

followed. The accuracy of measuring equipment and thoroughness in performing laboratory procedures are quite important. Since all the functions of the human body are in dynamic equilibrium with the factors of the surrounding environment, and the processes of adaptation to changed conditions take place over a certain period of time, the doctor must know the limits of fluctuations of each indicator in physiological conditions. The aim of the work was to determine the dynamics of the complete *blood* count of patients depending on the season. The object of the study was the laboratory parameters of the complete *blood* count of patients who applied to the hospital. For the study, 321 general blood tests were carried out in the conditions of the primary health care center on the basis of the Center for Medical and Health Care in Pavlograd. Automatic hematological analyzers RT-7600/RT-7600s and HB-7021 were used for work. We attempted to determine the groups of diseases most typical for the winter (January) and summer (June) of 2022 based on patient requests. Thus, a correlation between the dynamics of the general blood test in January was revealed. With reliability ($p > 0.05$), we established significant deviations of all indicators of the general blood analysis in January. For example, the hemoglobin indicator is taken. The data obtained are given as the arithmetic mean and the statistical error of the arithmetic mean $\bar{X} \pm S\bar{X}$. Discrepancies between indicators in a distribution that was close to normal were assessed using the Student's test.

Key words: complete *blood* count, cellular composition of blood, hemogram, dynamics of changes.

ORCID and contributionship / ORCID кожного автора та їх внесок до статті:

Shevchenko T. M.: [0000-0002-0947-0960](https://orcid.org/0000-0002-0947-0960)^{AEF}

Govoruha O. Yu.: [0000-0002-7238-9997](https://orcid.org/0000-0002-7238-9997)^{ABCD}

Tishchenko S. V.: [0009-0004-8854-0438](https://orcid.org/0009-0004-8854-0438)^{ABCD}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The authors declare no conflict of interest. / Автори заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Govoruha Olena Yuriyivna / Говоруха Олена Юріївна

Oles Honchar Dnipro National University / Дніпровський національний університет імені Олеся Гончара

Ukraine, 49010, Dnipro, 72 Gagarin Avenue / Адреса: Україна, 49010, м. Дніпро, проспект Гагаріна 72

Tel.: +380996368356 / Тел.: +380996368356

E-mail: elenagovorukha2411@gmail.com

A – Work concept and design, B – Data collection and analysis, C – Responsibility for statistical analysis, D – Writing the article, E – Critical review, F – Final approval of the article. / A – концепція роботи та дизайн, B – збір та аналіз даних, C – відповідальність за статистичний аналіз, D – написання статті, E – критичний огляд, F – остаточне затвердження статті.

Received 17.03.2023 / Стаття надійшла 17.03.2023 року

Accepted 25.08.2023 / Стаття прийнята до друку 25.08.2023 року

DOI 10.29254/2077-4214-2023-3-170-339-348

UDC 616.008.9-097.3:617.713-001.31-085.36]-092

Shmyr S. M., Klishch I. M.

BLOOD PROTEINASE-INHIBITOR SYSTEM IN RABBITS WITH MECHANICAL NON-PENETRATING CORNEAL INJURY AND ITS CORRECTION WITH THE USE OF XENOCORNEAL STROMA RECEIVED BY THE DECELLULARIZATION METHOD

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine (Ternopil, Ukraine)

shmyr@tdmu.edu.ua

Indicators of the proteinase-inhibitor system in rabbits under non-penetrating mechanical corneal injury and its correction using porcine xenocornea stroma obtained by decellularization were studied. The total proteolytic activity of blood plasma (TPA) was determined by the lysis of azoalbumin (degradation of low molecular weight proteins), azocasein (degradation of high molecular weight proteins) and azocoll (collagenolysis). To determine the state of the antiprotease system in the blood serum, the content of $\alpha 1$ protease inhibitor ($\alpha 1$ -PI) and $\alpha 2$ -macroglobulin ($\alpha 2$ -MG) was determined. The proteolysis index (PI), which reflects the intensity or "controllability" of proteolytic processes, was also calculated as the ratio of TRA to the total inhibitory capacity (the sum of $\alpha 1$ -IP and $\alpha 2$ -MG activity).

It was found that the simulation of mechanical non-penetrating corneal injury in the early stages of observation (3rd - 7th day) was accompanied by an increase in blood proteolytic activity, which was expressed in a significant increase in the concentration of azoalbumin, azocasein and azocoll in the blood serum and an increase in the concentration of antiprotease protection factors - $\alpha 1$ -IP and $\alpha 2$ -MG, indicating a compensatory increase in antiproteolytic potential to restrain the development of destruction. In later periods (14th - 28th day), the activity of proteolysis processes decreased, but by the 28th day, it significantly exceeded the level of animals without pathological process. At the same time, antiprotease protection decreased, which led to the preservation of significantly higher proteolysis index values. Surgical correction of mechanical trauma using the equivalent of porcine xenocorneal stroma obtained by decellularization is accompanied by a less intense increase in proteolysis factors and normalization of the prote-

ase/protease inhibitor ratio, as indicated by a significantly lower increase in the proteolysis index in the initial stages of the pathological percentage and its normalization by the end of the experiment.

Key words: proteinase-inhibitory system, blood, mechanical injury of the cornea, surgical correction, xenocornea, decellularization.

Connection of the publication with planned research works.

The article is a fragment of the complex inter-departmental research work of the Institute of Modeling and Analysis of Pathological Processes of the Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine "Pathogenetic features of systemic and organ disorders due to the action of extraordinary factors on the body" (state registration number 0122U100071).

Introduction.

Diseases affecting the cornea are one of the leading causes of blindness worldwide [1]. The epidemiology of blindness caused by corneal pathology is complex and encompasses a wide range of infectious and non-infectious eye diseases that cause corneal scarring, ultimately leading to functional blindness.

Corneal trauma and ulceration are essential causes of corneal blindness that are often underreported. Until recently, eye trauma and corneal ulceration were not considered important causes of corneal blindness. However, as public health programs in most countries have become more effective in reducing the prevalence of traditional causes of corneal blindness, such as trachoma, onchocerciasis, and leprosy, eye trauma and corneal ulcers have become more important. A thorough analysis of the world literature by Negrel & Thylefors revealed a global epidemic of ocular trauma with approximately 55 million eye injuries occurring annually, of which 750000 cases required hospitalization and 200000 were open eye injuries [2]. In addition, they estimated that approximately 1.6 million people were blind due to their injuries, 2.3 million had bilateral low vision, and 19 million were unilaterally blind or had low vision. Although ocular trauma is a global problem, the burden of blindness due to eye injuries falls most heavily on developing countries, especially those in war zones [2].

One of the promising methods that can be used to close defects in corneal injuries and ulcers is xenotransplantation [3-5]. Researchers working in experimental and clinical ophthalmology point to the effectiveness of the xenotransplantation technique using porcine corneas, given the genetic relationship and the so-called "immune privilege of the eye" that reduces the likelihood of rejection. However, whole corneal transplantation has a risk of rejection, given that both α Gal and non- α Gal (e.g., N-glycolinearhamyric acid) are expressed in porcine corneal cells [6]. Since cellular components of porcine corneas are the main source of xenoantigens [7], decellularized corneas can reduce the immune response after transplantation [8].

