

**МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ
І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ**

ШУПИК ОЛЕКСАНДР ВАСИЛЬОВИЧ

УДК 602:639.09:617.7: 636.09

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

16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин»

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата ветеринарних наук

Київ – 2021

Дисертацією є кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису

Роботу виконано в Національному університеті біоресурсів і природокористування України Міністерства освіти і науки України

Науковий керівник доктор ветеринарних наук,
професор, академік НААН
Мазуркевич Анатолій Йосипович,
Національний університет біоресурсів
і природокористування України,
професор кафедри хірургії і патофізіології
імені академіка І. О. Поваженка

Офіційні опоненти: доктор ветеринарних наук, професор
Горальський Леонід Петрович,
Поліський національний університет,
завідувач кафедри анатомії і гістології

кандидат медичних наук
Ратушнюк Андрій Володимирович,
ДУ «Національний інститут хірургії
та трансплантології імені О. О. Шалімова»
Національної академії медичних наук України,
старший науковий співробітник

Захист відбудеться «07» травня 2021 року о 15⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.004.03 у Національному університеті біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 15, навчальний корпус № 3, кімната 301

З дисертацією можна ознайомитися у науковій бібліотеці Національного університету біоресурсів і природокористування України за адресою: 03041, м. Київ, вул. Героїв Оборони, 13, навчальний корпус № 4, кімната 41а

Автореферат розіслано «05» квітня 2021 року

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради



В. В. Мельник

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Використання досягнень біотехнології для підвищення ефективності лікування тварин від хвороб очей різного походження – одне із найперспективніших завдань ветеринарної науки і практики (Lanton M. W. et al., 2019). Якісно новим вирішенням проблеми репаративних процесів в оці тварин є використання диференційованих чи недиференційованих клітин автологічного або аlogenного походження, отриманих з використанням клітинних технологій (Мазуркевич А. Й. та ін., 2013, 2019). У літературі наведено результати експериментальних досліджень щодо лікування тварин за різних патологічних станів ока у тварин шляхом трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин в ділянку пошкодження (Nasulov D. U. et al., 2014; Galanga B. et al., 2018).

Застосування мезенхімальних (стромальних) стовбурових клітин у ветеринарній медицині за патології ока у тварин базується на достатній науково-методичній базі (Ковпак В. В., 2010; Харкевич Ю. А., 2012; Журба В. І., 2013; Малюк М. О., 2016; Бокотько Р. Р. і Савчук Т. Л., 2019; Fasmusson I., 2010; Salaminejad M. B., 2017). Розроблені методи відбору кісткового мозку, жирової тканини, амніотичної оболонки у тварин і виділення з них фракції моноклеарних клітин з високою проліферативною активністю дають змогу якнайшвидше отримати необхідну кількість мезенхімальних стовбурових клітин та використати їх з метою стимуляції репаративних процесів у патологічно змінених тканинах ока та органах тварин. Встановлено, що останні, завдяки своїм імуномодуючим властивостям і здатності диференціюватися у багатьох напрямках, є найперспективнішим джерелом клітинного матеріалу.

Водночас залишаються мало вивченими питання клінічного використання стовбурових клітин за патології ока, не з'ясовано особливості реакції організму реципієнта на введення аlogenних клітин, не визначено дози та шляхи їх введення в кожному конкретному випадку, показання та протипоказання до їх застосування, відсутні результати використання тканин-трансплантатів, зокрема амніотичної оболонки, з високим вмістом мезенхімальних стовбурових клітин.

З огляду на це, вивчення біологічних властивостей мезенхімальних стовбурових клітин залежно від умов їх отримання, зберігання та використання для стимуляції репаративних процесів у тканинах ока тварин за різних видів патології ока є актуальним завданням.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертацію виконано як складову частину науково-дослідних робіт кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України за темою «Розробити нові способи стимуляції процесів відновлення ушкоджених тканин опорно-рухового апарату домашніх тварин методами клітинної терапії» (номер державної реєстрації 0118U000307, 2018–2020 рр.).

Мета та завдання дослідження. Мета дослідження – виявити динаміку морфофункціональних змін у тканинах ока тварин за експериментального

ушкодження тканин очного яблука та за різних видів патології спонтанного походження; дослідити вплив трансплантованих аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин і амніотичної оболонки, 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 й увеїту за показниками: клінічних проявів кератиту/увеїту; макроскопічних змін в оці; мікроскопічних досліджень;
- дослідити активність регенеративних процесів в експериментально ушкоджених тканинах ока за впливу трансплантованих аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин залежно від способу їх застосування;
- вивчити активність регенеративних процесів в експериментально ушкоджених тканинах ока за впливу трансплантованої аlogenної амніотичної оболонки залежно від способу її застосування;
- провести імунологічні тести на сумісність трансплантованих аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин в організмі тварин-реципієнтів з експериментальним кератитом/увеїтом;
- порівняти з традиційним методом лікування експериментального кератиту/увеїту у тварин ефективність застосування: аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин; аlogenної амніотичної оболонки; екстракту амніотичної оболонки у формі гелю;
- провести клінічні випробування ефективності застосування аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин та амніотичної оболонки 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 аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин і амніотичної оболонки.

Предмет дослідження – показники морфофункціонального стану ока у тварин-реципієнтів за експериментального та спонтанного кератиту/увеїту до та після введення аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин і амніотичної оболонки.

Методи дослідження: клінічні (огляд тварин, тест Шиммера, біомікроскопія щільною лампою, офтальмоскопія, флюорисциновий 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 під впливом аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин та амніотичної оболонки.

Вперше використано в доклінічних випробуваннях ефективність застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин та амніотичної оболонки для лікування кератиту/увеїту спонтанного походження.

Вперше порівняно ефективність різних способів трансплантації алогенних мезенхімальних стовбурових клітин, а саме: введення в тенозовий простір, субкон'юнктивально, інтравітреально та у передню камеру ока. Доведено, що застосування мезенхімальних стовбурових клітин шляхом введення їх в тенозовий простір і 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 використано розроблений автором комплексний метод моделювання експериментального увеїту, який дає змогу отримувати модель кератиту/увеїту з типовими для них змінами в тканинах ока дослідних тварин.

Доведено, що трансплантація алогенних мезенхімальних стовбурових клітин 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 змогу досягти найвищих результатів у відновленні патологічно змінених поверхневих шарів рогівки за кератиту у кролів і собак, про що свідчить повна епітелізація поверхні рогівки ока та зникнення клінічних і морфологічних ознак запальної інфільтрації вже на 30 добу.

Наукову новизну дисертації підтверджено патентами на корисну модель «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».

Практичне значення одержаних результатів. Отримані результати можуть бути використані в експериментальній роботі для подальшого вивчення властивостей алогенних мезенхімальних стовбурових клітин, трансплантованих в організм тварин-реципієнтів, та в клінічній практиці як один із альтернативних методів лікування тварин за кератитів/увеїтів.

Результати експериментальних досліджень з використання алогенних мезенхімальних стовбурових клітин та амніотичної оболонки для відновлення функціональної здатності ока у тварин за кератиту/увеїту засвідчують позитивний ефект від лікування у собак з кератитами/увеїтами спонтанного походження; використовуються в навчальному процесі та наукових дослідженнях кафедр закладів вищої освіти 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 Полтавського державного аграрного

університету; кафедри нормальної і патологічної фізіології тварин Харківської державної зооветеринарної академії; кафедри фізіології та біохімії сільсько-господарських тварин Дніпровського державного аграрно-економічного університету; кафедри 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 дисертації, 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 зі співавторами за їх згодою використано лише ті результати, які одержано особисто здобувачем.

