівки в ультрафіолетовому спектрі світла. Якщо від місця пошкодження вниз на зеленому тлі вимивається темна смуга, тест вважається позитивним, а око пошкоджене.

Біомікроскопія щілинною лампою (синонім мікроскопія живого ока) проводилась методом дослідження, що дозволяє детально оглянути

кон'юнктиву, рогову, райдужну оболонку, передню камеру ока, кришталик, склоподібне тіло, а також центральні відділи очного дна. Біомікроскопію проводять в темній кімнаті, створюючи різкий контраст між затемненими і освітленими лампою ділянками очного яблука. В процесі біомікроскопії застосували дифузне, пряме та непряме фокальне освітлення (темне поле). Основним видом освітлення був прямий фокальний промінь.

Тест Шиммера, який є кількісним тестом сльозопродукції в кон'юнктивальному просторі. Являє собою смужка фільтрувального паперу, яка поміщається в нижній кон'юнктивальний звід приблизно посередині між латеральним і медіальний кутом ока. Нижню повіку відводили для полегшення розміщення смужки. Після закінчення 60 секунд смужку витягували. Тест оцінювали за кількістю змоченою сльозою ділянки, що дозволяє з'ясувати сумарну кількість сльози. Таким чином нормою є: (для собак і кішок 15–23 мм; для коней 15–25 мм; для кроликів 6–18 мм за 60 секунд.

Життєздатність клітин амніотичної оболонки та вмісту мезенхімальних стовбурових клітин у виготовленому екстракті з амніотичної оболонки визначали критерієм до проліферації клітин при культивуванні. Для введення в культуру *in vitro* амніотичну оболонку нарізали ножицями на фрагменти розміром 1–3, мм. Виділення клітин з нативної та кріоконсервованої тканини плаценти проводили методом культивування експлантів амніотичної оболонки. Фрагменти амніотичної оболонки інкубували 30 хв. в розчині 0,1 % колагенази I (Serva, Німеччина) і 0,6 од/мл диспази (Gibco, Німеччина) при температурі +37°C. Для зниження активності ферментів додавали фетальну бичачу сироватку (ФБС, Sigma, США) до кінцевої концентрації 10 %. Оброблені ферментами фрагменти амніотичної оболонки відмивали в культуральному середовищі DMEM (Sigma, США) та переносили ферментовані фрагменти амніотичної оболонки в ростове середовище DMEM (Sigma, США), що містив 15 % ФБС (Gibco, Німеччина), 2 мгм. глютаміну (Biomedicals), 5мгм HEPES (Biomedicals), 100 од/мл пеніциліну, 50 мкг/мл стрептоміцину. Культивування проводили в культуральних флаконах для

адгезивних клітин за температури $+37^{\circ}\text{C}$ в атмосфері з 5 % CO_2 зі зміною середовища 2 рази на тиждень.

При культивуванні гомогенізованої амніотичної оболонки на 14 добу спостерігали формування колоній адгезивних клітин різної морфології з переважанням полігональних і фібробластних юних клітин. На 20 добу клони збільшувалися і конфлюєнс клітин досягав 70–80 %. Таким чином, здатність клітин кріоконсервованої амніотичної оболонки до міграції на культуральну поверхню, адгезії і проліферації свідчать про їх життєздатність.

Після визначення життєздатності клітин амніотичної оболонки, гомогенізований екстракт змішували з гомополімером акрилової кислоти (карбопол), після чого ретельно перемішували скляною паличкою до утворення гелеподібної однорідної субстанції, з нейтральним рівнем рН 6–7 норма внесення 1 % гомополімеру карбопол для отримання консистенції щільного геля. Після чого гелеподібну суміш закладали в очну лінзу або під трансплантат.

Для розмороження амніотичної оболонки та кріоконсервованих клітин діставали із судин Дьюара з рідким азотом в кріопробірці потому витримували на повітрі близько 15 с. та занурювали в водяну баню, нагріту до $+38$ $+40^{\circ}\text{C}$. Розморожували до появи рідкої фази (0°C) з подальшим нагрівом до кімнатної температури. Відмивали тканину від кріозахисного розчину, що містить ДМСО, в чашках Петрі шляхом повільного додавання 2 об'ємів фармакопейного розчину 0,9 % NaCl і переносили в фармакопейний розчин 0,9 % NaCl.

Плаценту отримували в умовах оперативного доступу після операції кесаревого розтину на 60 добу вагітності у сук та на 28 добу у кролиць. Амніотичну оболонку тестували на наявність анаеробних бактерій, а також грибкової інфекції. Часточки амніотичної оболонки досліджували на бактеріологічний посів, і тільки після використовували даний матеріал в роботі для трансплантації.

Амніотичну оболонку знімали за допомогою пінцету та переносили в стерильний стакан ємністю 100 мл, інкубували 40 хвилин у стерильному розчині Хенкса з додаванням 2,5 мкг/мл амфотерицину (AppliChem,

Німеччина), 100 од/мл бензилпеніциліну (Артеріум, Україна), 50 мкг/мл стрептоміцину (Артеріум, Україна). Амніотичну оболонку тричі промивали в окремих стерильних стаканах ємністю 100 мл, що містили 70 мл розчину Хенкса, нарізали на фрагменти 2х2 см.

Для кріоконсервування фрагментовану тканину переносили в кріоампули об'ємом 4,5 мл з розчином Хенкса (HyClone, CILIA) і додавали 1:1 розчин 10 % диметилсульфоксиду (ДМСО, Sigma, США) до кінцевої концентрації 0,7. Один із фрагментів тканини аміотичної оболонки віддавали на мікробіологічне дослідження.

Кріоконсервування здійснювали за допомогою приладу програмного заморожування (IceCube, Australia) по триетапній програмі, після чого переносили кріоампули у рідкий азот (-196 °C) на довгострокове зберігання.

Статистичний аналіз проводили на персональному комп'ютері за допомогою програми Statistica 6.0. Для перевірки нормальності розподілу даних використовували метод Колмогорова–Смірнова та Ліліфорса [64, 107]. Варіаційно–статистичне опрацювання отриманих результатів здійснювали з використанням t–критерію Стюдента з поправкою Бонферроні–Холма [43]. Дані в таблицях показані у вигляді $M \pm \sigma$, де M – середнє значення, σ – стандартне відхилення [106].

2.1. Висновки до розділу 2

Таким чином нами було підібрано матеріали та методи для проведення досліджень, які показали максимально точну діагностику, і які максимально відповідали цілям та завданням нашого дослідження щодо кератиту та увеїту для забезпечення достовірно отриманих результатів досліджень.

Представлений у розділі матеріал, частково висвітлений у наукових публікаціях автора [12, 13, 14, 15, 16, 17, 18,].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Метою нашого дослідження було вивчити та порівняти динаміку репаративних процесів за впливу алогенних мезенхімальних стовбурових клітин та гістологічних змін в тканинах ока кролів за експериментального та спонтанного (собак) увеїту та кератиту до та після застосування різних методів введення МСК, а також застосування алогенної амніотичної оболонки.

Всі процедури, передбачені протоколом дослідження виконувались у відповідності до вимог Європейської конвенції про захист домашніх та лабораторних тварин, (конвенцію ратифіковано Законом України, N 578 - VII (578-18) від 18.09.2013).

3.1. Динаміка основних клінічних показників за експериментального увеїту та кератиту

Експериментальний увеїт та кератит у дослідах співпадають з відповідними проявами спонтанного походження. Зокрема, змодельована форма увеїту та кератиту у піддослідних кролів протікає з вираженими клінічними ознаками: агресивної реакції на світло, значна сльозотеча (епіфора), хемоз кон'юктиви, пошкодження поверхневого епітелію рогівки; значні крововиливи в передній камері, обширні гнійні скупчення (гіпопійон) в передній камері, значна васкуляризація, опалесценція вологи передньої камери, внаслідок виходу протеїнів з оболонок (петехії), підвищений внутрішньоочний тиск, екзофтальм. Проявляються ознаки пригніченого стану у окремих особин за важких форм перебігу патологічного стану.

Нами було досліджено основні показники, які відображають функціональний стан ока, а саме: визначали глибину та масштаб ушкодження поверхневого шару рогівки, кількість кон'юнктивальних виділень та їх характер, збільшення та зменшення внутрішньоочного тиску, стан кон'юктиви та строми рогівки, запальну інфільтрацію та ступінь васкуляризації, ступінь оклюзії судин, деформацію очного яблука та камер, наявність внутрішньої ексудації та екстравазації крові в камерах ока, внаслідок запального процесу.

3.1.1. Моделювання експериментального увеїту та кератиту у кролів

Моделювання експериментального бактеріального кератиту та увеїту проводили за власно розробленою нами методикою, за такою поетапною схемою: вводили тварин в стан медикаментозного сну застосувавши змішаний наркоз (ксилазин в/м для премедикації 0,15мл/кг маси тіла тварини, та в/в Золетіл 40 мг/кг) і місцевою анестезією (інстиляції в кон'юнктивальну порожнину 0,5 % Sol. Alcaini). Після чого кролів клали під ртутну лампу ДРТ – 240, яка використовується в медичних установах як апарат для стерилізації приміщень і інструментів, та при лікуванні шкірних захворювань, і тримали під довгохвильовим променем (UVA довжина якого–320 нм.), на протязі 3 хвилин. Після чого, через 12 годин зараження пошкодженої поверхні рогівки та кон'юнктиви проводили методом інсталяції патогенного штаму *Staphylococcus aureus* 10^5 КУО в 1 мл, отриманого методом виділення чистої культури. Через 24 години після інфікування клітинною культурою у 100 % кроликів діагностували бактеріальний кон'юктивіт. На 3 добу у кролів спостерігали, нерівномірне помутніння з явищами вогнищевої інфільтрації та набряк строми і чітко вираженим запальним процесом та бактеріальним кератитом і вже на 7 добу чітко виражену ерозію рогівки 2,0–4,0 мм в діаметрі та коагуляційний некроз тканин рогівки. У всіх тварин на 7 добу був чітко виражений увеїт ускладнений бактеріальним кератитом, який характеризувався вираженим набряком кон'юнктиви (хемоз) з точковими крововиливами (пітехії) та неоваскуляризацією (патологічний ріст судин). Клінічний стан очей кролів характеризувався ознаками рогівкового синдрому, такими, як: світлобоязню, блефароспазмом, слъозотечею (епіфора). У експериментальних тварин об'єктивно при проведенні світлової біомікроскопії відзначали: коагуляційний некроз тканин рогівки, поверхневий її дефект. Передній поверхневий епітелій за рахунок ушкодження мав не прозорий, помутнівший вигляд, між камерами ока порушений обмін рідинами внаслідок підвищеного внутрішньоочного тиску, крім того розвивалася інтоксикація продуктами розпаду пошкоджених клітин, які особливо були виражені в оці з порушенням його кровопостачання,

опалесценцією вологи передньої камери, в деяких випадках виражений екзофтальм за рахунок переорбітального набряку.

Контроль експериментальних тварин здійснювався в визначені дні в однаковий час і однаковими методами, а саме:

1. Тест Шиммера (оцінка кількості слюзової рідини за допомогою тест-полоски). При цьому використовували секундомір. При оцінці результатів нормою вважали ≥ 15 мм (0 балів); від 5 до 10 мм – виражена недостатність (1 бал); ≤ 5 мм – важка недостатність вироблення слізної рідини (2 бали), від 15 до 35 мм – патологічна слюзотеча (3 бали).

2. Флюоресцеїновий тест Зейделя (використання флюоресцеїнової фарби, яка вказує на ступінь ушкодження поверхні рогівки). Ступінь кератопатії визначали по площі і інтенсивності фарбування рогівки флюорисцином. Рогівку ділили на 5 сегментів (верхній, нижній, латеральний, медіальний і центральний), в кожному з яких оцінювали ступінь забарвлення за 3 бальною шкалою в залежності від інтенсивності фарбування, де 0 балів – відсутність фарбування, 1 бал – слабе фарбування, 2 бали – помірне забарвлення, 3 бали – виражене забарвлення.

3. Тонометрія проводилась безконтактним способом ветеринарним тонометром «Icare TONOVET, Модель TV011», розмір 24–29 мм, х 35–95 мм. та 215 мм, 230 г, (Японія), по загальноприйнятій методиці, за норму брали середній показник 15–23 мм.рт.ст – 0 балів. Зниження або гіпотензія вказувала на значні запальні процеси та проявом відслоювання сітківки, < 15 –23 мм.рт.ст. – 1 бал > 15 –23 мм.рт.ст – 2 бали.

4. Біомікроскопія в фокальному світлі, що проводили на щілинній лампі фірми «Carl Zeiss» (Німеччина) по загальноприйнятій методиці. Задню біомікроскопію проводили при максимально розширеній зіниці з лінзою 90,0 D. Для огляду периферичних відділів сітчастої оболонки використовували лінзу Гольдмана, (при можливості доступу очного дна, при відносній прозорості очної рідини). Відсутність прозорості – 0 балів, запалення судинної оболонки враження очного дна ока – 1 бал.

5. Ультразвукову діагностику ока проводили апаратом фірми «IZISCAN VET» США (лінійним датчиком 7,5 МГц, при режимі В), визначали диструкції скловидного тіла, наявність крововиливів, відшарування сітківки, помутніння склоподібного тіла (ПомСТ) –1 бал, внутрішня ексудація (ВЕкс) – 2 бали, потовщення судинної оболонки (ПСО) – 3 бали.

6. Фотореєстрація.



Рис.3.1. Інтактне око кроля.



Рис. 3. 2. Експериментальне око кроля за кератиту та переднього увеїту.

На Рисунку 3.1. інтактного ока передня камера заповнена прозорою рідиною, яка обмежена райдужкою і рогівкою, візуалізується анехогенно, що вказує на прозорість рідинного вмісту (рис.3.3). Рогівка візуалізується як опукла, тонка прозора тканина, розташована в передній частині ока. Кришталик являє собою двоопуклу прозору структуру, яка знаходиться за зіницею і райдужною. Реакція на світло проявлялась акомодацією, яка виражалась звуженням зіниці ока. За результатами тесту Шиммера оцінка кількості слюзової рідини з допомогою тест-полоски дорівнювала 8 мм. При тонометрії безконтактним способом зазначено показники внутрішньоочного тиску, які дорівнювали 18 мм.рт.ст. При біомікроскопі в фокальному світлі видно чіткий рисунок внутрішньої судинної оболонки та сітківки ока. Флюоресцеїновий тест Зейделя був негативним, тобто поверхня рогівки не фарбувалась і специфічного світіння не визначалось.

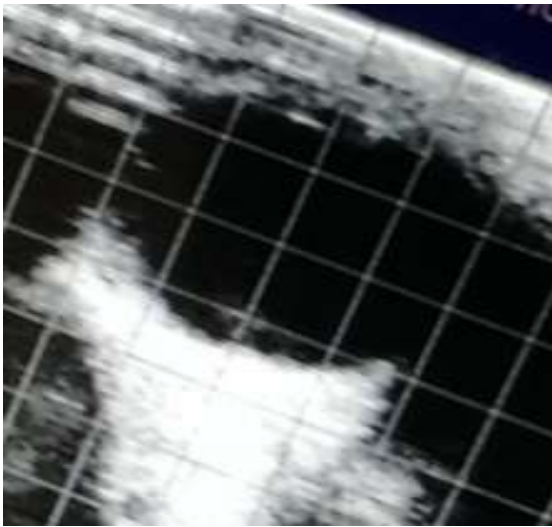


Рис.3. 3. Ультразвукове дослідження інтактного ока кроля.

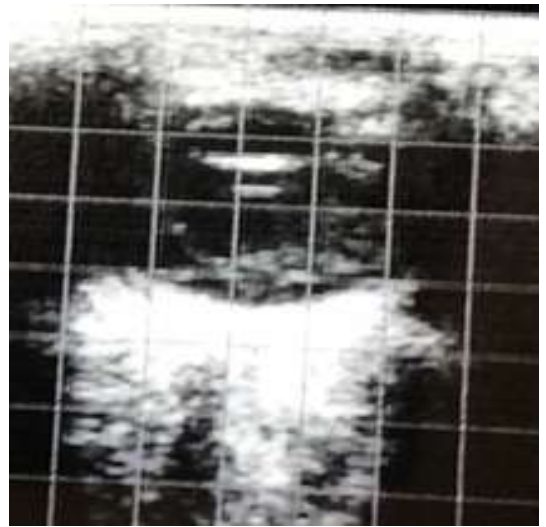


Рис.3. 4. Ультразвукове дослідження ока кроля за кератиту та увеїту.

На рисунку 3.2 видно опалесценцію вологи та значна неоваскуляризація рогівки, хемоз кон'юктиви і патологічна епіфора. В центрі ока протейновий преципітат, який ілюструється при УЗД ехогенним шаром та видно деформацію і зменшення передньої камери ока (рис. 3.4). За результатами тесту Шиммера оцінка кількості слюзової рідини з допомогою тест-полоски дорівнювала 34 мм. При тонометрії безконтактним способом зазначено показники внутрішньоочного тиску, які дорівнювали 35 мм.рт.ст. При біомікроскопі в фокальному світлі дослідження було неможливе в наслідок опалесценції вологи передньої камери. Флюоресцеїновий тест Зейделя був позитивним, тобто поверхня рогівки фарбувалась специфічним світінням. На рисунку 3,3 інтактного ока передня камера заповнена прозорою рідиною, візуалізується анехогенно, що вказує на прозорість цієї рідини. Рогівка візуалізується як чітка випукла смужка, розташована в передній частині ока. Кришталик відображений гіперехогено, який знаходиться поза зіницею і райдужкою, прикріплений циліарним тілом. Сітківка ока проходить гладкою непереривною лінією уздовж задньої стінки очного яблука. Кожен сегмент квадратів екрану дорівнює 0,5 см, що дає можливість визначити розмір очного яблука або інших структур, або тканин ока. На рисунку 3,4. відображається яскравим світінням гіперехогенний переорбітальний набряк, зменшена за розміром передня камера ока, внаслідок

неваскуляризації і помутніння рідини, яка візуалізується ехогенним прошарком в обох камерах ока. Підвивих кришталика візуалізується яскравою ехогенною лінією.

Для вивчення динаміки змін у оці та відповідних змін в цілісному організмі залежно від морфофункціонального стану цього органа здійснювалось із врахуванням ролі у регулюванні цілого ряду життєво важливих процесів. Тому нами було проведено введення 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин різними способами, щоб виявити найбільш ефективний метод трансплантації стовбурових клітин. Тварин розділили на 7 дослідних груп:

1 групі – одноразове введення в тенозовий простір. Вводили через малий розріз кон'юнктиви і капсули, уздовж склери в нижньо-внутрішній області очного яблука в трикутник, де склера переходить у пухкий сполучнотканинний шар, що оточений щільною сполучною тканиною, фіброзною пухкою тканиною і теновою капсулою.

2 групі – одноразове введення субкон'юнктивально. Голкою розміром 25–G, робили ін'єкцію під дорсальну або скронеvu зону кон'юнктиви очного яблука, попередньо зафіксувавши її хірургічним пінцетом.

3 групі – одноразове введення інтравітреально. Ін'єкцію в скловидне тіло виконували через склеру на відстані 1,5 мм. позаду лімбу, щоб не травмувати кришталик. Спочатку відібрали скловидне тіло в об'ємі 1,0 мл і потім через ту ж голку ввели мезенхімальні стовбурові клітини таку ж кількість.

4 групі – одноразове введення в передню камеру ока. Голкою 27 G – приєднували до шприца, вводили перпендикулярно лімбу під кутом 45^0 на відстані 1 мм. прокручуючими рухами паралельно райдужці. Спочатку відібрали вологу передньої камери (рідини) в об'ємі 1,0 мл і потім через ту ж голку ввели мезенхімальні стовбурові клітини таку ж кількість.

5 групі (загальна група) було призначене традиційне лікування, щоденне закапування генталяйну 4 % та ципроном по 4–5 разів на добу.

6 група інтактні тварини та 0 група (контроль) – загальні групи для двох серій досліджень

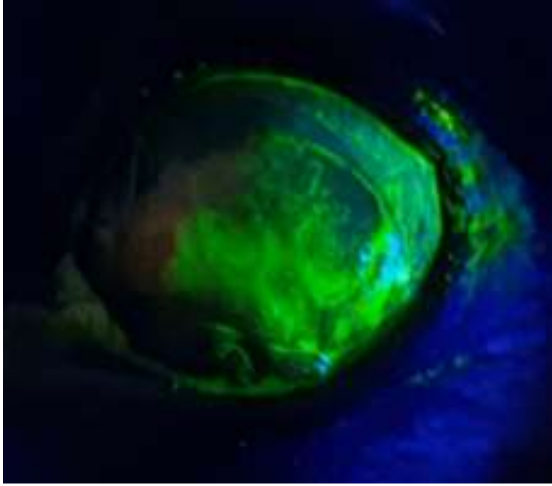


Рис.3. 5. Око кроля за увеїту та кератиту при дослідженні флюоресцеїном

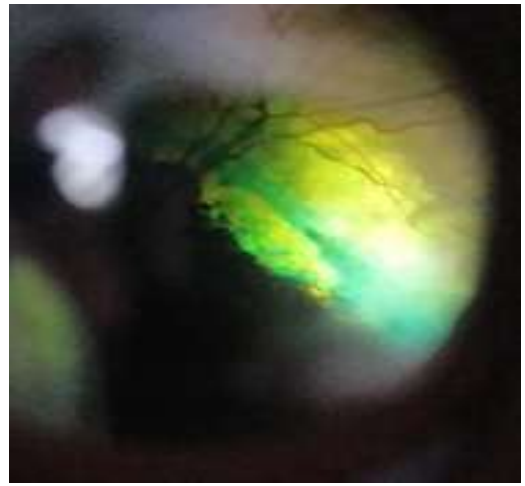


Рис.3. 6. Око кроля за увеїту при біомікроскопії щілинною лампою.

На рисунку 3. 5 око з пошкодженою рогівкою, яка відображається яскраво зеленим світінням при флюоресцеїновому тесті Зейделя за допомогою ультрафіолетової лампи Вудда, фарбування поверхні вказує на масштаб враження, що займає майже весь рогівковий епітелій. Та потовщене розгалуджене судинне дерево з оклюзією судин, та макулярний субретинальний крововилив за увеїту при світловій мікроскопії щілинною лампою на рисунку 3. 6.



Рис.3. 7. Око кроля за увеїту до введення МСК в тенозовий простір.



Рис.3. 8. Око кроля через 30 днів після введення МСК в тенозовий простір.

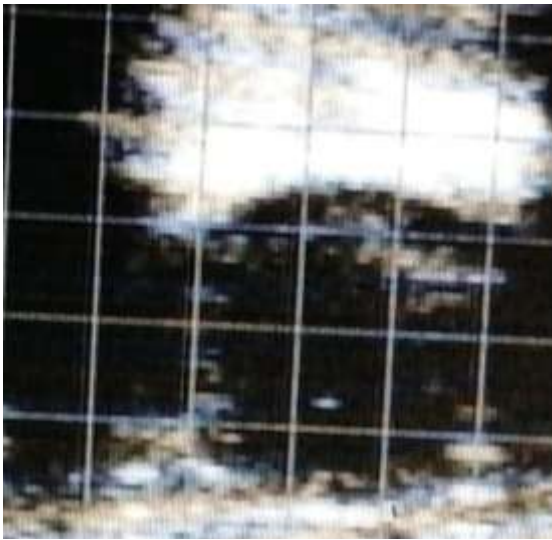


Рис.3. 9. Ультразвукове дослідження ока кроля за кератиту та увеїту до введення МСК в тенозовий простір

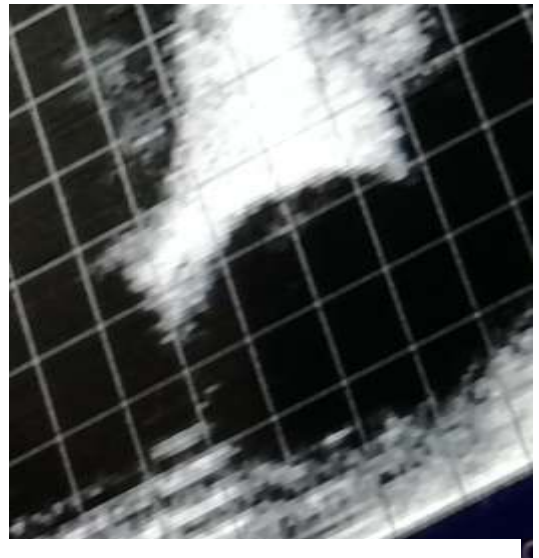


Рис.3. 10. Ультразвукове дослідження ока кроля через 30 діб після введення МСК в тенозовий простір.

На рисунку 3.7 волога передньої камери була опалесціювана, помутніння внаслідок запалення, райдужна оболонка з розлитим нечітким малюнком, зіниця діаметром 7 мм. (міоз зіниці ока), реакція на світло агресивна, по краю лімба крововилив, між рогівкою і райдужкою гіфема, видимі гнійні скупчення в передній камері ока, преципітати на рогівковому ендотелії, присутня епіфора, та неоваскуляризація рогівки. За результатами тесту Шиммера оцінка кількості слюзової рідини з допомогою тест-полоски дорівнювала 30 мм. При тонометрії безконтактним способом зазначено показники внутрішньо очного тиску, які дорівнювали 32 мм.рт.ст. При біомікроскопії в фокальному світлі дослідження було неможливе в наслідок опалесценції вологи передньої камери. Флюоресцеїновий тест Зейделя був позитивним, тобто поверхня рогівки фарбувалась специфічним світінням. При УЗД відзначався переорбітальний набряк, внутрішня ексудація та диструкція скловидного тіла, що візуалізувалось ехогенним світінням (рис3. 9). На рисунку 3.8, через 30 діб після введення МСК в тенозовий простір око кроля, не мало видимих патологічних клінічних ознак, крім сухості повік після опіку в вигляді лусочок зроговівшого поверхневого епітелію шкіри навколо повік. При застосуванні тесту Шимера виявлено недостатність слюзової рідини, яка дорівнювала 6 мм.

Внутрішньоочний тиск дорівнював 18 мм.рт.ст., що відповідало нормі, флюоресцеїновий тест Зейделя був негативний, тобто поверхневий шар рогівки повністю відновлений, при УЗД патологічних особливостей не відмічалось (рис. 3.10).



Рис.3.11. Око кроля за увеїту до введення МСК інтравітреально.



Рис.3.12. Око кроля через 30 діб після введення МСК інтравітреально.

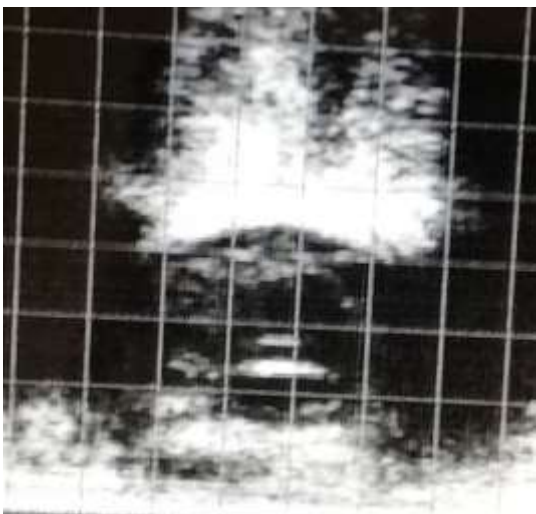


Рис.3.13. Ультразвукове дослідження ока кроля за кератиту та увеїту до введення МСК інтравітреально



Рис.3.14. Ультразвукове дослідження ока кроля через 30 діб після введення МСК інтравітреально

На рис.3.11 волога передньої камери була опалесційована (помутніння внаслідок запалення), райдужна оболонка з розлитим нечітким малюнком, зіниця діаметром 7,5 мм, реакція на світло агресивна, по краю лімба крововилив

в передню камеру ока, між рогівкою і райдужкою (гіфема), в центральній частині ока гіпопійон в вигляді білих білкових скупчень. Результат тесту Шиммера з допомогою тест-полоски дорівнював 25 мм. При тонометрії показники внутрішньоочного тиску, дорівнювали 32 мм.рт.ст. Флюоресцеїновий тест Зейделя був позитивним, поверхня рогівки в центральній частині фарбувалась специфічним світінням. При УЗД візуалізовано на рис.3.13 внутрішня ексудація, крововилив та диструкція скловидного тіла, що візуалізується ехогенним світінням. Через 30 діб, після введення МСК інтравітреально, видно на рис.3.12, зниження активності запального процесу, відсутність гіфеми та гіпопійону, та майже зрозумілий малюнок райдужки, але видно опалесценцію вологи передньої камери ока. Результат тесту Шиммера з допомогою тест-полоски дорівнював 24 мм. При тонометрії показники внутрішньоочного тиску, дорівнювали 25 мм.рт.ст. Флюорисциновий тест Зейделя був позитивним, поверхня рогівки в медіальній частині фарбувалась специфічним світінням. При УЗД візуалізовано на рис.3.14 незначна внутрішня ексудація та диструкція скловидного тіла, що візуалізується ехогенним світінням.



Рис.3.15. Око кроля за увеїту до введення МСК субкон'юнктивально.

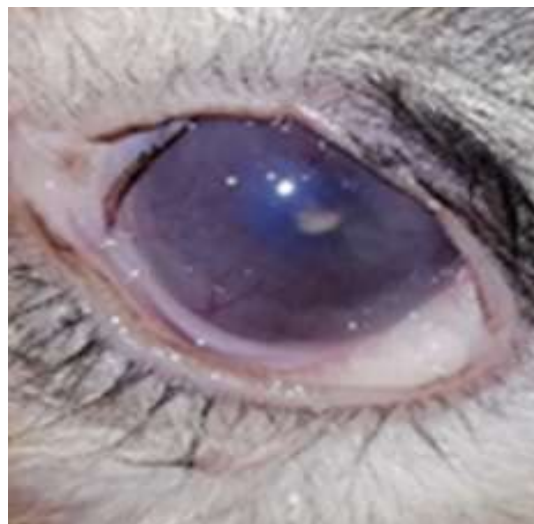


Рис.3.16. Ультразвукове дослідження ока кроля через 30 діб після введення МСК субкон'юнктивально

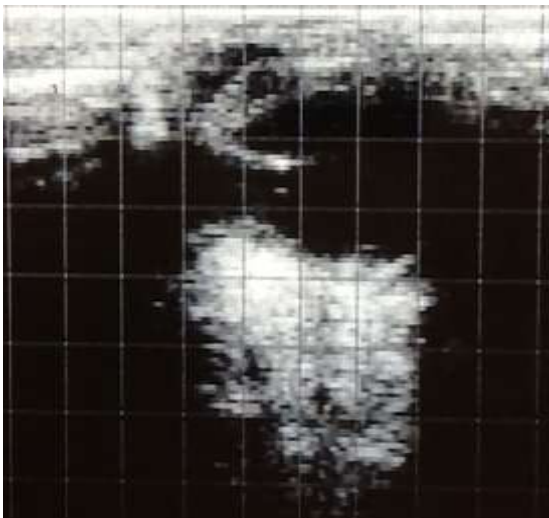


Рис. 3.17. Ультразвукове дослідження ока кроля з увеїтом до введення МСК .