The aim of the study.

To investigate the dynamics of indicators of the proteinase-inhibitory system in rabbits under mechanical non-penetrating corneal injury and after surgical correction using the equivalent of the xenocorneal stroma obtained by the decellularization method.

Object and research methods.

Thirty sexually mature rabbits of the "Chinchilla" breed with a body weight of 2.5–3 kg were used for the study, which were kept in proper sanitary and hygienic conditions at the vivarium of the Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine. When manipulating experimental animals, the rules of the "European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experiments and Other Scientific Purposes" [9], as well as "Scientific and Practical Recommendations for Keeping and Working with Laboratory Animals" [10] were followed.

Corneal damage was performed on both eyes of animals under local epibulbar anesthesia using 0.5% alkaine solution and retrobulbar anesthesia with 2% lidocaine solution 1.0 ml. Using a trephine with a diameter of 7 mm, a concentric epithelial notch was made in the upper half of the cornea, and later, within the limits of this notch, the epithelium was removed together with the front layer of the corneal stroma with a disposable ophthalmic scalpel (a flap with a thickness of up to 0.2 mm was cut) (fig. 1).

The transplant material is the stroma of the pig xenocornea, obtained by the decellularization method, which was carried out by treating it with a 0.5% solution

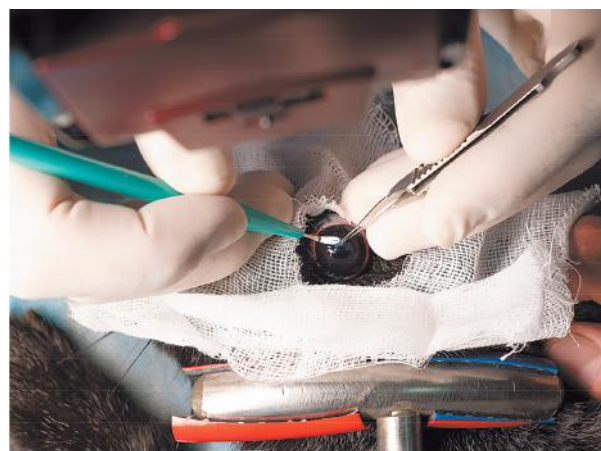


Figure 1 – Simulation of mechanical non-penetrating corneal injury.



Figure 2 – Closure of a corneal defect using porcine xenocorneal stroma obtained by the decellularization method.

of sodium dodecyl sulfate and, subsequently, with ultrasound followed by incubation in the presence of a 0.1% papain solution [11].

The injury was corrected by closing the corneal defect using the equivalent of the corneal stroma obtained by the decellularization method (fig. 2), suturing it in 4 places (at the 3rd, 6th, 9th, and 12th o'clock) using an atraumatic needle 8 / 0 nylon to the sclera through the conjunctiva.

After the surgical intervention, the animals were instilled with a solution of the fluoroquinolone antibiotic Vigamox, 1 drop three times a day for 8 days.

Blood for the study was taken from the marginal vein of the rabbit ear.

The determination of total proteolytic activity (TPA) of blood plasma was carried out by the lysis of azoalbumin, azocasein and azocol using a set of reagents "Simko Ltd" (Ukraine). The method is based on the fact that the incubation of protein azo compounds in the presence of proteolysis activators in the medium is accompanied by lysis of azoalbumin (indicates the breakdown of low molecular weight proteins), azocasein (an indicator of the breakdown of high molecular weight proteins) and azocollagen (an indicator of collagenolysis). The degree of degradation was assessed by the intensity of color of the incubation medium at 440 nm, for which a Lambda 25 Perkin Elmer spectrophotometer was used. The proteolytic activity was expressed in extraction units per 1 ml of plasma per 1 hour.

To determine the concentration of $\alpha 2$ -macroglobulin ($\alpha 2$ -MG), a method based on the formation of an active $\alpha 2$ -MG complex with trypsin, which is not sensitive to the action of the inhibitor from soybeans, was used [12]. To determine the concentration of $\alpha 1$ -protease inhibitor ($\alpha 1$ -PI) a method was used based on the fact that $\alpha 1$ -PI of blood serum can inhibit the hydrolysis of BAPNA by trypsin [12]. The proteolysis index (PI) was also calculated based on the ratio of TRA to the total inhibitory capacity of blood serum, which is determined by the sum of $\alpha 1$ -PI and $\alpha 2$ -MG indicators. This indicator reflects the tension or "manageability" of proteolytic processes.

Excel and STATISTICA software were used for statistical processing of digital results. Non-parametric estimation methods were used. For digital indicators, the value of the arithmetic mean of the sample (M), the variance of the sample and the error of the mean (m) were calculated. The reliability of the difference in values between independent quantitative values was determined using the Mann-Whitney test.

Research results and their discussion.

In the early post-traumatic period after a mechanical injury to the cornea, the activity of proteolysis processes increases significantly. In particular, on the 3rd day of observation, we recorded a significant increase in the blood plasma of lysis of azoalbumin by 46.4%, azocasein by 51.7%, and azocol by 73.1% compared to the level of animals that were not simulated with injuries (table 1).

By the 7th day of observation, indicators of general proteolytic activity, both in relation to finely dispersed proteins and highly dispersed proteins, as well as the main substance of connective tissue – collagen, decreased compared to the previous observation period, but were significantly higher than normal – albumin lysis – by 37.4%, azocasein – by 36.4%, azocol – by 51.3%.

Table 1 – Total proteolytic activity of blood plasma of rabbits under the condition of mechanical non-penetrating corneal injury and its correction using corneal stroma obtained by the decellularization method, (M±m)

Indicators		Azoalbumin lysis, $\text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Lysis of azocasein, $\text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	Azocol lysis, $\text{ml}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
Animals group				
Without simulated pathology, (n=10)		2,78±0,10	2,36±0,11	0,78±0,07
Mechanical injury of the cornea	3 days (n=10)	4,07±0,11*	3,58±0,12*	1,35±0,05*
	7 days (n=10)	3,82±0,12*	3,22±	1,18±0,04*
	14 days (n=10)	3,44±0,14*	3,14±0,10*	0,95±0,05*
	28 days (n=10)	3,41±0,13*	2,89±0,12 *	0,84±0,06
Mechanical injury of the cornea + surgical correction	3 days (n=10)	3,55±0,11**	3,82±0,14**	1,18±0,05**
	7 days (n=10)	3,38±0,10**	3,13±0,09*	1,06±0,06**
	14 days (n=10)	3,17±0,13**	2,77±0,10**	1,19±0,07**
	28 days (n=10)	2,84±0,14#	2,58±0,08**	0,81±0,04

Notes: * – the differences are significant between the group of animals without simulation of the pathological process and animals that were simulated mechanical corneal trauma ($p < 0.05$); # – differences are significant between experimental groups of animals without surgical correction and with surgical correction in the corresponding periods of observation ($p < 0.05$).