Апробація результатів дисертації. Результати досліджень було апробовано та одержали позитивні відгуки на: XIV Міжнародному конгресі спеціалістів ветеринарної медицини «Охорона здоров'я дрібних домашніх тварин» (м. Бровари, 2016 р.); Міжнародному семінарі з питань аграрної освіти, особливостей підготовки ветеринарних лікарів, основних сучасних проблем ветеринарної медицини у Франції «Дні аграрної освіти і науки Франції в Україні» (м. Київ, 2017 р.); науково-практичній конференції молодих вчених «Стан і перспективи розвитку та інновації в тваринництві, актуальні питання ветеринарної медицини» (м. Новомосковськ, 2018 р.); конференції з підготовки фахівців ветеринарної медицини «Практична складова» (сmt Немішаєве, 2018 р.); Міжнародній науково-практичній конференції «Кліматичні зміни та сільське господарство. Виклики для аграрної науки та освіти» (м. Київ, 2018 р.); XIX Міжнародному практичній ветеринарний семінар «Здоров'я тварин» (м. Київ, 2019 р.); XVI Міжнародній науково-практичній конференції професорсько-викладацького складу, аспірантів і студентів «Актуальні проблеми ветеринарної медицини» (м. Київ, 2019 р.); XVII Міжнародному конгресі спеціалістів ветеринарної медицини «Охорона здоров'я коней» (м. Київ 2019 р.); практичному семінарі щодо здоров'я тварин (м. Ганновер, Федеративна Республіка Німеччина, 2019 р.); міжвідомчих навчально-методичних зборах спеціалістів ветеринарної медицини, кінологічних підрозділів органів державної влади сектору безпеки та оборони України (м. Хмельницький, 2020 р.)

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 анотацій, вступу, 4 розділів, висновків, пропозицій виробництву, списку використаних джерел і додатків. Дисертацію викладено на 189 сторінках. Матеріали дисертації проілюстровано 9 таблицями, 3 схемами та 102 рисунками. Список використаних джерел містить 233 джерела, зокрема 96 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Вибір напрямів досліджень, матеріали та методи досліджень. Дослідження проведено впродовж 2015–2021 рр. в умовах навчально-наукової лабораторії «Центр клітинних технологій у ветеринарній медицині» кафедри хірургії і патофізіології імені академіка І. О. Поваженка Національного університету біоресурсів і природокористування України. Окремі фрагменти досліджень виконано в клініці та НВЛ «Зооцентр» Відокремленого підрозділу Національного університету біоресурсів і природокористування України «Немішаївський фаховий коледж», на базі клінічної лабораторії ДУ «Національний інститут хірургії та трансплантології імені О. О. Шалімова» НАМН України та в Клінічному центрі Університету ТІНО (м. Ганновер, Федеративна Республіка Німеччина).

Дослідження проведено у три етапи (чотири серії досліджень):

- 1) моделювання експериментального кератиту/увеїту у кролів;
- 2) формування дослідних груп, проведення діагностичних досліджень, призначення лікування тварин із експериментальним кератитом/увеїтом.
- 3) клінічні випробування методу застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин для відновлення функціональної здатності ока у собак за спонтанних випадків увеїту та кератиту.

В дослідах використано 90 кролів породи шиншила віком 3,5 місяці 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. Через 24 год після інфікування клітинною культурою у 100 % кролів діагностували бактеріальний кон'юнктивіт. На 3 добу спостерігали нерівномірне помутніння з явищами вогнищевої інфільтрації і набряк строми, а на 7 добу – чітко виражений увеїт, ускладнений бактеріальним кератитом.

Було проведено чотири серії досліджень. У *першій серії досліджень* тварини із експериментальним увеїтом розподілили на сім дослідних груп. Тваринам *першої дослідної групи* застосовували одноразове введення 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в тенозовий простір; тваринам

другої дослідної групи одноразово вводили 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин в субкон'юнктивальний простір; тваринам *третьої дослідної групи* одноразово вводили 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин інтравітреально; тваринам *четвертої дослідної групи* вводили одноразово 1×10^6 млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у передню камеру ока; тваринам *п'ятої дослідної групи* призначили традиційне лікування (щоденне закапування генталайну 0,4 % і ципронорму 4–6 разів на добу); тваринам *шостої дослідної групи (контрольної групи)* закапували ізотонічний розчин 4–6 разів на добу. До того ж від початку і до закінчення дослідів було сформовано також *сьому групу* кролів – інтактні тварини.

У *другій серії досліджень* вивчали ефективність використання амніотичної оболонки за експериментального кератиту та увеїту. З цією метою тварини із експериментальним кератитом розподілили на *шість дослідних груп*. Тваринам *першої дослідної групи* трансплантат (амніотичну оболонку) наносили на ушкоджену рогівку, використовуючи техніку пошарової трансплантації амніотичної оболонки; тваринам *другої дослідної групи* трансплантували амніотичну оболонку методом біологічного покриття; тваринам *третьої дослідної групи* застосовували екстракт амніотичної оболонки з очною лінзою; тваринам *четвертої дослідної групи* призначали традиційне лікування (щоденне закапування генталайну 0,4 % і ципронорму 4–6 разів на добу); тваринам *п'ятої дослідної групи (контроль)* застосовували закапування ізотонічного розчину 4–6 разів на добу; тварини *шостої дослідної групи* – інтактні тварини.

Під час *третьої та четвертої серій досліджень* проводили доклінічні випробування результатів експериментальних досліджень на собаках із клінічними проявами кератиту/увеїту спонтанного походження (клінічні випадки). Вивчали вплив трансплантованих алогенних мезенхімальних стовбурових клітин (за увеїту) та алогенної амніотичної оболонки (за кератиту) на активність відновлювальних процесів у патологічно змінених тканинах ока.

Протягом кожного дослідів проводили щоденний клінічний огляд дослідних тварин для виявлення можливих порушень клінічного стану. На сьомий, чотирнадцятий і тридцятий день після початку лікування здійснювали поглиблене клінічне дослідження із застосуванням інструментальних методів оцінки стану ушкоджених очей (тесту Шиммера, офтальмоскопії, біомікроскопії щілинною лампою, флюорисцинового тесту Зейделя, тонометрії, сонографії), фіксували отримані результати в журналі. Відбирали також проби крові для імунологічного тесту, а також зразки тканин ока для гістологічних досліджень (після виведення тварин із дослідів та їх евтаназії).

Для отримання необхідної кількості алогенних мезенхімальних стовбурових клітин із кісткового мозку та амніотичної оболонки було використано як донорів 3 кролів та одного безпородного пса. Кістковий мозок для отримання мезенхімальних стовбурових клітин відбирали у тварин за методами, розробленими співробітниками Національного університету біоресурсів і природокористування України (Мазуркевич А. Й., Бокотько Р. Р., Савчук Т. Л. та ін. «Клітинні технології у ветеринарній медицині», 2014).

Статистичну обробку отриманих цифрових даних здійснювали за допомогою пакету статистичних програм *Microsoft Excel*.

Результати візуальних досліджень (стан моношару за культивування мезенхімних стовбурових клітин, результати гістологічних досліджень, загальний вигляд тварин та очей) фіксували за допомогою фотоапарата *Samsung Digimax x8*.

РЕЗУЛЬТАТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Морфофункціональні зміни в тканинах ока кролів за експериментального увеїту/кератиту. Через 7 діб після моделювання кератиту/увеїту у тварин виявляли типовий стан запалення рогівки з ознаками помутніння. У всіх групах у всіх кролів було чітко виражено увеїт, ускладнений бактеріальним кератитом, який характеризувався вираженим набряком кон'юнктиви (хемоз) з точковими крововиливами (петехії) та неоваскуляризацією. Клінічний стан очей кролів характеризувався ознаками рогівкового синдрому: світлобоязню, блефароспазмом, слезотечею (епіфорою), зміною кольору райдужки та звуженням зіниці ока. За результатами тонометрії безконтактним способом отримано завищені показники внутрішньоочного тиску, які дорівнювали 35 мм рт. ст. У процесі проведення світлової біомікроскопії у тварин відзначали коагуляційний некроз тканин рогівки та її поверхневий дефект, який фарбувався флюоресцеїном (рис. 1, В). Між камерами ока, внаслідок запалення увеального тракту, підвищеного внутрішньоочного тиску, порушений обмін рідинами супроводжувався опалесценцією вологи передньої камери, що було зумовлено наявністю плаваючих запальних клітин. У деяких випадках виражений екзофтальм внаслідок періорбітального набряку (рис. 1, А, Б).