Рис.3.18. Ультразвукове дослідження ока кроля через 30 діб після введення МСК субкон'юнктивально.

На Рис. 3.15 видимі ознаки тотального увеїту, з яскраво вираженим запальним процесом, райдужна оболонка з розлитим нечітким малюнком, зіниця діаметром 5,5 мм, реакція на світло агресивна, між рогівкою і райдужкою (гіфема), в центральній частині ока гіпопіон в вигляді білих протеїнових преципітатів. Результат тесту Шиммера дорівнював 18 мм. При тонометрії показники внутрішньоочного тиску, дорівнювали 36 мм.рт.ст. Флюоресцеїновий тест Зейделя був позитивним, поверхня рогівки в центральній та в верхньолатеральній частині фарбувалась специфічним світінням. При УЗД візуалізовано на рис.3.17 внутрішня ексудація, потовщення судинної оболонки та диструкція скловидного тіла, що візуалізується ехогенним світінням. Після ін'єкції (МСК) субкон'юнктивально помітно зник запальний процес в кон'юнктиві ока та по краю лімбу (Рис 3.16.), відмічена патологічна неоваскуляризація та скопичення преципітатів, райдужна оболонка має змінений колір, зіниця діаметром 8,5 мм, реакція на світло агресивна, між рогівкою і райдужкою (гіфема), в центральній частині зіниці ока гіпопіон. Результат тесту Шиммера показав 16 мм. При тонометрії показники внутрішньоочного тиску, дорівнювали 25 мм.рт.ст. Флюоресцеїновий тест Зейделя був негативним. Патологічна неоваскуляризація з потвщеною

судинною оболонкою підтверджено при УЗД дослідженні на рис.3.17–3.18, гіперехогенними включеннями.



Рис.3.19. Око кроля з увеїтом до введення МСК в передню камеру ока.



Рис.3.20. Око кроля через 30 діб після введення МСК в передню камеру ока.

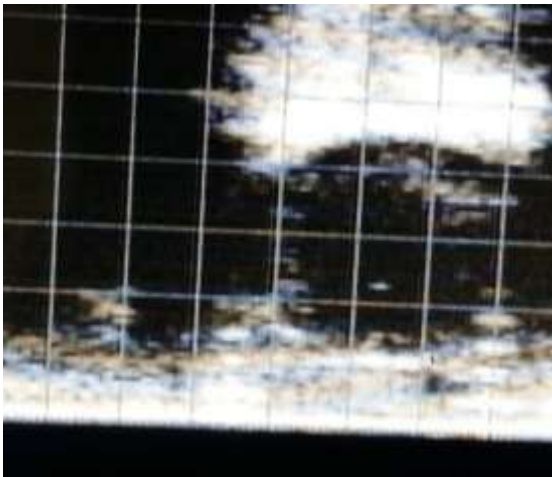


Рис.3.21.Ультразвукове дослідження ока кроля за увеїту до введення МСК в передню камеру.

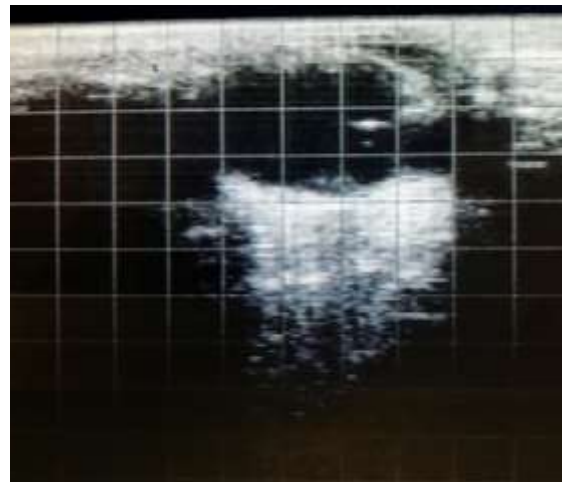


Рис.3.22.Ультразвукове дослідження ока кроля за увеїту після введення МСК в передню камеру 30 доба.

На рис.3.19 видно що волога передньої камери була опалесційована (помутніння внаслідок запалення), райдужна оболонка з розлитим нечітким малюнком, по краю лімба крововилив в передню камеру ока, між рогівкою і райдужкою (гіфема). Результат тесту Шиммера з допомогою тест-полоски дорівнював 20 мм. При тонометрії показники внутрішньоочного тиску,

дорівнювали 36 мм.рт.ст. Флюоресцеїновий тест Зейделя був позитивним, поверхня рогівки в центральній частині фарбувалась специфічним світінням. З Рисунок 3.21 на УЗД видно відшарування скловидного тіла, яке проявляється як яскрава ехогенна лінія в задній частині ока. Крововилив проявляються як мутний гіперехогенний матеріал позаду відшарування. Через 30 діб після введення МСК, відсутність проявів запального процесу, тільки помітно залишковий білковий преципітат. Результат тесту Шиммера дорівнював 12 мм, що вважається нормою. При тонометрії показники внутрішньоочного тиску, дорівнювали 20 мм.рт.ст. Флюоресцеїновий тест Зейделя був негативним, що вказує на повну епітелізацію та відновлення рогівкового шару (рис.3.20). За результатами УЗД патологічних відхилень не відмічалось, що відображено на (рис.3.22).

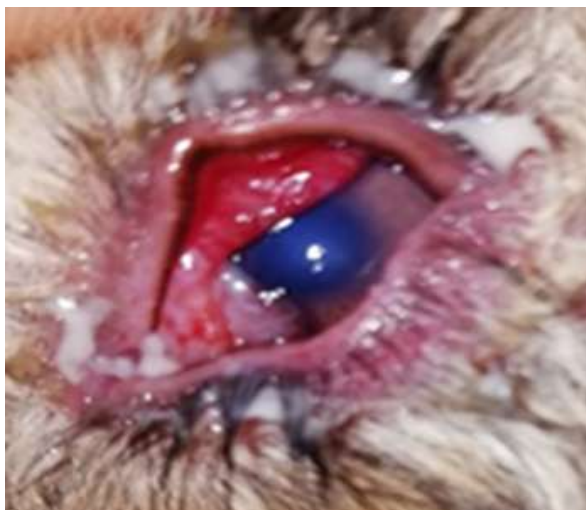


Рис. 3.23. Око кроля за увеїту та кератиту до традиційного лікування.



Рис. 3.24. Око кроля за увеїту та кератиту через 30 діб після традиційного лікування.

На рисунку 3.23 райдужна оболонка з розлитим нечітким малюнком, зіниця діаметром 8 мм, реакція на світло агресивна, виражений хемоз кон'юктиви, запалення третьої повіки, гнійні виділення по кутах повік (блефарит). Через слабку адгезію епітелію кон'юктиви з строною рогівки, видно персистуючі ерозії, при застосуванні флюоресцеїнового тесту Зейделя, з хронічними подразненнями ока. Тест Шиммера показав патологічну епіфору, яка дорівнювала 21 мм, внутрішньоочний тиск вказував на значне його

підвищення 43 мм.рт.ст. При УЗД на рисунку 3.25 переобітальний набряк, внутрішня ексудація, диструкція скловидного тіла, що відображено гіперехогенними світінням.

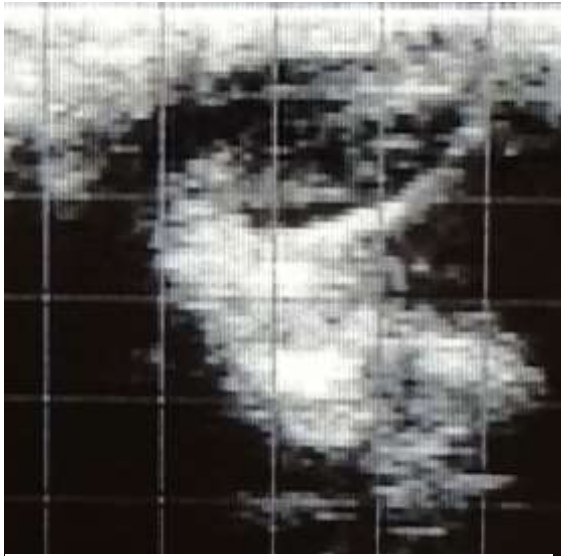


Рис. 3.25. Ультразвукове дослідження ока кроля за увеїту та кератиту до традиційного лікування.

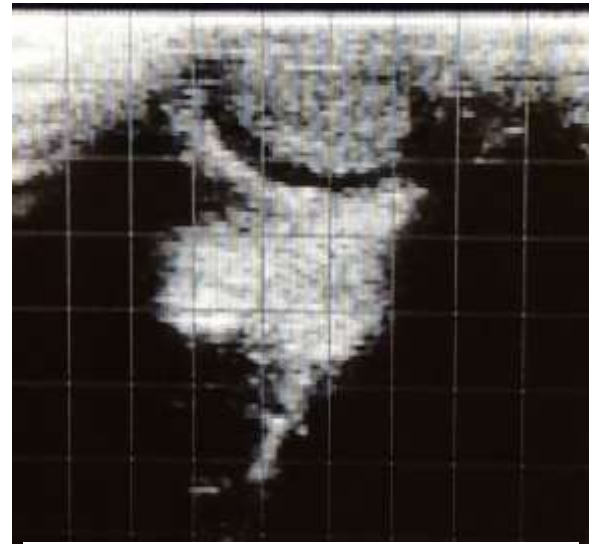


Рис. 3.26. Ультразвукове дослідження ока кроля за увеїту та кератиту через 30 діб після традиційного лікування.

Через 30 діб після лікування традиційним методом, закапування ципронорму та 4 % генталайну зображеного на рисунку 3.24, відмічається гіперплазія третьої повіки, значна епіфора, яка дорівнювала 15 мм, за результатами теста Шиммера, внутрішньоочний тиск дорівнював 12 мм.рт.ст. (гіпотензія), за рахунок зморщування очного яблука (фтіазис), помітно плавлення рогівки (кератомаліяція), що підтверджено тестом Зейделя, де враження рогівкового шару відображалось зеленим світінням по всій його поверхні та гіперехогенним світінням при УЗД на рисунку 3.26.

На Рис.3.27 відмічався гострий проліферативний запальний процес всередині камери, що призвів до заповнення її гнійним ексудатом і плавленням навколишніх тканин, але не викликав значного ушкодження на зовнішній поверхні рогівки, при проведенні флюорисцинового тесту, що був позитивним і відображався ниткоподібним кератитом, що підтверджено УЗД на рисунку 3.29, ехогенним світінням, що вказує на переобітальний набряк та внутрішню

екудацію, внутрішньоочний тиск дорівнював 38 мм.рт.ст. При зтяжному процесі без належного втручання, через слабку адгезію епітелію кон'юнктиви з строною рогівки, виникли персистуючі ерозії з хронічними подразненнями ока.



Рис. 3.27. Око кроля з увеїтом та кератитом до закапування ізотонічного розчину.



Рис. 3.28. Око кроля з увеїтом та кератитом через 30 днів після закапування ізотонічного розчину.

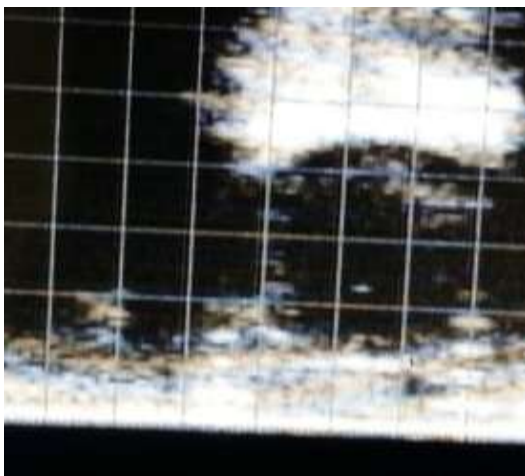


Рис. 3.29. Ультразвукове дослідження ока кроля з увеїтом та кератитом до закапування ізотонічного розчину.

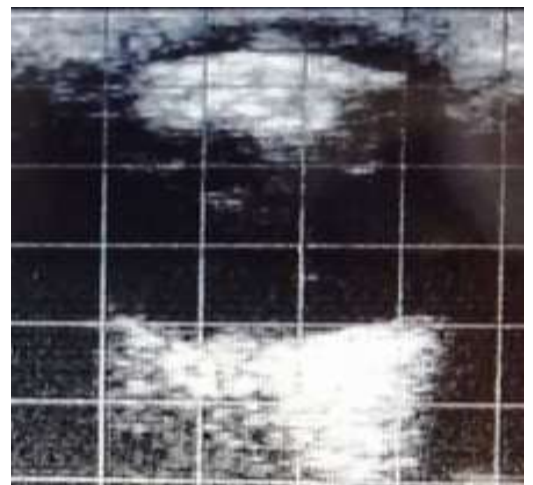


Рис. 3.30 Ультразвукове дослідження ока кроля з увеїтом та кератитом до закапування ізотонічного розчину (контроль).

Високий рівень бактеріальної забрудненості порушив метаболічні процеси, мікроциркуляцію та призвів до ацидозу в тканинах, що привів до розвитку некрозу і втрати цілісності структур і тканин ока, як видно з (рис.3.28), та підтвержено УЗД гіперехогенним світінням в передній камері ока з оклюзією

судин та переорбітальним набряком і значною деформацією очного яблука (рис.3.30).

Таблиця 3. 1

**Порівняльна оцінка вираженості запальної реакції очей
експериментальних тварин в залежності від методу введення МСК за
увейту, на 7 добу ($M \pm m; n=9$)**

Критерії діагностичних досліджень	Після трансплантації МСК, 7 доба					
	Теноновий простір	Суб. кон-но	Інтравіт реально	Перед. камера	Трад-не лікування	Конт- роль
Тест Шиммера	780 $\pm 0,01^{**}$	1030 $\pm 0,09$	960 $\pm 0,08^*$	860 $\pm 0,04^*$	1130 $\pm 0,07$	1506 $\pm 0,78$
Тест Зейделя	945 $\pm 1,02^*$	945 $\pm 1,02^*$	945 $\pm 1,02^*$	945 $\pm 1,02^*$	945 $\pm 1,02^*$	
Тонометрія	890 $\pm 0,13^{**}$	960 $\pm 0,96^*$	950 $\pm 0,88^*$	910 $\pm 0,29^*$	980 $\pm 0,06^*$	
Щілинна лампа	-	-	-	-	-	
Пом. СТ	910 $\pm 0,05^*$	1050 $\pm 0,06$	860 $\pm 0,05^{**}$	910 $\pm 0,02^*$	1124 $\pm 0,05$	
В. Екс	880 ^{**} $\pm 0,14$	950 $\pm 0,87^*$	945 $\pm 0,82^*$	905 $\pm 0,21^*$	975 $\pm 0,03^*$	
П. Суд. Об.	920 $\pm 0,09^*$	1300 $\pm 0,82$	986 $\pm 0,01^*$	1105 $\pm 0,01$	1380 $\pm 0,78$	
Стан К	1015 $\pm 0,03$	1000 $\pm 0,23$	1100 $\pm 0,45$	1035 $\pm 0,38$	1305 $\pm 0,08$	
ВАС	934 $\pm 0,01^*$	935 $\pm 0,01^*$	934 $\pm 0,01^*$	933 $\pm 0,01^*$	935 $\pm 0,01^*$	

Примітка: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; вірогідні дані порівняно з їх значенням у тварин контрольної групи.

Як видно з таблиці 3.1, вже на сьому добу при введенні МСК в теноновий простір знизились показники сльозотечі (Тест Шиммера) в – 1,9 раза, ВОТ (внутрішноочний тиск) – 1,6 та внутрішньої ексудації в – 1,6 раза, в порівнянні з контрольною групою. На відміну від показників групи з традиційним лікуванням де показники були більшими: сльозотечі в – 1,4 раза, ВОТ – 1,1 та внутрішньої ексудації в – 1,1 раза, в порівнянні з першою дослідною групою (введення в теноновий простір), що вказує на зниження запального процесу; зниження показників по всім критеріям оцінювання за введення МСК в теноновий простір, передню камеру ока та інтравітреально.

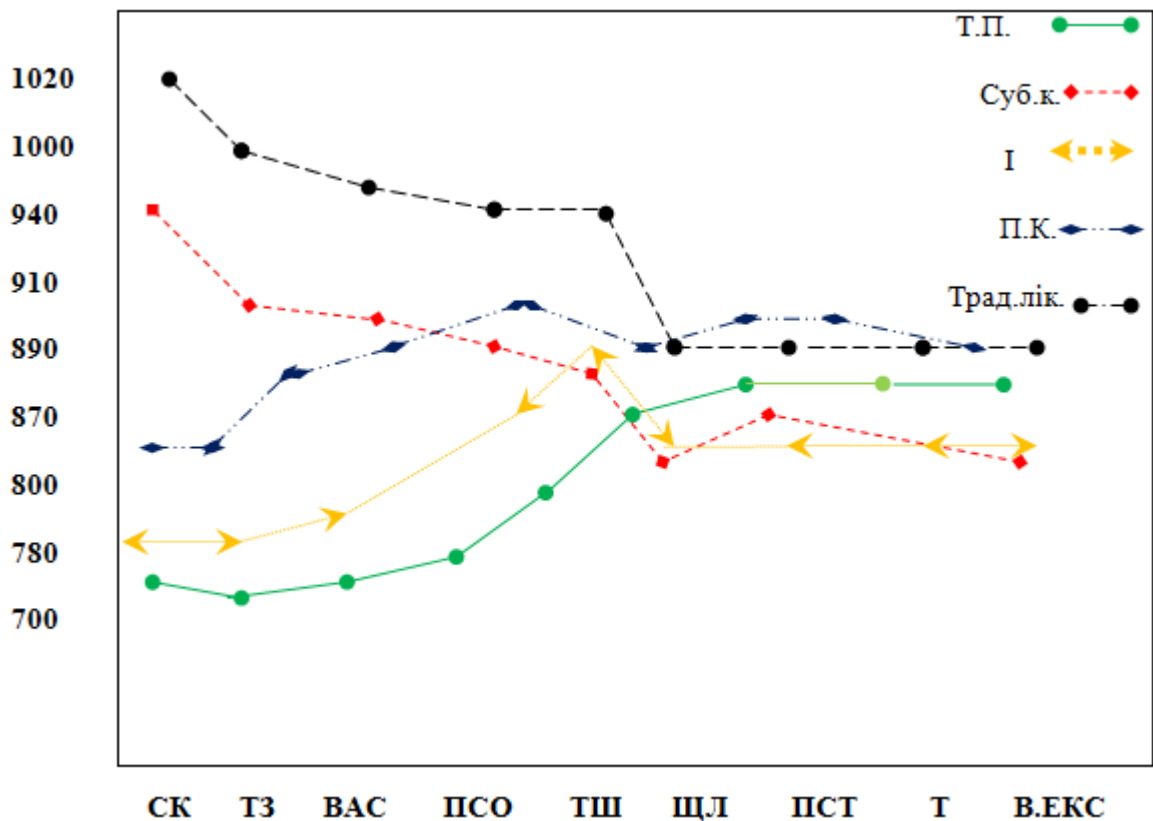


Рис. 3.31. Динаміка вираженості запальної реакції очей експериментальних тварин в залежності від методу введення МСК, в порівнянні з традиційним методом лікування за увеїту, на 7 добу.

Таблиця 3. 2

Порівняльна оцінка вираженості запальної реакції очей експериментальних тварин в залежності від методу введення МСК за увеїту, на 14 добу ($M \pm m; n=9$)

Критерії діагностичних досліджень	Після трансплантації МСК ,14 доба					Контроль
	Теноно новий простір	Суб. кон	Інтравіт- реально	Передня камера	Традиці- йне лікування	
Тест Шиммера	390 $\pm 0,01$ ***	470 $\pm 0,07$ **	465 $\pm 0,67$ **	430 $\pm 0,46$ **	570 $\pm 0,57$ *	1507 $\pm 0,88$
Тест Зейделя	345 $\pm 0,01$ ***	455 $\pm 0,46^*$ *	420 $\pm 0,04$ **	365 $\pm 0,02$ ***	590 $\pm 0,47$ *	
Тонометрія	390 $\pm 0,13$ ***	536 $\pm 0,86$ **	445 $\pm 0,06$ **	410 $\pm 0,29$ **	576 $\pm 0,77$ *	
Щілинна лампа	-	-	-	-	-	

Продовження таблиці 3.2

Пом. СТ	340 $\pm 0,05$ ***	450 $\pm 0,64$ **	380 $\pm 0,07$ ***	410 $\pm 0,02$ **	620 $\pm 0,67$ *	1507 $\pm 0,88$
В. Екс	380 $\pm 0,14$ ***	450 $\pm 0,87$ **	445 $\pm 0,82$ **	405 $\pm 0,21$ **	575 $\pm 0,57$ *	
П. Суд. Об.	320 $\pm 0,03$ *	645 $\pm 0,82$	486 $\pm 0,01$ **	505 $\pm 0,19$ *	680 $\pm 0,37$ *	
Стан К	523 $\pm 0,41$ *	465 $\pm 0,09$ **	520 $\pm 0,04$ *	525 $\pm 0,42$ *	605 $\pm 0,48$ *	
ВАС	334 $\pm 0,02$ ***	565* $\pm 0,09$	376 $\pm 0,06$ ***	340 $\pm 0,26$ ***	575 $\pm 0,66$ *	

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; вірогідні дані порівняно з їх значенням у тварин контрольної групи.

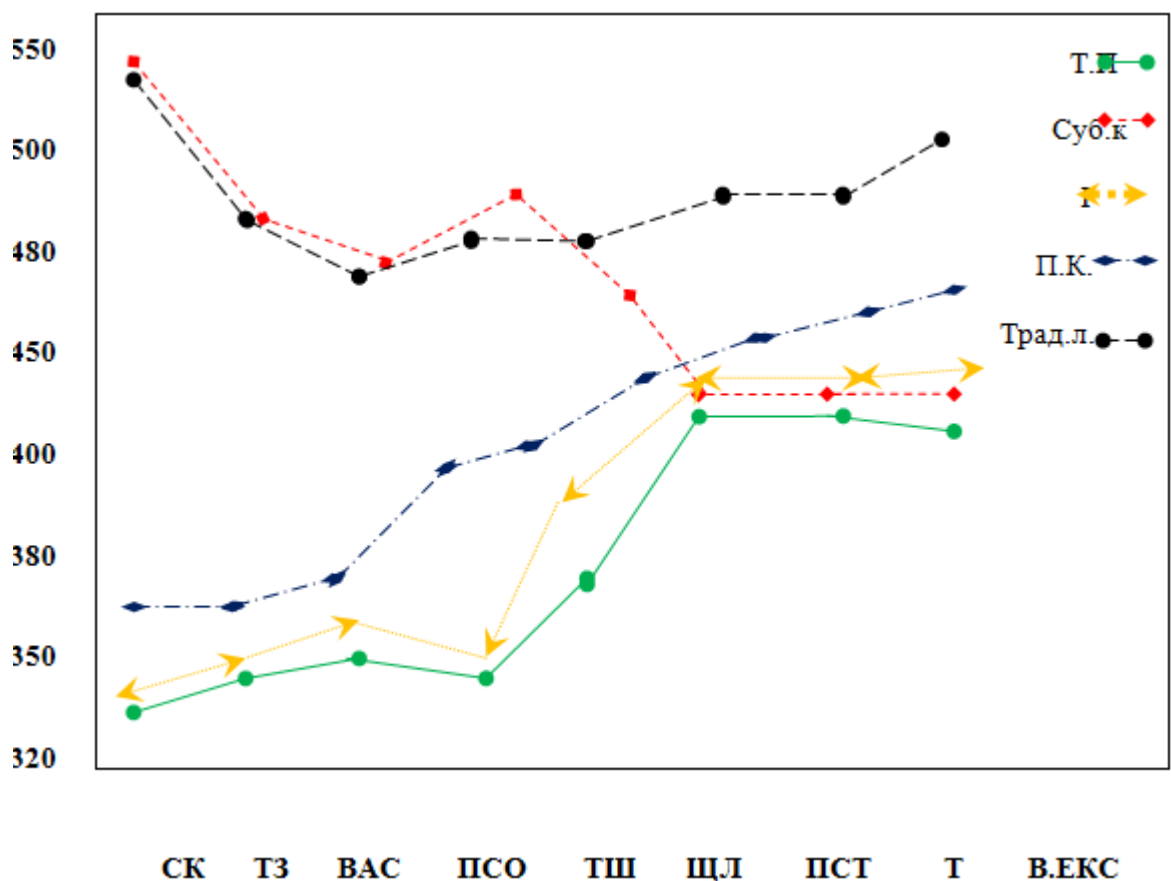


Рис. 3.32. Динаміка вираженості запальної реакції очей експериментальних тварин в залежності від методу введення МСК, в порівнянні з традиційним методом лікування за увеїту, на 14 добу.

Порівняння динаміки зниження запальної реакції в залежності від способу введення МСК на 14 добу, як видно з таблиці 3.2 після введення теноновий простір вірогідне зниження складало 25 %, що було у 3,9 раза нижчим в порівнянні з значеннями контрольної групи.

Таблиця 3.3

Порівняльна оцінка вираженості запальної реакції очей експериментальних тварин в залежності від методу введення МСК за увеїту, на 30 добу ($M \pm m; n=9$)

Критерії діагностичних досліджень	Після трансплантації МСК ,30 доба					
	Теноновий простір	Суб. кон	Інтравіт реально	Передня камера	Традиц лікуван	Контроль
Тест Шиммера	76 $\pm 0,06$ ***	382 $\pm 00,9$ **	370 $\pm 0,86$ **	106 $\pm 0,03$ ***	392 $\pm 0,5$ **	1509 \pm 0,87
Тест Зейделя	145 $\pm 0,04$ ***	454 $\pm 0,94$ **	320 $\pm 0,5$ **	188 $\pm 0,05$ ***	460 $\pm 0,5$ **	
Тонометрія	85 $\pm 0,13$ ***	330 $\pm 0,99$ **	186 $\pm 0,08$ ***	110 $\pm 0,03$ ***	334 $\pm 0,5$ **	
Щілинна лампа	95 $\pm 0,03$ ***	300 $\pm 0,94$ **	285 $\pm 0,53$ **	127 $\pm 0,04$ ***	305 $\pm 0,5$ **	
ПомСТ	210 $\pm 0,05$ **	280 $\pm 0,86$ **	260 $\pm 0,61$ **	217 $\pm 0,52$ **	290 $\pm 0,5$ **	
В. Екс	230 $\pm 0,34$ **	250 $\pm 0,97$ **	245 $\pm 0,62$ **	205 $\pm 0,21$ **	256 $\pm 0,5$ **	
П. Суд. Об.	200 $\pm 0,21$ **	240 $\pm 0,95$ **	216 $\pm 0,54$ **	205 $\pm 0,35$ **	242 $\pm 0,5$ **	
Стан К	195 $\pm 0,02$ ***	170 $\pm 0,09$ ***	280 $\pm 0,78$ **	235 $\pm 0,04$ **	305 $\pm 0,09$ **	

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; вірогідні дані порівняно з їх значенням у тварин контрольної групи.

Відповідно при субкон'юнктивальному введенні – 2,9; інтравітреально – 3,4; передню камеру ока – 3,5; традиційне лікування – 2,5 раза.

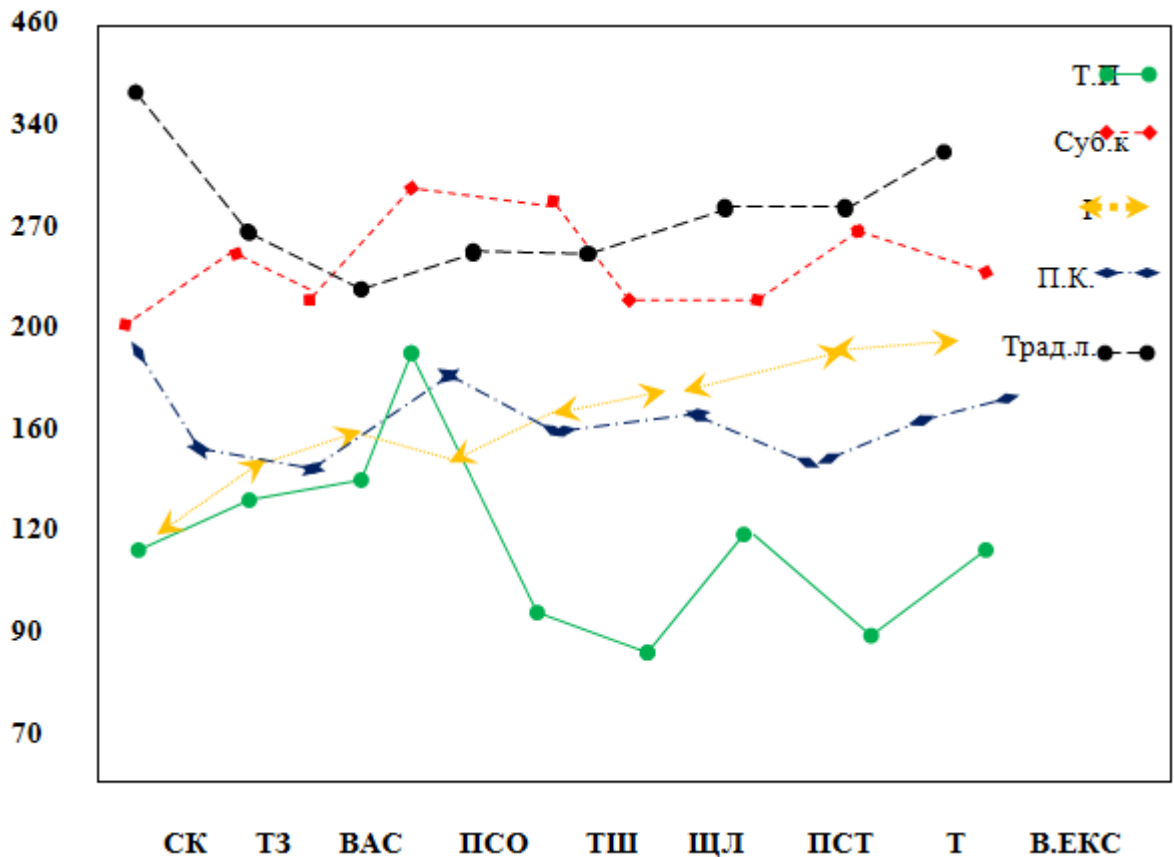


Рис. 3.33. Динаміка вираженості запальної реакції очей експериментальних тварин в залежності від методу введення МСК за увеїту, на 30 добу

Згідно статистичних даних наведених у таблиці 3.3 та рисунку 3.33 у дослідних тварин після введення АМСК на 30 добу залишковими проявами запальної реакції очей за експериментальному увеїті у кролів при введенні в тенонівий простір складало 10 %, що було нищим у 10 разів за контрольну групу тварин. Це найкращий ефект від застосування за інших методів і в порівнянні з традиційним методом, де показники дорівнювали 22 %, що вказує на зниження запальної реакції у 4,5 раза.