The same trend took place in the subsequent periods of observation, however, on the 28th day, although the total proteolytic activity decreased, it continued to reliably exceed the control indicators by 22.7%, 22.5%, and 7.7%, respectively, in relation to lysis of azoalbumin, azocasein and azocol.

In animals that underwent surgical correction using the equivalent of xenocorneal stroma obtained by decellularization, the activity of proteolysis processes was lower than in animals that did not undergo correction. In particular, on the 3rd day of observation, the rate of azoalbumin lysis was 126.8% compared to animals without pathology, which is 19.6% less than in animals that were not corrected. The rate of azocasein lysis slightly exceeded the level of animals without correction (by 10.1%), and the lysis of azocol was less than that of animals without correction by 20.8%. On the 7th day, the indicators decreased even more. The lysis of azoalbumin was 121.6%, azocasein 132.6%, and azocol 135.9% of the level of animals without simulated pathology, which is significantly less than in animals with mechanical corneal trauma without correction by 15.8%, 3.8%, respectively and 15.4%. On the 14th day, the indicators of lysis of azoalbumin and azocasein continued to decrease, and the indicator of azocol increased compared to the previous observation period and amounted to 152.5% of the norm. By the 28th day, the indicators of azoalbumin and azocol were at the level of animals without simulated pathology, and the level of azocasein lysis was higher by 9.3%, and in relation to the indicators of animals without correction, the indicators were significantly lower.

It is known that the traumatic process causes an inflammatory response, which involves tissue infiltration

Table 2 – Indicators of the antiprotease blood system of rabbits under the condition of mechanical non-penetrating corneal injury and its correction using the corneal stroma obtained by the decellularization method (M±m)

Animals group		Indicators		
		$\alpha 1\text{-IP}, \mu\text{mol/l}$	$\alpha 2\text{-MG}, \mu\text{mol/l}$	Proteolysis index
Intact, n=10		40,32±	2,73±0,09	0,137±0,006
Mechanical injury of the cornea	3 days, n=10	45,22±1,54	3,87±0,14*	0,183 ± 0,011*
	7 days, n=10	46,53±1,22*	3,55±0,12*	0,164 ± 0,014*
	14 days, n=10	42,21±1,16	3,44±0,15*	0,156 ± 0,012*
	28 days, n=10	41,22±1,11	2,88±0,11	0,160 ± 0,007*
Mechanical injury of the cornea + surgical correction	3 days, n=10	48,33±1,24*#	3,35±0,12*#	0,165 ± 0,009*#
	7 days, n=10	47,34±1,44*	3,28±0,14*#	0,149 ± 0,014*#
	14 days, n=10	46,17±1,12*#	3,22 ± 0,11*	0,144 ± 0,012*#
	28 days, n=10	42,11±1,14	2,87 ± 0,09	0,138 ± 0,011#

by activated neutrophils, which are the main effector cells of inflammation [13]. Their activation and subsequent degranulation is accompanied by the release into the extracellular space of hydrolytic enzymes, including proteinases, with broad substrate specificity. This leads to increased vascular permeability changes in the tissues in response to damage. All this leads to a violation of the ratio of proteolysis activity and the control system of this process, with the help of inhibitors of proteolytic enzymes [14, 15].

Proteolytic enzymes play a leading role in the degradation of connective tissue components, a typical representative of which is the corneal stroma. The consequence of proteolytic decay is rejecting damaged tissue elements, a necessary component in the normal course of reparative processes. However, excessive activation of proteolysis can cause damage to native tissues and the spread of inflammation. Such a scenario is especially dangerous in relation to the cornea, where, insignificant for many other tissue formations, an increase in the inflammatory process can cause a significant deterioration of the optical properties of the cornea and even create a threat of its perforation. In addition, excessive proteolysis can lead to xenograft rejection or damage [16].

Damage to the corneal epithelium and the development of the inflammatory process significantly reduces the activity of the antioxidant system of the epithelium, which causes excessive generation of reactive oxygen species and, as a result, the development of oxidative stress [17]. Sources of free radicals include blood macrophages that infiltrate corneal tissue during inflammation and monocytes, neutrophils, eosinophils, endothelial, smooth muscle and other cells. Reactive oxygen species directly damage stromal glycosaminoglycans, further impairing their properties, ultimately leading to corneal destruction and ulceration. After the attack of stromal glycosaminoglycans by reactive oxygen species, they become less resistant to proteolysis by tissue enzymes and phagocytizing cells. Normally, the tertiary spiral structure of collagen, the main structural substance of the cornea, is resistant to degradation by most proteases. Reactive oxygen species generated by activated macro-

phages or xanthine oxidase cause oxidative destruction of type 1 collagen fibrils, the first step in collagen destruction. At the second stage, these oxidised-modified molecules undergo enzymatic proteolysis [13].

Since we found a significant increase in proteolytic activity, the next stage of our research was to analyze changes in the content of proteolysis inhibitors – $\alpha 1\text{-IP}$ and $\alpha 2\text{-MG}$, as well as to calculate the proteolysis index.

On the 3rd day of the experiment, the content of $\alpha 1\text{-IP}$ in blood plasma increased by 12.2% and $\alpha 2\text{-MG}$ by 41.8% ($p < 0.05$) relative to the values of animals without simulated pathology (table 2). On the 7th day of observation, the indicator of $\alpha 1\text{-PI}$ remained at almost the same level, and $\alpha 2\text{-MG}$ decreased slightly compared to the previous period and amounted to 130% of the norm ($p > 0.05$). On the 14th day, a further decrease in antiproteases was recorded – the concentration of $\alpha 1\text{-IP}$ was 104.7% of the norm, $\alpha 2\text{-MG}$ – 126%. Until the 28th day of the experiment, the indicators did not differ from the level of animals without the simulated pathological process.

Carrying out surgical correction using the equivalent of the corneal stroma obtained by the decellularization method, the antiprotease activity of the blood increased on the 3rd day after the surgical intervention – the $\alpha 1\text{-IP}$ index was 119.9% and $\alpha 2\text{-MG}$ – 122.7% compared to animals without simulated pathology, moreover, in animals compared to animals with corneal injury without correction, the level of $\alpha 1\text{-IP}$ was higher by 6.9%, and $\alpha 2\text{-MG}$ was lower by 21.7%. In the subsequent periods of observation, indicators of antiprotease activity gradually decreased, and by the 28th day, they were equal to animals without simulated pathology.

Such dynamics were also reflected in the proteolysis index. In animals with mechanical trauma to the cornea on the 3rd day, it was 133.6% of the norm, and subsequently decreased and amounted to 119.7% on the 7th day, 113.9% on the 14th, and 113.9% on the 28th day – 116.8% of the similar indicator of animals that were not simulated with trauma. In animals that underwent surgical correction on the 3rd day of the experiment, the index exceeded the similar index of animals without simulated pathology by 20.4% and was 13.2% lower than in animals with mechanical trauma that was not corrected. On the 7th day, there was a significant decrease in the proteolysis index compared to the previous observation period – it was 108.8% of the norm, which is 10.9% lower than in animals without correction. By the 14th day, the indicator remained at the same level, and by the 28th day, it did not significantly differ from the norm and was 16.1% lower than in animals with corneal injury without correction.

