

УДК 617.713-001.31-091.8-085.361-092.9  
DOI: 10.24061/1727-0847.22.2.2023.16

**С. М. Шмир, С. Б. Крамар\***

*Кафедри отоларингології, офтальмології та нейрохірургії (зав. – проф. О. І. Яшан); \*гістології та ембріології (зав. – проф. З. М. Небесна) Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України*

## **МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ РОГІВКИ КРОЛІВ У ПІЗНІ ТЕРМІНИ ПІСЛЯ МОДЕЛЮВАННЯ МЕХАНІЧНОЇ НЕПРОНИКАЮЧОЇ ТРАВМИ РОГІВКИ ТА ЗА УМОВ ЇЇ КОРЕКЦІЇ ДЕЦЕЛЮЛЯРИЗОВАНОЮ СТРОМОЮ КСЕНОРОГІВКИ**

**Резюме.** Глобальна частота випадків втрати зору оцінюється в 36 мільйонів на рік, а однією з п'яти головних причин цього є травмування чи захворювання, що вражають рогівку ока. Пошкодження рогівки в ряді випадків вимагають хірургічного втручання із застосуванням ксенотрансплантатів.

**Мета.** Дослідити особливості морфологічних змін рогівки кролів у динаміці експериментальної механічної непроникаючої травми рогівки та при її корекції децелюляризованою стромою ксенорогівки.

**Матеріал і методи.** Експерименти виконано на кролях виду Шиншила із дотриманням правил біоетики. Тварини були розподілені на три групи: I – тварини без змодельованої патології, II – тварини, яким моделювали механічну непроникаючу травму рогівки, III – тварини з травмою рогівки, яким проводили хірургічну корекцію з використанням строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації. Виведення тварин з експерименту проводилося через 14 та 28 діб від початку моделювання патології. Кролям другої та третьої групи у верхній половині рогівки обох очей під місцевою анестезією наносили концентричну епітеліальну насічку, в межах якої одноразовим офтальмологічним скальпелем видаляли передній епітелій разом з верхнім шаром строми рогівки. Кролям третьої групи проводили корекцію травми рогівки шляхом закриття дефекту децелюляризованою стромою ксенорогівки свині. Для гістологічного дослідження шматочки рогівки обробляли згідно загальноприйнятої методики. Парафінові зрізи рогівки забарвлювали гематоксилином та еозином. Морфометрично визначали товщину переднього епітелію рогівки у центральній та крайовій ділянках травмування, товщину строми та товщину рогівки загалом. Достовірність різниці між даними визначалася при нормальному розподілі за t-критерієм Стьюдента. Різниці вважалися достовірними при значенні  $p < 0,05$ .

**Результати.** Морфометрично досліджено динамічне наростання товщини переднього епітелію у маргінальних зонах до  $103,49 \pm 5,17$  мкм на 14 добу досліду, що більше у 1,44 раза ( $p < 0,001$ ) порівняно з показником норми, а товщини рогівки, з максимальним значенням у цей же термін, до  $759,42 \pm 27,12$  мкм, що перевищувало інтактний показник у 2,39 раза ( $p < 0,001$ ). На 28 добу експерименту за умов моделювання механічної травми на мікроскопічному рівні виявлено закриття дефекту епітелієм середньою товщиною  $60,27 \pm 2,01$  мкм з нерівним рельєфом базальної поверхні та ділянками відшарування від власної речовини рогівки. У верхніх шарах строми мікроскопічно виявлені ознаки дозрівання молодого сполучної тканини з наявністю клітин фібробластичного та лейкоцитарного ряду, капілярів та невпорядкованою орієнтацією колагенових волокон. Морфометрично на 28 добу товщина власної речовини рогівки тварин другої групи достовірно ( $p < 0,001$ ) більша за показник норми, проте в 1,56 раза менша порівняно з 14 добою експерименту. Мікроскопічно та морфометрично встановлено, що за умов застосування децелюляризованої рогівки свині для корекції механічної травми рогівки гіперплазія епітелію крайових ділянок найбільш виражена на 14 добу  $126,37 \pm 5,06$  мкм, результатом чого було закриття дефекту добре структурованим епітеліальним регенератом  $35,20 \pm 1,07$  мкм без ділянок відшарувань. Дані морфометричні параметри достовірно ( $p < 0,001$ ) перевищували аналогічні у рогівці групи тварин без корекції. У цей же термін зафіксовано домінування у грануляційній тканині клітин фібробластичного ряду та відсутність морфологічних проявів запалення. Гістологічно досліджено, що застосування децелюляризованої рогівки свині через 28 діб після корекції забезпечує відновлення типової структури рогівки з наближенням морфометричних показників до групи інтактних тварин. На відміну від другої

дослідної групи, де корекція не проводилася, оновлений передній епітелій центральної зони рогівки тварин третьої групи мав чітку диференціацію на шари, рівний рельєф базальної поверхні та контуровану мембрану Боумена, а його товщина  $54,19 \pm 2,09$  мкм недостовірно відрізнялася від показника норми. У цей термін досліду при застосуванні корекції у строми гістологічно виявлено зрілу сполучну тканину та поодинокі капіляри в стані редукції, у той час як у рогівці тварин другої дослідної групи ще часто прослідковувались явища дозрівання сполучнотканинних компонентів. Мікроскопічно, у власній речовині пучки колагенових фібрил були орієнтовані паралельно, що є одним з факторів, які забезпечують прозорість рогівки.