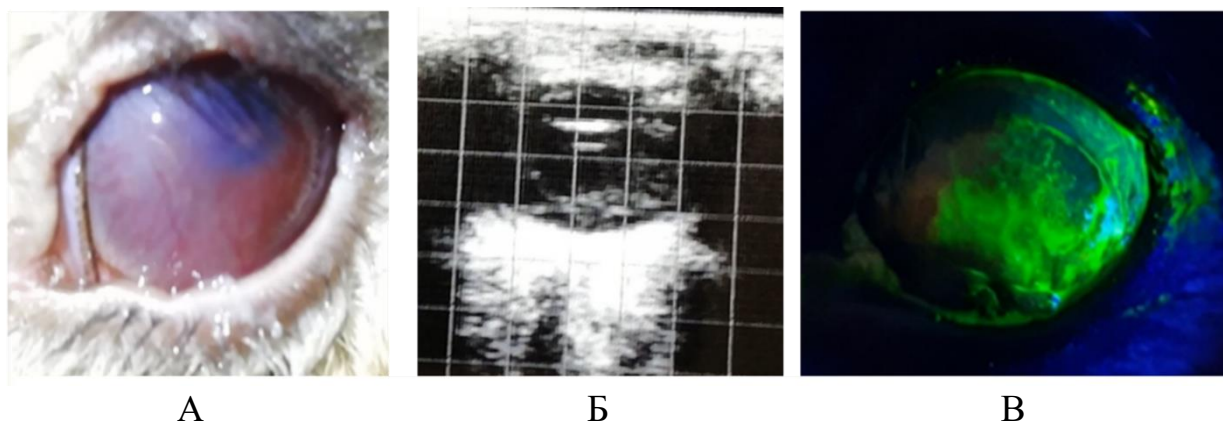


Рис. 1. Око кроля за кератиту/увеїту (вихідний стан): А – зовнішній вигляд; Б – візуалізація за допомогою УЗД; В – за флюоресцеїнового тесту Зейделя

На рис. 1 також видно опалесценцію вологи та значну неоваскуляризацію рогівки, хемоз кон'юнктиви і патологічну епіфору, спостерігали переорбітальний набряк (А), зменшення передньої камери ока, в центрі ока протеїнові преципітати, внутрішню ексудацію, потовщення судинної оболонки та деструкцію скловидного тіла і гіперехогенне світіння (Б).

За результатами гістологічних досліджень в ушкодженій зоні рогівки ока встановлено суттєві порушення мікроструктури всіх шарів передньої камери ока (рис. 2). Виразно проглядається хвилеподібно змінений епітеліальний шар поверхневого епітелію (1, а), відшарування райдужки (середньої судинної оболонки) (2), гіперплазія епітелію та скупчення запального ексудату зі збільшенням кількості фібробластів у зоні запалення (4), відслоювання та руйнування десцеметової оболонки (6), виразне руйнування боуменової оболонки (7).

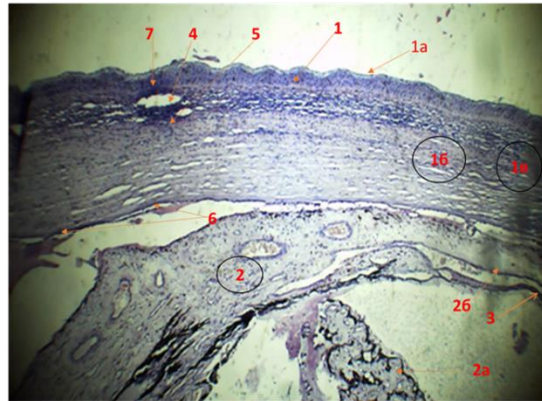


Рис. 2. Мікроскопічна будова рогівки ока кроля за експериментального кератиту/увеїту до введення мезенхімальних стовбурових клітин, Гематоксилін-еозин, $\times 50$

Отже, експериментальний кератит/увеїт у кроля, отриманий внаслідок використання власної методики моделювання, супроводжується типовими для гострого запального процесу проявами зі структурними та, відповідно, функціональними змінами, що підтверджується зміною показників клінічних і лабораторних досліджень.

Стимулюючий вплив алогенних мезенхімальних стовбурових клітин на регенеративні процеси в тканинах ока кроля з кератитом/увеїтом. У тварин першої дослідної групи вже на 30 добу після трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин у тенозовий простір не виявлено запального процесу в оці (рис. 3, А). Відсутні також епіфора і набряк, натомість яскраво виражене відновлення рисунка райдужної оболонки; не простежується опалесценція вологи передньої камери, помітно тільки залишкові помутніння у вигляді білкових преципітатів у ділянці зіниці ока та сухість повік у вигляді лусочок зроговілого поверхневого епітелію шкіри, як наслідок опіку УФ-променями. Методом УЗД підтверджено зникнення періорбітального набряку, що візуалізується анехогенно. Відновлені після деформації, в межах норми, правильна форма та розмір очного яблука. Ще зберігаються точкові ехогенні світіння, які вказують на вміст преципітатів у камері ока (рис. 3, Б). На рис. 3, В показано очне дно за прямої офтальмоскопії, де через прозору рогівку добре видно судинні розгалуження сітківки, без крововиливів і помутнень скловидного тіла, та відсутність ексудації і її набряку.

Проміжний контроль за відновлювальними процесами у патологічно змінених тканинах ока дав змогу встановити високу динаміку структурного та функціонального їх відновлення.

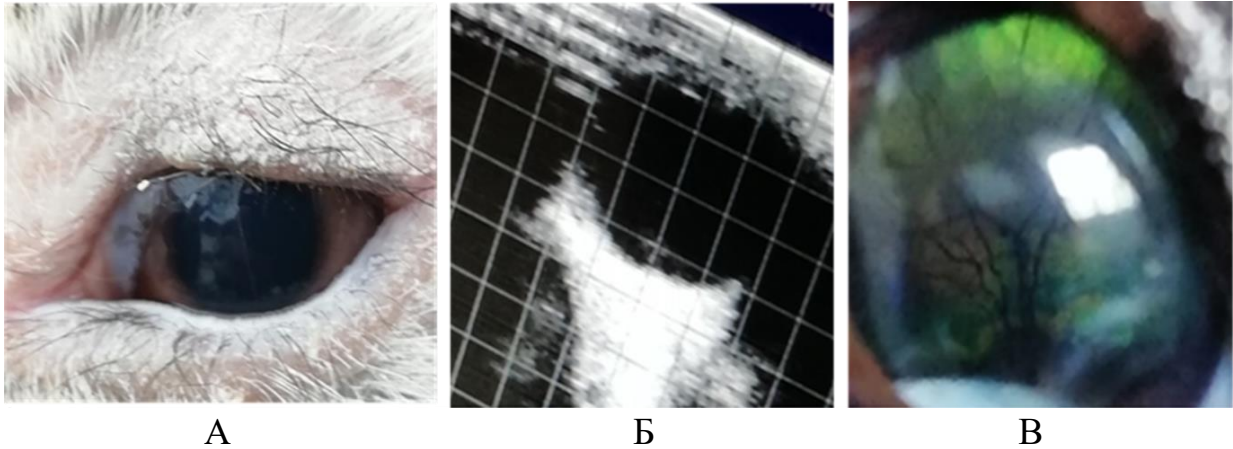


Рис. 3. Око кроля через 30 діб після трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин у тенозовий простір: А – зовнішній вигляд; Б – УЗД-картинка; В – пряма офтальмоскопія

За даними гістологічних досліджень, вже на 7 добу після трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин виявлено чітке структурування переднього епітелію зі зменшенням хвилеподібності епітеліального покриву (рис. 4, А), налагодження структури всіх шарів рогівки, яке відбувається завдяки активній диференціації епітеліоцитів, зменшення товщини її строми (2, 4); спостерігається вирівнювання колагенових фібрил десцеметової оболонки (5) і відновлення боуменової мембрани (6).