An increase in the content of indicators of the antiprotease system in the early periods of observation under the conditions of surgical correction of a non-penetrating mechanical injury of the cornea indicates an increase in the antiprotease potential for restraining the development of destructive processes. Such changes can be considered as an adaptive reaction of the organism [18].

A further decrease in the content of antiproteases in the later periods of observation may occur under the influence of many factors: first, more intense binding of proteinases that are activated; secondly, by the elimination of proteinase-inhibitor complexes, followed by cleavage of the protein molecule by proteolytic enzymes in an activated state; thirdly, by oxidation (oxidative denaturation) of active centers of inhibitors by active forms of oxygen [14].

Proteinases of activated granulocytes and macrophages hydrolyze connective tissue components, causing tissue destruction and activation of inflammatory mediators. An increase in the activity of proteinases ultimately leads to the depletion of the protective inhibitor reserve [15].

Conclusions.

1. Simulation of mechanical non-penetrating injury of the cornea in the early stages is accompanied by an increase in the proteolytic activity of the blood and an

increase in the concentration of antiprotease protection factors – α 1-IP and α 2-macroglobulin, which indicates an increase in the antiproteolytic potential to restrain the development of destruction. Such changes can be considered as an adaptive reaction of the body.

2. Surgical correction of mechanical injury using the equivalent of pig xenocorneal stroma obtained by the decellularization method is accompanied by a less intense increase in proteolysis factors and normalization of the protease/protease inhibitor ratio, as indicated by a significantly lower increase in the proteolysis index at the initial stages of the pathological process and its normalization before the end of the experiment.

Prospects for further research.

In the future, indicators of the proteinase-inhibitory system will be investigated in different periods of experimental non-penetrating corneal injury at the local level (in the intraocular fluid).

DOI 10.29254/2077-4214-2023-3-170-339-348

УДК 616.008.9-097.3:617.713-001.31-085.36]-092

Шмир С. М., Кліщ І. М.

СТАН ПРОТЕІНАЗО-ІНГІБІТОРНОЇ СИСТЕМИ КРОВІ КРОЛІВ З МЕХАНІЧНОЮ НЕПРОНИКАЮЧОЮ ТРАВМОЮ РОГІВКИ ТА ЗА ЇЇ КОРЕКЦІЇ З ВИКОРИСТАННЯМ СТРОМИ КСЕНОРОГІВКИ, ОТРИМАНОЇ МЕТОДОМ ДЕЦЕЛЮЛЯРИЗАЦІЇ

Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України (м. Тернопіль, Україна)

shmyr@tdmu.edu.ua

Досліджено показники протеїназо-інгібіторної системи крові у кролів за умов непроникаючої механічної травми рогівки та її корекції з використанням стромы ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації. Визначення загальної протеолітичної активності плазми крові (ЗПА) проводили за показниками лізису азоальбуміну (розпад низькомолекулярних протеїнів), азоказеїну (розпад високомолекулярних протеїнів) і азоколу (колагеноліз). Для з'ясування стану антипротеазної системи у сироватці крові проводили визначення вмісту α 1-інгібітора протеаз (α 1-ІП) та α 2-макроглобуліну (α 2-МГ). Розраховували також індекс протеолізу (ІП), що відображає напруженість або «керованість» протеолітичних процесів, як відношення ЗПА до сумарної інгібіторної ємності (сума активності α 1-ІП і α 2-МГ).

Встановлено, що моделювання механічної непроникаючої травми рогівки в ранні терміни спостереження (3-тя – 7-ма доби) супроводжується підвищенням протеолітичної активності крові, що виражалось у достовірному зростанні концентрації азоальбуміну, азоказеїну та азоколу у сироватці крові та збільшенні концентрації факторів антипротеазного захисту – α 1-ІП та α 2-МГ, що вказує на компенсаторне посилення антипротеолітичного потенціалу для стримування розвитку деструкції. У більш пізні терміни (14-та – 28-ма доби) активність процесів протеолізу знижувалась, однак до 28-мої доби достовірно перевищувала рівень тварин без патологічного процесу. Водночас знижувались показники антипротеазного захисту, що призвело до затороплення достовірно вищих показників індексу протеолізу. Хірургічна корекція механічної травми із застосуванням еквівалента стромы ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, супроводжується менш інтенсивним зростанням факторів протеолізу та нормалізацією співвідношення протеази/інгібітори протеаз, на що вказує достовірно менше зростання індексу протеолізу на початкових етапах патологічного процесу і нормалізація його до завершення експерименту.

Ключові слова: протеїназо-інгібіторна система, кров, механічна травма рогівки, хірургічна корекція, ксенорогівка, децелюляризація.

Зв'язок публікації з плановими науково-дослідними роботами.

Стаття є фрагментом комплексної міжкафедральної науково-дослідної роботи ННІ моделювання та аналізу патологічних процесів Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України «Патогенетичні особливості

системних та органних порушень за дії надзвичайних факторів на організм» (№ держреєстрації 0122U100071).

Вступ.

Захворювання, що вражають рогівку, є однією із основних причин сліпоти в усьому світі [1]. Епідеміологія сліпоти, викликаной патологією рогівки є

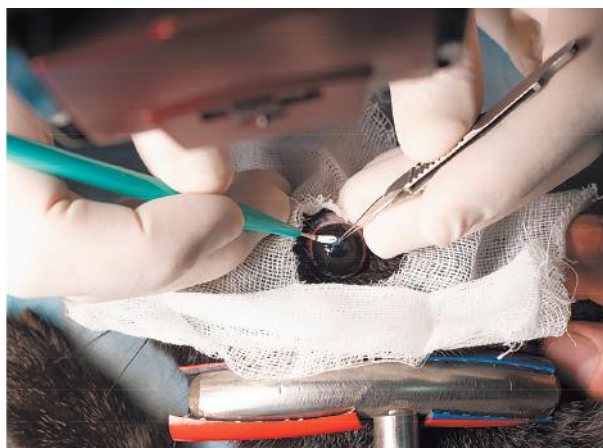


Рисунок 1 – Моделювання механічної непроникаючої травми рогівки.



Рисунок 2 – Закривання дефекту рогівки з використанням строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації.

складною та охоплює широкий спектр інфекційних і неінфекційних захворювань очей, які викликають рубцювання рогівки, що в кінцевому підсумку призводить до функціональної сліпоти.