Наведена статистична динаміка вираженої запальної реакції очей експериментальних тварин в залежності від методу введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин за увеїту, на 30 добу за традиційного була набагато більша ніж за введення мезенхімальних стовбурових клітин.

3.1.2. Особливості зміни мікроскопічної структури тканин ока за експериментального кератиту та увеїту в кролів.

При проведенні гістологічних досліджень нами було встановлено, що рогівка клінічно здорових інтактних тварин мала типову мікроскопічну будову. Орган складався з переднього епітелію, власна речовина, пластинка десцеметової оболонки заднього епітелію. Клітини переднього епітелію утворили шар клітин різної форми (рис. 3.34).

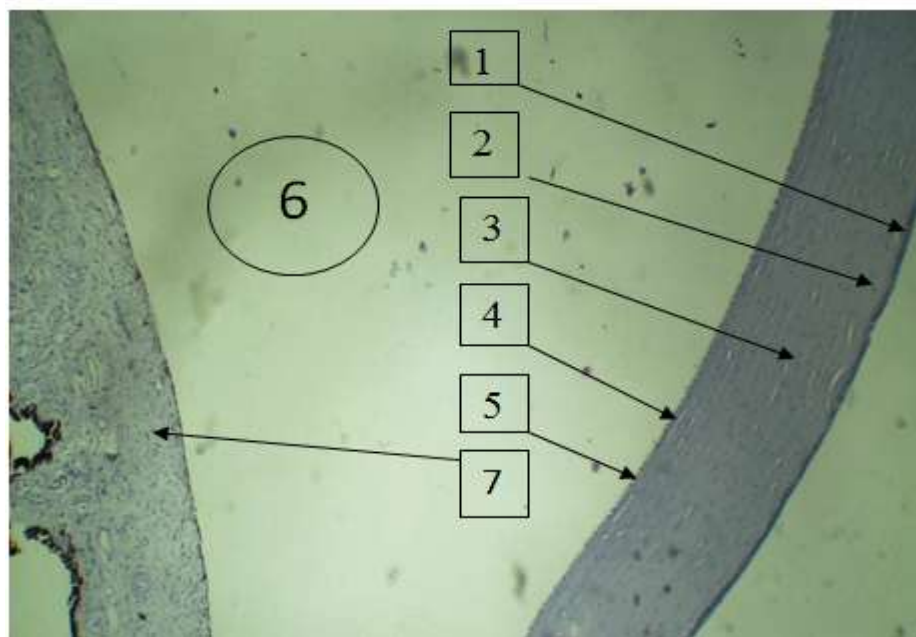


Рис. 34. Мікроскопічна будова інтактного ока кроля. 1– передній (покривний) епітелій; 2– боуменова мембрана; 3– строма (основна речовина); 4– десцеметова оболонка; 5– задній епітелій (ендотелій); 6– передня камера ока; 7–радужна оболонка. Гематоксилін та еозин, х 50.

Нижній базальний шар призматичної форми. До нього прилягали два ряди остистих (шипуватих) клітин. Над шаром шипуватих клітин спостерігалось 5 рядів плоских клітин, розташовані паралельно поверхні рогівки. Передній епітелій на периферії рогівки в ділянці лімба мав келихоподібні клітини. Під епітелієм чітко виділена строма рогівки, яка складалась з пучків колагенових волокон, які утворювали гомогенні пластинки. Між пластинками були і клітини кератоцити. Їхні ядра, витягнутої форми під поверхнею рогівки. У нижньому відділі строма переходила у десцеметову

оболонку. Вона складалась з колагенових волокон. З внутрішнього боку до задньої межової пластинки прилягав один шар плоских клітин ендотелію.

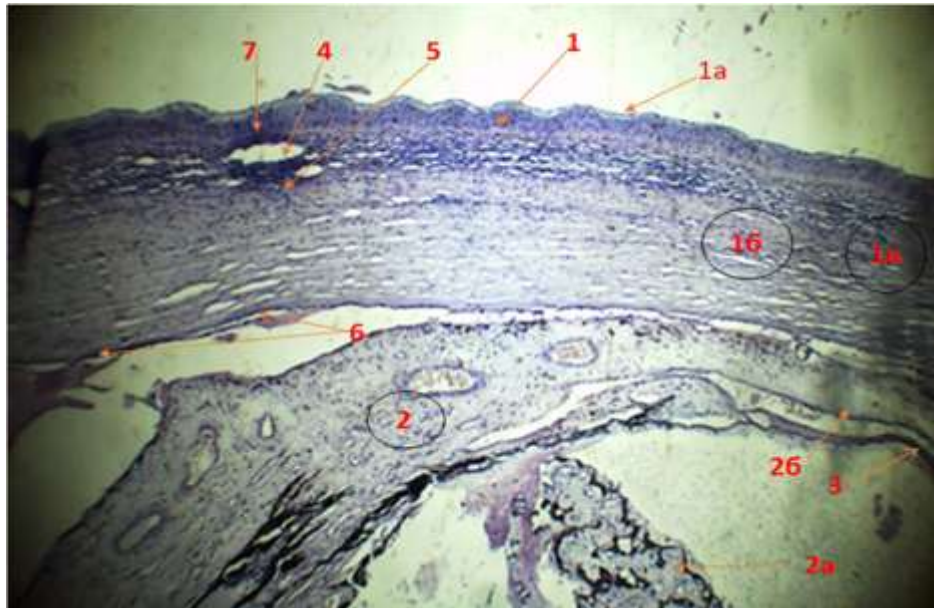


Рис. 3.35. Око кроля за експериментального кератиту та увеїту, до трансплантації МСК: 1– рогівка (зовнішня фіброзна оболонка); 1а – хвилеподібний передній епітелій; 1б – лімб; 1в – склера; 2 – райдужка, середня судинна оболонка (звуження кута ока); 2а – целіарне тіло; 2б – власне судинна оболонка; 3– внутрішня оболонка сітківки; 4 – гіперплазія епітелію; 5 – дифузне розсіяння еритроцитів; 6– відслоювання та руйнування десцеметової оболонки; 7– руйнування бауменової мембрани. Гематоксилін Караці та еозин, х 50

Оцінюючи гістологічні структури очей кролів за експериментального увеїту та керату (рисунок 3.35), визначали велику активність фібропластичних процесів, викликаних опіком та секундарною інфекцією, що викликали дистрофічні і деструктивні зміни, а саме руйнування переднього епітелію, нерівномірне тяжіння по всій довжині бауменової мембрани, потовщення строми рогівки з нерівномірним розслоюванням колагенових фібрил між якими містилось велика кількість змінених за формою і хаотично розміщених фібробластів і лімфоїдних клітин. Виявлялась велика кількість еритроцитів та нейтрофільних лейкоцитів. Райдужка та середня судинна оболонка має набряк, що призводить до звуження кута ока. Десцеметова мембрана мала нерівну

форму зубчастої лінії, яка переривалась в декількох місцях, і присутні відшаровування від щільної структури стромы. Ендотелій рогівки та його ворсинки були повністю зруйновані, призматичні клітини атипової форми невідповідно розкидані по всій довжині. Райдужна оболонка має зруйновану структуру, ушкодження стовбурових клітин рогівки епітелію по вираженості лімбальної ішемії в місці хімічного опіку, значний набряк та розслоювання стромы рогівки, хвилюподібний з пошкодженою поверхнею передній епітелій так і ендотелій розміщений на базальній мембрані з пошкодженою апікальною поверхнею епітеліальних клітин рогівки.

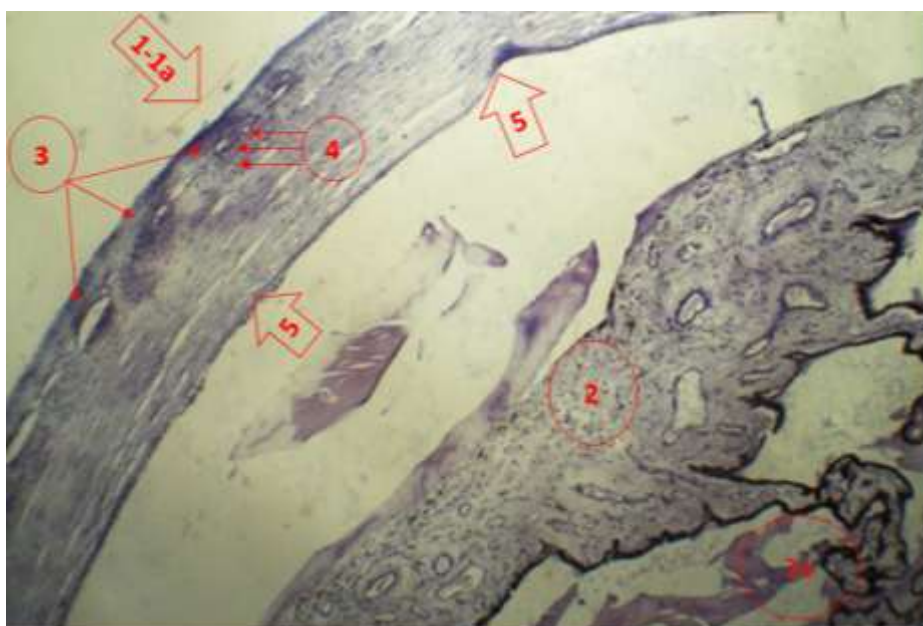


Рис. 3.36. Око кроля за експериментального увеїту та кератиту після введення МСК в теноновий простір, 7 доба; 1– рогівка, зовнішня фіброзна оболонка; 1а – хвилюподібний передній епітелій; 2 – райдужка, середня судинна оболонка; 2а – целіарне тіло; 3– гіперплазія епітелію запальний інфільтрат; 4 – дифузне розсіяння еритроцитів; 5– відслоювання та руйнування десцеметової оболонки

Гематоксилін Караці та еозин, х 50.

На рисунку 3.36. гістологічного препарату видно передній поверхневий епітелій через 30 діб після введення МСК в теноновий простір, який був відновлений але мав не рівну хвилясту поверхню. В стромі значного набряку не спостерігалось, зроговіння верхнього шару не відмічалось, але зустрічались

сегментоядерні лейкоцити, ближче до лімбу видно колагенові волокна, макрофаги та поодинокі лімфоцити, трохи нижче лімбу зібрані в пучок колагенові волокна між якими містились фібробласти. У деяких місцях пошкоджений ендотелій, десцеметової оболонки.

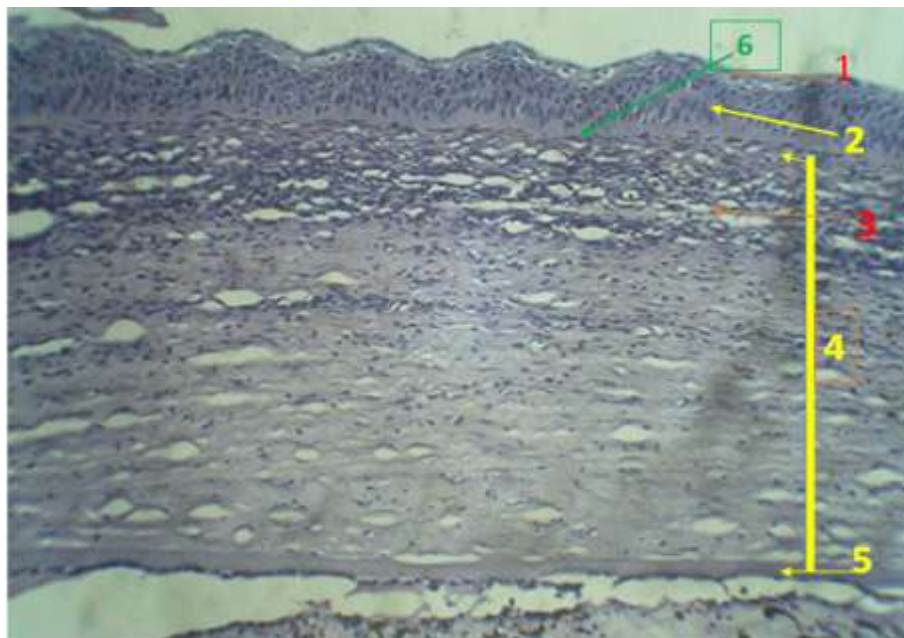


Рис. 3.37. Око кроля за експериментального кератиту та увеїту після введення МСК в теноновий простір, 14 доба; 1– хвилюподібний з пошкодженою поверхнею передній епітелій; 2– налагоджена диференціація епітеліоцитів по шарам; 3- Сітка колагенових фібрил в стромі по шарам; 4 – зменшення товщини стромі рогівки; 5 – вирівнювання колагенових фібрил, десцеметової оболонки ; 6 – відновлена бауменова мембрана.

Гематоксилін Караці та еозин, х 200.

З гістологічного зрізу на (рис.3.37) поверхневий епітелій без частин деепітелізації, але з потовщеною стромою рогівки, має дифузне розміщення клітин запального інфільтрату та збільшення кількості фібробластів по всій стромі, містить невелику кількість еритроцитів, що вказує на васкуляризацію. Було видно, що волога передньої камери була опалесційована (помутніння внаслідок запалення). Найбільш вираженим був набряк в поверхневих шарах стромі рогівки, який проявлявся формуванням її сітчастої структури. Виявлявся значний набряк стромі рогової оболонки. У стромі кератоцити

розподілені нерівномірно. Місцями відмічався фокальний мукоїдний набряк колагенових стромальних пластин. Ознаки запальної інфільтрації в центральних ділянках рогівки і поблизу лімба. Відновлення десцеметової оболонки.



Рис. 3.38. Око кроля за експериментального увеїту та кератиту після введення МСК в тенозовий простір, 30 доба: 1 – субепітеліальні рубці; 2 – зменшення набряку строми; 3 – відновлення десцеметової оболонки і шару колагенових фібрил; 4 – відновлений поверхневий передній епітелій.

Гематоксилін Караці та еозин, х 50

З гістологічного зрізу на рис.3.38, помітне зменшення товщини строми рогівки, відсутність нейтрофільних лейкоцитів між ендотелієм та райдужкою, але помітне скупчення еритроцитів у верхньому шарі колагенових волокон строми рогівки, помітні субепітеліальні рубці в місцях опіку але повністю вирівняні по шарах колагенові волокна строми, клітини базального шару прилягали один до одного рівномірно по всій товщині. В нижньому відділі строма чітко переходила в десцеметову оболонку. Клітини ендотелію прилягали до задньої межевої пластинки щільним шаром плоских клітин.

На рисунку 3.39. ознаки запальної інфільтрації в центральних ділянках рогівки і поблизу лімба, зовнішня фіброзна оболонка має хвилеподібний передній епітелій, гіперплазія епітелію запальний інфільтрат та збільшення

кількості фібробластів, дифузне розсіяння еритроцитів, що вказують на васкуляризацію, але відмічається налагоджена диференціація епітеліоцитів по шарам, сітка колагенових фібрил в стромі по шарам, зменшення товщини строми рогівки, руйнування колагенових фібрил, десцеметової оболонки та бауменової мембрани.

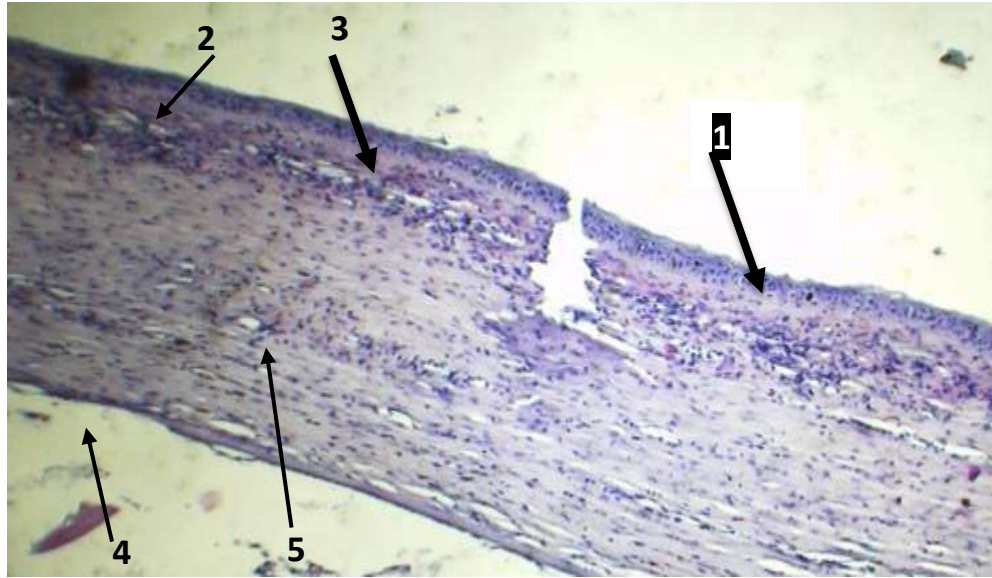


Рис. 3.39. Око кроля після закапування ізотонічного розчину за кератиту, 30 доба (контроль): 1– пошкоджений хвилеподібний передній епітелій; 2 – еритроцити в шарах строми; 3 – розшарування колагенових волокон строми; 4 – деформована десцеметова оболонка; 5 – кератоцити з різними базофільними ядрами. Гематоксилін Караці та еозин x100.

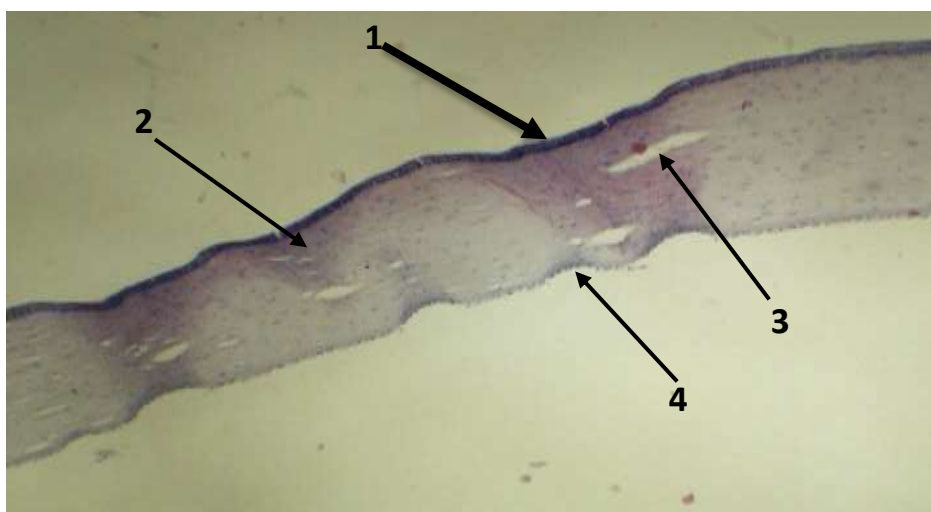


Рис. 3.40. Око кроля за кератиту: 1– епітелізація поверхневого шару; 2 – порушена диференціація епітеліоцитів; 3 – розслоювання колагенови фібрил; 4– набряк клітин цитоплазми десцеметової оболонки. Гематоксилін Караці та еозин x50.

У вихідному стані (рисунок 3.40) відзначали повну деепітелізацію поверхні рани. Шар епітелію нерівномірної товщини і складався з 2–3 шарів епітеліальних клітин, цитоплазма частини, яких набрякла. Порушена диференціація епітеліоцитів по верствам передня погранична пластинка, що розташована під покривним епітелієм немає чітких кордонів розмежування, між стромою і місцями має ознаки розслоювання щільної сітки колагенових фібрил, що вказує на запальний процес в середині шарів рогівки ока.

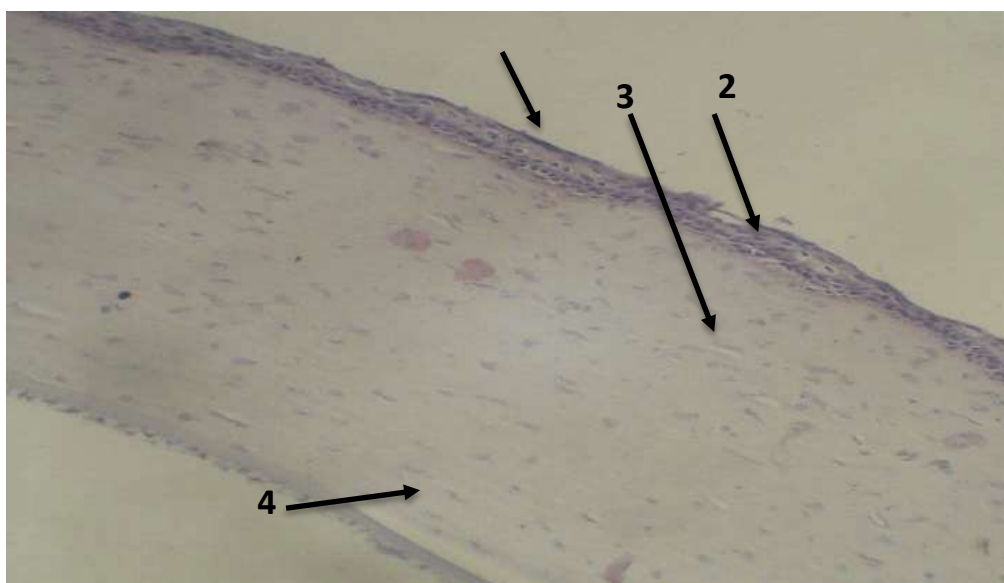


Рис. 3.41. Око кроля за кератиту, після застосування очного гелю на основі екстракту амніотичної оболонки, 7 доба: 1 – епітелізація поверхневого шару; 2 – порушена диференціація епітеліоцитів; 3 – розслоювання колагенови фібрил; 4 – набряк десцеметової оболонки. Гематоксилін Караці та еозин x100.

На 7 добу після застосування очного гелю з гомогенізованої АО мікроскопічно відзначається повна диференціація епітеліальних клітин по шарах, хоча місцями відзначається потовщення епітелію і незначний його акантоз в місці найглибшого пошкодження, присутнє незначне розслоювання колагенових фібрил стромы рогівки, та порушена диференціація епітеліоцитів в верхньому шарі рогівки, присутній набряк клітин цитоплазми десцеметової оболонки та її незначне відшарування (рис.3.41). При світловій мікроскопії гістологічного препарату (рисунок 3.42), відзначався фокальний набряк стромы рогової оболонки і незначний мукоїдний набряк її колагенових пластин.



Рис. 3.42. Око кроля за кератиту, після застосування очного гелю на основі екстракту амніотичної оболонки, 14 доба: 1– епітелізована поверхня рогівки; 2– вирівняні колагенові волокна строми рогівки; 3– десциметова оболонка з відновленими ендотеліальними клітинами.

Гематоксилін Караці та еозин x100.

Поверхня рогової оболонки повністю епітелізована. При цьому місцями зберігається витончення епітеліального покриву. В інших місцях відзначається збільшення кількості клітин епітелію до 5–6 шарів. У цих місцях відзначається їх диференціація по шарам і наближення епітеліального шару до нормальної. Ознак запальної інфільтрації рогової оболонки не виявлено. Присутнє збереження набряку строми рогової оболонки, але у меншій кількості тварин і в меншій мірі інтенсивності. Поверхня рогової оболонки повністю покрита шаром епітеліальних клітин.

На тридцяту добу після застосування очного гелю відзначалася повна епітелізація поверхні рани, диференціація клітин по шарам була присутня по всій роговій оболонці, але видно її зменшення товщини, в місці значного ушкодження. Набряку строми не відмічалось, вирівнювання колагенових волокон по всій довжині строми. Ендотелій десцеметової оболонки щільно прилягав до строми з внутрішнього боку непереривним шаром, в місці найглибшого пошкодження, в центральній частині відмічено місце, де була

невелика кривизна активної проліферації, де вище в стромі знаходиться місце розшарування колагенових волокон, які потім відзначаються, як субепітеліальні колагенові рубці (рис.3.43.).



Рис. 3.43. Око кроля за кератиту, після застосування очного гелю на основі екстракту амніотичної оболонки, 30 доба: 1— відновлений епітелій рогівки; 2— десцеметова оболонка з деформованими кератоцитами; 3— відновлена строма. Гематоксилін Караці та еозин x100.

Гістологічно виявили нерівномірну товщину по всій поверхні рогівки, спостерігаються мітоцити та великі цитоплазматичні ядра базофільного шару, базальна мембрана не рівномірної товщини. Між колагеновими волокнами розслоювання різної величини та форми, що вказує на набряк стромы та вміст в ній речовин запальної інфільтрації. В товщі стромі, між її волокнами подекуди зустрічаються кератоцити непрвельної форми, які добре зафарбувались. Десцеметова оболонка нерівномірно зафарбована, щільно прилягає до клітин ендотелію, і в деяких місцях відшарована, де помітно її потоншення. Спостерігалась інфільтрація увеального тракту з наявністю лімфоцитів та макрофагів, з великою інфільтрацією в райдужці та в війчастому тілі. В основі райдужки присутні лімфоїдні фолікули. В ціліарних відростках помітна диструкція тканин (втрата структури) (рис.3.44).

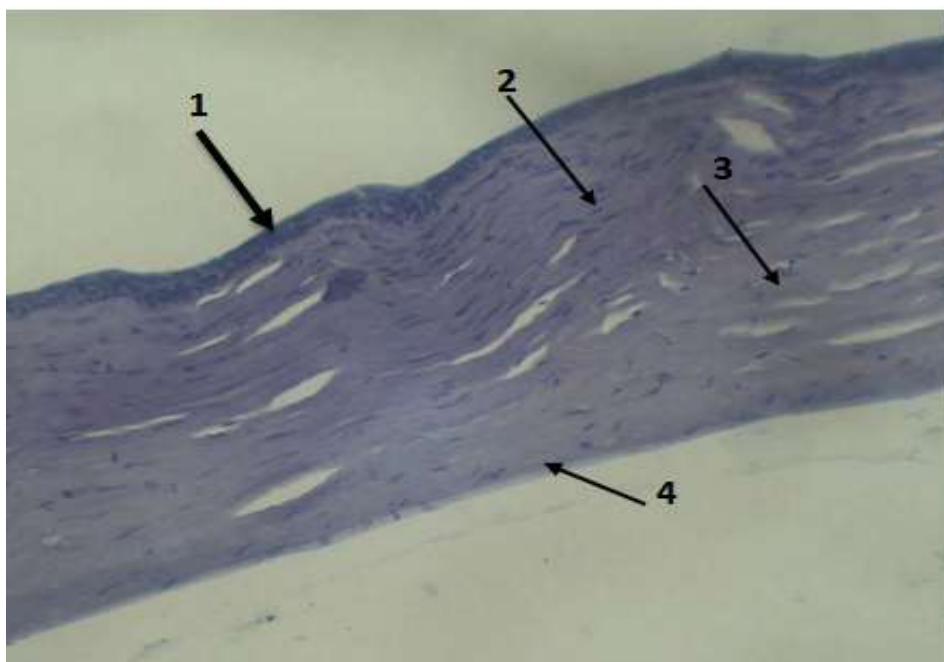


Рис. 3.44. Око кроля за кератиту, після застосування традиційного методу лікування, 30 доба: 1– пошкоджений поверхневий епітелій; 2– скупчення сегментоядерних лейкоцитів; 3– розшарування колагенових волокон; 4– відшарування плоских клітин ендотелію. Гематоксилін Караці та еозин x100.

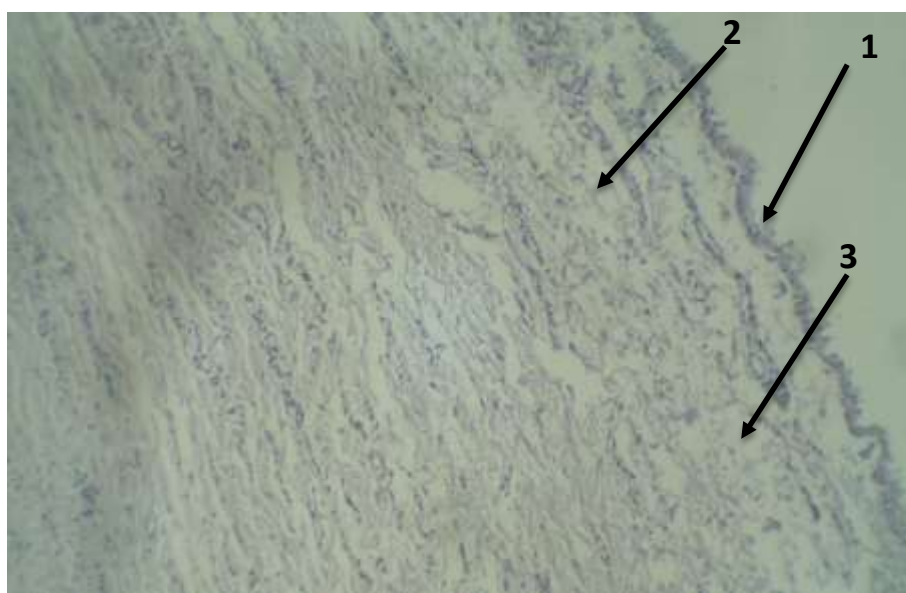


Рис. 3.45. Око кроля за кератиту, після закапування ізотонічного розчину (контроль), 30 доба: 1– пошкоджений поверхневий епітелій; 2– скупчення сегментоядерних лейкоцитів; 3– розшарування колагенових волокон. Гематоксилін Караці та еозин x50.

На рисунку 3.45 гістологічно виявлено гіперплазія переднього (покривного) епітелію, зруйнована бауменова мембрана, гіперплазія строми по всім шарам колагенових волокон, зруйновані кератоцити і фіброцити, розплавлена десцеметова оболонка, в передній камері ока скупчення нейтрофільних лейкоцитів, розшарування колагенових волокон та плоских клітин ендотелію.

3.1.3. Застосування амніотичної оболонки у тварин за експериментального кератиту

Як відомо, клітини амніотичної оболонки тварин належать до мезенхімальних. Такі МСК характеризуються низькою експресією антигенів, що захищає їх при алогенному введенні від атаки природних кілерів реципієнта, а також низькою чи нульовою експресією антигенів. На підставі цього доведено, що мезенхімальні стовбурові клітини амніотичної оболонки менш імуногенні порівняно з клітинами, виділеними з інших джерел. Тому нами було проведено дослідження по застосуванню амніотичної оболонки за різних хірургічних методик за кератиту.

Після діагностування кератиту кролі були розділені на шість дослідних груп:

Першій дослідній групі застосовували хірургічну методику пошарової трансплантації з фіксацією амніотичної оболонки в межах ушкодження до тканини рогівки вузлуватими швами, шовним матеріалом 8/00.

Другій дослідній групі виконували трансплантацію АО у вигляді біологічного покриття з фіксацією безперервним швом по краю лімба, шовним матеріалом 8/00.

Третій дослідній групі виконували трансплантацію АО у вигляді очного гелю, розробленого за власною методикою (на кафедрі хірургії і патофізіології ім. акад. І. О. Поваженка), закладали гелеподібний екстракт з гомогенізованої амніотичної оболонки, який за допомогою очної лінзи заправляли під третю повіку ока.