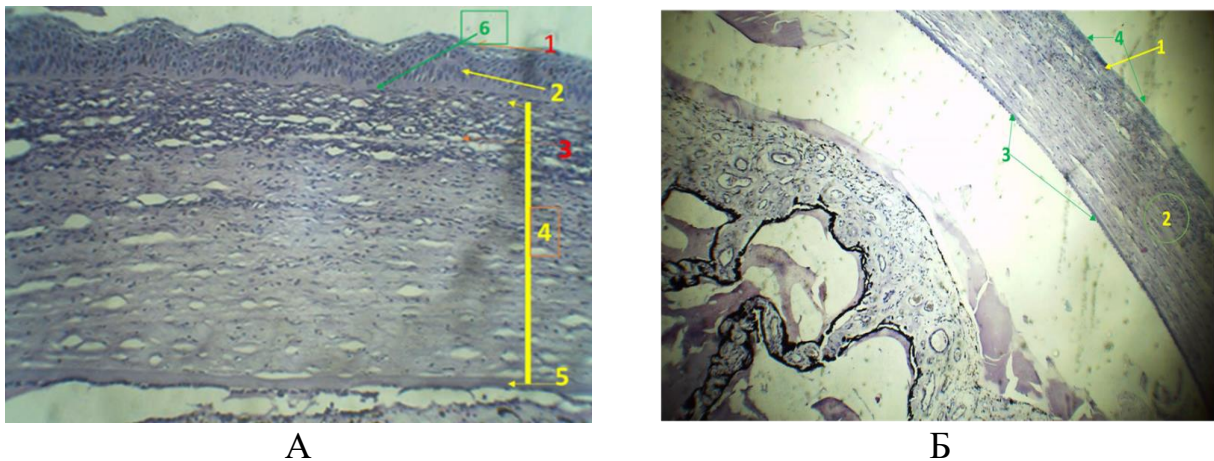


Рис. 4. Око кроля після трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин: А) 7 доба. Гематоксилін-еозин, $\times 100$; Б) 14 доба. Гематоксилін – еозин, $\times 50$

Зміни в рогівці на 14 добу спостережень свідчать про майже повне відновлення структури рогівки (рис. 4, Б). Як видно із рисунка, під шаром майже повністю відновленого переднього епітелію (4) ще є залишки так званих субепітеліальних рубців (1), значно зменшився набряк строми (2), відбувається

практично повне оновлення десцеметової оболонки і шару колагенових фібрил (3).

На 30 добу гістологічно не виявлено жодних наслідків ушкодженості рогівки. Всі шари її в результаті інтенсивної регенерації набувають первинного стану.

На рис. 5 видно багатошаровий плоский відновлений епітелій (передній), що не ороговіває (1), однорідну передню пограничну пластинку (боуменову мембрану) (2), рівно розташовані колагенові волокна у товщі строми (3), регенеровану десцеметову оболонку (4).

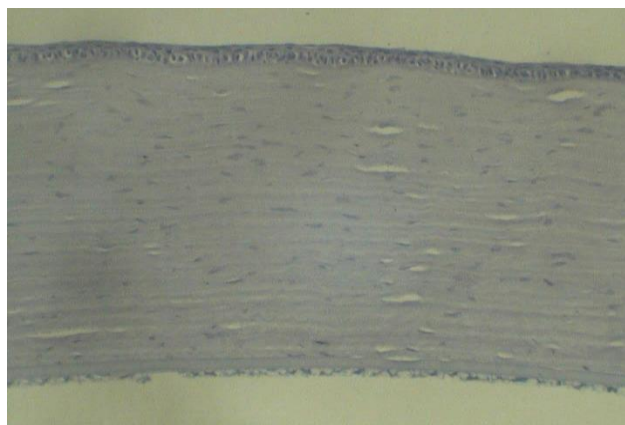


Рис. 5. Око кроля після трансплантації мезенхімальних стовбурових клітин, 30 доба. Гематоксилін-еозин, $\times 100$

У тварин *другої дослідної групи* після введення мезенхімальних стовбурових клітин субкон'юнктивально відновлювальні процеси відбуваються повільніше і з меншою активністю. На рис. 6 бачимо видимі ознаки тотального увеїту (А), де яскраво виражений запальний процес. Після ін'єкції (введення мезенхімальних стовбурових клітин) субкон'юнктивально на 30 добу помітно зникає запальний процес в кон'юнктиві ока та по краю лімба, залишається патологічна неоваскуляризація та скопичення преципітатів у вигляді гіперехогенних включень (Б), що підтверджено ультразвуковою діагностикою.

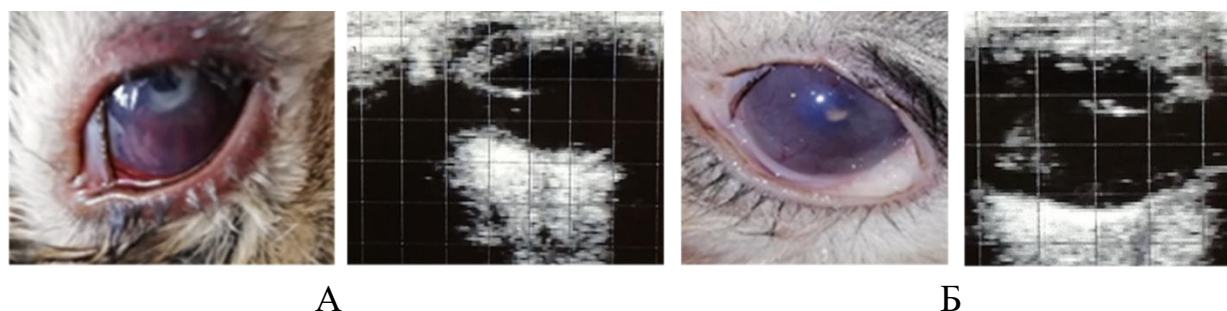


Рис. 6. Око кроля за увеїту до введення мезенхімальних стовбурових клітин (А) і через 30 діб після введення (Б)

У тварин *третьої дослідної групи* з увеїтом після введення мезенхімальних стовбурових клітин інтравітреально не відбувається повного завершення патологічного процесу в оці. Як видно із рис. 7, у вихідному стані, до введення

мезенхімальних стовбурових клітин, зберігається інтенсивна епіфора, хемоз кон'юктиви, світлобоязнь, гіфема по краю лімба, значна неоваскуляризація, звуження зіниці ока внаслідок скопичення гіпопіону в центрі передньої камери ока і значна її опалесценція (А). На УЗД гіперехогенним світінням ілюструється переорбітальний набряк, зменшення та деформація очного яблука, зумовлені накопиченням продуктів запальної реакції у передній камері та по краях орбіти ока. Гіперехогенно візуалізуються екстравазація крові по краях лімбу, що відображає оклюзію судин. Яскравим ехогенним шаром відмічається незначний вивих кришталика, спричинений запальним процесом.