Травма та виразка рогівки є важливими причинами рогівкової сліпоти, про які часто не повідомляється. Ще донедавна травма ока та виразка рогівки не вважалися важливими причинами рогівкової сліпоти. Однак, оскільки програми охорони здоров'я більшості країн стали більш ефективними у зниженні поширеності традиційних причин рогівкової сліпоти, таких як трахома, онхоцеркоз і проказа, травми очей та виразки рогівки стали більш важливими. Ретельний аналіз світової літератури, проведений Negrel & Thylefors виявив глобальну епідемію очної травми з приблизно 55 мільйонами випадків травм очей, які відбуваються щорічно, з яких 750000 випадків вимагали госпіталізації, а 200000 були травмами відкритого ока [2]. Крім того, вони підрахували, що приблизно 1,6 мільйона людей були сліпими через отримані травми, 2,3 мільйона мали двосторонній слабкий зір, а 19 мільйонів були односторонньо сліпими або мали слабкий зір. Незважаючи на те, що очна травма є глобальною проблемою, тягар сліпоти внаслідок травм ока найбільше лягає на країни, що розвиваються, особливо ті, де ідуть воєнні дії [2].

Одним із перспективних методів, що може бути використаний для закриття дефектів при травмах

і виразках рогівки є ксенотрансплантація [3-5]. Дослідники, що працюють у галузі експериментальної та клінічної офтальмології вказують на ефективність методики ксенотрансплантації з використанням рогівки свині, зважаючи на генетичну спорідненість, а також так звану «імунову привілейованість ока», що зменшує ймовірність відторгнення. Однак пересадка цілісної рогівки має ризик відторгнення, враховуючи, що як α Gal, так і не- α Gal (наприклад, N-гліколілнейрамінова кислота) експресуються в клітинах рогівки свиней [6]. Оскільки клітинні компоненти рогівки свиней є основним джерелом ксеноантигенів [7], децелюляризована рогівка має перевагу у зниженні імунної відповіді після трансплантації [8].

Мета дослідження.

Дослідити динаміку показників протеїназо-інгібіторної системи у кролів за умови механічної непроникаючої травми рогівки та за їх хірургічної корекції з використанням еквівалента строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації.

Об'єкт і методи дослідження.

Для проведення дослідження було використано 30 статевозрілих кролів породи «Шиншила» з масою тіла 2,5–3 кг, яких утримували у належних санітарно-гігієнічних умовах віварію Тернопільського національного медичного університету імені І.Я. Горбачевського МОЗ України. При проведенні маніпуляцій із експериментальними тваринами дотримувались правил «Європейської конвенції про захист хребтних тварин, які використовуються для експериментів та з іншою науковою метою» [9], а також «Науково-практичних рекомендацій із утримання лабораторних тварин та роботи з ними» [10].

Пошкодження рогівки проводили на обох очах тварин за умов місцевої епібульбарної анестезії з використанням 0,5% розчину алкаїну та ретробульбарної анестезії 2%-вим розчином лідокаїну 1,0 мл. За допомогою трепану діаметром 7 мм наносили концентричну епітеліальну насічку у верхній половині рогівки, а в подальшому у межах цієї насічки одноразовим офтальмологічним скальпелем видаляли епітелій разом з переднім шаром строми рогівки (викроювали клапоть товщиною до 0,2 мм) (рис. 1).

Трансплантаційний матеріал – строма ксенорогівки свині, отримана методом децелюляризації, яку проводили шляхом її обробки 0,5% розчином додецилсульфату натрію та, у подальшому, ультразвуком з подальшою інкубацією за присутності 0,1% розчину папаїну [11].

Корекцію травми здійснювали закриттям дефекту рогівки з використанням еквівалента строми рогівки, отриманої методом децелюляризації (рис. 2), пришиванням її у 4 місцях (на 3-ій, 6-ій, 9-й та 12-й годинах) за допомогою атравматичної голки 8/0 нейлон до склери через кон'юнктиву.

Тваринам після проведення оперативного втручання проводили інстиляцію розчину антибіотика фторхінолонового ряду Вігамокс по 1 краплі тричі на день впродовж 8-ми діб.

Кров для проведення досліджень забирали з крайової вени вуха кролів.

Визначення загальної протеолітичної активності (ЗПА) плазми крові здійснювали за показниками лізису азоальбуміну, азоказеїну і азоколу, використовуючи набір реактивів «Simko Ltd» (Україна). Метод

полягає в тому, що інкубація білкових азосполук за присутності у середовищі активаторів протеолізу супроводжується лізисом азоальбуміну (вказує на розпад низькомолекулярних протеїнів), азоказеїну (індикатор розпаду високомолекулярних протеїнів) та азоколагену (індикатор колагенолізу). Ступінь розпаду оцінювали за інтенсивністю забарвлення інкубаційного середовища при довжині хвилі 440 нм, для чого використовували спектрофотометр Lambda 25 «Perkin Elmer». Показник протеолітичної активності виражали в одиницях екстинкції на 1 мл плазми за 1 годину.

Для визначення концентрації α_2 -макроглобуліну (α_2 -МГ) використовували метод, що базується на утворенні активного комплексу α_2 -МГ із трипсином, що не чутливий до дії інгібітору з бобів сої [12]. Для визначення концентрації α_1 -інгібітора протеаз (α_1 -ІП) використали метод, що базується на тому, що α_1 -ІП сироватки крові може пригнічувати гідроліз трипсином БАПНА [12]. Проводили також розрахунок індекса протеолізу (ІП) за відношенням ЗПА до сумарної інгібіторної ємності сироватки крові, що визначається за сумою показників α_1 -ІП і α_2 -МГ. Цей показник є відображенням напруженості або «керованості» протеолітичних процесів.

Для проведення статистичної обробки цифрових результатів використовували програмне забезпечення «Excel» та «STATISTICA». Використовували непараметричні методи оцінки. Для цифрових показників розраховували значення середньої арифметичної вибірки (M), дисперсії вибірки і помилки середньої (m). Достовірність різниці значень між незалежними кількісними величинами визначали за допомогою критерію Мана-Вітні.

Результати дослідження та їх обговорення.

У ранньому посттравматичному періоді після нанесення механічної травми рогівки активність процесів протеолізу суттєво зростає. Зокрема, на 3-тю добу спостереження ми зафіксували достовірне зростання в плазмі крові лізису азоальбуміну на 46,4%, азоказеїну – на 51,7%, азоколу – на 73,1% від рівня тварин, яким травми не моделювали (табл. 1).

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

У тварин, яким проводили хірургічну корекцію з використанням еквівалента строми ксенорогівки, отриманої методом децелюляризації активність процесів протеолізу була меншою, ніж у тварин, яким корекцію не проводили. Зокрема, на 3-тю добу спостереження показник лізису азоальбуміну склав 126,8% порівняно з тваринами без патології, що на 19,6% менше, ніж у тварин, яким корекцію не проводили. Показник лізису азоказеїну дещо перевищував

рівень тварин без корекції (на 10,1%), а лізис азоколу був меншим, ніж у тварин без корекції на 20,8%. На 7-му добу показники зменшилися ще більше. Лізис азоальбуміну склав 121,6%, азоказеїну 132,6%, азоколу 135,9% від рівня тварин без змодельованої патології, що достовірно менше, ніж у тварин з механічною травмою рогівки без корекції відповідно на 15,8%, 3,8% та 15,4%. На 14-ту добу показники лізису азоальбуміну та азоказеїну і надалі знижувались, а показник азоколу зріс порівняно з попереднім терміном спостереження і склав 152,5% від норми. До 28-ої доби показники азоальбуміну та азоколу перебували на рівня тварин без змодельованої патології, а рівень лізису азоказеїну був вищим на 9,3%, причому стосовно показників тварин без корекції показники були достовірно нижчими.