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

**Ключові слова:** травма рогівки, корекція, децелюляризація, ксеноімплантат.

Глобальна частота виникнення сліпоти оцінюється в 36 мільйонів випадків на рік. Саме травма ока є однією з головних причин повної втрати зору, а також основною причиною його односторонньої втрати в країнах із низьким та середнім рівнем доходу [1-5]. У США близько 3 % всіх звернень до відділення невідкладної допомоги пов'язані з травмою ока, причому, переважна більшість цих звернень пов'язана з пошкодженням рогівки [6, 7]. Ця проблема зазвичай вимагає хірургічного втручання, створюючи значне соціальне та економічне навантаження на суспільство [8, 9]. На жаль, використання донорської рогівки є складним через культурні бар'єри, відсутність освіти або матеріально-технічні проблеми, пов'язані із закупівлею донорської тканини [3, 10]. Також очікується, що зростання поширеності інфекційних захворювань призведе до збільшення дефіциту донорської рогівки [11]. Тому, все частіше для хірургічної корекції травм рогівки застосовують ксеноімплантати [3, 12]. Використання рогівки свиней з цією метою, порівняно з іншими тваринами, має декілька переваг: оптимальні затрати при розведенні тварин, уникнення ряду екологічних та етичних проблем, адже їх м'ясо вживають у їжу, можливість генетичного модифікування для подолання імунних бар'єрів [3, 12, 13]. Трансплантація цілісної ксенорогівки має ризик відторгнення, тому необхідно зменшити її імуногенні властивості. Саме клітини рогівки свиней є основним джерелом ксеноантигенів [14], тому очікується, що її децелюляризація сприятиме зниженню імунної відповіді після трансплантації [15].

**Мета дослідження:** дослідити особливості морфологічних змін рогівки кролів у динаміці експериментальної механічної непроникаючої травми рогівки та при її корекції децелюляризованою строною ксенорогівки.

**Матеріал і методи.** Експерименти виконано на кролях виду Шиншила із дотриманням пра-

вил Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів та з іншою науковою метою [16], а також згідно з Науково-практичними рекомендаціями з утримання лабораторних тварин та роботи з ними [17]. Тварини отримували повноцінне та збалансоване харчування і перебували в належних санітарно-гігієнічних умовах віварію Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.

Відповідно до дизайну дослідження експериментальні тварини були розподілені на три групи:

I – тварини без змодельованої патології;

II – тварини, яким моделювали механічну непроникаючу травму рогівки;

III – тварини з травмою рогівки, яким проводили хірургічну корекцію з використанням строми рогівки свині, отриманої методом децелюляризації;

Виведення тварин з експерименту проводилося через 14 та 28 діб від початку моделювання патології.

Кролям другої та третьої групи у верхній половині рогівки обох очей під місцевою епібульбарною анестезією 0,5 % розчином алкаїну та ретробульбарною анестезією 2 % розчином лідокаїну трепаном наносили концентричну епітеліальну насічку, в межах якої одноразовим офтальмологічним скальпелем видаляли передній епітелій разом з верхнім шаром строми рогівки.

Кролям третьої групи проводили корекцію травми рогівки шляхом закриття дефекту децелюляризованою строною ксенорогівки свині, пришиванням її в 4 місцях (на 3, 6, 9 та 12 години) до склери через кон'юнктиву за допомогою атравматичної голки 8/0 нейлон. Впродовж восьми діб після операції тваринам проводилася інстиляція розчину антибіотика фторхінолонового ряду – (1 крапля 3 рази на день). Децелюляризацію строми ксенорогівки свині проводили шляхом її об-

робки 0,5 % розчином додецилсульфату натрію та, у подальшому, ультразвуком з наступною інкубацією за присутності 0,1 % розчину папаїну.

Для гістологічного дослідження шматочки роги́вки фіксували впродовж ночі в 10 % нейтральному забуференому формаліні. Обробку тканини проводили в гістопроесорі LOGOSone (Milestone, Італія). Парафінові зрізи роги́вки фарбували гематоксиліном та еозином [18], оцінювали за допомогою світлового мікроскопа Nikon Eclipse Si-E (Nikon, Японія) та фотодокументували цифровою камерою Sigeta M3CMOS 14000.

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

Для всіх величин були обчислені значення середнього арифметичного (M), похибки середнього арифметичного (m) і стандартне відхилення ( $\sigma$ ). Достовірність різниці між даними визначалася при нормальному розподілі за t-критерієм Стьюдента. Різниці вважалися достовірними при значенні  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження та їх обговорення.** Гістологічні дослідження препаратів роги́вки першої інтактної групи тварин засвідчили відповідність її структури загальновідомій морфології цього компоненту очного яблука. Мікроскопічно візуалізувалось п'ять шарів роги́вки: передній епітелій, що лежить на мембрані Боумена (передній пограничний пластинці), власна речовина (строма), яка мембраною Десце́ме (задньою пограничною пластинкою) відмежована від заднього епітелію (ендотелію) (рис. 1).

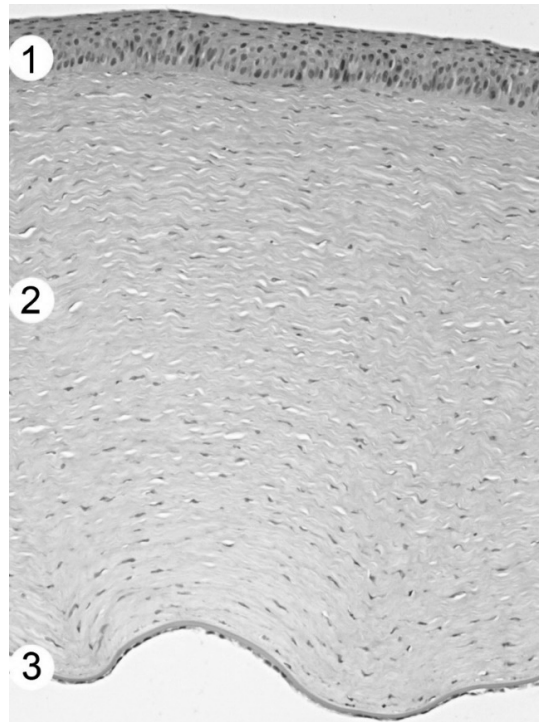


Рис. 1. Мікроскопічна структура роги́вки інтактної групи тварин: 1 – передній епітелій; 2 – власна речовина роги́вки; 3 – задній епітелій. Зabarвлення гематоксиліном та еозином. Мікрофотографія  $\times 100$

Передній епітелій роги́вки представлений багатошаровим плоским незроговілим епітелієм, що складається з трьох шарів клітин різної форми. Його товщина у інтактної групи тварин складала  $52,25 \pm 1,89$  мкм, а у ділянці лімба, де розташовані стовбурові клітини –  $71,64 \pm 2,57$  мкм (табл. 1). Боуменова мембрана, що побудована з колагенових фібрил та протеогліканів, мала гомогенну еозинофільну структуру. Під нею виявляли власну речовину роги́вки, що побудована з щільної сполучної тканини. Її товщина у першої дослідної групи тварин становила  $318,14 \pm 13,87$  мкм (див. табл. 1).