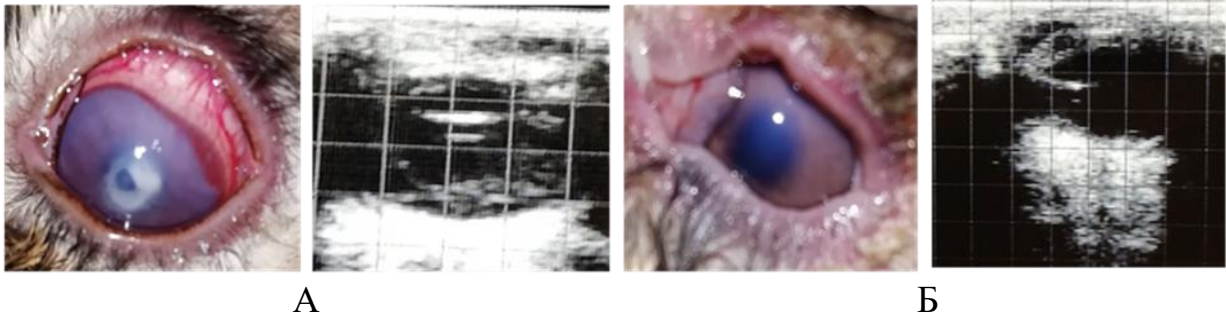


Рис. 7. Око кроля за увеїту з інтерпретацією УЗД до введення мезенхімальних стовбурових клітин інтравітреально (А) та через 30 діб після введення (Б)

Через 30 діб після введення мезенхімальних стовбурових клітин спостерігали залишковий прояв хемозу, зникнення рефлексу на світло, але із залишками епіфори ока та незначним набряком третьої повіки, а також відновлення рисунка райдужки, відсутність його міозу із залишковими явищами помутніння вологи передньої камери, що гарно відображається на УЗД ехогенним яскравим прошарком і акустичним імпедансом розгалуженого світла, зумовленого наявністю залишкових продуктів білкового розпаду внаслідок запальної реакції (Б).

Тваринам *четвертої дослідної групи* вводили алогенні мезенхімальні стовбурові клітини у передню камеру ока. На рис. 8, А видно, що волога передньої камери опалесційована (помутніння внаслідок запалення), райдужна оболонка з розлитим нечітким малюнком, по краю лімба обширний крововилив у передню камеру ока, між рогівкою і райдужкою (гіфема). У центрі зіниці ока гіпопіон, який перешкоджає акомодатії ока і викликає її міоз. Це підтверджується УЗД, за інтерпретацією якого видно відшарування скловидного тіла, що проявляється яскравою ехогенною лінією в задній частині ока. Крововилив проявляється як мутний гіперехогенний матеріал позаду відшарування.

Через 30 діб після введення мезенхімальних стовбурових клітин у передню камеру ока (Б) відсутні будь-які прояви запального процесу, залишаються помітними залишки білкового преципітату, відсутність набряку кон'юктиви, відновлена прозорість рідини передньої камери, що підтверджено ультразвуковою діагностикою, відновлення розміру очного яблука, анехогенне

відображення всіх камер, ехогенний тяж, який вказує на присутність білкового преципітату.

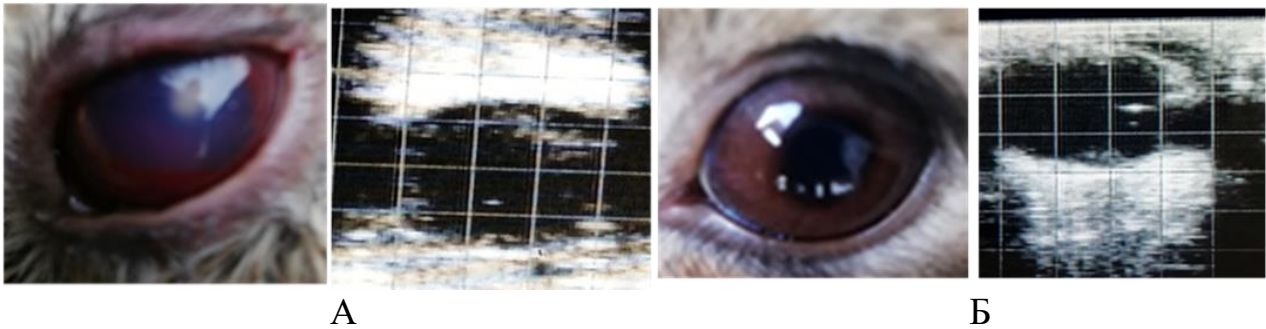


Рис. 8. Око кроля за увеїту з інтерпретацією УЗД до введення мезенхімальних стовбурових клітин у передню камеру ока (А) та через 30 днів після введення (Б)

У тварин *п'ятої дослідної групи*, яким було призначено традиційний спосіб лікування (рис. 9), у вихідному стані діагностовано виражений хемоз кон'юнктиви, скопичення гнійного ексудату, який склеює повіки та викликає помутніння поверхневого шару рогівки (А).

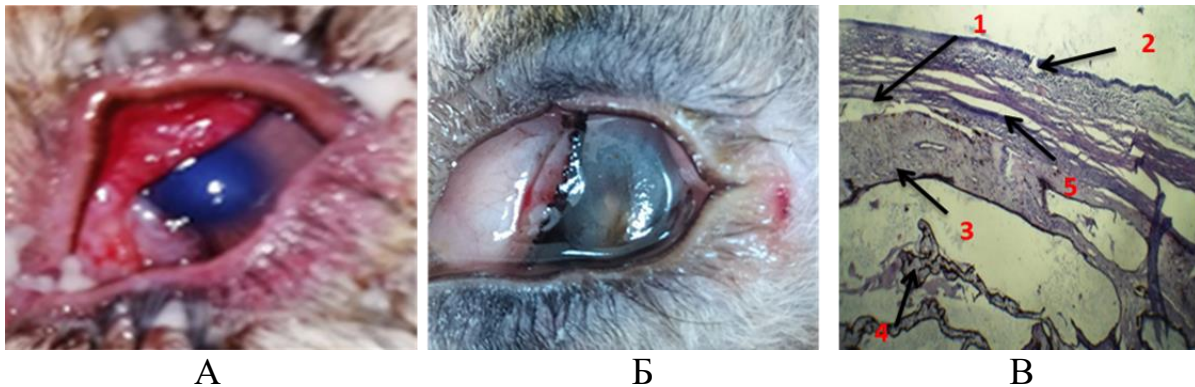


Рис. 9. Око кроля за увеїту до (А) та після (Б, В) традиційного лікування, 30 доба. Гематоксилін-еозин, $\times 50$

На 30 добу після початку лікування у тварин зареєстровано кератомаляцію поверхневого шару рогівки, гіпоплазію третьої повіки, що не дало змогу провести УЗД, яке б могло призвести до ще більшого травмування поверхневих шарів ока або рогівки (Б). У гістозрізах (В) чітко проявляється зруйнована боуменова мембрана (1), ушкоджений поверхневий епітелій (2), гіпоплазована райдужна оболонка (3), частини пошкодженого ціліарного тіла (4) та розшарування волокон строми (5).

У тварин *контрольної групи* (рис. 10) у вихідному стані (А) виявлено гострий проліферативний запальний процес всередині камери, що призвів до заповнення її гнійним ексудатом і плавленням навколишніх тканин. У подальшому спостерігалася активізація адгезії епітелію кон'юнктиви зі стромою рогівки, що призвело до персистуючої ерозії та підвищення подразливості.



Рис. 10. Око кроля за увеїту на контролі: А – вихідний стан; Б – на 30 добу спостережень

За таких умов неминуче зростає висока бактеріальна забрудненість поверхні рогівки, що порушує мікроциркуляцію, зміну метаболічних процесів, призводить до підвищення осмотичного тиску й ацидозу в тканинах. Наслідком таких змін є розвиток некрозу і втрати цілісності структур тканин ока, який на 30 добу спостережень (Б) проявляється у вигляді вторинного обширного запального процесу з охопленням всіх прилеглих до ока тканин і завершується втратою ока, як органа.

Отже, застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин за експериментального кератиту/увеїту кроля достовірно стимулює активність регенеративних процесів у тканинах ока. До того ж найвища ефективність трансплантованих мезенхімальних стовбурових клітин проявляється після введення їх у передню камеру ока та в теноновий простір, безпосередньо в епіцентр запального процесу.