Відомо, що травматичний процес спричиняється до розвитку запальної відповіді, що передбачає інфільтрацію тканин активованими нейтрофілами, що є основними ефекторними клітинами запалення [13]. Їхня активація та подальша дегрануляція супроводжується викиданням у позаклітинний простір гідролітичних ензимів, в тому числі і протеїназ, з широкою субстратною специфічністю. Це призводить до збільшення проникності судин, змін в самих тканинах у відповідь на пошкодження. Все це зумовлює порушення співвідношення активності протеолізу і системи контролю цього процесу, за допомогою інгібіторів протеолітичних ферментів [14, 15].

Провідну роль в деградації компонентів сполучної тканини, типовим представником якої є строма рогівки, відіграють протеолітичні ферменти. Наслідком протеолітичного розпаду є відторгнення ушкоджених тканинних елементів, що є необхідним компонентом при нормальному перебігу репаративних процесів. Проте, надмірна активація протеолізу може стати причиною ушкодження нативних тканин і поширення вогнища запалення. Такий сценарій є особливо небезпечним стосовно рогівки, де незначне для багатьох інших тканинних утворень, посилення запального процесу може спричинити істотне погіршення оптичних властивостей рогівки і навіть створити загрозу її перфорації. Окрім того, надмірний протеоліз може спричинитися до відторгнення ксенотрансплантата, або його пошкодження [16].

Пошкодження епітелію рогівки та розвиток запального процесу значно знижує активність антиоксидантної системи епітелію, що зумовлює надмірну генерацію активних форм кисню і, як наслідок – розвиток оксидативного стресу [17]. До джерел вільних радикалів відносять макрофаги крові, які інфільтрують тканину рогівки при запаленні, а також моноцити, нейтрофіли, еозинофіли, ендотеліальні, гладком'язові та інші клітини. Активні форми кисню безпосередньо пошкоджують стромальні глікозаміноглікани з подальшим порушенням їх властивостей, що зумовлює, в кінцевому підсумку, руйнування рогівки і виразкоутворення. Після атаки стромальних глікозаміногліканів активними формами кисню вони стають менш стійкими до протеолізу тканинними ферментами і фагоцитуючими клітинами. В нормі третинна спіральна структура колагену, основної структурної речовини рогівки, резистентна до деградації більшістю протеазами. Активні форми кисню, генеровані активованими макрофагами або ксанти-

Таблиця 1 – Загальна протеолітична активність плазми крові кролів за умови механічної непроникаючої травми рогівки та її корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації, ($M \pm m$)

Показник		Лізис азоальбу- міну, мл ⁻¹ · год ⁻¹	Лізис азока- зеїну, мл ⁻¹ · год ⁻¹	Лізис азоколу, мл ⁻¹ · год ⁻¹
Група тварин				
Без змодельованої пато- логії, (n=10)		2,78±0,10	2,36±0,11	0,78±0,07
Механічна травма рогівки	3-тя доба, (n=10)	4,07±0,11*	3,58±0,12*	1,35±0,05*
	7-ма доба, (n=10)	3,82±0,12*	3,22±	1,18±0,04*
	14-та доба, (n=10)	3,44±0,14*	3,14±0,10*	0,95±0,05*
	28-ма доба, n=10	3,41±0,13*	2,89±0,12 *	0,84±0,06
Механічна травма рогівки+ хірургіч- на корекція	3-тя доба, (n=10)	3,55±0,11**	3,82±0,14**	1,18±0,05**
	7-ма доба, (n=10)	3,38±0,10**	3,13±0,09*	1,06±0,06**
	14-та доба, (n=10)	3,17±0,13**	2,77±0,10**	1,19±0,07**
	28-ма доба, n=10	2,84±0,14#	2,58±0,08**	0,81±0,04

Примітки: * – відмінності достовірні між групою тварин без моделювання пато-
логічного процесу і тварин, яким моделювали механічну травму рогівки ($p < 0,05$);
– відмінності достовірні між дослідними групами тварин без хірургічної корекції
і з хірургічною корекцією у відповідні терміни спостереження ($p < 0,05$).

ноксидазою, викликають окиснювальну деструкцію колагенових фібрил типу 1, що є першим етапом руйнування колагену. На другому етапі відбувається ензимний протеоліз цих окиснено-модифікованих молекул [13].

Оскільки, ми виявили виразне зростання протеолітичної активності, наступним етапом нашого дослідження було проаналізувати зміни вмісту інгібіторів протеолізу – α_1 -ІП та α_2 -МГ, а також розрахувати індекс протеолізу.

На 3-тю добу експерименту вміст у плазмі крові α_1 -ІП зріс на 12,2, а α_2 -МГ на 41,8% ($p < 0,05$) відносно показників тварин без змодельованої патології (табл. 2). На 7-му добу спостереження показник α_1 -ІП залишався майже на тому ж рівні, а α_2 -МГ дещо знизився порівняно з попереднім терміном і склав 130% від норми ($p > 0,05$). На 14-ту добу зафіксовано подаль-

Таблиця 2 – Показники антипротеазної системи крові кролів за умови механічної непроникаючої травми рогівки та її корекції з використанням строми рогівки, отриманої методом децелюляризації ($M \pm m$)

Група тварин		Показник		
		α_1 -ІП, мкмоль/л	α_2 -МГ, г/л	Індекс протеолізу
Інтактні, n=10		40,321,12	2,73±0,09	0,137±0,006
Механічна травма рогівки	3-тя доба, n=10	45,22±1,54	3,87±0,14*	0,183 ± 0,011*
	7-ма доба, n=10	46,53±1,22*	3,55±0,12*	0,164 ± 0,014*
	14-та доба, n=10	42,21±1,16	3,44±0,15*	0,156 ± 0,012*
	28-ма доба, n=10	41,22±1,11	2,88±0,11	0,160 ± 0,007*
Механічна травма рогівки+ хірургіч- на корекція	3-тя доба, n=10	48,33±1,24*#	3,35±0,12*#	0,165 ± 0,009*#
	7-ма доба, n=10	47,34±1,44*	3,28±0,14*#	0,149 ± 0,014*#
	14-та доба, n=10	46,17±1,12*#	3,22 ± 0,11*	0,144 ± 0,012*#
	28-ма доба, n=10	42,11±1,14	2,87 ± 0,09	0,138 ± 0,011#

ше зниження антипротеаз – концентрація α_1 -ІП склала 104,7% від норми, α_2 -МГ – 126%. До 28-ої доби експерименту показники не відрізнялись від рівня тварин без змодельованого патологічного процесу.