Колагенові фібрили строми роги́вки інтактних тварин груповані у чисельні пучки та формують щільно прилеглі один до одного хвилеподібні пластинки між якими залягають видовжені кератоцити (фіброцити роги́вки) (див. рис. 1).

Мембрана Десце́ме інтенсивно еозинофільна та гомогенна, рівномірної товщини. На ній розташований одношаровий плоский епітелій (ендотелій передньої камери ока), ядра якого видовжені та гіперхромні. Морфометрично встановлено, що товщина роги́вки тварин інтактної групи становила  $377,72 \pm 16,78$  мкм (див. табл. 1).

**Динаміка змін товщини структурних компонентів рогівки кролів у пізні терміни після моделювання механічної непроникаючої травми рогівки та її хірургічної корекції (M±m)**

Група тварин		Показник товщини, мкм (n (кількість вимірів) ≥50)			
		переднього епітелію в ділянці ураження	переднього епітелію в маргінальній зоні	власної речовини рогівки	рогівки загалом (центральна ділянка)
Без змодельованої патології		52,25±1,89	71,64±2,57	318,14±13,87	377,72±16,78
Механічна травма рогівки	14 доба	29,88±1,47 ***	103,49±5,17 ***	759,42±27,12***	799,63±29,31 ***
	28 доба	60,27±2,01 **	86,19±1,97 ***	487,26±18,74***	556,96±21,49 ***
Механічна травма рогівки+ хірургічна корекція	14 доба	35,20±1,07 ***##	126,37±5,06 ***##	658,61±27,19***#	703,59±22,96 *** #
	28 доба	54,19±2,09 #	92,13±3,74 ***	423,44±18,55***#	487,39±24,11 ***#

Примітка: \* – відмінності достовірні між групою тварин без моделювання патологічного процесу і тварин, яким моделювали механічну травму рогівки (\* – p<0,05; \*\* – p<0,01; \*\*\* – p<0,001); # – відмінності достовірні між дослідними групами тварин без хірургічної корекції та з хірургічною корекцією у відповідні терміни спостереження (# – p<0,05; ## – p<0,01; ### – p<0,001)

Мікроскопічно через 14 діб після моделювання травми рогівки другій групі тварин у препаратах рогівки виявляли закриття ділянки ураження багатоядерним плоским епітелієм (рис. 2А) середньою товщиною 29,88±1,47 мкм, що достовірно (p<0,001) менша за інтактний показник (див. табл. 1).

Слід зазначити, що товщина епітеліального регенерату була варіабельною. У деяких осередках спостерігали розрив епітелію з ушкодженням грануляційної тканини, що розташовувалась безпосередньо під ним (рис. 2А, 2Б), а у інших – його відсутність через відшарування (рис. 2В). У маргінальних ділянках та зоні лімба товщина переднього епітелію складала 103,49±5,17 мкм, що в 1,44 раза (p<0,001) більше норми (див. рис. 2А, див. табл. 1).

У власній речовині рогівки в цей термін відмічено сформовану грануляційну тканину з численними капілярами, лейкоцитами, клітинами фібробластичного ряду, колагеновими фібрилами (див. рис. 2В). Товщина строми 759,42±27,12 мкм була достовірно (p<0,001) більшою у порівнянні з інтактним показником (див. табл. 1). В цей термін високий показник товщини строми пов'язаний, в основному, з наявністю грануляцій та значного об'єму аморфного компоненту у них, а набряк ко-

лагенових пластинок, що розташовані ближче до заднього епітелію рогівки був значно меншим.

Через 28 діб експерименту у рогівці другої дослідної групи тварин мікроскопічно спостерігали передній багатоядерний незроговілий епітелій середньою товщиною 60,27±2,01 мкм, що більше показника інтактної групи тварин в 1,15 раза (p<0,01) (рис. 3А, див. табл. 1). Такий епітелій характеризувався нерівністю рельєфу базальної поверхні та, відповідно, мембрани Боумена (див. рис. 3А). У деяких ділянках відмічено його нечітку диференціацію на шари. Слід відмітити і слабке з'єднання переднього епітелію та пограничної пластинки з новоутвореною сполучною тканиною, внаслідок чого на мікроскопічному рівні виявлено зони їх відшарування (рис. 3Б). Молода сполучна тканина у верхній шарі рогівки складалася з світло оксифільних колагенових волокон з конгломератами базофільних ядер, що належали клітинам здебільшого фібробластичного ряду та, в меншій мірі, лімфоцитам. Поміж пучками волокон спостерігали і капіляри (див. рис. 3А, рис. 3Б). Товщина строми рогівки в цей термін становила 487,26±18,74 мкм, що в 1,56 раза менше у порівнянні з показником на 14 добу, та все ж достовірно (p<0,001) перевищує показник норми (див. табл. 1).