Тваринам *першої дослідної групи* трансплантували алогенну амніотичну оболонку за технікою пошарової трансплантації з фіксацією її на ушкоджену ділянку рогівки вузлуватими швами, використовуючи нитку із поліаміду, 8/00.

На рис. 11 у вихідному стані, відразу після застосування амніотичної оболонки методом пошарової трансплантації на ушкоджену ділянку ока (експериментальний кератит) (А), спостерігали незначну епіфору, помітне помутніння поверхневого епітелію навколо дефекта рогівки, незначну васкуляризацію, виражену світлобоязнь.

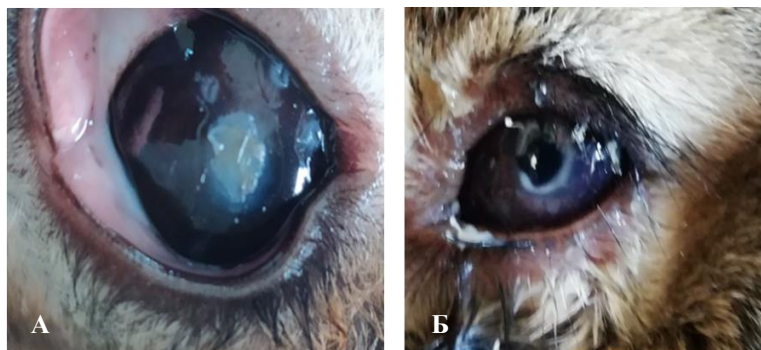


Рис. 11. Око кроля за експериментального кератиту до (А) та через 30 діб після застосування амніотичної оболонки методом пошарової трансплантації (Б): А – вихідний стан; Б – на 30 добу спостережень

Ефективність застосування амніотичної оболонки та її тканинних продуктів за експериментального кератиту у кролів. Тварин із гострим експериментальним кератитом розділили на шість груп.

Тваринам *першої дослідної групи* трансплантували алогенну амніотичну оболонку за технікою пошарової трансплантації з фіксацією її на ушкоджену ділянку рогівки вузлуватими швами, використовуючи нитку із поліаміду, 8/00.

На рис. 12 у вихідному стані, відразу після застосування амніотичної оболонки методом пошарової трансплантації на ушкоджену ділянку ока (експериментальний кератит) (А), спостерігали незначну епіфору, помітне помутніння поверхневого епітелію навколо дефекта рогівки, незначну васкуляризацію, виражену світлобоязнь.



Рис. 12. Око кроля за експериментального кератиту з трансплантацією амніотичної оболонки технікою біологічного покриття (А) та через 30 діб (Б)

У тварин *другої дослідної групи* після нанесення амніотичної оболонки методом біологічної пов'язки на ушкоджену ділянку рогівки ока спостерігали незначні помутніння рогівки в місцях ушкодження, хімоз кон'юктиви, епіфору, виражений міоз зіниці ока (рис. 13, А).

Через 30 діб після нанесення амніотичної оболонки не було виявлено жодних ознак запального процесу. Реакція ока на світло була безболісною, з рефлекторною відповіддю звуження зіниці ока. У центрі очного яблука, на місці дефекту рогівки, залишалося незначне помутніння (наслідок деепітелізації пошкодженої ділянки), яке поступово зникало. Амніотична оболонка була повністю лізована (Б).

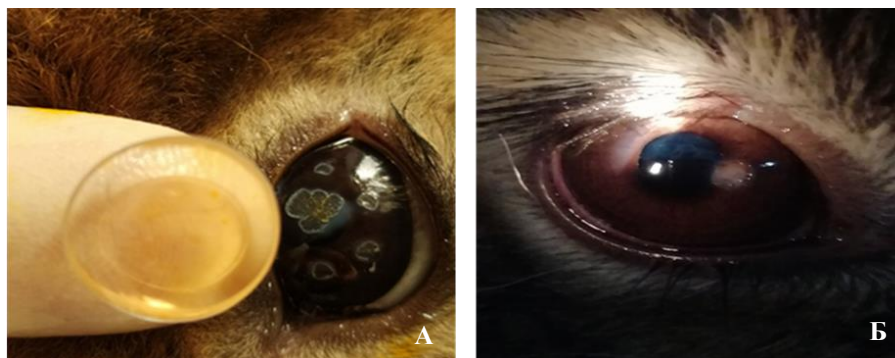


Рис. 13. Око кроля за експериментального кератиту: А – нанесення гомогенату амніотичної оболонки у формі геля; Б – на 7 добу після аплікації

Тваринам *третьої дослідної групи* із експериментальним кератитом (рис. 13) зі значними ушкодженнями рогівки наносили очний гель під третю повіку з використанням очної лінзи (А).

На 7 добу після нанесення гелю зафіксовано задовільний стан очного яблука: помітні лише залишкові явища у місцях найбільш значних уражень рогівки і повна відсутність її дефекту в менш ушкоджених ділянках, які ближче до лімбальної зони. Видимих клінічних ознак наявності запального процесу не виявляли. У клінічних дослідженнях показовим був флюоресцеїновий тест Зейделя, який міг вказувати на масштаб ушкодження рогівки ока.

Загальний стан змін у тканинах ока тварин *четвертої* (традиційне лікування) та *п'ятої дослідної* (контроль) груп був аналогічним, як відповідно у тварин цих груп у першій серії досліджень.

Отже, застосування багатої на стовбурові клітини амніотичної оболонки для відновлення функціональної здатності ушкодженої рогівки ока показало високий лікувальний ефект. Вищий лікувальний ефект отримали після застосування амніотичної оболонки методом біологічної пов'язки, а також нанесення гомогенату амніотичної оболонки у формі очного гелю за допомогою лінзи під третє повіку.

Доклінічні випробування результатів експериментальних досліджень на собаках. Вивчали ефективність застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин, а також амніотичної оболонки для стимуляції активності відновлювальних процесів у тканинах ока тварин за кератиту та увеїту спонтанного походження.

Ефективність застосування алогенних мезенхімальних стовбурових клітин за увеїту. Хворим тваринам після проведення діагностичних досліджень і встановлення діагнозу вводили $1,5 \times 10^6$ млн алогенних мезенхімальних стовбурових клітин безпосередньо в теноновий простір ока.

На рис. 14 у вихідному стані (А) видно повне помутніння волиги передньої камери ока, вільно плаваючі протеїнові залишки запальних клітин. Зареєстровано значне підвищення внутрішньоочного тиску, що вказує на наявність гострої запальної реакції. Спостерігали також блефароспазм і світлобоязнь.

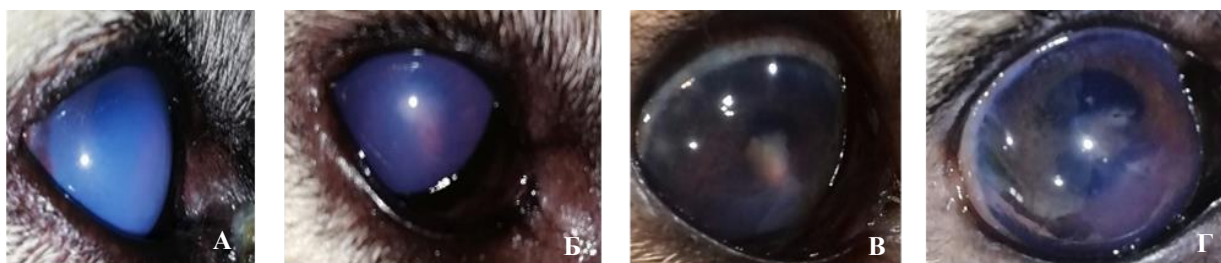


Рис. 14. Око собаки за увеїту до (А) та після трансплантації алогенних мезенхімальних стовбурових клітин через 7 (Б), 14 (В) та 30 (Г) діб

Через 7 діб (Б) після трансплантації алогенних мезенхімальних стовбурових клітин у теноновий простір реєструються зміни кольору вмісту передньої камери ока, яка була опалесційована. Зібрання вільно плаваючих

клітин в один білковий згусток у центрі зіниці ока. Фіксували також зменшення вмісту внутрішньої ексудації.