Проведення хірургічної корекції з використанням еквівалента строми рогівки, отриманої методом децелюляризації антипротеазна активність крові на 3-тю добу від проведення оперативного втручання зростала – показник α_1 -ІП склав 119,9% а α_2 -МГ – 122,7% відносно тварин без змодельованої патології, причому у тварин порівнянні з тваринами із травмою рогівки без корекції рівень α_1 -ІП був вищим на 6,9%, а α_2 -МГ нижчим на 21,7%. У подальші терміни спостереження показники антипротеазної активності поступово знижувались і до 28-ої доби перебували на рівні тварин без змодельованої патології.

Така динаміка відобразилась і на показнику індексу протеолізу. У тварин з механічною травмою рогівки на 3-тю добу він складав 133,6% від норми, а у подальшому знижувався і становив на 7-му добу 119,7%, 14-ту – 113,9% а на 28-му добу – 116,8% від аналогічного показника тварин, яким травму не моделювали. У тварин, яким проводили хірургічну корекцію на 3-тю добу експерименту індекс перевищував аналогічний показник тварин без змодельованої патології на 20,4% і був на 13,2% нижчим, ніж у тварин з механічною травмою, яким корекції не проводили. На 7-му добу відбулося суттєве зниження індекса протеолізу порівняно з попереднім терміном спостереження – він склав 108,8% від норми, що на 10,9% менше ніж у тварин без корекції. До 14-ої доби показник залишався на тому ж рівні, а до 28-ої доби суттєво не відрізнявся від норми і був на 16,1% меншим, ніж у тварин з травмою рогівки без корекції.

Підвищення вмісту показників антипротеазної системи у ранні терміни спостереження за умов хірургічної корекції непроникаючої механічної травми рогівки вказує на зростання антипротеазного потенціалу для стимулювання розвитку деструктивних процесів. Такі зміни можна розглядати як адаптивну реакцію організму [18].

Подальше зниження вмісту антипротеаз в подальші терміни спостереження може відбуватись за дії ряду чинників: по-перше, більш інтенсивного зв'язування протеїназ, що виразно активуються; по-друге, елімінацією комплексів протеїназа-інгібітор, з наступним розщепленням молекули білка, протеолітичними ферментами в активованому стані; по-третє, окисненням (окиснювальною денатурацією) активних центрів інгібіторів активними формами кисню [14].

Протеїнази активованих гранулоцитів і макрофагів гідролізують компоненти сполучної тканини, викликаючи деструкцію тканин й активацію медіаторів запалення. Підвищення активності протеїназ

в кінцевому результаті зумовлює виснаження захисного інгібіторного резерву [15].

Висновки.

1. Моделювання механічної непроникаючої травми рогівки в ранні терміни супроводжується підвищенням протеолітичної активності крові та збільшенням концентрації факторів антипротеазного захисту – α_1 -ІП та α_2 -макроглобуліну, що свідчить про зростання антипротеолітичного потенціалу для стримування розвитку деструкції. Такі зміни можна розглядати як адаптивну реакцію організму.

2. Хірургічна корекція механічної травми із застосуванням еквівалента строми ксенорогівки свині,

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

Перспектива подальших досліджень.

У перспективі будуть досліджуватися показники протеїназо-інгібіторної системи у різні періоди експериментальної непроникаючої травми рогівки на локальному рівні (у внутрішньоочній рідині).

References / Література

1. Deanna HD, Kamran MR, Dimitrios K. Treatment of Non-Infectious Corneal Injury. Review of Diagnostic Agents, Therapeutic Medications, and Future Targets Drugs. 2022;82:145-167.
2. Negrel AD, Thylefors B. The global impact of eye injuries. Ophthalmic Epidemiology. 1998;5:143-167.
3. Kim MK, Miyagawa S. Xenotransplantation. London: IntechOpen; 2017. p. 25-46.
4. 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;21:25-34.
5. Pasiechnikova NV, Iakymenko SA, Bihuniak VV, Turchyn MV. Eksperymentalne obhruntuvannya I pershyi dosvid vykorystannia ksenorohivky pry likuvalno-tektonichnii keratoplastytsi u hvoryh iz vyrazkamy rohivky riznoi etiologii. Novosti medytsyny I farmatsii. Oftalmologiya [Internet]. 2012;417:1. Dostupno: <http://www.mif-ua.com/archive/article/28928>. [in Ukrainian].
6. Cohen D, Miyagawa Y, Mehra R, Lee W, Isse K, Long C, et al. Distribution of non-gal antigens in pig cornea: relevance to corneal xenotransplantation. Cornea. 2014;33:390-397.
7. Lee HI, Kim MK, Oh JY, Ko JH, Lee HJ, Wee WR, et al. Gal alpha (1-3) Gal expression of the cornea in vitro, in vivo and in xenotransplantation. Xenotransplantation. 2007;14:612-618.
8. Hargrave SL, Mayhew E, Hegde S, Niederhorn J. Are corneal cells susceptible to antibody-mediated killing in corneal allograft rejection? Transpl. Immunol. 2003;11:79-89.
9. Council of Europe. European convention for the protection of vertebrate animals used for experimental and other scientific purposes. Strasbourg. 1986;123:52.
10. Kozemiakin IY. M. Naukovo-praktichni rekomendatsii z utrymattia laboratornyh tvaryn ta roboty z nymy. K.; 2002. 155 s. [in Ukrainian].
11. Kohan BM, Pasiechnikova NV, Nasinnyk IO, Kolomijchuk SH, vynakhidnyky; Dedzavna ustanova "Instytut ochnyh hvorob I tkanyynnoi terapii im. V.P. Filatova NAMN Ukrainy", patentovlasnyk. Sposib otrymattia ekvivalenta stromy rohivky dlia keratoplastyky. Patent Ukrainy № u2015032153. 2015 Ver 25. [in Ukrainian].
12. Veremeienko KN, Holobolodko OP, Kizim AI. Proteoliz v normie I pri patolohii. Zdorovia; 1988. 200 s.
13. Amanso A.M. Differential roles of NADPH oxidases in vascular physiology and pathophysiology. Front. Biosci. 2012;1(4):1044-1064.
14. Krynytska Ila. Stan protejinazo-inhibitornoi systemy krovi ta bronhoalveoliarnoho zmyvu u shchuriv z modeliovanyh hepatopulmonalnym syndromom. Zahalna patolohia ta patolohichna fiziologhiia. 2012;7(4):92-97. [in Ukrainian].
15. Kresin VJ, Kresin VJ, Sementsiv NH, Reheda MS. Osoblyvosti zryshen stanu proteinazno-inhibitornoi systemy za umov rozvytku eksperymentalnoho alerichnogo alveolitu I shliahy joho korektsii. Odeskij medychnyj zurnal. 2009;3(113):35-37. [in Ukrainian].
16. Turchyn NV, Klishch IN, Krynytska Ila. Dynamika pokazateliei proteinazo-inhibitornoi sistemi krovi I vodianistoi vlahi pri eksperymentalnoj mehanicheskoy nepronikajushchej travmie rohovitsy. Oftalmologiya. Vostochnaia Evropa. 2015;1(24):43-50.
17. Turchyn MV, Klishch IM. Dynamika pokaznykiv oksydatijnogo stresu za umovy eksperymentalnoi mehanichnoi nepronikajushchoi travmy rohivky ta ii korektsii keratoksenoimplantom. Visnyk problem biolohii I medytsyny. 2015;2.3(120):239-242. [in Ukrainian].
18. Zorin NA, Zorina VN, Zorina RM, Levchenko VH. Universalnyi rehulator - α_2 -makrohlobulin. Klinicheskaia laboratornaia diahnostika. 2004;11:18-21. [in Ukrainian].