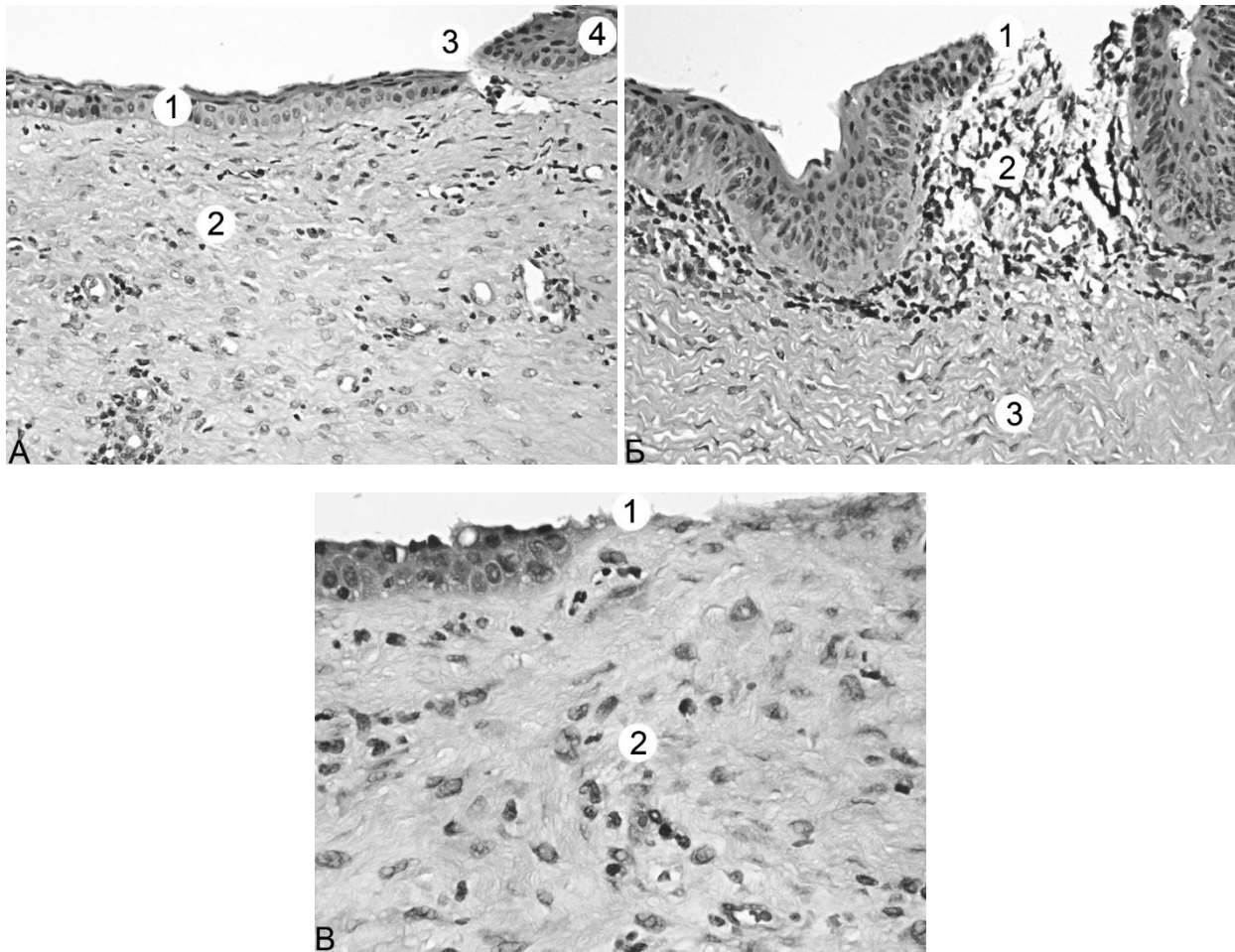


Рис. 2. Рогівка кроля другої експериментальної групи через 14 днів після її механічного травмування. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Мікрофотографії: А (x200). 1 – епітеліальний регенерат, 2 – сформована грануляційна тканина, 3 – розрив епітеліального пласта, 4 – потовищений передній епітелій в маргінальній зоні; Б (x200). 1 – розрив епітеліального пласта, 2 – ушкоджена грануляційна тканина, 3 – строма; В (x400). 1 – пошкоджений епітеліальний регенерат, 2 – грануляційна тканина

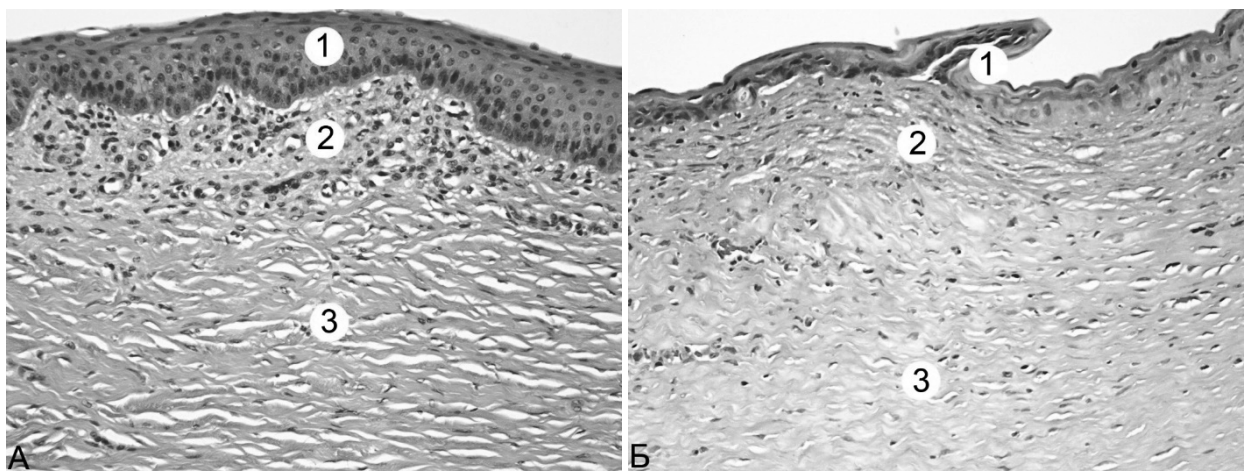


Рис. 3. Мікроскопічний стан рогівки кроля другої дослідної групи через 28 днів від моделювання механічної травми. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Мікрофотографії: А (x200): 1 – передній епітелій, 2 – новоутворена сполучна тканина, 3 – строма; Б (x200): 1 – відшарування епітеліального пласта, 2 – новоутворена сполучна тканина, 3 – строма

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

відшарувань епітелію, а навпаки, добра сформованість Боуенової мембрани та заякореність її компонентів у нижче лежачу сполучну тканину (рис. 4). Строма рогівки у цей термін досліду мала товщину  $658,61 \pm 27,19$  мкм, а це в 2,07 рази більше ( $p < 0,001$ ) за її товщину у інтактних тварин, але у 1,15 рази менше ( $p < 0,05$ ) у порівнянні з показником другої групи. У верхніх шарах власної речовини спостерігали зрілу грануляційну тканину, що складалася з капілярів, фіброblastів, пучків колагенових фібрил та поодиноких лейкоцитів (див. рис. 4).