Четверта дослідна група – традиційне лікування (щоденне закапування генталяйн 0,4 %, і ципронорм 4–6 разів на добу) – загальна група; тваринам п'ятої дослідної групи інтактні тварини (група порівняння, загальна група) та нульова контрольна група (шоста дослідна група, загальна група), де застосовували закапування ізотонічного розчину 4–6 разів на добу.

На етапі забору матеріалу (на 7, 14 та 30 добу), тварини виводились із експериментального дослідження шляхом глибокого наркотизування з послідовним забором рогової оболонки з енуклеованого ока. Для оцінки ступеня запального процесу використовували розроблену бальну шкалу [13], що включає 8 ознак:

I. Виділення в кон'юнктивальній порожнині: 0 – відсутні, 1– незначні слизові, 2 – виражені слизові;

II. Ступінь гіперемії кон'юнктиви очного яблука: 0 – блідо-рожева, відповідає фізіологічній нормі, 1– слабка гіперемія кон'юнктиви очного яблука, 2 – помірно-виражена гіперемія кон'юнктиви очного яблука, 3 – виражена гіперемія кон'юнктиви очного яблука;

III. набряк рогівки: 0 – набряк рогівки відсутній, 1 – помірно-виражений локальний набряк рогівки в зоні запалення, 2 – середнього ступеня вираження локальний набряк рогівки в зоні запалення, 3 – дифузний набряк в зоні запалення з переходом на навколишню рогівку;

IV. Запальна інфільтрація: 0 – відсутня, 1 – точкові одиничні (не більше трьох) субепітеліальні інфільтрати, 2 – точкові множинні (більше трьох) субепітеліальні інфільтрати, 3 – локальна інфільтрація рогівки;

V. Васкуляризація рогівки: 0 – відсутня, 1 – є в межах одного квадрату, 2 – в межах двох квадратів;

VI. Стан навколишньої рогівки: 0 – прозора, набряк рогівки відсутній, 1 – прозора, помірно виражений набряк рогівки, 2 – зниження прозорості, дифузний набряк рогівки;

VII. Стан амніотичної мембрани: 0 – мембрана повністю лізована, 1 – мембрана частково лізована, 2 – мембрана збережена;

VIII. Ступінь помутніння рогівки: 0 – відсутня, 1 – ніжне хмаровидне, 2 – значне помутніння, з втратою прозорості.

Першій дослідній групі кролів застосовували шляхом техніки пошарової трансплантації амніотичної оболонки (рис.3.46). На 7 добу після трансплантації амніотичної оболонки при розкритті повік спостерігали помірну гіперемію кон'юнктиви і відсутність виділень, амніотична оболонка частково візована в місці найбільшого пошкодження. Відзначали епітелізацію поверхні рогівки і наявність помірно вираженого набряку у стромі рогівки. У цих місцях кератоцити практично були відсутні. Запальні інфільтрати визначались поблизу лімба і навколо шовного матеріалу.

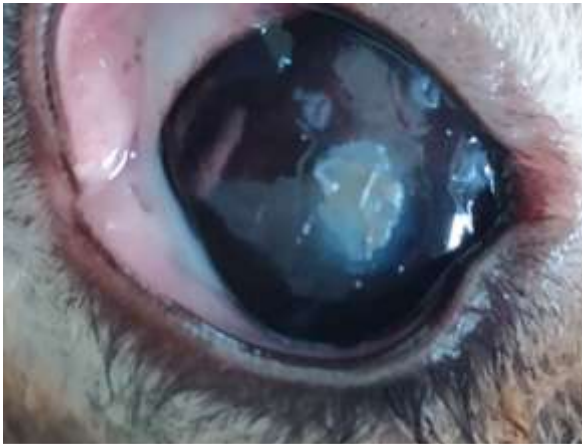


Рис. 3.46. Застосування техніки пошарової трансплантації, після підшивання амніотичної оболонки на рогівку ока кроля за кератиту.



Рис. 3.47. Техніка пошарової трансплантації, через 30 діб після підшивання амніотичної оболонки на рогівку ока кроля за кератиту.

Через 14 діб після трансплантації амніотичної оболонки спостерігали помірну гіперемію кон'юнктиви і відсутність кон'юнктивального вмісту у всіх випадках, мембрана була повністю збережена на поверхні рогівки і частково лізована.

Через 30 діб після трансплантації амніотичної мембрани у кролів спостерігали блідо-рожеву кон'юнктиву і слабку гіперемію кон'юнктиви. Мембрана повністю лізована. Набряк стромы був відсутній. Спостерігали точкову інфільтрацію і наявність васкуляризації в центральній частині рогівки (рис. 3. 47).

Другій дослідній групі кролів трансплантацію проводили технікою біологічного покриття АО. На 7 добу після трансплантації амніотичної оболонки (ТАО) при розкритті повік спостерігали відсутність кон'юнктивальної ін'єкції, гіперемовану кон'юнктиву і збереження АО на поверхні рогівки у всіх кролів. Характерним було наявність вираженого набряку в стромі рогівки під мембраною (рис.3.48).



Рис. 3.48. Застосування техніки біологічного покриття, після підшивання амніотичної оболонки на рогівку ока кроля за кератиту.



Рис. 3.49. Застосування техніки біологічного покриття через 30 днів після підшивання амніотичної оболонки на рогівку ока кроля за кератиту.

На 14 добу після ТАО відзначали блідо-рожеву кон'юнктиву і відсутність виділень з кон'юнктивальної порожнини. Виявлено частковий лізис АО в оптичній зоні рогівки з її збереженням в області лімба і швів. АО була відсутня, розташована в просвіті очної щілини у вигляді тяжа. При цьому у всіх випадках поверхня рогівки була епітелізована.

На 30 добу після ТАО відзначали блідо-рожеву кон'юнктиву і відсутність виділень з кон'юнктивальної порожнини. У всіх експериментальних тварин амніотична оболонка відсутня, поверхня рогівки була епітелізована, флюоресцеїном не фарбувалася. У деяких випадках спостерігали формування неінтенсивного помутніння з явищами залишкової інфільтрації. Васкуляризація рогівки у всіх тварин була відсутня (рис.3.49).

Третій дослідній групі кролів проводили трансплантацію АО виконували у вигляді очного гелю, розробленого за власною методикою (на кафедрі хірургії і патофізіології ім. акад. І. О. Поваженка) закладали гелеподібний екстракт з гомогенізованої амнітичної оболонки, який вносили до очної лінзи і заправляли під третю повіку ока (рис. 3.50), на 7 добу чітко видно зменшення вогнищ ураження рогівки по периферії з незначним ураженням по центру рогівки, що підтверджено при світловій мікроскопії щілинною лампою та флюоресцеїновим тестом Зейделя (рис. 3.51).

На 14 добу видимих ознак запальної реакції не відмічалось, тільки залишкові явища у вигляді хмароподібного помутніння в центрі рогівки ока, яке не фарбувалось флюоресцеїном, що вказує на повну репарацію клітин поверхневого шару рогівки (рис. 3.52).



Рис. 3.50. Трансплантація гомогенізованої АО у вигляді очного гелю на рогівку ока кроля за кератиту.

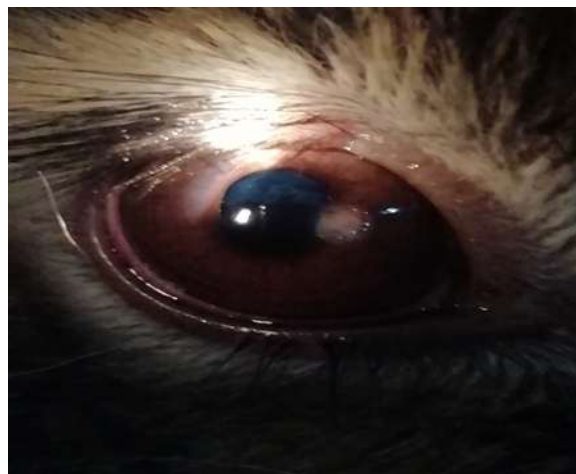


Рис. 3.51. Око кроля через 7 днів після трансплантації гомогенізованої АО у вигляді очного гелю на рогівку за кератиту.

При цьому у всіх термінах спостереження у більшості експериментальних тварин не виявляли клінічних і морфологічних ознак запальної інфільтрації, і на 30 добу після застосування очного гелю з АО не було ніяких клінічних ознак кератиту, крім залишкових явищ рубцювання, що підтверджено тестом Зейделя та при світловій мікроскопії (рис.3.53).

Четвертій дослідній групі проводили традиційне лікування (за каратиту, загальна група). Через 30 діб після лікування традиційним методом (щоденне закапування генталайн 0,4 %, і ципронорм 4–6 разів на добу).

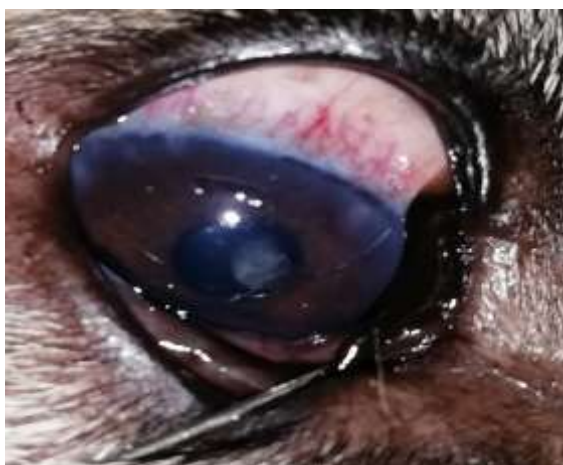


Рис. 3.52. Око кроля через 14 діб після трансплантації гомогенізованої АО у вигляді очного гелю на рогівку за кератиту.



Рис. 3.53. Око кроля через 30 діб після трансплантації гомогенізованої АО у вигляді очного гелю на рогівку за кератиту.

Відмічалась значна епіфора, яка дорівнювала 15 мм. тест-полоски за результатами теста Шиммера, за рахунок зморщування очного яблука (фтіазис), помітного плавлення рогівки, за рахунок агресивної дії препарату, який містив дексаметазон, що підтверджено тестом Зейделя, де враження рогівкового шару відображалось зеленим світінням по всій його поверхні, що ускладнювало епітелізації епітелію рогівки ока. П'ята дослідна група інтактні тварини (загальна група). Нульовій дослідній групі тварин (контроль, загальна група) закапування ізотонічного розчину 4–6 разів на добу.

На всьому етапі дослідів проводили клінічні дослідження (тест Шиммера, біомікроскопія щілинною лампою, флюоресцеїновий тест Зейделя, 7, 14, 30 добу після початку лікування та гістологічні дослідження після виведення тварин з експерименту з послідуочим забором рогової оболонки з енуклеованого ока. Таким чином, нами було повністю досліджено біомікроскопію, гістологію та саме відновлення ока, як органа після трансплантації алогенної амніотичної оболонки за кератиту.

**Порівняльна оцінка вираженості запальної реакції очей
експериментальних тварин в залежності від технік трансплантації АО і
екстракту з АО за кератиту, на 7добу ($M \pm m; n=9$)**

Критерії	Порівняння технік 7 доба				
Діагнос. дослід.	БП	Птр	Ек АО	Традицій не лікування	Контроль
СК	820 $\pm 0,04^*$	1010 $\pm 0,09$	920 $\pm 0,06^*$	1103 $\pm 0,02$	1510 $\pm 0,56$
Вид-к	790 $\pm 0,01^{**}$	1035 $\pm 0,01$	970 $\pm 0,08^*$	1130 $\pm 0,02$	1510 $\pm 0,56$
Н-ст-р	760 $\pm 0,05^{**}$	1060 $\pm 0,13$	740 $\pm 0,01^{**}$	1155 $\pm 0,02$	
Зап.інф.	920 $\pm 0,04^*$	920 $\pm 0,04^*$	920 $\pm 0,04^*$	920 $\pm 0,02^*$	
ФТ-т	920 $\pm 0,03^*$	920 $\pm 0,03^*$	920 $\pm 0,02^*$	920 $\pm 0,02^*$	
РОГ	730 $\pm 0,002^{**}$	1100 $\pm 0,08$	820 $\pm 0,01^{**}$	1301 $\pm 0,002$	
АМ	860 $\pm 0,02^*$	960 $\pm 0,02^*$	0	0	
ПОМ	920 $\pm 0,02^*$	920 $\pm 0,02^*$	920 $\pm 0,02^*$	920 $\pm 0,02^*$	
ВАС	920 $\pm 0,002^*$	920 $\pm 0,002^*$	920 $\pm 0,002^*$	920 $\pm 0,002^*$	

Примітка: $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$; вірогідні дані порівняно з їх значенням у тварин контрольної групи.

Порівняльна оцінка вираженої запальної реакції очей експериментальних тварин в залежності від техніки трансплантації амніотичної оболонки і екстракту гомогенізованої амніотичної оболонки у формі гелю дало позитивний ефект, що стимулювало відновлювальні процеси за кератиту, яке показало достовірне прискорення відновлення структури і функції ока тварини. Причому, активність відновлення функціональної здатності ока за алогенної трансплантованої амніотичної оболонки та екстракту гомогенізованої амніотичної оболонки пришвидшило репаративні процеси, де показано за клінічних випадків і на рівні макроскопічному, мікроскопічному.

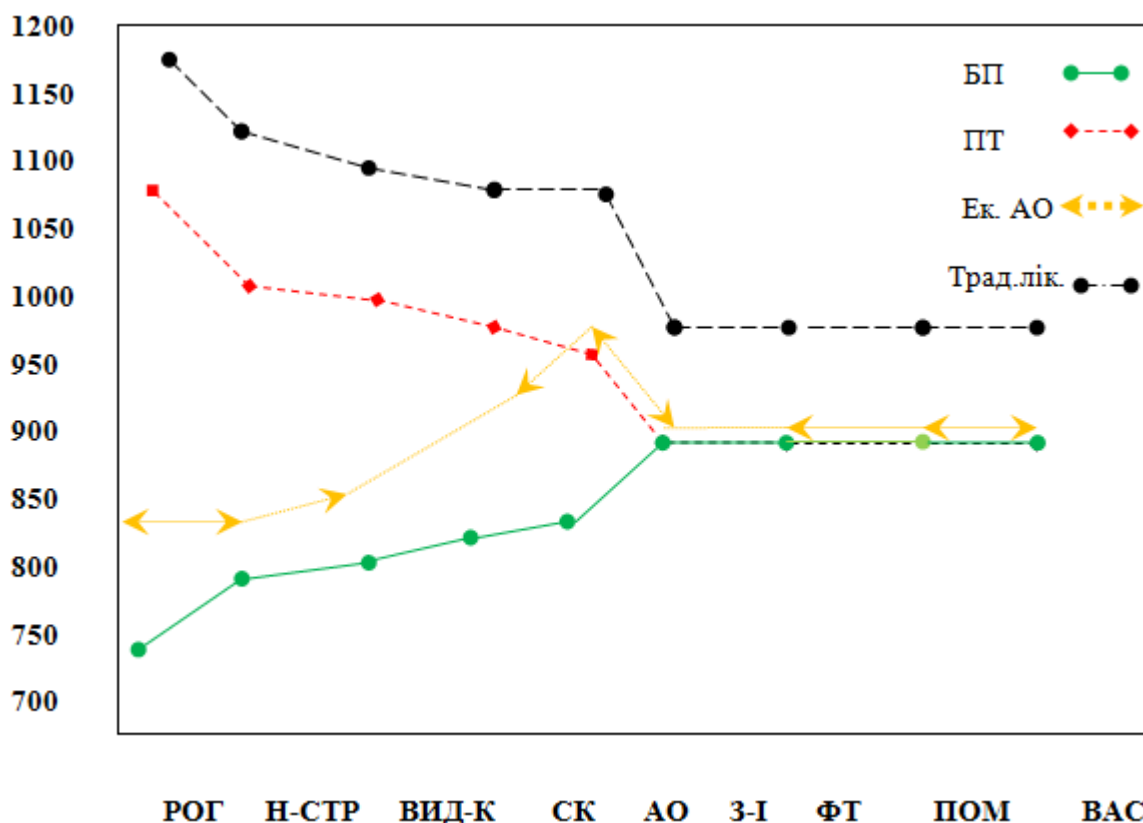


Рис. 3.54. Динаміка вираженості запальної реакції очей експериментальних тварин в залежності від хірургічної техніки трансплантації АО і застосування очного гелю на основі екстракту з АО, на 7 добу.

На 7 добу після трансплантації амніотичної мембрани вираженість запального процесу в рогівці експериментальних тварин була достовірно нижче в групі з біологічним покриттям (БП) АО ніж у групі з пошаровою трансплантацією (ПТ) за наступними показниками: кількість виділень в кон'юнктивальній порожнині ($p=0,01$), ступінь набряку строми рогівки ($p=0,01$) і стан навколишньої рогівки ($p=0,002$), (табл. 3. 4, рис. 3.54).

Таким чином нами встановлено високу ефективність застосування алогенної амніотичної оболонки та екстракту гомогенізованої амніотичної оболонки у формі гелю для стимуляції регенеративних процесів в ушкоджених поверхневих шарах рогівки ока в тварин, а саме в собак та котів за кератиту: повна епітелізація поверхні ушкодженої рогівки, яка вже завершувалася на 30 добу експериментального та спонтанного кератиту в кролів та собак з відновленням функціонального стану ока та його мікроскопічної структури.

**Порівняльна оцінка вираженості запальної реакції очей
експериментальних тварин в залежності від технік трансплантації АО і
екстракту з АО за кератиту, на 14 добу ($M \pm m; n=9$)**

Критерії діагно- стичних дослід- жень	Порівняння технік 14 доба				
	БП	Птр	Ек АО	Трад. лікув	Конт- роль
СК	380±0,35***	420±0,55**	400±0,46**	492±0,47**	1510 ±0,56
Вид-к	380±0,36**	420±0,57**	400±0,47**	501±0,47*	
Н-ст-р	405±0,77**	410±0,84**	408±0,8**	434±0,47**	
Зап.інф.	380±0,14**	460±0,31**	420±0,28**	562±0,47*	
ФТ	380±0,14**	460±0,31**	420±0,28**	562±0,47*	
РОГ	380±0,18**	460±0,38**	420±0,31**	556±0,47*	
АМ	360±0,19**	455±0,31**	0	0	
ПОМ	405±0,05**	445±0,09**	425±0,07**	604±0,47*	
ВАС	415±0,05**	465±0,05**	435±0,08**	602±0,47*	

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; вірогідні дані порівняно з їх значенням у тварин контрольної групи

На 14 добу після трансплантації амніотичної оболонки статистично достовірних відмінностей між трьома експериментальними групами за статистичними даними не відзначалося ($p > 0,05$) (табл. 3.5, рис.3.55), але в порівнянні з традиційним методом лікування різниця була суттєвою.

Порівняльна оцінка вираженості запальної реакції очей експериментальних тварин в залежності від технік трансплантації амніотичної оболонки і екстракту гомогенізованої амніотичної оболонки за кератиту у формі гелю показало вже на 14 добу віднолювання кровопостачання до судинної оболонки, стабілізацію процесу обміну рідинами між камерами ока та увеального тракту, що відновлює функцію акомодатії та всіх рефлексів ока, та майже зникнення явища неоваскуляризації рогівки ока. Це дає змогу об'єктивно побачити всю картину запальної реакції очей всіх патстанів ока.

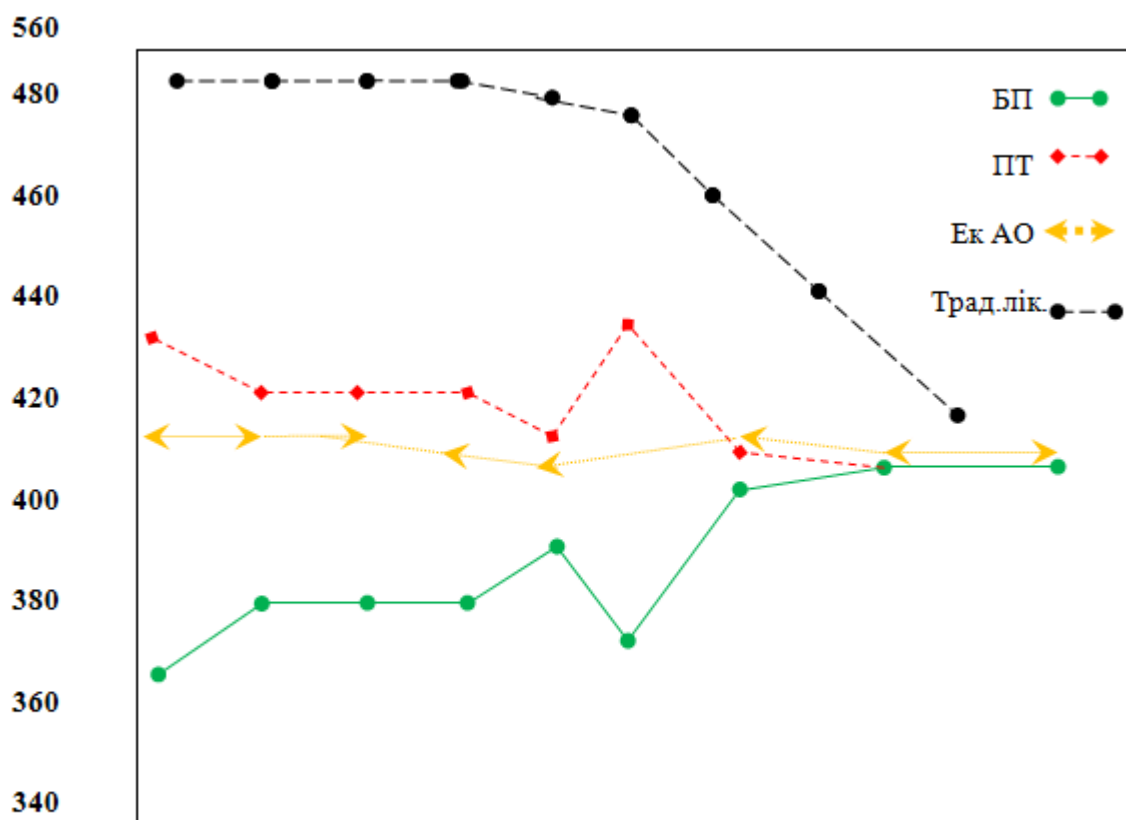


Рис. 3.55. Динаміка вираженості запальної реакції очей експериментальних тварин в залежності від хірургічної техніки трансплантації АО і застосування очного гелю на основі екстракту з АО, на 14 добу.

На рис. 3.55 видно чітку динаміку вираженої запальної реакції очей експериментального характеру у тварин в залежності від хірургічної техніки трансплантації амніотичної оболонки і застосування очного гелю на основі екстракту гомогенізованої амніотичної оболонки, що показало на 14 та 30 добу повним завершенням відновлення функціональної здатності ока тварини, про що свідчать показники наведені в таблиці та графіку, інструментальні та гістологічні дослідження. В даному спостереженні спостерігалась висока активність репаративного процесу, вона була нижча за введення інтравітреально та субкон'юнктивально. Реєструвалася чітка лізація амніотичної оболонки, просвітлення відновлених шарів рогівки, що давало змогу візуалізувати чіткий малюнок райдужки ока від репаративного ефекту.

**Порівняльна оцінка вираженості запальної реакції очей
експериментальних тварин в залежності від технік трансплантації АО
і екстракту з АО за кератиту, на 30 добу (M±m;n=9)**

Критерії	Порівняння технік 30 доба				
Діагнос. дослід.	БП	Птр	Ек АО	Трад. Лікуван.	Конт роль
СК	85±0,1***	120±0,5***	100±0,3***	392±0,2*	1510 ±0,55
Вид-к	0	0	0	460±0,4*	
Н-ст-р	100±0,4***	100±0,4***	100±0,4***	334±0,3*	
Зап.інф.	85±0,8***	120±0,8***	95±0,9***	120±0,2*	
ФТ	85±0,1***	120±0,6***	90±0,2***	562±0,1*	
РОГ	90±0,1***	90±0,1***	90±0,1***	556±0,5*	
АМ	70±0,3***	130±0,3***	0	0	
ПОМ	95±0,3***	115±0,6***	110±0,3***	305±0,2*	
ВАС	85±0,1***	120±0,5***	90±0,2***	150±0,3***	

Примітка: *p< 0,05; **p< 0.01; ***p< 0,001; вірогідні дані порівняно з їх значенням у тварин контрольної групи

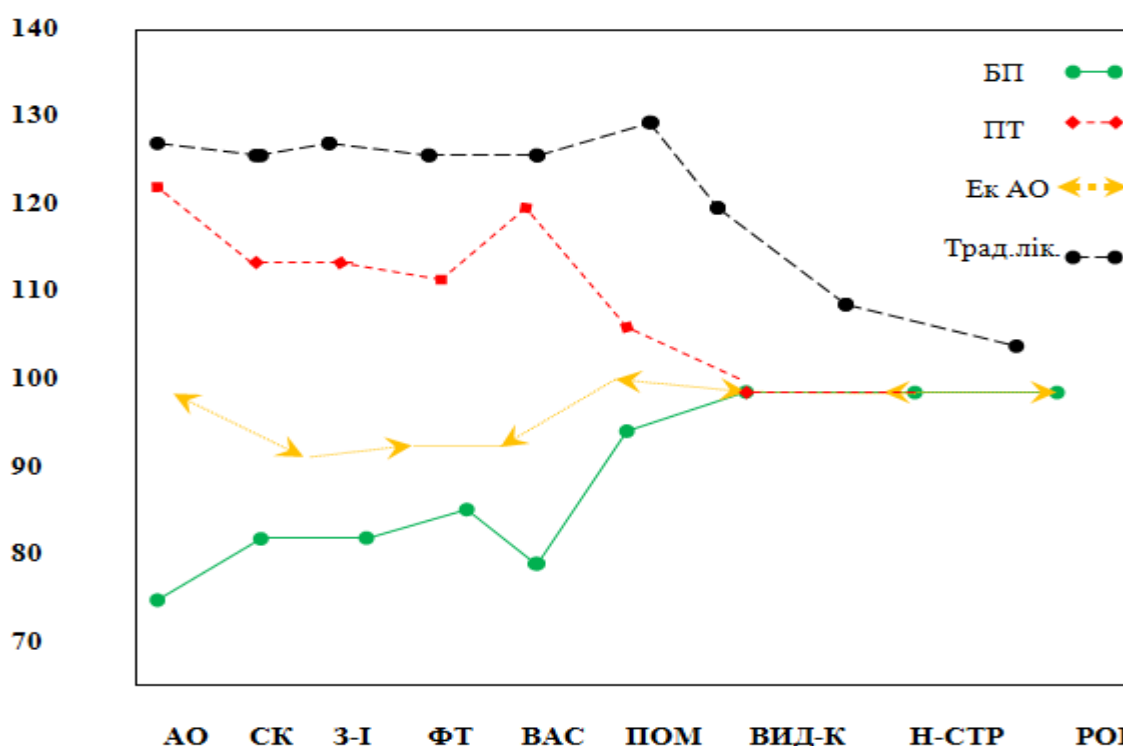


Рис. 3.56. Динаміка вираженості запальної реакції очей експериментальних тварин в залежності від хірургічної техніки трансплантації АО і застосування очного гелю на основі екстракту з АО, на 30 добу.

На 30 добу в порівнюваних групах з різною технікою ТАО вираженість запального процесу в рогівці тварин була достовірно нижче в групі із застосуванням техніки біологічного покриття по критеріям: ступінь гіперемії кон'юнктиви ($p = 0,03$), запальна інфільтрація стромы рогівки ($p = 0,03$), ступінь фарбування рогівки флюоресцеином ($p = 0,03$), збереження рогівки ($p = 0,001$), васкуляризація рогівки ($p = 0,02$) (табл. 3.6, рис. 3. 56).

3.1.4. Дослідження ефективності трансплантації амніотичної оболонки в залежності від складності патологічного процесу за клінічних випадків кератиту у собак

Метою клінічного випробування в наших дослідженнях було вивчити вплив трансплантованої амніотичної оболонки на активність репаративних процесів в оці собак за кератиту спонтанного походження.



Рис. 3.57. Глибокий гнійний кератит (з білим гнійним інфільтратом та васкуляризацією) до застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.



Рис. 3.58. Глибокий гнійний кератит (з білим гнійним інфільтратом та васкуляризацією) через 7 діб після застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.

На рисунку 3.57 видно патологію на момент потрапляння пацієнта до клініки, на рисунку 3.58 – результат через 7 діб після підшивання амніотичної оболонки та інсталяції екстракту з її тканин. На рисунку 3.59 результат через 14 діб після підшивання амніотичної оболонки та інсталяції екстракту з її тканин. На рис.3.60 після розшивання повік через 30 діб видно відновлену

прозору рогівку, з часточками не повністю лізованих тканин амніону по краю лімбу.



Рис. 3.59.Глибокий гнійний кератит (з білим гнійним інфільтратом та васкуляризацією) через 14 діб після застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.



Рис. 3.60.Глибокий гнійний кератит (з білим гнійним інфільтратом та васкуляризацією) через 30 діб після застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.



Рис. 3.61. Паннус і плазма третьої повіки (ускладнений ерліхіозом) до застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.



Рис. 3. 62. Паннус і плазма третьої повіки (ускладнений ерліхіозом) через 7 діб після застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.

На рис. 3.61 собака з рецидивним паннусом і плазмомою третьої повіки ускладнений ерліхіозом. Зробивши за напрацьованою методикою операцію з трансплантацією підготовленого амніону вже через 7 діб, як видно з рис.3.62,

зменшується площа враження рогівки та на 14 добу повністю її відновлення, але з деякою васкуляризацією рогівки (рис. 3.63) . І вже на 30 добу відновлена рогівка майже по всій поверхні з частками не лізованого амніону по краю лімба (рис. 3.64).

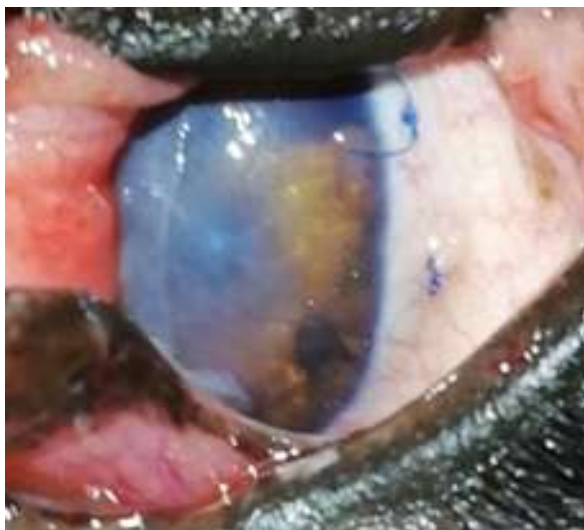


Рис. 3.63. Паннус і плазмама третьої повіки (ускладнений ерліхіозом) через 14 діб після застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.



Рис. 3.64. Паннус і плазмама третьої повіки (ускладнений ерліхіозом) через 30 діб після застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.