Через 14 діб (В) видно повне освітлення вологи передньої камери з незначною васкуляризацією і білковим згустком у центрі зіниці ока. Встановлено також відсутність блефароспазму та світлобоязні, значне зниження внутрішньоочного тиску.

Через 30 діб (Г) спостерігається повне освітлення очної рідини, що дає змогу провести повне клінічне обстеження органа, яке вказує на відсутність запальної інфільтрації та внутрішньої ексудації, на нормалізацію очного тиску за тонометрії. Також були помітними лише незначні хмароподібні скупчення білкових преципітатів майже прозорої структури.

Досліди із введенням аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин у передню камеру ока. Після проведення діагностичних досліджень і встановлення діагнозу трансплантували $1,5 \times 10^6$ млн аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин у передню камеру ока.

На рис. 15 чітко відображаються ознаки переднього увеїту (А) з характерною чітко вираженою запальною інфільтрацією, обширною гіфемою, яка, візуалізувалася між рогівкою та райдужною оболонкою, навколо значного гнійного скупчення продуктів розпаду тканин запального процесу, що призвело до екзофтальму. Було встановлено значне підвищення внутрішньоочного тиску.

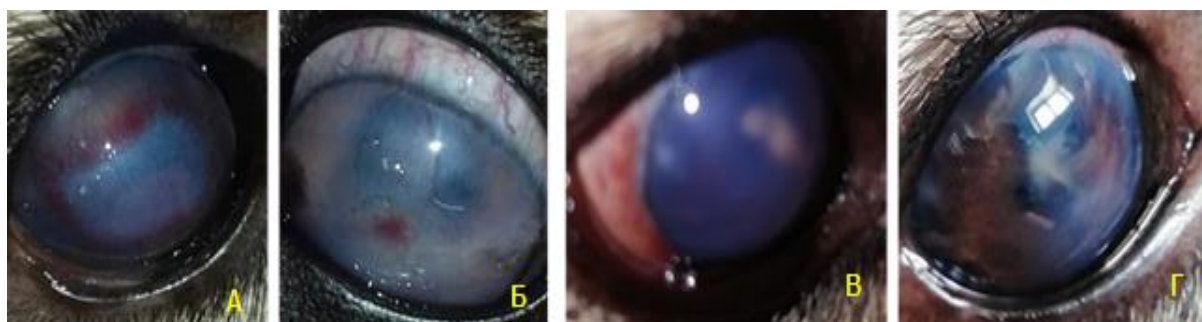


Рис. 15. Око собаки за увеїту до трансплантації аlogenних мезенхімальних стовбурових клітин (А) та через 7 (Б), 14 (В) та 30 (Г) діб

Через 7 діб (Б) виявили незначне посвітління передньої камери ока, зменшення кількості білкових преципітатів, але ще спостерігалася значна васкуляризація і високий очний тиск, що супроводжувався блефароспазмом та світлобоязністю.

Через 14 діб (В) зареєстровані суттєві зміни, які супроводжувалися зменшенням мінімального ступеня екзофтальму, зменшеним в об'ємі протеїнового преципітату у вигляді щільного згустка; зберігалася значна опалесценція вологи передньої камери ока.

Через 30 діб (Г) виявлено значні покращення органу за візуального спостереження; відсутні ознаки запального процесу. Спостерігалися лише хмароподібні, невеликих розмірів білкові включення у передній камері.

Застосування амінотичної оболонки для лікування кератомаляції рогівки ока. На рис. 16 (А) представлено загальний вигляд ока, ушкодженого внаслідок

термічного опіку. Запальний процес ускладнився руйнуванням поверхневих шарів рогівки – кератомалациєю рогівки.

На 7 добу після трансплантації амніотичної оболонки фіксували зниження активності запального процесу, припинення продуктів запалення в кон'юнктивальній порожнині і трансплантовану амніотичну оболонку, яка частково лізована в лімбальній зоні ока (Б).

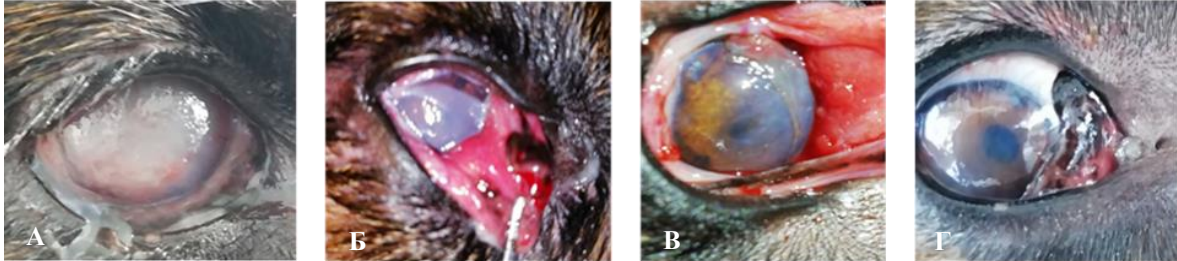


Рис. 16. Око собаки за кератомалациєю рогівки (А), на 7 (Б), 14 (В) та 30 (Г) добу після трансплантації амніотичної оболонки

Через 14 діб після трансплантації амніотичної оболонки зареєстровано частково лізовану амніотичну оболонку, просвітлення відновлених шарів рогівки, що давало змогу візуалізувати чіткий малюнок райдужки ока (Б). У місцях проходження шовного матеріалу по краю лімба виявляли грануляційні тканини, оточені точковими крововиливами, що незначною мірою спостерігалось на внутрішній поверхні третьої повіки.

Через 30 діб після трансплантації амніотичної оболонки фіксували повне відновлення поверхневого шару рогівки від склери до центру ока, без ознак запального процесу, з відновленням всіх зорових функцій тварини, які були підтверджені клінічно-діагностичними дослідженнями.

Застосування очного гелю з вмістом гомогенату амніотичної оболонки. На рис. 17 зображено епітеліальну дистрофію, що була встановлена після проведення клінічних досліджень та проявлялася патологічною неоваскуляризацією рогівки ока і хмароподібним помутнінням по всій її поверхні і в центрі ока, відмічалася повна непрозорість білого кольору (А).



Рис. 17. Око собаки з епітеліальною дистрофією у вихідному стані (А) та після застосування очного гелю на 14 (Б) та 30 (В) добу

Згодом зник патологічний ріст судин у шарах рогівки ока, з'явилося просвітління ближче до склери і початок деепітелізації в центрі найбільш

глибшого пошкодження. На 14 добу (Б) спостерігалось залишкове хмароподібне включення в центрі ока, де було найглибше враження, яке не фарбувалося флюоресцеїном. Через 30 діб після застосування очного гелю рогівка мала ознаки відновлення її структури та функції: видно повне відновлення прозорості тканин рогівки з незначним залишковим помутнінням без ознак рубцювання і повним відновленням функції зору, що вказує на повне відновлення всього поверхневого шару рогівки (В).

Отже, використання амніотичної оболонки, яка містить мезенхімальні стовбурові клітини, для відновлення ушкодженої рогівки ока дає високий лікувальний ефект і після відповідного клінічного випробування може використовуватися із лікувальною метою.

ВИСНОВКИ

Дисертацію присвячено вирішенню 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 тенозовий 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 мезенхімальних стовбурових клітин та амніотичної оболонки 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 амніотичної оболонки та екстракту гомогенізованої амніотичної оболонки 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»;

– «Спосіб відновлення рогівки ока у собак та котів за ерозій, виразок та хімічних опіків, за допомогою амніотичної оболонки плода».