СТАН ПРОТЕЇНАЗО-ІНГІБІТОРНОЇ СИСТЕМИ КРОВІ КРОЛІВ З МЕХАНІЧНОЮ НЕПРОНИКАЮЧОЮ ТРАВМОЮ РОГІВКИ ТА ЗА ЇЇ КОРЕКЦІЇ З ВИКОРИСТАННЯМ СТРОМИ КСЕНОРОГІВКИ, ОТРИМАНІЙ МЕТОДОМ ДЕЦЕЛЮЛЯРИЗАЦІЇ

Шмир С. М., Кліщ І. М.

Резюме. Метою нашого дослідження було визначення особливостей змін показників протеїназо-інгібіторної системи крові у кролів за умов непроникаючої механічної травми рогівки та її корекції з використанням строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації. Залежно від проведеної корекції тварин поділили на 3 групи: 1 група – тварини без патології (інтактні); 2-га – тварини із змодельованою непроникаючою механічною травмою рогівки; 3-я – тварини із змодельованою непроникаючою механічною травмою рогівки, яким проводили хірургічну корекцію із використанням строми ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації. Матеріал для дослідження отримували на 3-тю, 7-му, 14-ту та 28-му доби після моделювання патологічного процесу. Проведеними дослідженнями встановлено, що моделювання механічної непроникаючої травми рогівки в ранні терміни (3-тя, 7-ма доби від моменту нанесення травми) супроводжується підвищенням протеолітичної активності крові як стосовно дрібнодисперсних і великодисперсних білків, так і основної речовини сполучної тканини – колагену, про що свідчить достовірне зростання концентрації азоказеїну, азоальбуміну та азоколу. У подальші терміни спостереження (14-та та 28-ма доби) активність протеолітичних процесів знижувалась, однак до норми не приходила. Водночас мало місце збільшення концентрації факторів антипротеазного захисту – α_1 -ІП та α_2 -макроглобуліну, що вказує на посилення антипротеолітичного потенціалу для стримування розвитку деструкції. Хірургічна корекція механічної травми із застосуванням ксенорогівки свині, отриманої методом децелюляризації, супроводжується менш інтенсивним зростанням факторів протеолізу на ранніх етапах, а до завершення терміну експерименту показники перебували на триві-ні тварин без змодельованої патології. Водночас показники антипротеазної активності були вищими, ніж у

тварин без корекції, а це сприяло нормалізації співвідношення протеази/інгібітори протеаз, на що вказує достовірно менше зростання індексу протеолізу на початкових етапах патологічного процесу і нормалізація його до завершення експерименту.

Ключові слова: протеїназо-інгібіторна система, кров, механічна травма рогівки, хірургічна корекція, ксенорогівка, децелюляризація.

BLOOD PROTEINASE-INHIBITOR SYSTEM IN RABBITS WITH MECHANICAL NON-PENETRATING CORNEAL INJURY AND ITS CORRECTION WITH THE USE OF XENOCORNEAL STROMA RECEIVED BY THE DECELLULARIZATION METHOD

Shmyr S. M., Klishch I. M.

Abstract. The purpose of our study was to determine the characteristics of changes in the indicators of the proteinase-inhibitory blood system in rabbits under the conditions of non-penetrating mechanical trauma to the cornea and its correction using pig xenocorneal stroma obtained by the decellularization method. Depending on the performed correction, the animals were divided into 3 groups: 1 group – animals without pathology (intact); 2nd – animals with a simulated non-penetrating mechanical injury of the cornea; 3rd – animals with a simulated non-penetrating mechanical injury of the cornea, which underwent surgical correction using porcine xenocorneal stroma obtained by the decellularization method. The material for research was obtained on the 3rd, 7th, 14th and 28th days after modeling the pathological process. The conducted studies established that simulation of a mechanical non-penetrating corneal injury in the early stages (3rd, 7th days from the moment of injury) is accompanied by an increase in the proteolytic activity of blood both in relation to fine and large-dispersed proteins, and the main substance of connective tissue – collagen, which shows a significant increase in the concentration of azocasein, azoalbumin and azocol. In the subsequent periods of observation (14th and 28th days), the activity of proteolytic processes decreased, but did not return to normal. At the same time, there was an increase in the concentration of antiprotease protection factors – α 1-IP and α 2-macroglobulin, which indicates an increase in the antiproteolytic potential to restrain the development of destruction. Surgical correction of a mechanical injury using a pig xenocornea obtained by the decellularization method is accompanied by a less intensive growth of proteolysis factors in the early stages, and until the end of the experiment, the indicators were at the level of animals without simulated pathology. At the same time, indicators of antiprotease activity were higher than in animals without correction, and this contributed to the normalization of the protease/protease inhibitor ratio, as indicated by a significantly lower increase in the proteolysis index at the initial stages of the pathological percentage and its normalization before the end of the experiment.

Key words: proteinase-inhibitory system, blood, mechanical injury of the cornea, surgical correction, xenocornea, decellularization.

ORCID and contributionship / ORCID автора та його внесок до статті:

Shmyr S. M.: [0000-0002-4144-9053](https://orcid.org/0000-0002-4144-9053)^{BCD}

Klishch I. M.: [0000-0001-6226-4296](https://orcid.org/0000-0001-6226-4296)^{AEF}

Conflict of interest / Конфлікт інтересів:

The Authors declare no conflict of interest. / Автори статті заявляють про відсутність конфлікту інтересів.

Corresponding author / Адреса для кореспонденції

Shmyr Solomiya Mykolayivna / Шмир Соломія Миколаївна

Ivan Horbachevsky Ternopil National Medical University of the Ministry of Health of Ukraine / Тернопільський національний медичний університет імені І.Я. Горбачевського МОЗ України

Ukraine, 46001, Ternopil, 1 Maidan Voli / Адреса: Україна, 46001, м. Тернопіль, Майдан Волі 1

Tel.: +380979867367 / Тел.: +380979867367

E-mail: shmyr@tdmu.edu.ua

A – Work concept and design, **B** – Data collection and analysis, **C** – Responsibility for statistical analysis, **D** – Writing the article, **E** – Critical review, **F** – Final approval of the article / **A** – концепція роботи та дизайн, **B** – збір та аналіз даних, **C** – відповідальність за статистичний аналіз, **D** – написання статті, **E** – критичний огляд, **F** – остаточне затвердження статті.

Received 24.03.2023 / Стаття надійшла 24.03.2023 року
Accepted 28.08.2023 / Стаття прийнята до друку 28.08.2023 року