Рис. 3.65. Кератомалія рогівки ока собаки до застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.



Рис. 3.66. Кератомалія рогівки ока собаки через 7 діб після застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.



Рис. 3.67. Кератомалія рогівки ока собаки через 14 діб після застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.



Рис. 3.68. Кератомалія рогівки ока собаки через 30 діб після застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.

На рисунку 3.65 собака після хімічного опіку з імуноопосередкованими ускладненнями, з діагнозом кератомалія рогівки. Було проведено оперативне втручання за тією ж методикою і на рис. 3.66 і 3.67 видно процеси, які відбуваються на 7 та 14 добу після підшивання амніотичної оболонки. І на 30 добу чітко видно повністю відновлену рогівку ока, та повністю лізований трасплантат амніону (рис.3.68).



Рис.3.69. Перфоруєча септична виразка рогівки (внаслідок механічної травми) до застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.



Рис.3.70. Перфоруєча септична виразка рогівки (внаслідок механічної травми) через 7 діб після застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.



Рис. 3.71. Перфоруєча виразка рогівки (внаслідок механічної травми) через 14 діб після застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.



Рис. 3.72. Перфоруєча виразка рогівки (внаслідок механічної травми) через 30 діб після застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.

Внаслідок механічної травми ока на рис.3.69, утворилась перфоруєча септична виразка рогівки. Після трансплантації підготовленої амніотичної мембрани через 7 діб, (рис.3.70) видно активний процес очищення з глибини виразки та не лізований амніон, а вже на 14 добу (рис.3.71) повний його лізис з повним загоєнням виразки та незначною васкуляризацією. На 30 добу видно повністю відновлену рогівку з незначним хмароподібним помутнінням на місці пошкоджених глибоких шарів рогівки (рис.3.72).



Рис. 3.73. Субтотальний корнеальний секвестр рогівки (вроджений анкілоблефарон) до застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.



Рис. 3.74. Субтотальний корнеальний секвестр рогівки (вроджений анкілоблефарон) через 7 діб після застосування трансплантації АО методом біологічної пов'язки.

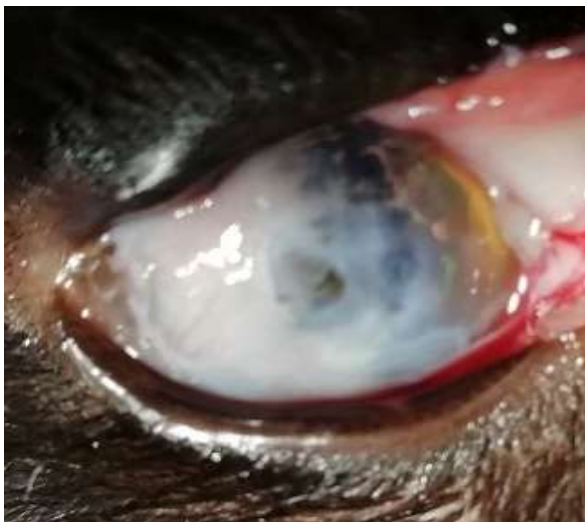


Рис. 3.75. Субтотальний
корнеальний секвестр рогівки
(вроджений анкілоблефарон)
через 14 днів після застосування
трансплантації АО методом
біологічної пов'язки.



Рис. 3.76. Субтотальний
корнеальний секвестр рогівки
(вроджений анкілоблефарон)
через 30 днів після застосування
трансплантації АО методом
біологічної пов'язки.

На рис. 3.73 собака потрапила з діагнозом прогресуючий вроджений субтотальний корнеальний секвестр рогівки і після оперативного скринінгу було проведено трансплантацію амніону рис.3.74, і як видно з рис.3.75 та 3.76, є ділянки з повністю прозорими та відновленими шарами рогівки, а інші васкуляризовані потребують повторного скринінгу та трансплантації.



Рис. 3.77. Епітеліальна дистрофія
з патологічною
неоваскуляризацією рогівки до
застосування очного гелю з
екстракту АО



Рис. 3.78. Епітеліальна дистрофія
з патологічною
неоваскуляризацією рогівки через
7 днів після застосування очного
гелю з екстракту АО



Рис. 3.79. Епітеліальна дистрофія з патологічною неоваскуляризацією рогівки через 14 діб після застосування очного гелю з екстракту АО



Рис. 3.80. Епітеліальна дистрофія з патологічною неоваскуляризацією рогівки через 30 діб після застосування очного гелю з екстракту АО

Таблиця 3.7

Порівняльна оцінка вираженості запальної реакції очей собак, після трансплантації АО, кератиту, на 7,14 та 30 добу ($M \pm m; n=6$)

Періоди оцінювання	Методи трансплантації амніотичної оболонки за клінічного кератиту у собак						Трад. лікув.
	Собака №1 БП	Собака №2 БП	Собака №3 БП	Собака №4 ПТ	Собака №5 БП	Собака №6 Екс.АО	Собака №7
Вихідний стан	22±0,4	25±0,3	24±0,6	29±0,7	23±0,4	15±0,3	29±0,5
Трансплантація АО, 7 доба	13±0,2*	16±0,3*	15±0,5*	16±0,3*	14±0,4*	7±0,4*	22±0,9
Трансплантація АО, 14 доба	7±0,5**	9±0,6**	9±0,2**	10±0,2**	6±0,4**	2±0,8**	17±0,7*
Трансплантація АО, 30 доба	1±0,1***	2±0,6***	3±0,7***	5±0,3***	1±0,1***	1±0,1***	9±0,1**

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; вірогідні дані порівняно з їх значенням у тварин вихідного стану

На рис. 3.77. пес з епітеліальною дистрофією що спричинив патологічну неоваскуляризацію рогівки. В цьому випадку були застосовані тільки інсталяції екстрактом тканин амніотичної оболонки з застосуванням очної лінзи, рис.

3.78, і вже на 14 добу (рис.3.79) та 30 добу (рис.3.80) видно відновлену поверхню рогівки, майже без видимих ознак васкуляризації.

В таблиці 3.7 показано згідно критеріїв оцінювання за розробленою шкалою для кожного дослідження і засумовано в один цифровий показник по кожному пацієнту з клінічними діагнозами кератит і різною етіологією ушкоджень рогівки ока у собак.

Через 7 діб після підшивання АО за сумою критеріїв відбулися покращення, знизилась запальна інфільтрація тканин, зменшився набряк строми, знизились клінічні прояви і тільки при вродженій патології суттєвих змін не відбулось, тільки збільшився післяопераційний набряк строми рогівки.

На 14 добу після ТАО за критеріями в сумі значно покращились, відмічали ще значне зменшення запального процесу, як в кон'юнктиві так і в стромі рогівки. Видно було у всіх випадках значний лізис АО, який був помітний тільки в зоні лімбу. Залишалась незначна васкуляризація та помутніння майже відновленого епітеліального шару рогівки у всіх випадках але майже без змін з випадком вродженої патології.

На 30 добу у всіх пацієнтів була відсутня епіфора, слизові були блідо-рожевого кольору. Амніотична оболонка лізована повністю, покривний епітелій рогівки за тестом Зейделя не фарбувався, що вказує на відновлення морфологічної структури, але ще залишались незначні залишкові помутніння і в двох інших явища часткової інфільтрації по краю лімба з незначними вузликами в місцях проходження шва, де на 30 добу достовірно зниження запальної реакції було у 22 рази (собака №1,2,3,5, 6,) та відновлення морфологічних, функціональних показників на 95,5 % , а з випадком вродженої патології зміни не відзначались(собака №4) де зниження запальної реакції було у 5,8 рази в порівнянні з вихідним станом і у 3,2 за традиційного лікування у собаки №7, але чітко виражалось місце прозорості шару епітелію рогівки, на відміну від початкового акантозу, корнеального секвестру рогівки, що добре виражено на в табл. 3.7 та рисунку 3.81.

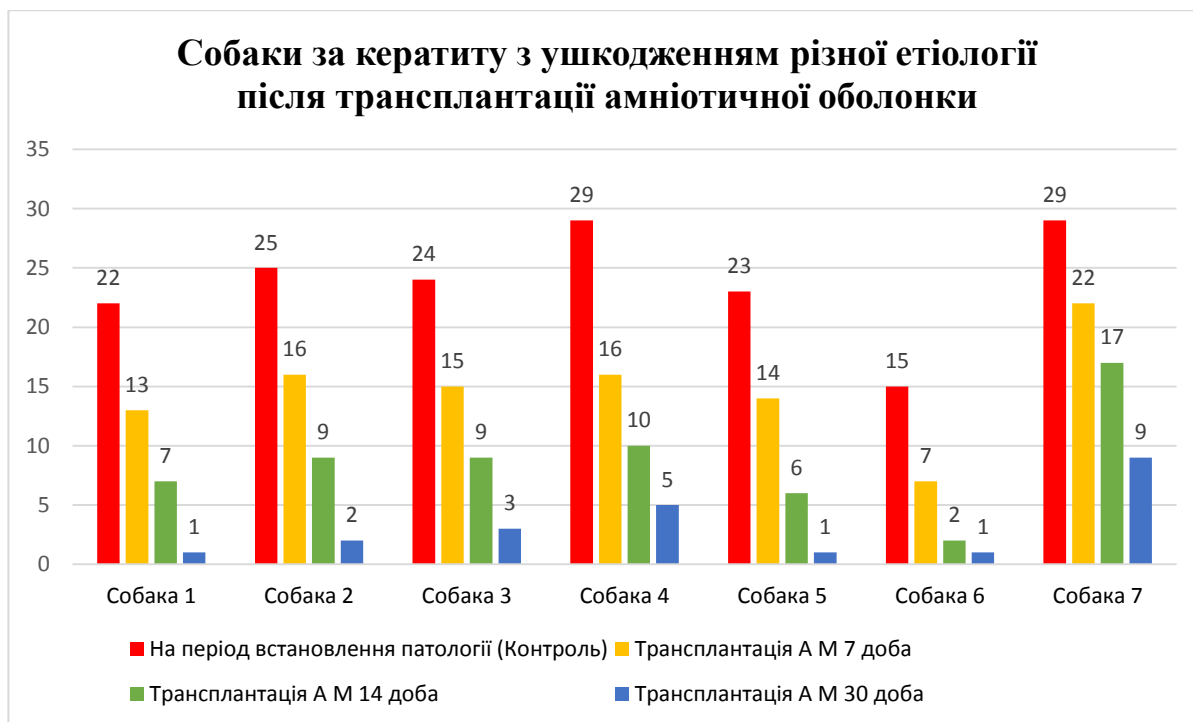


Рис. 3.81. Динаміка вираженості запальної реакції очей собак після трансплантації АО за кератиту, на 7,14 та 30 добу.

Як видно із рис. 3.81 динаміка вираженості запальної реакції очей собак після трасплантації амніотичної оболонки за кератиту відразу після застосування на ушкоджену ділянку ока спостерігали незначну епіфору, помітне помутніння поверхневого епітелію. На 30 добу спостережень після нанесення амніотичної оболонки не було виявлено жодних ознак запального процесу, як видно на рисунку. Реакція на світло була безболісною, з рефлекторною відповіддю звання зіниці ока. У центрі очного яблука у місці ушкодження, ще залишались незначні ознаки помутніння, яке характеризувало наслідок деепітелізації пошкодженої ділянки рогівки ока в тварин, вона супроводжувалась з поступовим зникненням. Амніотична оболонка на 30 добу експерименту спонтанного характеру була повністю візована.

Тому даний метод репаративного характеру за кератиту показав себе дуже ефективно, адже трансплантована амніотична оболонка є багатою на стовбурові клітини галогенного походження, що дає змогу відновлювати функціональну здатність ушкодженої рогівки ока, де і показало високий результат

3.1.5. Ефективність трансплантованих алогенних мезенхімальних стовбурових клітин за різних методів введення та імунна відповідь на їх застосування

Нами було проведено дослідження на репаративний процес мезенхімальними стовбуровими клітинами за різних методів введення та дослідження імунної відповіді на їх введення за хвороб очей у тварин. Різні методи введення проводили за такими способами:

1. Введення в тенозовий простір (рис.3.82). Вводили через малий розріз кон'юнктиви і капсули, уздовж склери в нижньо-внутрішній області очного яблука в трикутник, де склера переходить у пухкий сполучнотканинний шар, що оточений щільною сполучною тканиною, фіброзною пухкою тканиною і теновою капсулою.

2. Субкон'юнктивальний шлях введення (рис. 3.83). Голкою розміром 25G, робили ін'єкція під скроневу зону кон'юнктиви очного яблука, попередньо зафіксувавши її хірургічним пінцетом.

3. Введення інтравітреальне (рис.3.84). Ін'єкцію в скловидне тіло виконували через склеру на відстані 1,5 мм. позаду лімбу, щоб не травмувати кришталик. Спочатку відібрали скловидне тіло в об'ємі 1,0 мл. і потім через ту ж голку вводили мезенхімальні стовбурові клітини таку ж кількість.

4. Введення в передню камеру ока (рис.3. 85). Голкою 27G приєднували до шприца вводили перпендикулярно лімбу під кутом 45° на відстані 1 мм. позаду останнього прокручуючими рухами паралельно райдужці. Спочатку відібрали скловидне тіло в об'ємі 1,0 мл. і потім через ту ж голку ввели мезенхімальні стовбурові клітини, таку ж кількість.

Всім тваринам при надходженні була зроблена комплексна діагностика і встановлений клінічний діагноз. Клінічна картина очей тварин мала типові ознаки тотального увеїту у всіх чотирьох пацієнтів (рис.3.86, рис. 3.90, рис. 3.94, рис.3.98.) і характеризувалася вираженим набряком і гіперемією повік, без гнійних виділень, хемозом, змішаної ін'єкцією очного яблука, набряком і гнійної інфільтрацією рогівки, гіпопіон з різним рівнем вираженим набряком

райдужки без візуалізації зіниці, гнійним ексудатом в склоподібному тілі з відсутнім рефлексом з очного дна, внаслідок опалесценції вологи передньої камери ока і наявністю гіфеми та ретробульбарна гематома з переорбітальним набряком тканинних структур, яка проявляється яскравим гіперехогенним білим світлом при сонографічному дослідженні, що являється найбільш інформативним при таких патологіях (рис.3.88, рис.3.92, рис.3.96, рис.3.100).



Рис. 3.82. Введення в тенозовий простір



Рис. 3. 83. Субкон'юнктивальний шлях введення



Рис. 3.84. Введення інтравітреальне.



Рис. 3.85. Введення в передню камеру ока

На рис. 3.86 типові ознаки тотального увеїту, який характеризувався вираженим набряком і гіперемією повік, без гнійних виділень, хемозом,

змішаної ін'єкцією очного яблука, набряком і гнійної інфільтрації рогівки,



Рис. 3.86. Клінічний спонтанний випадок увеїту у собаки, №1.



Рис.3. 87. Око собаки №1 на 30 добу після введення стовбурових клітин інтравітреально.

гипопион з різним рівнем, вираженим набряком райдужки без візуалізації зіниці, гнійним ексудатом в склоподібному тілі з відсутнім рефлексом з очного дна внаслідок опалесценції вологи передньої камери ока і наявністю гіфеми.



Рис. 3.88. УЗД клінічного спонтанного випадку увеїту у собаки №1.

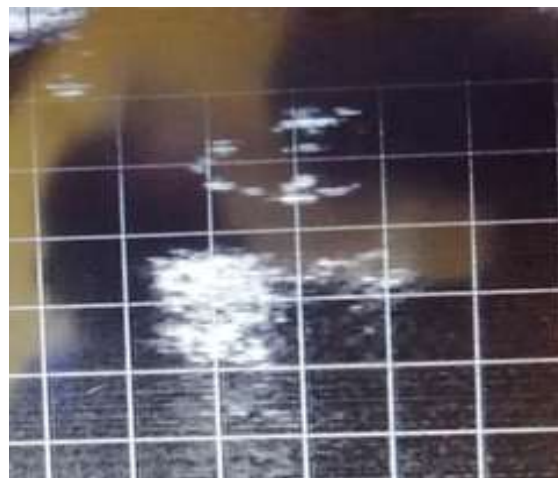


Рис.3.89. УЗД на 30 добу після введення стовбурових клітин інтравітреально, собака №1.

Результат тесту Шиммера з допомогою тест-полоски дорівнював 25 мм. При тонометрії показники внутрішньоочного тиску дорівнювали 52 мм.рт.ст. Флюорисциновий тест Зейделя був негативним. При УЗД візуалізовано на рис. 3.88 внутрішня ексудація, крововилив та диструкція скловидного тіла, що візуалізується ехогенним світінням. Через 30 діб після введення МСК

інтравітреально, видно на рис. 3.87, зниження активності запального процесу, відсутність гіфеми та гіпопіону та майже зрозумілий малюнок райдужки, але видно опалесценцію вологи передньої камери ока. Результат тесту Шиммера з допомогою тест-полоски дорівнював 23 мм. При тонометрії показники внутрішньоочного тиску дорівнювали 41 мм.рт.ст. При УЗД візуалізовано на рис.3.89 незначна внутрішня ексудація та диструкція скловидного тіла, що візуалізується ехогенним світінням.

На рисунку 90, видимі ознаки тотального увеїту, з яскраво вираженим запальним процесом, райдужна оболонка з розлитим нечітким малюнком, реакція на світло агресивна, між рогівкою і райдужкою (гіфема), в центральній частині ока гіпопіон в вигляді білих протеїнових преципітатів. Результат тесту Шиммера дорівнював 23 мм. При тонометрії показники внутрішньоочного тиску, дорівнювали 36 мм.рт.ст. Флюорисциновий тест Зейделя був позитивним, поверхня рогівки в центральній частині фарбувалась специфічним світінням.



Рис. 3.90. Клінічний спонтанний випадок увеїту у собаки №2.



Рис. 3.91. Собака за увеїту №2 на 30 добу після введення стовбурових клітин субкон'юнктивально.

При УЗД візуалізовано на рис. 3.92 внутрішня ексудація, потовщення судинної оболонки та диструкція скловидного тіла, що візуалізується ехогенним світінням. Після ін'єкції МСК субкон'юнктивально помітно зник

запальний процес в кон'юнктиві ока та по краю лімбу (рис. 3.91.), відмічена патологічна запальна інфільтрація та скопичення преципітатів, райдужна оболонка має змінений колір, зіниця діаметром 8,5 мм, реакція на світло агресивна, між рогівкою і райдужкою (гіфема), в центральній частині зіниці ока гіпопіон.

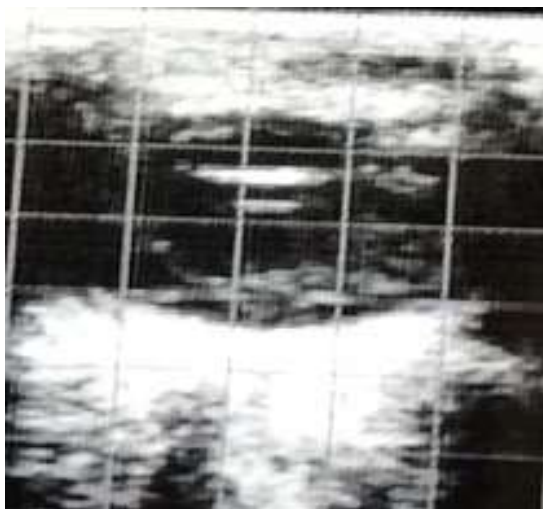


Рис. 3.92. УЗД клінічного спонтанного випадку увеїту у собаки №2.

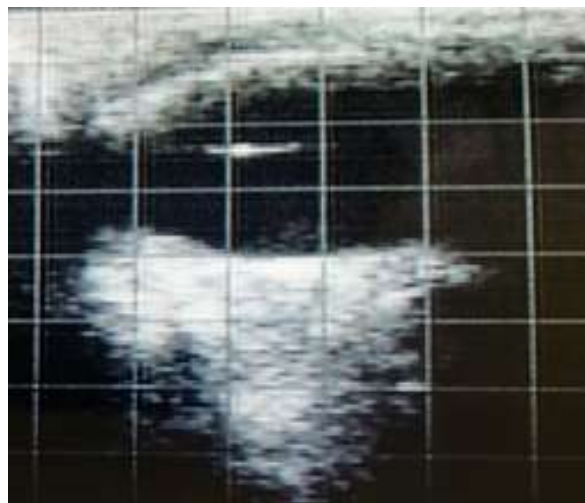


Рис. 3.93. УЗД на 30 добу після введення стовбурових клітин субкон'юнктивально, собака №2 .



Рис. 3.94. Клінічний спонтанний випадок увеїту у собаки №3.



Рис. 3.95. Око собаки №3 на 30 добу після введення стовбурових клітин в передню камеру ока.

Результат тесту Шиммера показав 16 мм. При тонометрії показники внутрішньоочного тиску дорівнювали 34 мм.рт.ст. Флюорисциновий тест

Зейделя був негативним. Патологічна неоваскуляризація з потовщеною судинною оболонкою підтверджено при УЗД дослідженні на рис. 3.93 гіперехогенними включеннями, відмічався переорбітальний набряк.

На рис.3.94 видно що волога передньої камери була опалесційована (помутніння внаслідок запалення), райдужна оболонка з розлитим нечітким малюнком. Результат тесту Шиммера з допомогою тест-полоски дорівнював 25 мм. При тонометрії показники внутрішньоочного тиску дорівнювали 38 мм.рт.ст. Флюорисциновий тест Зейделя був негативним, поверхня рогівки не фарбувалась специфічним світінням. З рисунка 3.96 на УЗД видно відшарування скловидного тіла, яке проявляється як яскрава ехогенна лінія в задній частині ока. Через 30 діб після введення МСК в передню камеру ока відмічалась відсутність проявів запального процесу тільки помітно залишковий білковий преципітат. Результат тесту Шиммера дорівнював 15 мм, що вважається нормою. При тонометрії показники внутрішньоочного тиску дорівнювали 25 мм.рт.ст. Помутніння передньої камери та запальної інфільтрації, не відзначалось (рис.3.95). За результатами УЗД патологічних відхилень не спостерігалось, що відображено на (рис.3.97).



Рис.3.96. УЗД клінічного спонтанного випадку увеїту у собаки №3.

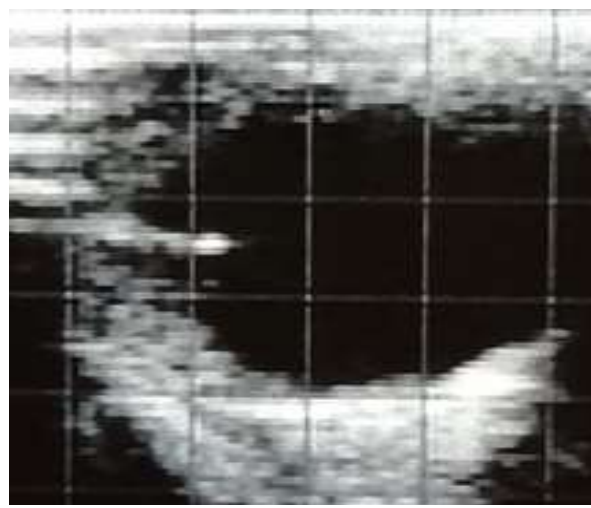


Рис.3.97. УЗД на 30 добу після введення стовбурових клітин в передню камеру ока, собака №3 .

На рисунку 3.98 волога передньої камери була опалесційована, помутніння внаслідок запалення, райдужна оболонка з розлитим нечітким

малюнком, реакція на світло агресивна по краю лімба крововилив, між рогівкою і райдужкою гіфема, видимі гнійні скупчення в передній камері ока, преципітати на рогівковому ендотелії, присутня епіфора, та неоваскуляризація рогівки.

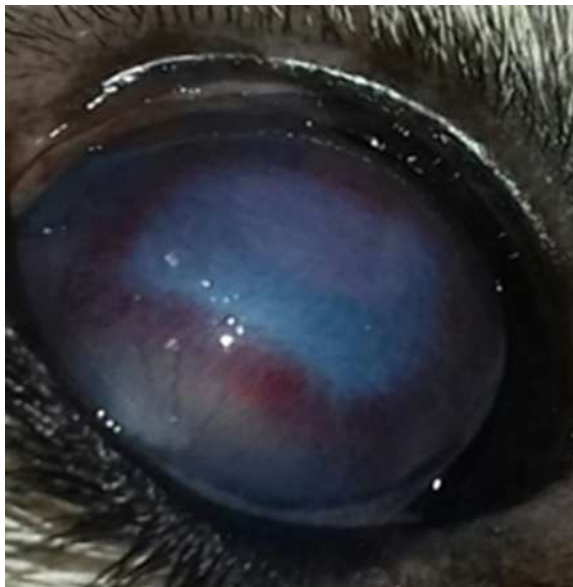


Рис.3.98. Клінічний спонтанний випадок увеїту у собаки №4.



Рис.3.99. Собака №4, на 30 добу після введення стовбурових клітин в тенозовий простір.

За результатами тесту Шиммера оцінка кількості слюзової рідини за допомогою тест-полоски дорівнювала 28 мм. При тонометрії безконтактним способом зазначено показники внутрішньоочного тиску, які дорівнювали 47 мм.рт.ст. При біомікроскопі в фокальному світлі дослідження було неможливе в наслідок опалесценції вологи передньої камери. Флюорисциновий тест Зейделя був негативним. При УЗД відзначався переорбітальний набряк, внутрішня ексудація та диструкція скловидного тіла, що візуалізувалось ехогенним світінням (рис.3.100). На рисунку 3.99, через 30 діб після введення МСК в тенозовий простір, не мало видимих патологічних клінічних ознак, крім білкового преципітату в передній камері око. При застосуванні тесту Шимера встановлено достатню кількість слюзової рідини, яка дорівнювала 14 мм. Внутрішньоочний тиск дорівнював 19 мм.рт.ст, що відповідало нормі, флюорисциновий тест Зейделя був негативний, при УЗД патологічних особливостей не відмічається (рис.3.101).

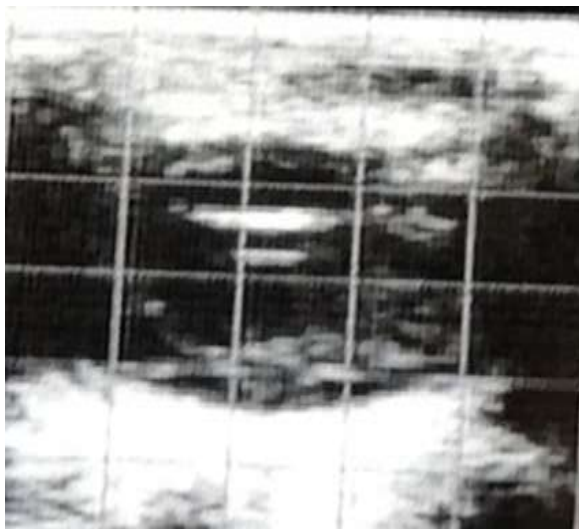


Рис. 3.100. УЗД клінічного випадку увеїту у собаки №4.



Рис. 3.101. УЗД на 30 добу після введення стовбурових клітин в тенозовий простір, собака №4 .

На період встановлення патології ока, як видно з табл. 8 за загальними критеріями оцінювання, для всіх пацієнтів, за сумою показників при клінічному обстеженні і встановленні діагнозу, ступінь ушкодження очей істотно не відрізняється. На 7добу після введення МСК не залежно від шляху введення, істотних змін не відбулося у всіх чотирьох пацієнтів, але видно що припинились процеси інфільтрації, проліферації та ексудації, зменшилась гіперемія, що вплинуло на зменшення гіфеми і вказує на припинення гострого запального процесу і вплив МСК на цей процес (рис.3.83, рис.3.87, рис.3.91, рис.3.95), і значними змінами про це свідчить сонографічна картина обстеження кожного пацієнта, де видно зменшення гіперехогенного світіння, особливо на рис.3.85, рис.3.93, рис.3.97, що вказує про кращу ефективність впливу на процес при введенні МСК в тенозовий простір, інтраветріально і в передню камеру ока, тобто безпосередньо в зону запального процесу.

Вже на 14 добу після введення МСК при прямій офтальмоскопії, дослідженнями щілинною лампою і підтвердженнями сонографічним зображенням у табл. 8, показники всіх критеріїв оцінювання значно знизили свої показники і підтверджує що в трьох випадках з чотирьох зупинився запальний процес, майже без затримки працюють пальпебральний, корнеальний та зіничний рефлекси, є незначна опалесценція вологи передньої

камери очей, значне зменшення гіфеми і відсутність гіпопіону але як наслідок його присутності вільні преципітати в центральній зоні, що являються наслідком руйнування білкових структур. Значно зменшилось світіння ехогенних структур, що вказують на зменшення внутрішньої ексудації та зменшення товщини судинної оболонки. І майже без суттєвих змін у пацієнта №2 при субкон'юнктивальному введенні, що вказує на не значну ефективність дії МСК при даній патології рис.3.87, рис.3.89.