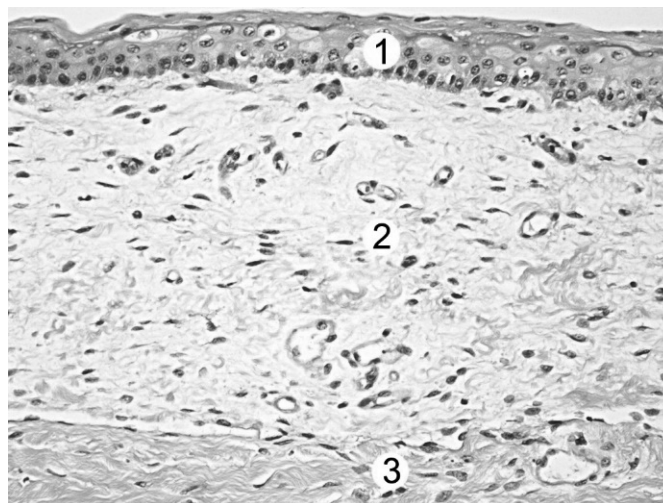


Рис. 4. Центральна ділянка травмованої рогівки кроля через 14 днів після хірургічної корекції: 1 – епітеліальний регенерат, 2 – грануляційна тканина, 3 – колагенові волокна. Забарвлення гематоксилином та еозином. Мікрофотографія  $\times 200$

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

клітин у базальному шарі та багато рядів клітин остистого шару вказують на активну проліферацію епітеліоцитів, які забезпечують регенераторні можливості. У стромі маргінальної зони спостерігали структурно збережені колагенові пластинки та клітини фіброblastичного диферону (рис. 5).

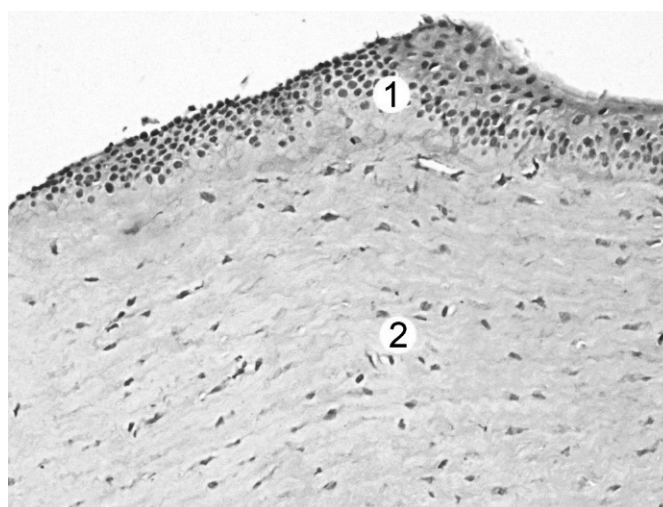


Рис. 5. Крайова зона рогівки кроля на 14 добу після хірургічної корекції із застосуванням децелюляризованої рогівки свині: 1 – потовщений епітелій, 2 – строма. Забарвлення гематоксилином та еозином. Мікрофотографія  $\times 100$

Гістологічні дослідження рогівки тварин третьої групи через 28 днів після хірургічної корекції встановили відновлення її типової структури. Передній епітелій, товщиною  $54,19 \pm 2,09$  мкм, що достовірно не відрізнялася від показника норми (див. табл. 1), складався з трьох шарів клітин. Мембрана Боумена чітко контурована, з рівним рельєфом. Прослідковується міцний контакт епітелію та мембрани з сполучною тканиною, що розташована нижче. Строма рогівки у цей термін досліду вже не містила грануляцій, а складалася з хвилеподібних сполучнотканинних пластинок,

які побудовані з пучків колагенових фібрил та орієнтовані паралельно, а це є одним з факторів, які забезпечують прозорість рогівки. Між ними залягали базофільні кератоцити видовженої форми. Слід зазначити, що у поодиноких ділянках верхньої частини власної речовини рогівки виявляли дрібні крововиливи або капіляри, що редукуються (рис. 6). Товщина стромы рогівки тварин третьої групи на 28 добу складала  $423,44 \pm 18,55$  мкм, що у 1,33 раза ( $p < 0,001$ ) більше показника норми, проте в 1,55 раза менше у порівнянні з її товщиною на 14 добу після корекції (див. табл. 1).