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

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. Вип. 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 дегенеративних 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., Благий Р. С., Граборенко Н. І., Кристиняк Ю. М. 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 Transplantation. 2020. Vol. 8 (2). URL: <http://transplantation.org/2020-8-2-en/article-06/>. *(Здобувачем проведено аналіз наукових джерел з проблеми досліджень).*

Патенти 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. № u 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 А61К35/545 (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. *(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. Стан і перспективи розвитку та інновації в тваринництві, актуальні питання ветеринарної медицини: науково-практична конференція молодих вчених, м. Новомосковськ, 25 квітня 2018 року: тези доповіді. Новомосковськ, 2018. С. 125.

10. Шупик О. В. Застосування стовбурових клітин в тварин за увеїту. Конференція з підготовки фахівців ветеринарної медицини. Практична складова, смт Немішаєве, 30–31 травня 2018 року: тези доповіді. Немішаєве, 2018. С. 119.

АНОТАЦІЯ

Шупик А. 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 зі спеціальності 16.00.02 «Патологія, онкологія і морфологія тварин». Національний університет біоресурсів і природокористування України. Київ, 2021.

Дисертацію присвячено вивченню морфофункціональних змін в оці тварин експериментального та спонтанного характеру, а також впливу на активність відновлювальних процесів залежно від способу введення мезенхімальних стовбурових клітин.

Наведено результати макроскопічних і клінічних досліджень (тесту Шиммера, офтальмоскопії, біомікроскопії щілинною лампою, флюоресцеїнового тесту Зейделя, тонометрії, сонографії) на 7, 14, 30 добу після початку лікування та гістологічних досліджень після виведення тварин з експерименту.

За введення алогенних мезенхімальних стовбурових клітин (за увеїтів, експериментального кератиту, ерозій, виразок) спостерігається активізація та прискорення репаративних процесів, починаючи вже з 7 доби експерименту, після трансплантації алогенних мезенхімальних стовбурових клітин, які вводили різними шляхами, залежно від патологічного процесу. За цих умов відбувається значне відновлення експериментально пошкодженої тканини ока, і вже на 30 добу експерименту мікроструктура ока була досить наближеною до такої в нормі.

Доведено, що за клінічних випадків у собак із увеїтами/кератитами, виразками, ерозіями спостерігається значне видужання (відновлення тканин) вже на 30 добу, яке фіксувалося клінічно за допомогою тесту Шиммера, біомікроскопії щілинною лампою, флюоресцеїнового тесту Зейделя, тонометрії, сонографії на 7, 14, 30 добу після початку лікування травм очей.

Ключові слова: мезенхімальні стовбурові клітини, око, репаративний процес, клітинний матеріал, амніотична оболонка, увеїт, експериментальний кератит, дегенеративні процеси.

АННОТАЦІЯ

Шупик А. В. Морфофункциональные изменения в поврежденных тканях глаза животных и активность репаративных процессов при воздействии стволовых клеток. – Квалификационный научный труд на правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата ветеринарных наук по специальности 16.00.02 «Патология, онкология и морфология животных». Национальный университет биоресурсов и природопользования Украины. Киев, 2021.

Диссертация посвящена изучению морфофункциональных изменений в глазу животных экспериментального и спонтанного характера, а также влиянию на активность восстановительных процессов в зависимости от способа введения мезенхимальных стволовых клеток.

Приведены результаты, макроскопических, клинических исследований (теста Шиммера, биомикроскопии щелевой лампой, флюорисцинового теста Зейделя, тонометрии, сонографии) на 7, 14, 30 сутки после начала лечения и гистологических исследований после вывода животных с эксперимента.

При введении аллогенных мезенхимных стволовых клеток (при увеите, экспериментальном кератите, эрозиях, язвах) наблюдается активизация и ускорение репаративных процессов, начиная уже с 7 суток эксперимента после трансплантации аллогенных мезенхимных стволовых клеток, которые вводили разными путями, в зависимости от патологического процесса. При этих условиях происходит значительное восстановление экспериментально поврежденной ткани глаза, и уже на 30 сутки эксперимента микроструктура глаза была достаточно приближенной к таковой в норме.

Доказано, что при клинических случаях у собак и кошек с увеитами/кератитами, язвами, эрозиями наблюдается значительное выздоровление (восстановление тканей) уже на 30 сутки, которое фиксировалось клинически с помощью теста Шиммера, биомикроскопии щелевой лампой, флюорисцинового теста Зейделя, тонометрии, сонографии) на 7, 14, 30 сутки после начала лечения травм глаз.

Ключевые слова: мезенхимные стволовые клетки, глаз, репаративный процесс, клеточный материал, амниотическая оболочка, увеит, экспериментальный кератит, дегенеративные процессы.

ANNOTATION

Shupyk O. V. Morphofunctional Changes in the Damaged Tissues of the Eye of Animals and the Activity of Reparative Processes Under the Influence of Stem Cells. – The qualification scientific work on the rights of the manuscript.

Dissertation for the degree of candidate of veterinary sciences on specialty 16.00.02 «Pathology, Oncology and Morphology of Animals». National University of life and environmental sciences of Ukraine. Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to the study of the nature of morphofunctional changes in the eye of experimental and spontaneous nature, as well as the influence on the activity of regenerative processes depending on the method of introduction of mesenchymal stem cells.

The results of macroscopic, clinical studies (Schimmer test, ophthalmoscopy, slit lamp biomicroscopy, fluorescent Seidel test, tonometry, sonography) for 7, 14, 30 days after treatment and histological examination after withdrawal of animals from the experiment.

With the introduction of allogeneic mesenchymal stem cells (to eliminate experimental keratitis, erosion, ulcer) is the activation and border repair of relative

processes, starting with 7, the experiment is obtained after transplantation of allogeneic mesenchymal stem cells, called different washers. there is a significant recovery of experimentally damaged eye tissue and for 30 days of the experiment the microstructure of the eye should be close to normal.

It is proved that in clinical cases in dogs with conditions/keratitis, ulcers, erosions, there is a significant recovery (tissue repair) for 30 days, which was recorded clinically using (Schimmer test, slit lamp biomicroscopy, fluorescein Seidel test, sono on 7, 14, 30 days after the start of treatment of eye injuries.

For the first time, the effectiveness of various methods of allogeneic mesenchymal stem cells was tested, namely: introduction into the tenon space, subconjunctival, intravitreal, anterior chamber of the eye, as well as various techniques of amniotic membrane application (layer-by-layer transplantation technique, biological bandage, application shell). With the introduction of allogeneic mesenchymal stem cells into the tenon space and the use of the amniotic membrane at the site of experimental damage to the animal's eye, the regeneration process is more intense than after other methods of allogeneic mesenchymal stem cells.

The obtained research results can be used in the scientific field to deepen knowledge about the influence of stem cells on regenerative processes in the eye of animals and in clinical practice for spontaneous manifestations, as one of the alternative methods of treating animals for eye tissue damage, and in educational work to study features. regeneration of eye tissues in animals under the influence of allogeneic mesenchymal stem cells.

The influence of allogeneic mesenchymal stem cells on the activity of regenerative processes in the eyes of rabbits and dogs with uveitis/keratitis 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 (layerbylayer 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 and 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.

It was found that the activity of regenerative processes in animals with experimental keratitis / uveitis depends on the method of introduction of mesenimal stem cells. The highest activity of regenerative processes according to the indicators of sonographic research methods, slit light biomicroscopy and tonometry, which were confirmed histologically, are 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 the most effective way to regenerate damaged superficial 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 epithelialization 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.

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.

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

Key words: mesenchymal stem cells, reparative process, cellular material, amniotic membrane, uveitis, experimental keratitis, degenerative processes.

Підписано до друку 05.04.21
Ум. друк. арк. 1,6
Наклад 100 прим.

Формат 60x84\16
Зам. № 210223

Віддруковано у редакційно-видавничому відділі НУБіП України
вул. Героїв Оборони, 15, Київ, 03041
тел.: 527-81-55