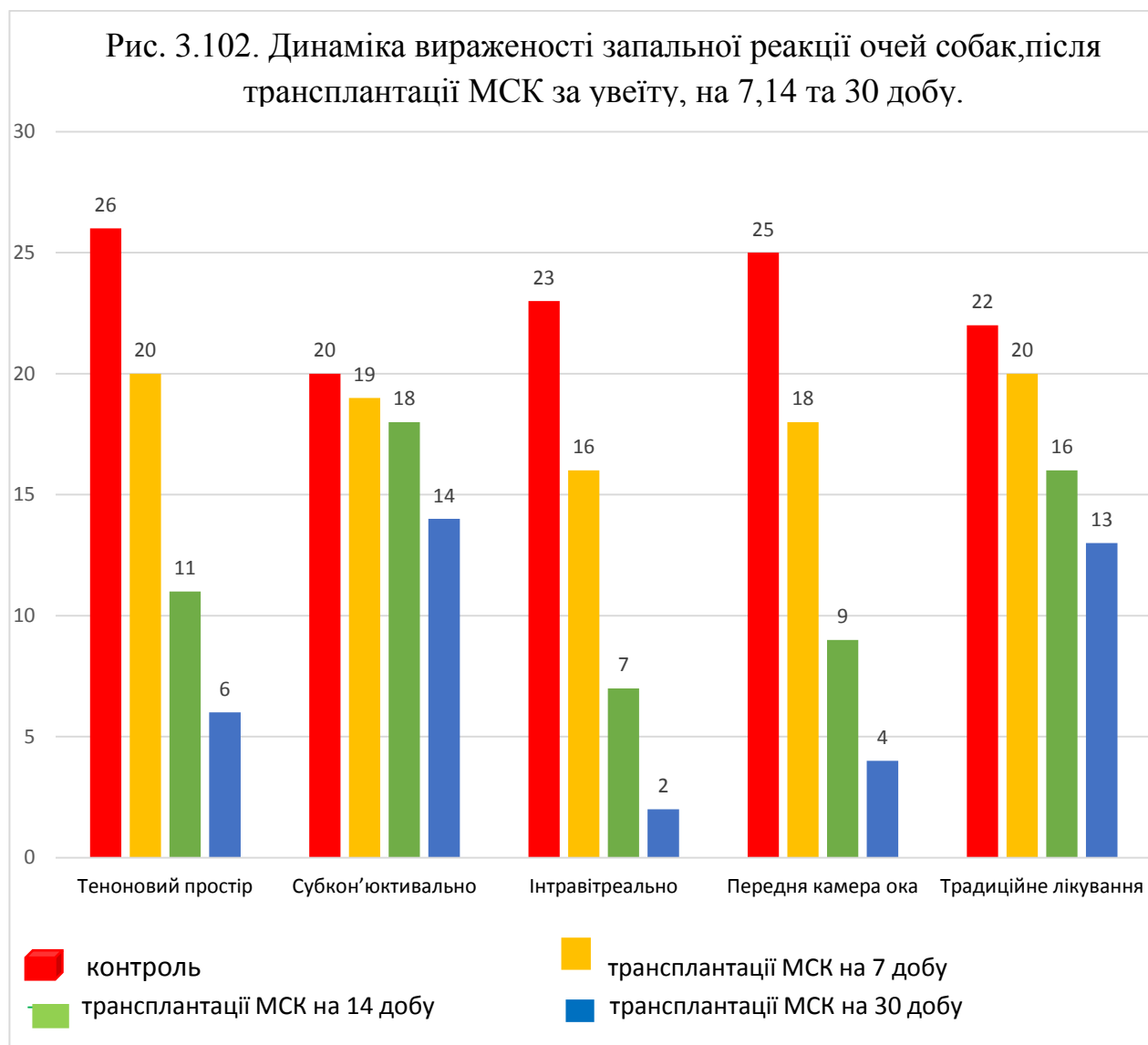
На 30 добу експериментального дослідження чітко видно з табл.8, що ефективність застосування МСК чітко виражена при даній патології ока, прозорість передньої камери ока відновилаь у трьох пацієнтів, кон'юнктива без набряку та запальної інфільтрації, хемоз відсутній у всіх пацієнтів, кут передньої камери ока вільний, чітко видно райдужну оболонку. У пацієнта №1 (рис.3.83) видно незначні пітехії по зоні лімбу та краю рогівки, що вказують на залишки гіфеми та відірваного помутнівшого хрусталика внаслідок агресивного запального процесу і підвищеного внутрішньоочного тиску в період запальної реакції (рис.3. 95.) і майже без значних змін пацієнт №2, який має найбільшу суму за критеріями оцінювання. І як видно з рис.3.87 має значну опалесценцію вологи передньої камери, без зміни всі показники, які вказують на продовження запальної реакції в тканинах ока, що і підтверджується сонографічними дослідженнями де видно внутрішню ексудацію, помутніння склистого тіла і потовщення судинної оболонки.

З чого і можна встановити не високу ефективність введення МСК субкон'юнктивально, що не являється епіцентром запального процесу при тотальному увеїті. І значний вплив на запальний процес при введенні МСК де вірогідне зниження запальної реакції : інтравітреально – у 11,5 , в передню камеру ока– 6,2 та в теноновий простір – 4,3 раза (табл. 3. 8, собака № 1, №3, №4), в порівнянні з традиційним методом лікування, де зниження було у 1,6 раза за спонтанних випадків увеїту у собак. Дані показники свідчать про високу ефективність алогенних мезенхімальних стовбурових клітин за різних методик введення їх та з різною порівняльною характеристикою репаративних процесів.

Порівняльна оцінка вираженості запальної реакції очей собак, залежно від методу трансплантації МСК, за увеїту, на 7, 14 та 30 добу ($M \pm m; n=4$)

Періоди оцінювання	Методи трансплантації МСК за увеїту				
	Теноновий простір	Субкон'юктивально	Інтравітреально	Передня камера ока	Трад. лікування
Вихідний стан	26±0,5	20±0,4	23±0,3	25±0,4	22±0,5
7 доба	20±0,4	19±0,9	16±0,6*	18±0,6	20±0,9
14 доба	11±0,1*	18±0,9	7±0,1**	9±0,08**	16±0,7*
30 доба	6±0,5**	14±0,6*	2±0,7***	4±0,08*	13±0,4*

Примітка: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$; вірогідні дані порівняно з їх значеннями у тварин вихідного стану



Шляхи введення хоч і вимагають певних клінічних умов і являються більш інвазивними і травматичними, але як видно з досліджень являються дуже

ефективними при даних патологіях, що допомагає не тільки швидкому закінченню процесу і репарації тканин ока а й відновленню основної функції органу зору та його важливих рефлексів, які відіграють важливу роль в функціонуванні ока.

Мікробна контамінація значно поглиблює наслідки пошкодження тканин і структур ока, які призводять до ацидозу тканин, що змінює мікроциркуляцію та вихід і руйнування клітинних мембран і затягування фази запалення а саме вона визначає перебіг та результати репаративного процесу, тому можна говорити не тільки про відновлювальну функцію ушкоджених тканинних структур ока за допомогою МСК але й вплив на інтенсивність запального процесу, що значно зменшує терміни репарації тканин ока на рівні клітин і тканин, про що свідчить динаміка зниження запальної реакції очей вже на 30 добу в порівнянні з традиційним методом лікування увеїту у собак, яка була значно нижчою за введення в епіцентр запального процесу але краща за введення МСК субкон'юнктивально (рис.3.102).

Таблиця 3. 9

Вміст імуноглобулінів в сироватці крові за увеїту кролів до та після введення МСК мкмоль/л ($M \pm m; n=9$)

Групи тварин	Ig A	Ig M	Ig G
Інтактні тварини (контроль)	2,43±0,35	0,45±0,06	31,2±7,58
Кролі з увеїтом (вихідний стан)	2,87±0,39	0,52±0,05	34,2±4,20
Введення в теноновий простір	2,38±0,20	0,48±0,09	30,4±0,43
Введення субкон'юнктивально	2,44±0,59	0,51±0,43	31,4 ±5,90
Введення інтравітреально	2,63±0,27	0,49±0,53	32,1±0,41
Введення впередню камеру	2,81±0,29	0,47±0,56	33,1±0,48
Традиційний метод лікування	2,82±0,29	0,54±0,02	32,2±4,14

Примітка: вірогідні дані порівняно з їх значеннями у тварин вихідного стану.

Для визначення рівня імуноглобулінів (IgA, IgM, IgG) у експериментальних тварин використовували аналізатор Alisei QS (виробник Radim, Італія), який за методом ферментної хемілюмінесценції забезпечує високу точність показників у сироватці крові тварин.

Незначне підвищення рівню імуноглобулінів у експериментальних тварин за увеїту/кератиту в порівнянні їх з інтактними тваринами у яких спостерігалась запальна реакція в тканинах ока (табл.3.9). Зробивши дослідження сироватки крові було відзначено, що за рахунок особливості імунологічного захисту ока, це – наявність гематофтальмічного бар'єру між судинами і вологою передньої камери ока, та склоподібним тілом, значної зміни в показниках імуноглобулінів A(IgA), G(IgG), між досліджуваними групами істотних змін не відзначено і запальний процес в оці на весь організм вцілому майже не реагує але присутня відповідь на гостру фазу запальної реакції в оці, де процес втягує тканини які межують з очним яблуком де іде збільшення імуноглобулінів M(IgM).

За результатами імунологічних досліджень в різних фазах запального процесу в оці проводили імунологічний контроль на виявлення титру антитіл на вміст імуноглобулінів трьох класів A(IgA), M(IgM), G(IgG) у сироватці крові дослідних тварин, де не відмічались зміни зниження чи підвищення рівня імуноглобулінів до та після введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в тканини ока, що підтверджує відсутність будь-яких алергічних проявів та реакцій на введення культури клітин.

3.2. Висновки до розділу 3

В дослідженнях з вивчення ефективності впливу трансплантованих алогенних мезенхімних стовбурових клітин на активність репаративних процесів в оці кролів за експериментального увеїту/кератиту а також в дослідях на собаках за спонтанного характеру доведено та науково обґрунтовано ефективність застосування алогенних мезенхімних стовбурових клітин.

Зокрема, результати проведених нами досліджень з використанням морфологічних досліджень, імунологічних, клінічних ока свідчить, що

застосування МСК за експериментального увеїту/кератиту достовірно прискорює відновлення структури ока тварини. Причому, активність відновлювання функціональної здатності ока за увеїту та кератиту з використанням різних методів введення МСК вища порівняно з традиційним методом лікування.

Найбільш ефективним способом відновлення тканин ока за увеїту та кератиту виявився спосіб введення МСК в тенонвй прості, передню камеру ока та інтравітреально.

Клінічне випробування ефективності досліджуваного методу клітинної терапії з використанням алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на собаках за увеїту та кератиту спонтанного походження підтвердив результати експериментальних досліджень на лабораторних тваринах (кролях).

Основні наукові результати розділу опубліковано в наукових працях автора [12, 13, 14, 15, 16, 17–23].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ ОДЕРЖАНИХ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Актуальність проблеми хвороб очей у тварин полягає, з одного боку, суттєвим поширенням хвороби серед домашніх тварин та, з іншого боку, обмеженістю засобів та способів лікування хворих тварин. Зокрема, хвороби тварин із патологією ока становлять левову частку серед офтальмологічних хвороб, які часто призводять до погіршення зору [81, 82, 84].

За останні 6 років (з 2015 по 2021 роки) захворюваність тварин на увеїт/кератит в Україні значно зросла, порівняно з іншими роками [29]. За висновками окремих вчених тенденція зростання захворюваності очей у тварин різної етіології зберігатиметься і в подальшому [155, 162, 205], що підкреслює високу актуальність наших досліджень.

Оскільки основним патогенетичним фактором в розвитку увеїту/кератиту є зниження функціональної активності зору, то лікування в основному спрямоване на забезпечення зниження запальної реакції та внутрішньоочного тиску, відновлення акомодатції ока, обмін рідинами між камерами ока. Проте використання в замісній терапії лише медикаментозного лікування, лише частково поліпшує ситуацію, оскільки має передбачувати не тільки усунення причини, що викликала зниження функціональної здатності ока і, відповідно, її структури, а й має бути спрямована на повне відновлення функції і, відповідно, структури органу. За рахунок офтальмологічного бар'єру ока майже всі фармакологічні препарати, які знижують запальну реакцію в тканинах не проникають в тканини ока, тим самим є малоефективні.

Важливо приділяти увагу хворим тваринам в питаннях вибору лікарських засобів та кормів, які часто можуть мати антиагоністичний ефект і тим самим погіршити перебіг захворювання.

Застосування стовбурових клітин для відновлення ушкоджених чи патологічно змінених тканин у тварин стало звичним явищем в багатьох ветеринарних клініках США, Іспанії, Китаю, Австралії [195, 197, 201, 203].

Разом з тим можливості клінічного застосування стовбурових клітин та продуктів клітинних технологій ще далеко не вичерпані. За висновками Міжнародної асоціації стемологів застосування методів клітинної регенеративної терапії людини знаходиться ще в стадії випробувань [188]. У ветеринарній медицині стан ще гірший, незважаючи на те, що підходи до застосування трансплантації стовбурових клітин тваринам набагато простіші, ніж у гуманній медицині [59, 60, 61].

Як відомо, застосування стовбурових клітин для відновлення у тваринному організмі ушкоджених чи патологічно змінених тканин базується на їх здатності після трансплантації виявляти місця з порушенням клітинного гомеостазу тканин (органів), вбудовуватись в ушкоджені ділянки і там під впливом відповідних біологічно активних речовин заповнювати дефект, диференціюючись у відповідні клітини, властиві для даної тканини чи органу [55, 56].

До того, стовбурові клітини мають здатність пригнічувати активність лімфоцитів в організмі тварини-реципієнта [56, 59] і тим самим знижувати можливість розвитку його імунної відповіді на трансплантований клітинний матеріал. Використання у ветеринарній медицині донорських (алогенних) стовбурових клітин, отриманих від здорових тварин-донорів, на відміну від застосування аутогенних клітин, дає можливість на порядок знизити вартість лікування тварин [60, 61].

В наших дослідженнях, проведених з використанням тварин із увеїтом та кератитом, ми застосовували алогенні стовбурові клітини, отримані із кісткового мозку здорових тварин-донорів. Досліджено активність та особливості відновлювальних процесів у патологічно зміненій тканині ока тварин залежно від способу введення їм алогенних мезенхімних стовбурових клітин.

Моделювання експериментального увеїту/кератиту у піддослідних кролів шляхом опромінення (опік) УФ лампою ДРТ- 240 довгохвильовими променями UVA та інсталяцією патогенного штаму *Staphylococcus aureus* 105 КУО в 1 мл.

на пошкоджене око, переконливо показало, що цей метод дає можливість отримувати класичну модель увеїту/кератиту з чітким клінічними ознаками (блефароспазм, слъозотеча, міоз, запалення тканин передньої камери ока, райдужної оболонки та целюлярного тіла, пошкодження рогівки) та відповідними структурними змінами в щитоподібній залозі [38, 120].

Тваринам з експериментальним увеїтом/кератитом обрано різні методи відновлення функціональної здатності ушкоджених тканин ока. Було проведено чотири серії досліджень. Перша серія досліджень тварини із експериментальним увеїтом, яких розподілили на сім дослідних груп. Тваринам першої групи застосовували одноразове введення 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в тенозовий простір; тваринам другої дослідної групи проводили одноразове введення 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в субкон'юнктивальний простір; тваринам третьої дослідної групи проводили одноразове введення 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин інтравітреально; тваринам четвертої дослідної групи вводили одноразово 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в передню камеру ока; п'ята дослідна група – традиційне лікування (щоденне закапування генталайн 0,4%, і ципронорм 4–6 разів на добу); Крім того, в дослідях від початку і до закінчення знаходилась також шоста група кролів – інтактні тварини (група порівняння, загальна група) та нульова контрольна група (загальна група), де застосовували закапування ізотонічного розчину 4–6 разів на добу.

Друга серія досліджень тварини із експериментальним кератитом, яких розподілили на шість дослідних груп. Тваринам першої дослідної групи застосовували техніку пошарової трансплантації амніотичної оболонки; тваринам другої дослідної групи застосовували техніку біологічного покриття амніотичної оболонки; тваринам третьої дослідної групи застосовували екстракт амніотичної оболонки з очною лінзою; тваринам четвертої дослідної групи традиційне лікування (щоденне закапування генталайн 0,4%, і ципронорм 4–6 разів на добу) – загальна група; тваринам п'ятої дослідної групи

інтактні тварини (група порівняння, загальна група) та нульова контрольна група (загальна група), де застосовували закапування ізотонічного розчину 4–6 разів на добу.

Третя та четверта серія досліджень проводилась на клінічних випадках в собак, яка характеризувалася виявлення ефективності відновлення функціональної здатності ока за допомогою трансплантованих алогенних мезенхімальних стовбурових клітин за увеїту та алогенної амніотичної оболонки за кератиту.

Такий методичний підхід дав нам можливість встановити одночасно в одних і тих же умовах ефективність різних способів відновлення структури і, відповідно, функції ока після трансплантації їм мезенхімних стовбурових клітин; порівняти ефективність цього методу клітинної терапії із традиційним методом (щоденне закапування генталайн 0,4%, і ципронорм 4–6 разів на добу). Як відомо, традиційний метод спрямований лише на забезпечення часткового поліпшення ситуації, оскільки має передбачувати не тільки усунення причини, що викликала зниження функціональної здатності ока і, відповідно, її структури, а й має бути спрямована на повне відновлення функції і, відповідно, структури органу а стероїдні і не стероїдні препарати при пошкоджених тканинах ще значно збільшують ризик виразок та кератомалачії рогівки.

А наявність інтактних тварин в досліді дало можливість онлайн порівнювати отримані в експерименті результати з показниками клінічно здорових тварин, які утримувались в однакових із тваринами дослідних груп умовах.

Основними показниками для контролю активності відновлення функціональної здатності ушкодженої тканини ока було обрано (тест Шиммера, біомікроскопія щілинною лампою, флюорисциновий тест Зейделя, тонометрія, сонографія, зміна кольору райдужки, відповідна її реакція на світло та акомодация ока), а також особливості макроскопічних і мікроскопічних змін в самому оці.

Порівняння динаміки всіх досліджуваних показників показало, що найвищий вірогідний ефект у відновленні структури і функції експериментально ушкодженого ока отримано після застосування алогенних мезенхімних клітин методом введення в тенозовий простір та передню камеру окаю.

Це підтверджується вірогідним зменшенням проти відповідних показників у тварин контрольної групи на 30 добу за введення в тенозовий простір: внутрішньої ексудації у 6,5 раз, тонометрія – 17,7 раз, васкуляризація 12,3 раз, слъозотеча (Тест Шиммера) – в 19,8 раз, та введення в передню камера ока: внутрішня ексудація 7,3 раз, тонометрія 13,7 раз, васкуляризація 9,2 раз слъозотеча (Тест Шиммера) – 14,2 раз.

Результати гістологічних досліджень узгоджуються із результатами клінічних показників. Так, на 30 добу після введення МСК в тенозовий простір та передню камеру ока її мікроскопічна будова не відрізнялась від такої у інтактних тварин, за винятком субепітеліальних рубців в місцях найглибших ушкоджень.

Таким чином, за результатами проведених нами гістологічних досліджень ока встановлено, що у тварин першої і четвертої дослідної групи (кролів за увеїту), яким алогенні мезенхімні стовбурові клітини вводили безпосередньо у тенозовий простір і передню камеру ока, процеси відновлення структурного та функціонального стану ока прискорюються значно активніше, ніж в інших групах.

Введення алогенних мезенхімних стовбурових інтравітреально та субкон'єктивально показало нижчі результати. Проте ці результати були вірогідно вищими проти відповідних показників у тварин контрольної групи та групи тварин з традиційним лікуванням, що є свідченням високої ефективності лікування експериментального увеїту/кератиту методом клітинної регенеративної терапії з використанням недиференційованих алогенних мезенхімних стовбурових клітин із кісткового мозку.

Результати експериментальних досліджень ми випробовували в умовах клініки на собаках зі спонтанним увеїтом/кератитом. Як відомо, хвороби супроводжуються значним запальним процесом, що призводить до підвищення внутрішньоочного тиску, у деяких випадках гіфема та гіпопіон, внаслідок чого відбувається опалесценція вологи передньої камери ока та міозу зіниці, недостатністю кровопостачання, хемозом кон'юнктиви, епіфорою, а за кератиту ще відбувається пошкодження поверхневого епітелію рогівки, внаслідок чого гальмується інтенсивність обміну рідинами між камерами ока, супроводжується неоваскуляризацією та оклюзією судин, а за важких форм його перебігу може призвести до незворотних змін в тканинах ока та втратою зору.

З цією метою хворим тваринам після встановлення діагнозу вводили мезенхімальні стовбурові клітини в тенозовий простір, субкон'юнктивально, інтравітреально та передню камеру ока за увеїту $1,5 \times 10^6$ заздалегідь вирощених в стерильних умовах клітини. Також проводили трансплантацію омніотичної оболонки технікою пошарової трансплантації, біологічного покриття та застосування екстракту з амніотичної оболонки в формі гелю за допомогою лінзи під третю повіку ока за кератиту різної етіології.

На 7, 14, 30 добу у тварин проводили клінічні обстеження. Результати досліджень показали високу відновлювальну здатність структури і функції ока за введення МСК, на що вказує динаміка зниження запального процесу, швидка епітелізація поверхневих шарів рогівки та відновлення всіх морфологічних показників та функцій ока, який на 30 добу після введення хворим собакам МСК безпосередньо в тенозовий простір у 4,3 раза, передню камеру у 6,2 раза та інтравітреально у 11,5 раза достовірно знижена запальна реакція очей проти цього показника у вихідному стані. Субкон'юнктивально та традиційний метод мав зменшення запальної реакції в 1,4 та 1,6 раза у порівнянні до вихідного стану.

Запальна реакція очей на 30 добу після трансплантації амніотичної оболонки різними техніками (біологічного покриття у 22 раза, пошарова

трансплантація 5,8 раза) та екстракту амніотичної оболонки у формі гелю за спонтанного кератиту різної етіології у собак та епітелізація поверхневого шару рогівки у 15 разів достовірно змешувалась у порівнянні до вихідного стану.

Таким чином, встановлено, що трансплантація алогенних мезенхімних стовбурових клітин, призводить на 30 добу досліджень до відновлювальних репаративних процесів та морфофункціональних властивостей у оці тварин, як за експериментального так і спонтанного кератиту/увеїту.

ВИСНОВКИ

Дисертацію присвячено розв'язанню актуального науково-практичного завдання – дослідженню структурно-функціональних змін у тканинах ока за експериментального кератиту та увеїту, впливу трансплантованих алогенних мезенхімальних стовбурових клітин та їх продуктів на активність регенеративних процесів у тканинах ока та відновлення його функції. Наведено наукове обґрунтування ефективності застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин та амніотичної оболонки для стимуляції регенеративних процесів у тканинах ока, переваг цього методу, порівнюючи із традиційним способом лікування. Результати експериментальних досліджень підтверджено доклінічними випробуваннями.

1. Морфологічні зміни в тканинах ока лабораторних тварин за експериментального кератиту/увеїту є типовими для запального процесу, його стадійності (альтерація, судинна реакція, проліферація), що підтверджується результатами гістологічних досліджень. Застосування комплексу діагностичних досліджень, які поєднують клінічний огляд, інструментальні методи (тест Шиммера, біомікроскопію щілинну лампу, офтальмоскопію, флюоресцеїновий тест Зейделя, тонометрію, сонографію) дають змогу з великою достовірністю визначати характер морфофункціональних змін у тканинах ока.

2. Після трансплантації алогенних мезенхімальних стовбурових клітин за увеїту вже на 7 добу відновлюється кровопостачання до судинної оболонки, стабілізуються процеси обміну рідинами між камерами ока та увеального тракту, що відновлює функцію акомодатії та всіх рефлексів, зникають явища неоваскуляризації рогівки та міозу зіниці ока та відновлюється типовий рисунок райдужної оболонки.

3. За впливу трансплантованих алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у 94 % дослідних тварин патологічний процес у тканинах ока за експериментального кератиту/увеїту вже через 30 діб завершувався повним відновленням функціональної здатності ока, про що свідчать показники інструментальної діагностики та гістологічних досліджень.

4. Активність регенеративних процесів у тканинах ока кроля за експериментального кератиту/увеїту залежить від способу застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин: найвища активність регенеративних процесів за переднього увеїту спостерігається після введення мезенхімальних стовбурових клітин у передню камеру ока та в теноновий простір, безпосередньо в епіцентр запального процесу. Вона нижча за введення інтравітреально та субкон'юнктивально, про що свідчать показники сонографічних методів дослідження, щільної світлової біомікроскопії і тонометрії, а також це підтверджено гістологічно.

5. Внаслідок порівняння ефективності методів застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин та амніотичної оболонки з традиційними методами лікування для відновлення структури і функції патологічно змінених тканин ока за експериментального та спонтанного кератиту/увеїту у лабораторних тварин і собак виявлено суттєві переваги методів з використанням алогенних мезенхімальних стовбурових клітин та амніотичної оболонки.

6. За результатами імунологічних досліджень доведено, що трансплантація алогенних МСК і АО не викликало з боку організму тварин-реципієнтів імунної відповіді впродовж всього періоду досліджень, на що вказують результати досліджень вмісту імуноглобулінів трьох класів A(IgA), M(IgM), G ((IgG) у сироватці крові дослідних тварин та відсутність будь-яких алергічних реакцій.

7. Випробування методів відновлення функціонального стану ока за експериментального кератиту/увеїту в клініці з використанням собак із кератитами, увеїтами та іншими хронічними патологічними процесами очей показали високу лікувально-відновлюючу ефективність алогенних мезенхімальних стовбурових клітин та амніотичної оболонки, порівнюючи із традиційним методом лікування цих хвороб очей.

8. Встановлено високу ефективність застосування алогенної АО та екстракту гомогенізованої АО у формі гелю для стимуляції регенеративних процесів в ушкоджених поверхневих шарах рогівки ока у кролів і собак за

кератиту: повна епітелізація поверхні ушкодженої рогівки завершується вже на 30 добу.

9. Використаний в дослідженнях, розроблений автором оригінальний метод моделювання гострої форми кератиту та увеїту у кролів з типовими для цих патологічних процесів проявами дозволив отримати об'єктивні показники перебігу патологічних процесів в тканинах ока та динаміки стимулюючого впливу на них засобами клітинної регенеративної терапії.

ПРОПОЗИЦІЇ ВИРОБНИЦТВУ

1. Результати проведених досліджень можуть бути використані у науковій та навчальній роботі профільних установ ветеринарної медицини для подальшого вивчення молекулярних механізмів взаємодії алогенних та ксеногенних мезенхімальних стовбурових клітин з організмом тварин-реципієнтів, а також у клінічній практиці як один із додаткових методів лікування тварин за різних патологічних станів ока. Отримані дані можна використовувати для лікування та аналізу процесів регенерації тканин ока.

2. За результатами досліджень науково-експериментальної роботи відпрацьовано нові способи моделювання патологій ока у кролів і способи активізації відновлювальних процесів з відновленням структури ушкодженого ока у тварин алогенними мезенхімальними стовбуровими клітинами, які підтверджені двома патентами на корисну модель:

– «Спосіб застосування мезенхімальних стовбурових клітин для репаративних процесів ока у собак та котів за різного перебігу увеїту» (патент на корисну модель u 2019, № 141623 від 27/00, 27.04.2020).

– «Спосіб відновлення рогівки ока у собак та котів за ерозій, виразок та хімічних опіків, за допомогою амніотичної оболонки плода» (патент на корисну модель u 2019, № 139673 від 1/00, 10.01.2020).

3. Отримані результати пропонується використовувати у процесі написання відповідних розділів підручників і навчальних посібників за напрямом експериментальної регенеративної терапії у ветеринарній медицині.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Абрамович О. О., Заячківська О. С. Особливості структури ока за увеїту та кератиту. Вісник проблем біології і медицини. 2017. Вип. 2, Т. 1 (87). С. 42–45.
2. Алив Г. Ф., Соболев В. И. Использование консервированной амниотической оболочки тварин в реконструктивно-восстановительной хирургии глаза. Вісник проблем біології і медицини. 2010. № 3. С. 18–26.
3. Андрейчин Ю. М., Хлебач О. В. Синдроми та симптоми людей і тварин за увертів та кератитів. Медична та клінічна хімія. 2000. Т. 15, № 2. С. 21 – 37.
4. Аристархов В. Г., Кириллов Ю. Б., Пантелеев И. В. Профилактика послеоперационного увеїта при хирургическом лечении і терапії. Хирургия. 2019. № 8. С. 19–21.
5. Асляев Л. А. Морфологические изменения трансплантатов тканей ока при различных способах ее пересадки. III Всесоюз. конф. по пересадке тканей и органов : тез. докл. Ереван, 1994. С. 37.
6. Ашукіна Н. О. Морфологія ока щурів в умовах екзогенного стану. Український морфологічний альманах. 2012. Т. 8, № 2. С. 7 – 10.
7. Бирюкова И. В. Применение амниотической мембраны в офтальмохирургии. Путь науки. 2014. № 8 (8). С. 39 – 42.
8. Бирюкова Е. В. Использование консервированной амниотической мембраны для реконструкции поверхности переднего отрезка глаза. Фарматека. 2013. № s1-12. С. 32 – 39.
9. Білець М. В. Зміна структури структури ока за різних синдромів за увеїту та кератиту. Світ медицини та біології. 2007. №2. С. 14 – 19.
10. Білоокий В. В., Ткачук Н. П., Шеремет М. І. Аналіз оперативних втручань при патології ока в тварин. Ветеринарний вісник. 2014 Т. 19, № 3 (71). С. 172 – 174.

11. Білоокий В. В., Ткачук Н. П., Шеремет М. І. Аналіз патологічних станів різної етіології в оці тварин. Буковинський медичний вісник. – 2004. – Т. 18, № 3 (71). – С. 162 – 170.
12. Шупик О. В., Мазуркевич А. Й., Бокотько Р. Р., Савчук Т. Л., Данілов В. Б., Кладницька Л. В., Харкевич Ю. О. Ефективність застосування мезенхімальних стовбурових клітин за увеїту в собак, в залежності від способу їх введення. Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. 2021. Вип. 2. № 1. С. 222–233.
13. Шупик О. В., Мазуркевич А. Й., Бокотько Р. Р., Дудус Т. В. Ефективність застосування різних технік трансплантації амніотичної оболонки за дегенеративних процесів рогівки. Теорія і практика у ветеринарній медицині. 2020. Вип. 8. № 3. С. 219–225.
14. Шупик О. В., Мазуркевич А. Й., Бокотько Р. Р., Моделювання експериментального бактеріального кератиту та увеїту Теорія і практика у ветеринарній медицині. 2020. Вип. 8. № 4. С. 276–282
15. Шупик О. В., Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Бокотько Р. Р., Данілов В. Б. Морфофункціональні зміни в тканинах рогівки ока тварин за наявності дегенеративних процесів та їх корекція за допомогою стовбурових клітин, які містяться в амніотичній мембрані. Вісник сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». 2018. Випуск 11. № 43. С. 40–45.
16. Немтінов П. В., Устименко А. О., Лобинцева Т. А., Панченко Л. В., Шупик О. В., Соколов М. В., Солютін Р. В., Паляниця С. І. Оптимізація критеріїв відбору зразків кордової крові для проведення алогенних трансплантацій у реципієнтів різних вікових груп. Клітинна та органна трансплантологія. 2020. Вип. 8. № 2. С. 348-358.
17. Шупик О. В., Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Бокотько Р. Р., Савчук Т. Л. The effectiveness of amniotic membrane depending on the cause of

corneal damage in dogs. Український часопис ветеринарних наук. 2020. Вип. 9. № 2. С. 232-300.

18. Шупик О. В., Мазуркевич А. Й., Харкевич Ю. О., Бокотько Р. Р., Пасніченко О. С., Данілов В. Б. Патент України на корисну модель № 139673 МПК А61D1/00 (2020.01). Спосіб відновлення рогівки ока у собак та котів за ерозій, виразок, та хімічних опіків, за допомогою амніотичної оболонки плода; заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. № u 201907514; заявлено 05.07.2019; опубліковано 10.01.2020. Бюл. № 1.

19. Шупик О. В., Мазуркевич А. Й., Харкевич Ю. О., Бокотько Р. Р., Пасніченко О. С., Данілов В. Б. Патент України на корисну модель № 141623 МПК А61K35/545 (2020.01). Спосіб застосування мезенхімальних стовбурових клітин для репаративних процесів ока у собак та котів за різного перебігу увеїту; заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. № u 201908123; заявлено 15.07.2019; опубліковано 27.04.2020. Бюл. № 8.

20. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Харкевич Ю. О., Ковпак В. В., Бокотько Р. Р., Кладницька Л. В., Савчук Т. Л., Данілов В. Б., Бруско Є. П., Шупик О. В. Використання стовбурових клітин та продуктів клітинних технологій для лікування коней із ламінітом: [науково-методичні рекомендації]. К., 2020. 32 с.