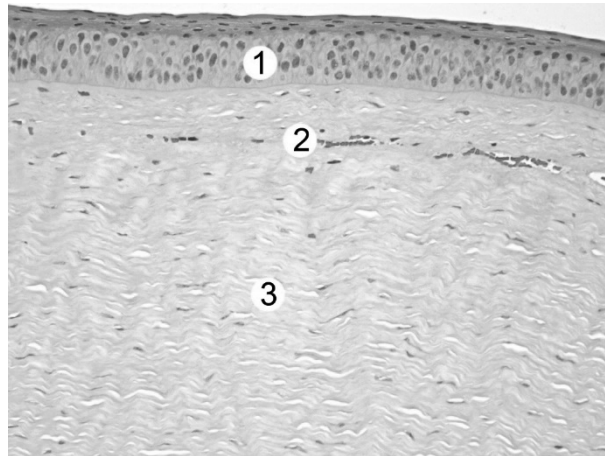


Рис. 6. Гістологічний стан рогівки кроля третьої експериментальної групи на 28 добу після корекції: 1 – передній епітелій, 2 – капіляри в стані редукції, 3 – сполучнотканинні пластинки. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Мікрофотографія  $\times 200$

У периферійних ділянках рогівки в цей термін експерименту передній епітелій залишався потовщеним  $92,13 \pm 3,74$  мкм у 1,29 раза у порівнянні з нормою, але цей параметр мав тенденцію до зни-

ження ( $p < 0,001$ ) (див. табл. 1). Прослідковувалась збереженість диференціації на шари. Строма рогівки у цій зоні мала типову будову без ознак запалення (рис. 7).

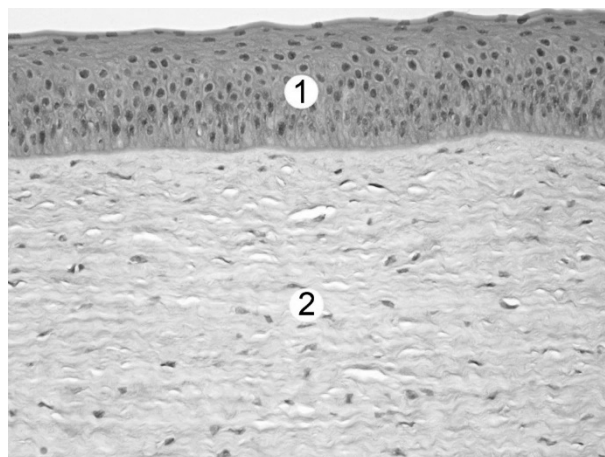


Рис. 7. Мікроскопічний стан крайової ділянки рогівки тварин третьої групи на 28 добу досліду: 1 – передній епітелій, 2 – власна речовина. Забарвлення гематоксиліном та еозином. Мікрофотографія  $\times 200$

**Висновки.** 1. Гістологічно встановлено, що рогівка інтактних тварин, яким не проводили моделювання механічної непроникаючої травми мала типову морфологію та складалася з п'яти шарів: пе-

реднього епітелію, мембрани Боумена, власної речовини, мембрани Десцеме та заднього епітелію. 2. За умов моделювання механічної непроникаючої травми рогівки в пізні терміни експерименту мі-

кроскопічно встановлено формування епітеліального регенерату з нечітко вираженою пошаровою диференціацією, слабким з'єднанням та ділянками відшарувань від набряклої власної речовини рогівки (14 доба) та закриття ним дефекту травмування (28 доба) зі збереженням нерівного рельєфу базальної поверхні та ділянками відшарування від власної речовини рогівки. У верхніх шарах стромі виявлено ознаки дозрівання молодого сполучної тканини з наявністю клітин фібробластичного та лейкоцитарного ряду, капілярів та неупорядкованою орієнтацією колагенових волокон. 3. Мікроскопічно та морфометрично встановлено, що застосування децелюляризованої рогівки свині для корекції механічної травми рогівки покращує динаміку регенерації, пришвидшує дозрівання грануляційної тканини, загоєння дефекту, сприяє структурованості та

відновленню морфології рогівки з максимальною наближеністю до норми. На 14 добу після хірургічної корекції виявлено гіперплазію епітелію крайових ділянок з формуванням добре структурованого епітеліального регенерату без ділянок відшарувань, домінування у грануляційній тканині клітин фібробластичного ряду, зменшення набряку стромі та відсутність морфологічних проявів запалення. Застосування децелюляризованої рогівки свині через 28 діб після корекції забезпечує відновлення типової структури рогівки з наближенням морфометричних показників до групи інтактних тварин.

#### Перспективи подальших досліджень.

Планується вивчення динаміки змін ультраструктури рогівки кролів після моделювання механічної непроникаючої травми та за умов її корекції децелюляризованою ксеностромою.

#### Список використаної літератури

1. Deanna HD, Kamran MR, Dimitrios K. *Treatment of Non-Infectious Corneal Injury: Review of Diagnostic Agents, Therapeutic Medications, and Future Targets. Drugs.* 2022;82:145-67.
2. Li C, Fu Y, Liu S, Yu H, Yang X, Zhang M, et al. *The global incidence and disability of eye injury: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. EClinicalMedicine.* 2023 Aug 9;62:102134. doi: 10.1016/j.eclinm.2023.102134.
3. Yoon CH, Choi HJ, Kim MK. *Corneal xenotransplantation: Where are we standing? Prog Retin Eye Res.* 2021 Jan;80:100876. doi: 10.1016/j.preteyeres.2020.100876.
4. Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV, et al. *Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. Lancet Glob Health.* 2017 Dec;5(12): e1221-e1234. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30393-5.
5. Porth JM, Deiotte E, Dunn M, Bashshur R. *A Review of the Literature on the Global Epidemiology of Corneal Blindness. Cornea.* 2019 Dec;38(12):1602-9. doi: 10.1097/ICO.0000000000002122.
6. Kwok SS, Shih KC, Bu Y, Lo AC, Chan TC, Lai JS, et al. *Systematic Review on Therapeutic Strategies to Minimize Corneal Stromal Scarring After Injury. Eye Contact Lens.* 2019 Nov;45(6):347-55. doi: 10.1097/ICL.0000000000000584.
7. Barrientez B, Nicholas SE, Whelchel A, Sharif R, Hjortdal J, Karamichos D. *Corneal injury: Clinical and molecular aspects. Exp Eye Res.* 2019 Sep;186:107709. doi: 10.1016/j.exer.2019.107709.
8. Almeida HG, Kara-José N, Hida RY, Kara-Junior N. *A 15-Year Review of Corneal Transplant in Brazil. Eye Contact Lens.* 2018;44(2): S376-S381. doi:10.1097/ICL.0000000000000554.
9. Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. *Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. JAMA Ophthalmol.* 2016 Feb;134(2):167-73. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2015.4776. PMID: 26633035.
10. Ugalahi MO, Adebusoye SO, Ohusanya BA, Baiyeroju A. *Ocular injuries in a paediatric population at a child eye health tertiary facility, Ibadan, Nigeria. Injury.* 2023;54(3):917-23. doi: 10.1016/j.injury.2023.01.014.
11. Stern JH, Tian Y, Funderburgh J, Pellegrini G, Zhang K, Goldberg JL, et al. *Regenerating Eye Tissues to Preserve and Restore Vision. Cell Stem Cell.* 2018 Jun 1;22(6):834-49. doi: 10.1016/j.stem.2018.05.013.
12. Choi HJ, Kim MK, Lee HJ, Ko JH, Jeong SH, Lee JI, et al. *Efficacy of pig-to-rhesus lamellar corneal xenotransplantation. Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Aug 22;52(9):6643-50. doi: 10.1167/iovs.11-7273.
13. *Xenotransplantation 2.0. Nat Biotechnol.* 2016 Jan;34(1):1. doi: 10.1038/nbt.3466.
14. Lee JJ, Kim DH, Jang YE, Choi HJ, Kim MK, Wee WR. *The attitude toward xenocorneal transplantation in wait-listed subjects for corneal transplantation in Korea. Xenotransplantation.* 2014;21(1):25-34. doi:10.1111/xen.12069.