21. Nemtinov P., Ustyomenko A., Lobyntseva G., Panchenko L., Shupyk O., Sokolov M., Salyutin R., Palianytsia S. Optimization of the selection criteria for cord blood units for transplantation in recipients of the different age groups. Cell and Organ Transplantology. 2020; 8(2):in press. DOI: 10.22494/cot.v8i2.114. Посилання на сайт: <http://transplantology.org/2020-8-2-en/article-06/>.

22. Шупик О. В., Мазуркевич А. Й., Данілов В. Б. Ефективність застосування різних методик трансплантації амніотичної оболонки. Досягнення та перспективи застосування гумінових речовин у сільському господарстві: Міжнародна науково-практична конференція, присвячена 95-

річчю Дніпровського державного аграрно-економічного університету та 110-річчю від дня народження професора Л. А. Христевої, м. Дніпро, 19–20 жовтня 2018 року: тези доповіді. 2018. С. 29–31.

23. Шупик О. В., Мазуркевич А. Й., Данілов В. Б.. Мікроскопічні зміни ока після введення мезенхімних стовбурових клітин за експериментального увеїту в кролів. Актуальні проблеми фізіології тварин: Міжнародна науково-практична конференція, присвяченій 122-річчю Національного університету біоресурсів і природо-користування України, м. Київ, 3–5 травня 2018 року: тези доповіді. 2018. С. 13. Бортников Н. Г., Ємельяненко І. В.

24. Вплив різних препаратів за лікування кератиту та увеїту. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 1994. № 1. С. 24 – 85.

25. Брейдо И. С. Хирургическое лечение заболеваний ока у щурів та мишей. С.-Пб: Гиппократ, 1998. 330 с.

26. Васильєва І. М., Попова Л. Д. Вміст антитіл за імунного увеїту. Вісник проблем біології та медицини. 2012. Т. 1, вип. 4. С. 49 – 61.

27. Вернигородський В. С., Фетісова М. В., Вернигородська М. В. Адаптаційний стан після хірургічного увеїту та кератиту. Клінічна ендокринологія та ендокринна хірургія. 2014. № 2. С. 34 – 36.

28. Вернигородський В. С., Яворовенко О. Б., Фетісова Н. М. Проблеми інвалідності та реабілітації хворих на увеїт та кератит тварин. Международный офтальмологический журнал. 2009. № 3(21). С. 27 – 31.

29. Воронич-Семченко Н. М. Біохімічні показники сироватки крові щурів за увеїту та кератиту та в умовах корекції препаратом „Цитокін-100”. Фізіологічний журнал. 2018. Т. 55, № 7. С. 8-14.

30. Гирла Я. В., Жилик Н. В., Музика А. П. Нове в діагностиці функціонального стану ока тварин. Хист. 2016. № 16. С. 343.

31. Гідора С. В. Морфогенетичні аспекти захворювань ока за увеїту та кератиту. Хист. 2014. № 16. С. 175.

32. Гобігун Н. Г. Особливості обміну кальцію, фосфору та магнію при експериментальному увеїті та кератиті у кролів: матеріали XVIII з'їзду

Українського фізіологічного товариства з міжнар. участю, (Одеса, 20-22 трав. 2010 р.). Фізіологічний журнал. 2010. Т. 56, № 2. С. 140 – 141.

33. Горанов В. А. Получение культуры клітин ока из фетального плода кроликов *in vitro* для ксенотрансплантации. Белелорус. мед. журн. 2004. № 4. С. 44–46.

34. Городецкая И. В., Корневская Н. А. Зависимость устойчивости организма к хроническому увеїту та кератиту. Российский физиологический журнал им. И. М. Сеченова. 2011. Т. 97, № 12. С. 1346 – 1354.

35. Городецкая И. В., Корневская Н. А. Устойчивость организма к хроническому увеїту та кератиту. Вестник ВГМУ. 2009. Т. 8, № 3. С. 1 – 15.

36. Гринь В. К., Штутін А. А. Застосування мезенхімних стовбурових клітин в кардіології і травматології. Журнал НАМН України. 2014. Т.7, № 1. С. 67-75.

37. Громова О. А. Магия магния за увеїту та кератиту в тварин. Новая аптека. 2014. № 6. С. 18 – 20.

38. Громова О. А., Калачева А. Г., Торшин И. Ю. Калийсберегающие свойства магния. Кардиология. 2013. № 10. С. 38 – 48.

39. Громова О. А., Торшин И. Ю., Лиманова О. А. Многогранная роль макро - и микроэлементов в построении костной ткани при кератитах. Гинекология. 2013. № 2. С. 50 – 56.

40. Гуранич Т. В., Багрій М. М., Воронич-Семченко Н. М. Вплив комбінованого дефіциту міді на структурно-функціональні особливості гіпоталамо-гіпофізарно-тиреоїдної системи за увертів та кератитів. Вісник проблем біології і медицини. 2014. Т. 1 , № 4. С. 88 – 93.

41. Гусак Є. В., Погорелов М. В., Ткач Г. Ф. Мікроелементний склад довгих та мішаних кісток скелета в нормі та при патології за увертів та кератитів. Український морфологічний альманах. 2010. Т. 8, № 4. С. 51 – 55.

42. Дедух Н. В., Пошелок Д. М., Малышкина С. В. Моделирование и ремоделирование увеїту та кератиту на лабораторних тваринах (обзор

литературы). Український морфологічний альманах. 2014. – Т. 12, № 1. – С. 107 – 111.

43. Децик О. З. Методичні підходи до узагальнення результатів наукових досліджень за увеїту. Галицький лікарський вісник України. 2012. Т. 7, № 2. С. 5 – 8.

44. Дмитриев Л. С., Завидовский Б. И. Особенности индивидуальной чувствительности самцов белых крыс к действию стресса разного генеза за кератиту та увеїту. Хист. 2013. № 15. С. 181.

45. Дранник Г. Н. Клиническая иммунология, эндокринология и алергология тварин за кератитів і увеїтів. под ред. Г. Н. Дранника. Одесса : изд-во. МИА. 2010. С. 606.

46. Емінгуї Н. Г., Ємельяненко І. В. Повна та часткова трансплантація у офтальмології. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2018. № 1. С. 82 – 99.

47. Ємельяненко І. В., Воронич-Семченко Н. М., Тучак О. І., Николишин Л. В., Порівняльний аналіз структурно-функціональних особливостей офтальмологічної системи за умов хірургічної корекції увеїту та кератиту на лабораторних тваринах та в комплексі з альфа-токоферолом. Клінічна та експериментальна патологія. 2013. Т.11, № 3 (Ч. 2). С. 63 – 67.

48. Зінкевич Н. Г., Ємельяненко І. В. Трансплантація в эндокринології. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2013. № 1. С. 78 – 89.

49. Золотухин С. Е., Аусси Г. С., Шевченко Н. Н. Роль гормонов в патогенезе глюкокортикоидного остеопороза и заболеваний пародонта (экспериментальное исследование) за увеїту та кератиту. Український морфологічний альманах. 2010. Т. 7, № 3. С. 110 – 113.

50. Зорин В. Л., Зорина А. И., Петрикова О. С. Офтальмологічна патологія у тварин. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2012. Т. 3, № 8. С. 27–40.

51. Зуб С. Т., Радченко О. М., Пластунов Б. А. Гормональний стан тварини за умов розвитку різних типів загальних неспецифічних адаптаційних

реакцій в експерименті та клініці за увертів та кератитів. Буковинський медичний вісник. 2006. Т. 10, № 2. С. 142 – 144.

52. Імпічко К. А. Особливості кератиту та увеїту у хворих тварин. Клінічна та експериментальна патологія. 2009. Т. VIII, № 3. С. 117 – 120.

53. Касаткіна Є. П. Кератит та увеїт у тварин. Пробл. едокринол. 2001, Т. 47, № 4. С. 3-7.

54. Кащенко С. А., Гончарова М. В. Ультрамикроскопические изменения тканей ока у крыс после иммуносупрессии. Морфология. 2013. Т. 7, № 3. С. 49 – 53.

55. Ковпак В. В. Вплив умов культивування на проліферативну активність мезенхімних стовбурових клітин собак. Ветеринарна біотехнологія. 2009. № 15. С. 170–176.

56. Королева А. А. Влияние терапии на минеральную плотность костной ткани у женщин в постменопаузе за кератиту. Медицинские новости. 2009. № 13. С. 68–70.

57. Косминіна Н. С., Гнатейко О. З., Лук'яненко Н. С. Оцінка функціонального стану гіпофізарно-тиреоїдної системи за кератитів. Буковинський медичний вісник. 2015. Т. 17, № 1. С. 52 – 55.

58. Коцур Н., Міщенко О. Вітаміни: сучасний стан проблеми та заходи подолання за хвороб очей. Педагогіка, психологія та мед.-біол. пробл. фіз. виховання і спорту. 2019. № 6. С. 96 – 99.

59. Кравченко В. І., Постол С. В. Динаміка захворюваності на патологію очей в Україні. Международный эндокринологический журнал. 2019. № 5. С. 27 – 32.

60. Кубарко А. И., Yamashita S. Увеїтитта кератити. Фундаментальные аспекты ока у тварин. / под. ред. А. И. Кубарко. Минск–Нагасаки, 2008. С. 153–178.

61. Кухарчук О. Л., Радченко В. В., Сірман В. М. Досягнення, проблеми і перспективи розвитку регенераційної медицини у офтальмології Медицина залізничного транспорту України. 2018. № 7. С. 87–99.

62. Кухарчук О. Л., Радченко В. В., Сірман В. М. Стволовые клетки: эксперимент, теория, клиника. Эмбриональные, мезенхимальные, нейральные и гемопоэтические стволовые клетки. Черновцы: Золоті литаври, 2004. 505 с.

63. Лебединець Н. В., Парубоча О. М. Сучасні аспекти динаміки офтальмологічної патології у собак та котів. Довкілля та здоров'я. 2012. № 3. С. 21 – 25.

64. Лемешко Б. О., Рогожников А. В. Нормальности погрешностей измерений в классических экспериментах и мощности критериев, применяемых для проверки отклонения от нормального закона. Метрология. 2012. № 5. С. 3-26.

65. Лупашко М. О. Стан захворюваності очей на теренах Чернівецької області. Хист. 2014. № 16. С. 88.

66. Магнев Г. Ф., Соболев В. И. Роль препаратів в процессе болезней офтальмологічних патологий в белах крыс. Вісник проблем біології і медицини. 1997. № 3. С. 17 – 22.

67. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Ковпак В. В., Сушко М. І. Бокотько Р. Р. Вплив різних методів трипсинізації на проліферативну активність ембріональних клітин. Науковий вісник Національного аграрного університету. 2008. Вип. 127. С. 197–205.

68. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Ткаченко С. М., Ковпак В. В. Бокотько Р. Р. Патент України на корисну модель № 40805, МПК (2009) А61К 35/28. Спосіб прижиттєвого отримання стромальних стовбурових клітин кісткового мозку тварин. Заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. № u 2008 13659. Заявл. 26.11.2008. Опубл. 27.04.2009. Бюл. № 8.

69. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Ковпак В. В., Бокотько Р. Р. Патент України на корисну модель № 46600. МПК (2009) А61К 35/28. Спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку кролів із високою проліферативною активністю. Заявник і патентовласник Національний

університет біоресурсів і природокористування України. № у 2009 07829. Заявл. 24.07.2009. Опубл. 25.12.2009. Бюл. № 24.

70. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Ковпак В. В. Бокотько Р. Р. Патент України на корисну модель № 47783, МПК (2009) А61К 35/28. Спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку котів із високою проліферативною активністю. Заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. № у 2009 08607. Заявл. 14.08.2009. Опубл. 25.02.2010. Бюл. № 4.

71. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Ковпак В. В. Бокотько Р. Р. Патент України на корисну модель № 50905, МПК (2009) А61К 35/28. Спосіб отримання фракції моноклеарних клітин кісткового мозку собак із високою проліферативною активністю. Заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. № у 2009 13880. Заявл. 29.12.2009. Опубл. 25.06.2010. Бюл. № 12.

72. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Ковпак В. В., Бокотько Р. Р., Данілов В. Б., Харкевич Ю. О. Патент України на корисну модель № 49229. МПК (2009) А61К 35/28. Спосіб створення біологічного трансплантату на основі індукованих в остеогенному напрямку мезенхімних стовбурових клітин собак *in vitro*. Заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. № у 2009 10454. Заявл. 15.10.2009. Опубл. 26.04.2010. Бюл. № 8.

73. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Данілов В. Б., Бокотько Р. Р., Ковпак В. В., Харкевич Ю. О., Журба В. І. Патент України на корисну модель № 57834. МПК (2010) А61К 35/28. Спосіб стимуляції проліферативних процесів у рані шкіри щурів шляхом трансплантації в ділянку рани мезенхімних стовбурових клітин. Заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. № у 2010 11089. Заявл. 15.09. 2010. Опубл. 10.03.2011. Бюл. № 5.

74. Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Харкевич Ю. О., Ковпак В. В., Данілов В. Б., Бокотько Р. Р. Методи видоспецифічної оцінки стовбурових

клітин та їх застосування у ветеринарній клітинній регенеративній терапії: [науково-методичні рекомендації]. К., 2017. 34 с.

75. Масалова Н. Н., Захаренко Р. В. Состояние фосфорно-кальциевого обмена и костного метаболизма в норме и при нарушении функции глаза. Дальневосточный медицинский журнал. 2010. № 2 С. 122-125.

76. Масягина О. А. Нарушение обмена кальция у детей с патологией ока : автореф дис. на соискание ученой степени канд. мед. наук : спец. 14.00.09 “Педиатрия” СПб, 2007. 18 с.

77. Мерецький В. М. Ріст та формоутворення кісток скелета за умов корекції вторинного остеопорозу за патологій ока : автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.01 “Нормальна анатомія”. Тернопіль, 2013. 18 с.

78. Мирина Е. Ю. Остеопороз. Принципы диагностики и лечения увеїту та кератиту. Русский медицинский журнал. 2012. № 13. С. 638 – 641.

79. Москаленко Р. А. Морфофункціональні зміни ока тварин в умовах впливу мікроелементозу (анатомо-експериментальне дослідження): автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.03.01 “Нормальна анатомія Х., 2018. 19 с.

80. Москаленко Р. А., Романюк А. М., Будко Г. Ю. Диференціація паренхіми ока тварин в умовах впливу модельованого мікроелементозу. Український морфологічний альманах. 2010. Т. 8, № 1. С. 62 – 64.

81. Надольник Л. И. Стресс и око. Биомедицинская химия. 2011. Т. 56, № 4. С. 443 – 456.

82. Небожина М. В. Влияние экспериментального увеїту та кератиту, вызванного введением мерказолила на состояние процессов свободнорадикального окисления в ткани печени в условиях рентгеновского облучения. Эндокринологія. 2010. Т. 4, № 2. С. 261.

83. Ноздрачев А. Д., Поляков Е. Л. Анатомия крысы при увеїті. СПб. : Лань, 2001. 464 с.

84. Нурметова І. К. Функціональне значення патології очей в процесах адаптації. Досягнення біології та медицини. 2018. № 2. С. 69-78.
85. Оленович О. А. Характеристика функціонального стану нирок у щурів та собак з експериментальним увеїту та кератиту. Експериментальна та клінічна офтальмологія. 2014. № 3. С. 105 – 109.
86. Олійник В. А. Стан кісткової системи у хворих з порушенням зору тварин. Здоров'я України. – 2009. – № 7/3. – С. 21 – 25.
87. Олійник В. А., Поворознюк В. В., Терехова Г. М. Системна патологія ока при захворюваннях внутрішніх органів: клініка, діагностика, профілактика і лікування (огляд літератури та власні дані). Офтальмологія. 2016. Т. 7, № 2. С. 257–273.
88. Парнош С. М. Офтальмологія та стовбурові клітини. Вісник наукових досліджень. 2018. № 2. С. 122–139.
89. Петунина Н. А. Использование препаратов ока в клинической практике. Ч. 1. Мед. Науч. учеб.- метод. журн. 2003. № 12. С. 99–113.
90. Пішак В. П., Ходоровська А. А., Федонюк Л. Я. Морфофункціональний стан ока в умовах стресу на фоні введення мелатоніну в різні терміни доби. Буковинський медичний вісник. 2007 Т. 10, № 4. С. 137 – 140.
91. Плеш І. А., Кшановська О. Й., Хомко О. Й. Сучасні можливості клінічної лабораторної діагностики / Авт. кол.: [та ін.]. Буковинський медичний вісник. 2014. Т. 18, № 1. С. 147 – 150.
92. Побігун Н. Г. Кальцій-фосфорний баланс та мінеральна щільність кісткової тканини при експериментальній увеїту та кератиту. Галицький лікарський вісник. 2018. Т. 22, № 7. С. 138 – 139.
93. Побігун Н. Г. Вплив хронічного стресу на функціональну активність та морфологічні особливості ока за умов офтальмологічної дисфункції. Інновації в медицині 85-а наук.-практ. конф. студентів та молодих учених із міжнар. участю, 12-13 берез. 2015 р. : зб. матеріалів конф. Івано-Франківськ, 2015. С. 96.

94. Побігун Н. Г. Дослідження змін показників кальцієвого метаболізму в щурів за патологій очей під впливом фізичного навантаження. Буковинський медичний вісник. 2011. Т. 18, № 3 (71). С. 119 – 123.

95. Побігун Н. Г. Характеристика змін кальцій-фосфорного обміну в щурів за патологій очей при дії хронічного стресу та фізичного навантаження. Інновації в медицині: 83-я наук.-практ. конф. студентів та молодих учених із міжнар. участю, 27-28 берез. 2014 р.: зб. матеріалів конф. Івано-Франківськ, 2014. С. 109.

96. Побігун Н. Г. Порівняльна характеристика показників кальцієвого гомеостазу при експериментальній патології очей за умов поєднаної дії хронічного стресу і фізичного навантаження при різних класифікаціях гіпотиреозу. Галицький лікарський вісник. – 2013. Т. 22, № 3. С. 51–55.

97. Побігун Н. Г., Ємельяненко І. В. Рівень магнію при експериментальній патології очей, дії стресорів та фізичного навантаження: матеріали ХІХ-го з'їзду Укр. фізіол. товариства ім. П. Г. Костюка з міжнар. участю, присвяченого 90-річчю від дня народження академіка П. Г. Костюка. Фізіологічний журнал. 2014. Т. 60, № 3. С. 142 – 143.

98. Побігун Н. Г., Ємельяненко І. В. Динаміка змін кальцій-фосфорного обміну та стану кісткової тканини за експериментальних умов увеїту та кератиту. Здобутки клінічної і експериментальної медицини. 2011. – № 1. – С. 84 – 89.

99. Побігун Н. Г., Попадинець О. Г., Ємельяненко І. В. Морфофункціональні зміни ока за умов експериментальної патології та дисфункції та фізичного навантаження. Клінічна анатомія та оперативна хірургія. 2015. Т. 14, № 1 (51). С. 69–73.

100. Потоцький М. К. Основи гістопатологічної техніки "Методичні вказівки для студентів та лікарів ветеринарної медицини-патоморфологів" К., 2006. 101 с.

101. Прейма Х. І., Ященко А. М. Роль глікокон'югатів у процесах морфогенезу шкіри потомства на тлі увеїту та кератиту материнського організму. Буковинський медичний вісник. 2007. № 8. С. 232 – 236.
102. П'янке Р. В. Лікування і діагностика увеїту та кератиту. Фізіологічний журнал. 2014. Т. 57, № 3. С. 65 – 77.
103. Раскин А. М. Аутоиммунные процессы в патологии глаза тварин за стресу. Л. Медицина, 2016. 223 с.
104. Рещенко И. В. Дефицит білка в практике офтальмолога. Клиническая медицина. 2008. № 7. С. 47 – 51.
105. Романюк А. М., Москаленко Р. А. Морфологічні зміни ока статевонезрілих щурів в умовах дії мікроелементозів. Український морфологічний альманах. 2012. Т. 6, № 1. С. 136–137.
106. Румянцев П. О., Румянцева У. В., Саенко В. А. Статистические методы анализа в клинической практике. Часть I. Одномерный статистический анализ. Проблемы эндокринологии. 2010. № 5. С. 41–58.
107. Свириденко Н. Ю. Вопросы терапии глаза. Русский медицинский журнал. 2011. № 13. С. 633–638.
108. Семченко Н. М. Офтальмологічний статус та історія досліджень увеїту та кератиту. Вісник наукових досліджень. 2004. № 1. С. 72-73.
109. Смалюх О. З. При увеїті визначають лужну фосфатазу. Увеїт: що потрібно знати лікарю-практику (огляд літератури). Буковинський медичний вісник. 2010. Т. 17, № 5. С. 168 – 181.
110. Старкова Н. Т. Структурні зміни ока в щурів. Пробл. эндокринол. 2016. 48, № 1. С. 4-6.
111. Суплотова Л. А., Некрасова М. Р., Давыдова Л. И. Проблема остеопении в патологии глаза. Клиническая медицина. 2009. № 1. С. 62 – 66.
112. Темченко Н. М. Співвідношення показників офтальмологічної системи в тварин. Практична ветеринарія. 2019. Т. XIV, № 1. С. 62-68.
113. Терещенко И. В. Дефицит магния в практике офтальмолога. Клиническая медицина. 2018. № 7. С. 46 – 51.

114. Тобігун Н. Г. Особливості обміну кальцію, фосфору та магнію при експериментальній увеїті та кератиті та аутоотрансплантація: матеріали XVIII з'їзду Українського фізіологічного товариства з міжнар. участю, (Одеса, 20-22 трав. 2010 р.). Фізіологічний журнал. 2010. Т. 56, № 2. С. 140–141.

115. Третьяк С. И., Романович А. В., Хрыщанович В. Я. Трансплантация тканей ока: настоящее и будущее. Вести НАН Беларуси . Сер. мед. наук. 2011. № 4. С. 110–112.

116. Третьяк С. И., Хрыщанович В. Я. Трансплантация культур клеток глаза и других эндокринных органов новое направление в хирургической эндокринологии. Мед. новости. 2002. № 12. С. 9–14.

117. Тучак О. І. Стан перекисного окиснення ліпідів і антиоксидантної системи при увеїті та кератиті, можливості корекції: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук: спец. 14.03.03 «Нормальна фізіологія». Л., 2012. 21 с.

118. Тучак О. І., Воронич-Семченко Н. М. Зміни вільнорадикального окислення ліпідів, активності антиоксидантної системи, вмісту оксиду азоту при увеїтах та кератитах. Фізіологічний журнал. 2017. Т. 54, № 1. С. 54-57.

119. Федченко Н. Н., Бондаренко А. А., Гарец В. И. Современные аспекты структурно-функциональной организации глаз. Український морфологічний альманах. 2016. Т. 6, № 1. С. 161–164.

120. Фомина К. А. Офтальмологічний статус белых крыс различного возраста в обычных условиях окружающей среды. Вісник проблем біології і медицини. 2011. Т. 1, № 2. С. 175 – 177.

121. Хара М. Р., Павлович В. М., Михайлюк В. М. Статеві відмінності функціональних і структурних порушень у міокарді щурів з увеїтом. Фізіологічний журнал. 2018. Т. 59, № 2. С. 18 – 22.

122. Хвостова С. А. Возрастные особенности минеральной плотности костей нижних конечностей. Фундаментальные исследования. 2011. № 10. С. 170 – 176.

123. Ходоровська А. А., Штефанець Т. О., Малик Ю. Ю. Морфологічні зміни епітелію ока на фоні дії стресу у собак. Клінічна та експериментальна патологія. 2018. Т. VIII, № 3. С. 113. – 114.

124. Хоруженко А. И. Новые методические подходы к культивированию тиреоцитов *in vitro* с сохранением их фолликулярной структуры. Экспериментальная онкология. 2002. № 2. С. 40–45.

125. Хрыщанович В. Я. Оценка качества жизни пациентов с первичным послеоперационным увеїтом та кератитом, принимающих цитокрин. Бел. мед. журн. 2014. № 1. С. 103–105.

126. Хрыщанович В. Я. Оценка эффективности заместительной у пациентов с первичным кератитом та увеїтом. Бел. мед. журн. 2006. № 4. С. 98–109.

127. Хрыщанович В. Я. Морфометрическая характеристика ксенотрансплантата глаз после имплантации в артериальное сосудистое русло. Военная медицина. 2005. № 7. С. 112–116.

128. Хрыщанович В. Я. Ультрасонография глаз и объем заместительной терапии у больных послеоперационным кератитом та увеїтом. Актуальные вопросы хирургии: материалы XXV пленума Правления Ассоциации белорусских хирургов и Республ. науч.- практ. конф., Борисов, 25–26 сент. 2010 г. Минск: БГМУ, 2010. С. 329–331.

129. Хрыщанович В. Я., Третьяк С. И. Компенсация недостающей функции ока методом ее пересадки. Медикосоциальная экспертиза и реабилитация: сб. науч. ст. / под ред. проф. В. Б. Смычка. Минск, 2004. Вып. 6. С. 290–293.

130. Хрыщанович В. Я., Третьяк С. И., Горанов В. А. Коррекция нарушений липидного обмена путем ксенотрансплантации культуры глаз реципиентам с увеїтом в эксперименте. Проблемы хирургии в современных условиях: материалы XIII съезда хирургов Республики Беларусь, Гомель, 28–29 сент. 2006 г. в 2 т. сост. А. Н. Лызиков [и др.]. Гомель ГГМУ, 2006. Т. 2. С. 180.

131. Хрыщанович В. Я., Третьяк С. И. Минеральная плотность костной ткани у больных послеоперационным кератитом та увеїтом. Военная медицина. 2016. № 3. С. 51–54.
132. Чарнош С. М. Увеїт і серцевий ритм. Вісник наукових досліджень. 2013. № 2. С. 122 – 124.
133. Чимпой К. А. Особливості офтальмологічного гомеостазу у хворих на хронічні дифузні захворювання очей. Клінічна та експериментальна патологія. 2018. Т. VIII, № 3. С. 117–120.
134. Швед М. І., Пасечко Н. В., Мартинюк Л. П. Корекція порушень кальцієвого обміну, ліпідного обміну та мінеральної щільності кісткової тканини у хворих на увеїт та кератит, які проживають в мінеральнодефіцитній місцевості. Международный эндокринологический журнал. 2008. № 2. С. 65 – 70.
135. Шиленок В. Н. Эффективность заместительной терапии после офтальмоэктомиї Белорусско-польские дни хирургии: сб. материалов Междунар. науч. симпоз., Гродно, 18–19 окт. 2001 г. Гродно, 2001. С. 145–146.
136. Шумаков В. І., Онищенко Н. А. Біологічні резерви кісткового мозку і корекція тканинних дисфункцій глаз. Москва. 2017. 308 с.
137. Янко Р. В. Морфофункціональні зміни очей собак та котів та у молодих щурів за умов нормобаричної гіпоксії. Фізіологічний журнал. 2018. Т. 69, № 3. С. 61–71.
138. Abbas M. M., Mahmoud A. H., El-Desouky W. Biochemical changes in serum lipid fractions, calcium, magnesium and phosphorus levels in women with subclinical hypothyroidism. Nature Sci. 2013. Vol. 11, № 5. P. 113–118.
139. Alessandri G. Autoimmune hypothyroidism in rats. Experimental Method. Liver Int. 2010. Vol. 57. P. 184-198.
140. Al-Hakeim H. K. Amniotic membrane grafts in caustic burns of the eye: (Burns of the second degree). J. Lab. Physicians. 2009. Vol. 1, № 2. P. 49–52.

141. Alsalameh S., Amin R., Gemba T. Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Autors : [et al.]. Arthritis Rheum.* 2004. Vol. 50. P. 1522–1532.
142. Amashukeli M., Giorgadze E., Tsagareli M. The impact of thyroid diseases on bone metabolism and fracture risk. *Georgian Med. News.* – 2010. – Vol. 184-185. – P. 34 – 39.
143. Andrews P. W., Matin M. M., Bahrami A. R. Embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells: opposite sides of the same coin. *Biochemical Society Transactions.* 2005. Vol. 33. P. 1526–1530.
144. Baddoo M., Hill K., Wilkinson R. Characterization of mesenchymal stem cells isolated from murine bone marrow by negative selection. *J. Cell Biochem.* 2003. Vol. 89. P. 1235–1249.
145. Badiavas E. V., Mehrdad Abedi, Butmarc Janet. Participation of bone marrow derived cells in cutaneous wound healing. *J. Cell Physiol.* 2003. Vol. 196, № 2. P. 245–250.
146. Baltaci A. K., Mogulkoc R., Belviranli M. Serum levels of calcium, selenium, magnesium, phosphorus, chromium, copper and iron. Their relation to zinc in rats with induced hypothyroidism. *Acta. Clin. Croat.* 2013. Vol. 52, № 2. P. 151–156.
147. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* 2002. Vol. 30. P. 42–48.
148. Basu G., Mohapatra A. Embryonic stem cells and embryonal carcinoma cells: opposite sides of the same coin. *Metab.* 2012. Vol. 16, № 2. P. 204–213.
149. Bassett J. H., Williams A. J., Murphy E. A lack of thyroid hormones rather than excess thyrotropin causes abnormal skeletal development in hypothyroidism. *Endocrinol.* 2008. Vol. 22, № 2. P. 501 – 512.
150. Bergstrom I., Landgren B., Brinck J. Physical training preserves bone mineral density in postmenopausal women with forearm fractures and low bone mineral density. *Osteoporos. Int.* 2010. Vol. 19, № 2. P. 177–183.

151. Biondi B. Natural history, diagnosis and management of subclinical thyroid dysfunction. *Best. Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012. Vol. 26, № 4. P. 431–446.
152. Blanton M. W., Hadad I., Johnstone B. H. Adipose stromal cells and platelet-rich plasma therapies synergistically increase revascularization during wound healing. *Plast. Reconstr. Surg.* 2009. Vol. P. 56–64.
153. Bongso A., Lee E. H. *Stem cells. From Bench to Bedside.* Singapore. University of Singapore. 2005. P. 588.
154. Bushinsky D. A. Contribution of intestine, bone, kidney and dialysis to extracellular fluid calcium content. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol.* 2010. Vol. 5. P. 12–22.
155. Cardoso L. F., Maciel L. M., de Paula F. J. The multiple effects of thyroid disorders on bone and mineral metabolism. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 2014. Vol. 58, № 5. P. 452–463.
156. Chen L., Tredget E. E., Liu C. Analysis of Allogenicity of Mesenchymal Stem Cells in Engraftment and Wound Healing in Mice. *PLoS ONE.* 2009. Vol. 4, № 9. P. 7119.
157. Chung Y., Klimanskaya I, Becker S. Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres. *Nature.* 2006. Vol. 439. P. 216–219.
158. Conti M. I., Martinez M. P., Olivera M. I. Biomechanical performance of diaphyseal shafts and bone tissues of femurs from hypothyroid rats. *Endocrine.* 2009. Vol. 36, № 2. P. 291–298.
159. Croitoru-Lamoury J., Lamoury F. M., Zaunders J. J. Human mesenchymal stem cells constitutively express chemokines and chemokine receptors that can be upregulated by cytokines, IFN-beta, and Copaxone. *J. Interferon Cytokine Res.* 2007. Vol. 27. P. 53–64.
160. De Camargo R. A., Pereira H. R., Felisbino S. L. Isolation of bone marrow mesenchymal stem cells, *Acta Ortop. Bras.* 2006. Vol. 14, № 1. P. 22–24.