15. Hargrave SL, Mayhew E, Hegde S, Niederkorn J. Are corneal cells susceptible to antibody-mediated killing in corneal allograft rejection? *Transpl Immunol.* 2003 Jan-Mar;11(1):79-89. doi: 10.1016/S0966-3274(02)00082-5.
16. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe. 1986;123:52.
17. Кожемякін ЮМ. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. Київ; 2002. 155 с.
18. Горальський ЛП, Хомич ВТ, Кононський ОІ. Основи гістологічної техніки і морфофункціональні методи досліджень у нормі та при патології. Житомир: Полісся; 2011. 288 с.

#### References

1. Deanna HD, Kamran MR, Dimitrios K. Treatment of Non-Infectious Corneal Injury: Review of Diagnostic Agents, Therapeutic Medications, and Future Targets. *Drugs.* 2022;82:145-67.
2. Li C, Fu Y, Liu S, Yu H, Yang X, Zhang M, et al. The global incidence and disability of eye injury: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2019. *EClinicalMedicine.* 2023 Aug 9;62:102134. doi: 10.1016/j.eclinm.2023.102134.
3. Yoon CH, Choi HJ, Kim MK. Corneal xenotransplantation: Where are we standing? *Prog Retin Eye Res.* 2021 Jan;80:100876. doi: 10.1016/j.preteyeres.2020.100876.
4. Flaxman SR, Bourne RRA, Resnikoff S, Ackland P, Braithwaite T, Cicinelli MV, et al. Vision Loss Expert Group of the Global Burden of Disease Study. Global causes of blindness and distance vision impairment 1990-2020: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Glob Health.* 2017 Dec;5(12):e1221-e1234. doi: 10.1016/S2214-109X(17)30393-5.
5. Porth JM, Deiotte E, Dunn M, Bashshur R. A Review of the Literature on the Global Epidemiology of Corneal Blindness. *Cornea.* 2019 Dec;38(12):1602-9. doi: 10.1097/ICO.0000000000002122.
6. Kwok SS, Shih KC, Bu Y, Lo AC, Chan TC, Lai JS, et al. Systematic Review on Therapeutic Strategies to Minimize Corneal Stromal Scarring After Injury. *Eye Contact Lens.* 2019 Nov;45(6):347-55. doi: 10.1097/ICL.0000000000000584.
7. Barrientez B, Nicholas SE, Whelchel A, Sharif R, Hjortdal J, Karamichos D. Corneal injury: Clinical and molecular aspects. *Exp Eye Res.* 2019 Sep;186:107709. doi: 10.1016/j.exer.2019.107709.
8. Almeida HG, Kara-José N, Hida RY, Kara-Junior N. A 15-Year Review of Corneal Transplant in Brazil. *Eye Contact Lens.* 2018;44(2): S376-S381. doi:10.1097/ICL.0000000000000554.
9. Gain P, Jullienne R, He Z, Aldossary M, Acquart S, Cognasse F, et al. Global Survey of Corneal Transplantation and Eye Banking. *JAMA Ophthalmol.* 2016 Feb;134(2):167-73. doi: 10.1001/jamaophthalmol.2015.4776. PMID: 26633035.
10. Ugalahi MO, Adebusoye SO, Olusanya BA, Baiyeroju A. Ocular injuries in a paediatric population at a child eye health tertiary facility, Ibadan, Nigeria. *Injury.* 2023;54(3):917-23. doi: 10.1016/j.injury.2023.01.014.
11. Stern JH, Tian Y, Funderburgh J, Pellegrini G, Zhang K, Goldberg JL, et al. Regenerating Eye Tissues to Preserve and Restore Vision. *Cell Stem Cell.* 2018 Jun 1;22(6):834-49. doi: 10.1016/j.stem.2018.05.013.
12. Choi HJ, Kim MK, Lee HJ, Ko JH, Jeong SH, Lee JI, et al. Efficacy of pig-to-rhesus lamellar corneal xenotransplantation. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2011 Aug 22;52(9):6643-50. doi: 10.1167/iovs.11-7273.
13. Xenotransplantation 2.0. *Nat Biotechnol.* 2016 Jan;34(1):1. doi: 10.1038/nbt.3466.
14. Lee JJ, Kim DH, Jang YE, Choi HJ, Kim MK, Wee WR. The attitude toward xenocorneal transplantation in wait-listed subjects for corneal transplantation in Korea. *Xenotransplantation.* 2014;21(1):25-34. doi:10.1111/xen.12069.
15. Hargrave SL, Mayhew E, Hegde S, Niederkorn J. Are corneal cells susceptible to antibody-mediated killing in corneal allograft rejection? *Transpl Immunol.* 2003 Jan-Mar;11(1):79-89. doi: 10.1016/S0966-3274(02)00082-5.
16. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg: Council of Europe. 1986;123:52.
17. Коземіакін ЮМ. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними. Київ; 2002. 155 с. [in Ukrainian].
18. Горальський ЛП, Хомич ВТ, Кононський ОІ. Fundamentals of histological technique and morphofunctional methods of research in norm and in pathology. *Zhitomir: Polissya;* 2011. 288 s. [in Ukrainian].