161. De Martino M., Zontaa S., Rampino T. Mesenchymal Stem Cells Infusion Prevents Acute Cellular Rejection in Rat Kidney Transplantation. Transplantation proceedings. 2010. Vol. 42. P. 1331–1335.
162. Demartini A., Kulak C. A., Borba V. C. Bone mineral density of children and adolescents with congenital hypothyroidism. Arq. Bras. Endocrinol. Metabol. 2007. Vol. 51, № 7. P. 1084 – 1092.
163. Dhanwal D. K. Thyroid disorders and bone mineral metabolism. Indian J. Endocrinol. Metab. 2011. Vol. 15, № 2. P. 107 – 112.
164. Di Mase R., Cerbone M., Improda N. Bone health in children with long-term idiopathic subclinical hypothyroidism. Ital. J. Pediatr. 2012. Vol. 38. P. 56 – 59.
165. Docheva D., Popov C., Mutschler W. Human mesenchymal stem cells in contact with their environment: surface characteristics and the integrin system. J. Cell Mol. Med. 2007. Vol. 11. P. 21–38.
166. Dousdampanis P., Grigka K., Vagenakis A. The thyroid and the kidney: a complex interplay in health and disease. Int. J. Artif. Organs. 2014. Vol. 37, № 1. P. 1 – 12.
167. Duncan Basset J. H, Harvey C. B, Williams G. R. Mechanism of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. Mol Cell Endocrinol. 2003 . Vol. 213. P. 1-11.
168. Eslaminejad M. B., Nazarian H., Falahi F. Ex vivo Expansion and Differentiation of Mesenchymal Stem Cells from Goat Bone Marrow. Iranian Journal of Basic Medical Sciences. 2009. Vol. 12, № 2. P. 70–79.
169. Falanga V., Iwamoto S., Chartier M. Autologous bone marrow-derived cultured mesenchymal stem cells delivered in a fibrin spray accelerate healing in murine and human cutaneous wounds. Tissue Eng. 2007. Vol. 13. P. 1299–1312.
170. Farquharson C., Staines K. The skeleton: no bones about it. J. Endocrinol. 2011. Vol. 211, № 2. P. 107–108.
171. Fathke C., Wilson L., Hutter J. Contribution of bone marrow-derived cells to skin: collagen deposition and wound repair. Stem Cells. 2004. Vol. 22, № 5. P. 812–822.

172. Ferrari P. Cortisol and the renal handling of electrolytes: role in glucocorticoid-induced hypertension and bone disease. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2003. Vol. 17, № 4. P. 575 – 589.
173. Flohr T. R. The use of stem cells in liver disease/ T.R. Flohr // *J. Current Opinion in Organ Transplantation.* - 20014.- Vol. 14. – P. 64-71.
174. Galli C., Passeri G., Macaluso G. M. Osteocytes and WNT: the mechanical control of bone formation. *J. Dent. Res.*–2010.Vol. 89, № 4. P. 331–343.
175. Ghosh A. K., Joshi S. R. Disorders of calcium, phosphorus and magnesium metabolism. *J. Assoc. Physicians India.* 2008. Vol. 56. P. 613–621.
176. Glinoeer D. Potential consequences of maternal hypothyroidism on the off-spring: evidence and implications. *Horm Res.* 2001. Vol. 55. P. 109-114.
177. Gronthos S., Zannettino A. C., Hay D. J. Molecular and cellular characterization of highly purified stromal stems derived from human bone marrow. *Cell Sci.* 2003. Vol. 116. P. 1827–1835.
178. Hall V. Porcine Embryonic Stem Cells: A Possible Source for Cell Replacement Therapy. *Stem Cell Rev.* 2008. Vol. 4. P. 275–282.
179. Hao W., Ming J., Hu Y. Y. Osteogenic Differentiation of Adipose-derived Stem Cells Isolated from Rabbit Subcutaneous Adipose Tissue. *Journal of US-China Medical Science.* 2007. Vol. 4, № 3. P. 19–25.
180. Hellammer D. H., Hellammer J. Stress. The brain-body connection. Basel: Karger, 2008. 108 p.
181. Hoek Van I., Daminet S. Interactions between thyroid and kidney function in pathological conditions of these organ system: a review. *Gen. Comp. Endocrinol.* 2009. Vol. 160, № 3. P. 205–215.
182. Horiuchi H., Tategaki A., Yamashita Y. Chicken Leukemia Inhibitory Factor Maintains Chicken Embryonic Stem Cells in the Undifferentiated State. *The journal of biol.* 2004. Vol. 279, № 23. P. 24514–24520.
183. Iglesias P., Diez J. J. Thyroid dysfunction and kidney disease. *Eur. Endocrinol.* 2009. Vol. 160, № 4. P. 503–515.

184. Jiang Y., Jahagirdar B. N., Reinhardt R. L. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. *Nature*. 2002. Vol. 418. P. 41–49.
185. Karakukcu C., Polat Y., Torun Y. A. The effects of acute and regular exercise on calcium, phosphorus and trace elements in young amateur boxers. *Clin. Lab*. 2013. Vol. 59, № 5-6. P. 557–562.
186. Karimifar M., Esmaili F., Salari A. Effect of Levothyroxine and thyroid stimulating hormone on bone loss in patients with primary hypothyroidism. *J. Res. Pharm. Pract*. 2014. Vol. 3, № 3. P. 83–87.
187. Kim S. J., Jang J. D., Lee S. K. Treatment of long tubular bone defect of rabbit using autologous cultured osteoblasts mixed with fibrin. *Cytotechnology*. 2007. Vol. 54. P. 115–120.
188. Kim S. Y., Kim E. H., Lee S. Stem Cell In Adult Pancreas: Its Activation and Induction of Beta Cell Differentiation *The Korean J. Anat*. 2004. Vol. 37, № 2. P. 117–122.
189. Kim W. S., Park B. S., Sung J. H. Wound healing effect of adipose-derived stem cells: A critical role of secretory factors on human dermal fibroblasts. *Journal of Dermatological Science*. 2012. Vol. 48. P. 15–22.
190. Koch T. G., Heerkens T., Thomsen P. D. Isolation of mesenchymal stem cells from equine umbilical cord blood. *BMC Biotechnology*. 2007. Vol. 26. P. 1–9.
191. Kooistra H. S., Dias-Espineira M., Mol J. A. ecretion pattern of thyroid-stimulating hormon in dogs during euthyroidism and hypothyroidism. *Domest Anim Endocrinol*. 2014. Vol. 18. P. 19-29.
192. Krampera M., Glennie S., Dyson J. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*. 2003. Vol. 101. P. 3722–3729.
193. Lee J. S., Buzkova P., Fink H. A. Subclinical thyroid dysfunction and incident hip fracture in older adults. *Arch. Intern. Med*. 2010. Vol. 170. № 22. P. 1876–1883.

194. Lee W. Y., Oh K. W., Rhee E. J. Relationship between subclinical thyroid dysfunction and femoral neck bone mineral density in women. Arch. Med. Res. 2013. № 37. № 4. P. 511–516.
195. Liang L. B., Wang Y. J., Zhang M. Changes of bone mineral density and bone metabolic marker in patients with subclinical hypothyroidism. Sichuan. Da. Xue. Xue. Bao. Yi. Xue. Ban. 2014. Vol. 45. № 1. P. 66–69.
196. Lynch S. E., Colvin R. B., Antoniades H. N. Growth Factors in Wound Healing. Single and Synergistic Effects on Partial Thickness Porcine Skin Wounds. Clin. Invest. 2009. Vol. 84. P. 640–646.
197. Mansourian A. R. Metabolic pathways of tetraiodothyronine and triiodothyronine production by thyroid gland: a review of articles. Pak. J. Biol. Sci. 2011. Vol. 14. № 1. P. 1–12.
198. Marwaha R. K., Puri S., Tandon N. Effects of sports training & nutrition on bone mineral density in young Indian healthy females. Indian J. Med. Res. 2011. Vol. 134. № 3. P. 307–313.
199. Merla R., Martinez J. D., Martinez M. A. Hypothyroidism and renal function in patients with systolic heart failure. Tex. Heart Inst. J. 2010. Vol. 37. № 1. P. 66 – 69.
200. Morreale de Escobar G, de Vijlder J., Butz S. The thyroid and brain, European Thyroid Symposium. NY: Schattauer, 2006. P. 33-233.
201. Mrugala D., Bony C., Neves N. Phenotypic and functional characterisation of ovine mesenchymal stem cells: application to a cartilage defect model. Ann. Rheum. Dis. 2008. Vol. 67. P. 288–295.
202. Nanney L. B., King L. E. Epidermal growth factor and transforming growth factor- α . The molecular and cellular biology of wound repair. - 2nd ed. Clark R. A. F. ed. New York. Plenum Press. 2000. P. 171–194.
203. Neuss S., Becher E., Woltje M. Functional expression of HGF and HGF receptor/c-met in adult human mesenchymal stem cells suggests a role in cell mobilization, tissue repair, and wound healing. Stem Cells. 2009. Vol. 22. P. 405-414.

204. Nunez J., Celi S., Ng L. Multigenic control of thyroid hormone functions in the nervous system. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 . Vol. 287. P. 1-12.
205. Pejin R., Curic N., Kovacev-Zavisic B. Bone metabolism during substitution therapy of primary hypothyroidism. *Med. Pregl.* 2012. Vol. 62, № 9. P. 407–411.
206. Ponsoye M., Paule R., Gueutin V. Kidney and thyroid dysfunction. *Nephrol. Ther.* 2018. Vol. 9. № 1 P. 13–20.
207. Radetti G., Maselli M., Buzi F. The natural history of the normal/mild elevated TSH serum levels in children and adolescents with Hashimoto's thyroiditis and isolated hyperthyrotropinaemia: a 3-year follow-up *Clin. Endocrinol. (Oxf).* 2013. Vol. 76. № 3. P. 394–398.
208. Rasmusson I. Immune modulation by mesenchymal stem cells *Exp. Cell Res.* 2006. Vol. 312. P. 2169–2179.
209. Ringe J., Strassburg S., Neumann K. Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J. Cell Biochem.* 2011. Vol. 101. P. 135–146.
210. Rizzoli R. Nutrition: its role in bone health. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* 2012. Vol. 22. № 5. P. 813–829.
211. Rowe W. J. Correcting magnesium deficiencies may prolong life *Clin. Interv. Aging.* 2019. Vol. 7. P. 51–54.
212. Sabuncu T., Aksoy N., Arikan E. Early changes in parameters of bone and mineral metabolism during therapy for hyper- and hypothyroidism. *Endocr. Res.* 2012. Vol. 27, № 1-2. P. 203 – 213.
213. Schneider M. R., Wolf E., Braun J. Canine embryo-derived stem cells and models for human diseases. *Human Molecular Genetics.* 2018. Vol. 17. P. 42–47.
214. Schwarz C., Leichtle A. B., Arampatzis S. Thyroid function and serum electrolytes: does an association really exist? *Swiss. Med. Wkly.* 2019. Vol. 142. P. 136–139.

215. Seo M. S., Jeong Y. H., Park J. R. Isolation and characterization of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *J. Vet. Sci.* 2014. Vol. 10. № 3. P. 181–187.
216. Shivaleela M. B., Poornima R. T., Jayaprakash D. S. Serum calcium and phosphorous levels in thyroid dysfunction. *Indian J. Fundam. App. Life Sci.* 2013. Vol. 2. № 2. P. 179–183.
217. Silva W. A., Covas D. T., Panepucci R. A. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2012. Vol. 21. P. 661–669.
218. Solouk A., Mirzadeh H., Shokrgozar M. The Study of Collagen Immobilization on a Novel Nanocomposite to Enhance Cell Adhesion and Growth *Iranian Biomedical Journal.* 2011. Vol. 15. P. 6–14.
219. Son B. R., Marquez-Curtis L. A., Kucia M. Migration of bone marrow and cord blood mesenchymal stem cells in vitro is regulated by stromal-derived factor-1-CXCR4 and hepatocyte growth factor-c-met axes and involves matrix metalloproteinases. *Stem Cells.* 2010. Vol. 24. P. 1254–1264.
220. Sotiropoulou P. A., Perez S. A., Gritzapis A. D. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells.* 2009. Vol. 24. P. 74–85.
221. Summer R., Fitzsimmons K., Dwyer D. Isolation of an Adult Mouse Lung Mesenchymal Progenitor Cell Population. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2008. Vol. 3. P. 152–159.
222. Suneel B., Nagendra D. R., Aparna R. R. Mineral status in thyroid disorders (hypo & hyper). *Int. J. App. Biol. Phar. Tech.* 2007. Vol. 2. № 4. P. 423–429.
223. Tuan R. S., Boland G., Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res. Ther.* 2006. Vol. 5. P. 32–45.
224. Tuchendler D., Bolanowski M. The influence of thyroid dysfunction on bone metabolism. *Thyroid Res.* 2015. Vol. 7, № 1. P. 12–16.

225. Vaidya B., Pearce S. H. Management of hypothyroidism in adults. *BMJ*. 2005. Vol. 337. P. 284–290.
226. Vats A., Tolley N. S., Bishop A. E. Embryonic stem cells and tissue engineering: stem cells to the clinic. *Jornal Of The Royal Society Of Medicine*. 2004. Vol. 98. P. 346–350.
227. Villa A., Snyder E. Y., Vescovi A. Establishment and properties of a growth factor-dependent perpetual neural stem cell line from the human CNS. *Exp. Neurol*. 2017. Vol. 61. №. P. 67–84.
228. Wang R., Nelson J. C., Weiss R. M. Accuracy of free thyroxine measure-ments across natural ranges of thyroxine binding to serum proteins. *Thyroid*. 2003. Vol. 10. P. 31-39.
229. Wenrong X. U., Xiran Z., Q. Hui Q. Rate of epithelialisation and operations in corneal ulcers treated with amniotic membrane transplantation combined with botulinum toxin- induced ptosis *In Vitro. Exp. Biol. Med*. 2002. Vol. 229. P. 623–631.
230. Williams G. R. Actions of thyroid hormones in bone. *Endocrinol. Pol*. 2001. Vol. 60. № 5. P. 380–388.
231. Wu Y., Chen L., Scott P. G. Mesenchymal Stem Cells Enhance Wound Healing Through Differentiation and Angiogenesis. *Stem Cells*. 2000. Vol. 25. P. 2648–2659.
232. Yu K., Narayanan L., Mattie D. The pharmacokinetics of perchlorate and its effect on the hypothalamus-pituitali-thyroid axsis in the male rat. *Toxicoloh. Appl. Pharmacol*. 2015, 182, №2, 148-159.
233. Zhu H., Mitsunashi N., Klein A. Amniotic membrane transplantation for reconstruction after excision of large ocular surface neoplasias. 2020. Vol. 34. P. 228–435.

ДОДАТКИ

Додаток А

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

Статті у наукових фахових виданнях України,
у тому числі включених до міжнародних наукометричних баз даних

1. **Шупик О. В.,** Мазуркевич А. Й., Малюк М. О., Бокотько Р. Р. Данілов В. Б. Морфофункціональні зміни в тканинах рогівки ока тварин за наявності дегенеративних процесів та їх корекція за допомогою стовбурових клітин, які містяться в амніотичній мембрані. Вісник сумського національного аграрного університету. Серія «Ветеринарна медицина». 2018. Випуск 11. № 43. С. 40–45. *(Здобувачем проведено дослідження, підготовлено матеріали для статті).*

2. **Шупик О. В.,** Мазуркевич А. Й., Бокотько Р. Р., Дудус Т. В. Ефективність застосування різних технік трансплантації амніотичної оболонки за дегетивних процесів рогівки. Теорія і практика у ветеринарній медицині. 2020. Вип. 8. № 3. С. 219–225. *(Здобувачем проведено аналіз наукових джерел з проблеми досліджень).*

3. **Шупик О. В.,** Мазуркевич А. Й., Бокотько Р. Р. Моделювання експериментального кератиту та увеїту Теорія і практика у ветеринарній медицині. 2020. Вип. 8. № 4. С. 276–282 *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, підготовлено матеріали для публікації).*

4. **Shupyk O. V.,** Masurkevych A. Y., Bokotko R. R., Savchuk T. L., Pasnichenko O. S., Krystyniak Y. M. The effectiveness of amniotic membrane depending on the cause of corneal damage in dogs. Ukrainian journal of veterinary sciences. 2020. Vol. 11. № 4. P.132-145 *(Здобувачем проведено експериментальні дослідження, підготовлено матеріали для публікації).*

5. **Шупик О. В.,** Мазуркевич А.Й., Бокотько Р. Р., Савчук Т. Л., Данілов В. Б., Кладницька Л. В., Харкевич Ю. О., Пасніченко О. С., Р. С. Благий, Н. І. Граборенко, Ю. М. Кристиняк. Ефективність застосування мезенхімальних стовбурових клітин за увеїту в собак, в залежності від способу їх введення.

Доповнення додатку А

Науково-технічний бюлетень Державного науково-дослідного контрольного інституту ветеринарних препаратів та кормових добавок і Інституту біології тварин. 2021. Вип. 2. № 1. С. 222–233. *(Здобувачем проведено дослідження, підготовлено матеріали для статті).*

Стаття у науковому виданні, включеному до міжнародної наукометричної бази даних Scopus

6. Nemtinov P., Ustymenko A., Lobyntseva G., Panchenko L., **Shupyk O.**, Sokolov M., Salyutin R., Palianytsia S. Optimization of the selection criteria for cord blood units for transplantation in recipients of the different age groups. Cell and Organ Transplantology. 2020; 8(2):in press. DOI: 10.22494/cot.v8i2.114. Посилання на сайт: <http://transplantology.org/2020-8-2-en/article-06/>. *(Здобувачем проведено аналіз наукових джерел з проблеми досліджень).*

Патент України на корисну модель

7. **Шупик О. В.**, Мазуркевич А. Й., Харкевич Ю. О., Бокотько Р. Р., Пасніченко О. С., Данілов В. Б. Патент України на корисну модель № 139673 МПК А61D1/00 (2020.01). Спосіб відновлення рогівки ока у собак та котів за ерозій, виразок, та хімічних опіків, за допомогою амніотичної оболонки плода; заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. № у 201907514; заявлено 05.07.2019; опубліковано 10.01.2020. Бюл. № 1. *(Здобувачем взято участь у розробленні принципу корисної моделі, проведено експериментальні дослідження, підготовлено матеріали до патентування).*

8. **Шупик О. В.**, Мазуркевич А. Й., Харкевич Ю. О., Бокотько Р. Р., Пасніченко О. С., Данілов В. Б. Патент України на корисну модель № 141623 МПК А61K35/545 (2020.01). Спосіб застосування мезенхімальних стовбурових клітин для репаративних процесів ока у собак та котів за різного перебігу увеїту; заявник і патентовласник Національний університет біоресурсів і природокористування України. № у 201908123; заявлено 15.07.2019;

Доповнення додатку А

опубліковано 27.04.2020. Бюл. № 8. *(Здобувачем взято участь у розробленні принципу корисної моделі, проведено експериментальні дослідження, підготовлено матеріали до патентування).*

Тези наукових доповідей:

9. Шупик О. В. Репаративні процеси в ушкоджених тканинах ока за впливу стовбурових клітин. Науково-практична конференція молодих вчених. Стан і перспективи розвитку та інновації в тваринництві, актуальні питання ветеринарної медицини:, м. Новомосковськ, 25 квітня 2018 року: тези доповідей. Н. 2018. С 125. *(Здобувачем проведено дослідження на кролях, здійснено аналіз результатів, підготовлено тези до друку).*

10. Шупик О. В. Застосування стовбурових клітин в тварин за увеїту. Конференція підготовка фахівців ветеринарної медицини. Практична складова. смт. Немішаєве, ВСП «Немішаєвський агротехнічний коледж» НУБіП України 30-31 травня 2018 року: тези доповідей. Н., 2018. С. 119. *(Здобувачем проведено дослідження на кролях, здійснено аналіз результатів, підготовлено тези до друку).*

Додаток Б



Доповнення додатку Б



Доповнення додатку Б

Погоджено

Проректор з навчальної та виховної роботи Національного університету біоресурсів і природокористування України, доктор економічних наук, професор, академік НААН



С. М. Кваша

«01» березня 2021 р.

Затверджую

Перший проректор Національного університету біоресурсів і природокористування України, доктор сільськогосподарських наук, професор, академік НААН



І. І. Ібатулін

2021 р.

АКТ

про впровадження результатів кандидатської дисертації
у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертації на тему: **«Морфофункціональні зміни в ушкоджених тканинах ока тварин та активність репаративних процесів за впливу стовбурових клітин»**, що представлені на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин», виконаної здобувачем кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України **Шуником Олександром Васильовичем**, розглянуто на засіданні кафедри анатомії, гістології і патоморфології тварин імені академіка В. Г. Касьяненка Національного університету біоресурсів і природокористування України (протокол № 10 від 26.02.2021р.).

Результати дослідження впроваджено у навчальну програму кафедри при викладанні дисципліни «Патологічна анатомія тварин» і «Гістологія, гістологія, ембріологія» щодо впливу стовбурових клітин на процес регенерації тканин ока при підготовці фахівців ОС «Бакалавр» та «Магістр» із спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» у Національному університеті біоресурсів і природокористування України.

Декан факультету
ветеринарної медицини,
доктор біологічних наук, професор,
академік НААН

М. І. Цвіліховський

Завідувач кафедри
анатомії, гістології і патоморфології
тварин імені академіка В. Г. Касьяненка,
доктор ветеринарних наук, професор

О. П. Мельник



Доповнення додатку Б

Погоджено

Затверджую

Проректор з навчальної та виховної роботи Національного університету біоресурсів і природокористування України, доктор економічних наук, професор, академік НААН

Перший проректор Національного університету біоресурсів і природокористування України, доктор сільськогосподарських наук, професор, академік НААН

 С. М. Кваша

 — І. І. Ібатуллін

«*26*» *березня* 2021 р.

березня 2021 р.



АКТ

про впровадження результатів кандидатської дисертації
у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертації на тему: «Морфофункціональні зміни в ушкоджених тканинах ока тварин та активність репаративних процесів за впливу стовбурових клітин», що представлені на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин», виконаної здобувачем кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України **Шуником Олександром Васильовичем**, розглянуто на засіданні кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України (протокол № 7 від 03.02.2021р.).

Результати дослідження впроваджено у навчальну програму кафедри при викладанні дисципліни «Патофізіологія тварин» і «Спеціальна хірургія» щодо впливу стовбурових клітин на процес регенерації тканин ока при підготовці фахівців ОС «Бакалавр» та «Магістр» із спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» у Національному університеті біоресурсів і природокористування України.

Декан факультету
ветеринарної медицини,
доктор біологічних наук, професор,
академік НААН

 М. І. Цвіліховський

Завідувач кафедри
хірургії і патофізіології
імені академіка І. О. Поваженка,
доктор ветеринарних наук, доцент

 М. О. Малюк

Доповнення додатку Б

Затверджую

Проректор з науково-педагогічної,
наукової роботи Полтавської
державної аграрної академії,
кандидат сільськогосподарських

наук, доцент

О. О. Горб

«06» серпня 2021 р.



АКТ

про впровадження результатів кандидатської дисертації
у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертації на тему: «Регенеративні процеси у щитоподібній залозі тварин за гіпотиреозу та їх стимуляція мезенхімальними стовбуровими клітинами», що представлені на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин», виконаної здобувачем кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка факультету ветеринарної медицини Національного університету біоресурсів і природокористування України **Шупиком Олександром Васильовичем**, впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни «Патологічна фізіологія» і «Цитологія, гістологія, ембріологія» стосовно активізації відновлювальних процесів з відновленням структури ушкоджених тканин ока у тварин, аlogenними мезенхімальними стовбуровими клітинами, при підготовці фахівців ОС «Бакалавр» та «Магістр» із спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» у Полтавській державній аграрній академії.

Розглянуто на засіданні кафедри нормальної і патологічної анатомії та фізіології тварин протокол № 6 від 01.2021 р.

Декан факультету
ветеринарної медицини,
доктор ветеринарних наук, професор

С. М. Кулинич

Завідувач кафедри нормальної і
патологічної анатомії та фізіології тварин,
доктор ветеринарних наук, професор

В. П. Бердник

Доповнення додатку Б

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Перший проректор
Харківської державної
зооветеринарної академії
Кібкало Д.В.



«20» січня 2021 року

АКТ

про впровадження результатів кандидатської дисертації
у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертації на тему: *«Морфофункціональні зміни в ушкоджених тканинах ока тварин та активність репаративних процесів за впливу стовбурових клітин»*, що представлені на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин» виконаної *Шутиком Олександром Васильовичем*, впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни «Патологічна фізіологія» стосовно активізації відновлювальних процесів з відновленням структури ушкоджених тканин ока у тварин, аlogenними мезенхімальними стовбуровими клітинами у підготовці фахівців ОС «Бакалавр» та «Магістр» із спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» в Харківській державній зооветеринарній академії.

Розглянуто на засіданні кафедри нормальної і патологічної фізіології тварин протокол № 5 від 20 січня 2021 року.

Декан факультету
ветеринарної медицини,
доктор ветеринарних наук,
професор

О.М.Бобрицька

Завідувач кафедри нормальної і
патологічної фізіології тварин,
доктор ветеринарних наук, професор

І. О. Жукова

Доповнення додатку Б

ЗАТВЕРДЖУЮ:

Проректор з наукової роботи
Сумського НАУ,
д. вет. н., професорЮ. І. Данько
2021 р.

АКТ

про впровадження результатів
кандидатської дисертаційної роботи у навчальний процес

Даним актом стверджується, що результати дисертаційної роботи Шупика Олександра Васильовича на тему: «Морфофункціональні зміни в ушкоджених тканинах ока тварин та активність репаративних процесів за впливу стовбурових клітин», що представлені на здобуття наукового ступеня кандидата ветеринарних наук зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин», впроваджено у навчальну програму при викладанні дисципліни «Патологічна фізіологія сільськогосподарських тварин» стосовно впливу стовбурових клітин на морфофункціональні зміни в ушкоджених тканинах ока, у підготовці фахівців ОС «Бакалавр» із спеціальності 211 «Ветеринарна медицина» в Сумському національному аграрному університеті на кафедрі анатомії, нормальної та патологічної фізіології тварин, протокол № 8 від 1 лютого 2021 року.

Погоджено:

Проректор з науково-педагогічної
та навчальної роботи СНАУ
 В. М. Жмайлов

Декан факультету ветеринарної медицини

 О. Л. Нечипоренко
Завідувач кафедри анатомії, нормальної
та патологічної фізіології тварин,
д. вет. н., професор
 М. Д. Камбур

Доповнення додатку Б

Директор приватної клініки

ветеринарної медицини

"Ветхаус", смт. Немішасве,

вул. Технікумівська 4Б



В.М. Овчарук

« 4 » лютого 2021 р.

АКТ

впровадження результатів

кандидатської дисертаційної роботи в ветеринарну практику

Складений у тому, що матеріали дисертаційної роботи «Морфофункціональні зміни в ушкоджених тканинах ока тварин та активність репаративних процесів за впливу стовбурових клітин», здобувача кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України Шуника Олександра Васильовича, використовуються у практичній діяльності клініки ветеринарної медицини "Ветхаус" під час проведення активізації відновлювальних процесів з відновленням структури ушкодженої тканини ока у тварин аlogenними мезенхімальними стовбуровими клітинами.

Головний лікар,
к.вет.наук



В. М. Овчарук

Доповнення додатку Б

Директор приватної клініки

ветеринарної медицини

"Клініка доктора Буряка", с. мт. Чабани,

вул. Покровська 8А



П. Д. Буряк

« 05 » лютого 2021 р.

АКТ

впровадження результатів

кандидатської дисертаційної роботи в ветеринарну практику

Складений у тому, що матеріали дисертаційної роботи «Морфофункціональні зміни в ушкоджених тканинах ока тварин та активність репаративних процесів за впливу стовбурових клітин», здобувача кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України Шуника Олександра Васильовича, використовуються у практичній діяльності клініки ветеринарної медицини Клініка доктора Буряка під час проведення активізації відновлювальних процесів з відновленням структури ушкоджених тканин ока у тварин аlogenними мезенхімальними стовбуровими клітинами.

Директор



П. Д. Буряк

Доповнення додатку Б

Затверджую
Проректор з наукової роботи та
міжнародних зв'язків
Одеського державного аграрного
університету
назва навчального чи наукового закладу

підпис **Олексій ДАНЧУК** прізвище, ініціали
 « 11 »  2021 р.
 М.П. 

А К Т
про впровадження результатів
дисертаційної роботи у навчальний процес

Цим актом стверджується, що результати дисертаційної роботи на тему: «Морфофункціональні зміни в ушкоджених тканинах ока тварин та активність репаративних процесів за впливу стовбурових клітин»,

назва теми

що подана на здобуття наукового ступеня доктора філософії за спеціальністю 211 – «Ветеринарна медицина», галузь знань – «Ветеринарна медицина», виконана **Шупиком Олександром Васильовичем**

П.І.П. здобувача

впроваджено у навчальну програму під час викладання дисципліни Патологічна фізіологія

назва дисциплін

Результати дисертаційної роботи Шупика Олександра Васильовича, щодо активізації відновлювальних процесів з відновленням структури ушкоджених тканин ока у тварин, аlogenними мезенхімальними стовбуровими клітинами використовуються під час читання лекцій, проведення лабораторних занять, а також під час проведення наукових досліджень на кафедрі фізіології, патофізіології та біохімії

назва кафедри (лабораторії)

для підготовки фахівців ОР «магістр»

за спеціальністю 211 «Ветеринарна медицина»

шифр і назва спеціальності

у Одеському державному аграрному університеті

назва навчального чи наукового закладу

Завідувач кафедри ветеринарної
 фізіології, патофізіології та біохімії,
 кандидат біологічних наук, доцент



Василь НАЙДА

Доповнення додатку Б

Директор приватної клініки

ветеринарної медицини

"Зооветцентр", м. Буча,

вул. Пушкіньська 7Ж

 В. А. Марковский

« 10 » листо 20 д/р.

AKT

вировадження результатів

кандидатської дисертаційної роботи в ветеринарну практику

Складений у тому, що матеріали дисертаційної роботи «Морфофункціональні зміни в ушкоджених тканинах ока тварин та активність репаративних процесів за впливу стовбурових клітин», здобувача кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України Шупика Олександра Васильовича, використовуються у практичній діяльності клініки ветеринарної медицини "Зооветцентр" під час проведення активізації відновлювальних процесів з відновленням структури ушкодженої тканини ока у тварин аlogenними мезенхімальними стовбуровими клітинами.

Директор



В. А. Марковский