## MORPHOLOGICAL CHANGES OF THE RABBIT CORNEA IN THE LATE TERMS AFTER THE SIMULATION OF A MECHANICAL NON-PENETRATING CORNEA INJURY AND ITS CORRECTION USING DECELLULARIZED XENOSTROMA

**Abstract.** The global incidence of vision loss is estimated at 36 million per year, and one of the five leading causes is injury or disease affecting the cornea. In some cases, damage to the cornea requires surgical intervention using xenografts.

**This study aims** to investigate the peculiarities of the morphological changes of the rabbit cornea in the dynamics of experimental mechanical non-penetrating corneal injury and its correction with decellularized xenocorneal stroma.

**Material and methods.** Experiments were performed on Chinchilla rabbits in compliance with the rules of bioethics. The animals were divided into three groups: I – animals without simulated pathology, II – animals with simulated mechanical non-penetrating corneal trauma, III – animals with corneal trauma that underwent surgical correction using pig corneal stroma obtained by the decellularization method. Animals were removed from the experiment 14 and 28 days after the beginning of pathology simulation. Rabbits of the second and third groups were subjected to a concentric epithelial incision in the upper half of the cornea of both eyes under local anaesthesia, within which the anterior epithelium was removed together with the upper layer of the corneal stroma with a disposable ophthalmic scalpel. The rabbits of the third group underwent corneal injury correction by closing the defect with decellularized pig xenocorneal stroma. For histological examination, pieces of the cornea were processed according to generally accepted methods. Paraffin sections of the cornea were stained with hematoxylin and eosin. The thickness of the anterior corneal epithelium in the central and peripheral areas of the injury, the stroma's thickness, and the cornea's general thickness were determined morphometrically. The normal distribution determined the reliability of the difference between the data according to the student's t-test. Differences were considered significant at  $p < 0,05$ .

**Results.** Morphometrically established, the dynamic increase in the thickness of the anterior epithelium in the marginal zones up to  $103.49 \pm 5.17 \mu\text{m}$  on the 14<sup>th</sup> day of the experiment, which is 1.44 times greater ( $p < 0,001$ ) compared to the norm, and the thickness of the cornea, with the maximum value in the same period, to  $759.42 \pm 27.12 \mu\text{m}$ , which exceeded the intact indicator by 2.39 times ( $p < 0.001$ ). On the 28<sup>th</sup> day of the experiment, under the conditions of simulation of mechanical injury at the microscopic level, the closure of the defect with an epithelium of average thickness  $60.27 \pm 2.01 \mu\text{m}$  with an uneven relief of the basal surface and areas of detachment from the substantia propria was revealed. In the upper layers of the stroma, signs of maturation of young connective tissue with the presence of fibroblastic and leukocyte cells, capillaries and disordered orientation of collagen fibers are microscopically revealed. Morphometrically, on the 28<sup>th</sup> day, the substantia propria thickness of the second group animals is significantly ( $p < 0.001$ ) bigger than the norm but 1.56 times less compared to the 14<sup>th</sup> day of the experiment. Microscopically and morphometrically, it was established that under the condition of using a decellularized pig cornea for the correction of mechanical corneal trauma, hyperplasia of the epithelium of the marginal areas was most pronounced on the 14<sup>th</sup> day  $126.37 \pm 5.06 \mu\text{m}$ , which resulted in the closure of the defect with a well-structured epithelial regenerate  $35.20 \pm 1.07 \mu\text{m}$  without areas of exfoliation. These morphometric parameters significantly ( $p < 0.001$ ) exceeded those of similar groups of animals in the cornea without correction. In the same term, the dominance of cells of the fibroblastic series and the absence of morphological manifestations of inflammation were recorded in the granulation tissue. It was histologically investigated that using a decellularized pig cornea 28 days after correction ensures the restoration of the typical structure of the cornea with the approximation of morphometric indicators to the group of intact animals. In contrast to the second experimental group, where no correction was performed, the renewed anterior epithelium of the central corneal zone of the animals of the third group had a clear differentiation into layers, an even relief of the basal surface and a contoured Bowman's membrane. Its thickness  $54.19 \pm 2.09 \mu\text{m}$  was unreliably different from the norm. During this period of the experiment, when correction was applied, mature connective tissue and single capillaries in a state of reduction were histologically detected in the stroma, while the phenomena of maturation of connective tissue components were often observed in the cornea of the animals of the second experimental group. Microscopically, in the substantia propria, bundles of collagen fibrils were oriented parallel, which is one of the factors that ensure the cornea's transparency.

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

**Key words:** corneal injury, correction, decellularization, xenoinplant.

*Відомості про авторів:*

**Шмир Соломія Миколаївна** – асистент кафедри отоларингології, офтальмології та нейрохірургії Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України, м. Тернопіль;

**Крамар Соломія Богданівна** – кандидат біологічних наук, доцент кафедри гістології та ембріології Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, м. Тернопіль.

*Information about the authors:*

**Shmyr Solomiia M.** – assistant professor of the Otorhinolaryngology, Ophthalmology and Neurosurgery Department of the I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil;

**Kramar Solomiia B.** – PhD, associate professor of the Histology and Embryology Department of the I. Horbachevsky Ternopil National Medical University, Ternopil.

Надійшла 19.04.2023 р.

Рецензент – проф. Я. І. Пенішкевич (Чернівці)