

М. Б. Данилюк<sup>1</sup>, І. М. Кліщ<sup>1</sup>, І. П. Кузьмак<sup>1</sup>, А. П. Краснопорова<sup>2</sup>  
ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ І. Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО  
МОЗ УКРАЇНИ<sup>1</sup>  
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ В. Н. КАРАЗІНА<sup>2</sup>

## ЕЛЕМЕНТНИЙ СКЛАД ЕКВІВАЛЕНТА СТРОМИ РОГІВКИ, ОТРИМАНОЇ МЕТОДОМ ДЕЦЕЛЮЛЯРИЗАЦІЇ

**Вступ.** У результаті збільшення військового, дорожньо-транспортного і побутового травматизму проблема дефіциту донорського матеріалу особливо актуальна. Величезний дефіцит донорського матеріалу для кератопластики змушує шукати додаткові джерела трансплантаційного матеріалу, методики виготовлення та використання ксеногенних трансплантатів. Одним з таких матеріалів є рогівка свині, яка за своєю структурою і біомеханічними параметрами має схожість з рогівкою людини.

**Мета дослідження** – вивчити елементний склад еквівалента строми рогівки, видаленої з очей свиней та отриманої методом децелюляризації з метою подальшої можливості її застосування як матеріалу для кератопластики.

**Методи дослідження.** Рогівкову оболонку, одержану з видалених очей свиней, розміщують у середовищі для культивування тканини, після чого проводять її децелюляризацію. Обробляють 0,5 % розчином додецилсульфату натрію при постійному струшуванні; обробляють ультразвуком (трічі), проводять інкубацію за наявності ензимного розчину папаїну; промивають буферним розчином (рН 6,5), центрифугують. Поміщають у розчин полівінілпіролідону для зберігання. З метою визначення елементного складу біологічних зразків у роботі використали фотоколориметричний та атомно-абсорбційний методи аналізу.

**Результати й обговорення.** Досліджено елементний склад еквівалента строми рогівки, отриманої методом децелюляризації. За результатами атомно-абсорбційного аналізу, в децелюляризованій рогівці свиней ідентифіковано 14 макро- та мікроелементів. Серед макроелементів найбільшою була кількість натрію – 8323 мг/кг повітряно-сухої проби, калію – 1163 мг/кг, магнію – 618 мг/кг, кальцію – 224 мг/кг. Масова частка мікроелементів у досліджуваному об'єкті перебувала в такій послідовності: залізо – 755 мг/кг, кобальт – 296 мг/кг, нікель – 103 мг/кг, титан – 13,2 мг/кг, цинк – 7,9 мг/кг, манган – 4,5 мг/кг, силіцій – 6,2 мг/кг, купрум – 5,7 мг/кг, лантан – 0,4 мг/кг. Найменшою була кількість срібла – 0,03 мг/кг.

**Висновок.** Перспективними для подальших досліджень є всебічне вивчення та вдосконалення використаного методу децелюляризації рогівки тварин з метою отримання біоінженерних зразків для їх подальшої кератопластики, що дозволить вирішити актуальну проблему трансплантології – отримання донорського матеріалу.

КЛЮЧОВІ СЛОВА: рогівка свиней; децелюляризація; макро- та мікроелементи; атомно-абсорбційний метод аналізу; кератопластика.

ВСТУП. Захворювання рогівки є другою причиною сліпоти в більшості країн світу, що розвиваються. На сьогодні, незважаючи на прогрес у наших знаннях про етіопатогенез різних захворювань передньої частини ока, захворювання рогівки вважають основною причиною втрати зору [1, 2].

Рогівка – це прозора передня поверхня ока, яка забезпечує приблизно дві третини його фокусної сили. Будь-яка постійна втрата прозорості внаслідок травмування або захворювання може призвести до сліпоти. Всесвітня організація охо-

© М. Б. Данилюк, І. М. Кліщ, І. П. Кузьмак, А. П. Краснопорова, 2021.

рони здоров'я виявила 23 мільйони людей по всьому світу, які страждають від захворювань рогівки, що призводять до часткової, а в 10 мільйонів – до повної втрати зору на одному чи обох очах. При цьому на рік у світі проводять лише від 100 до 200 тисяч пересадок рогівки. Таким чином, у світі існує значний дефіцит донорських рогівок для пересадки. У західних країнах існує відносний дефіцит донорських рогівок, але у країнах, що розвиваються, спостерігають майже повну їх відсутність. Такі хвороби, як трахома, травми й опіки рогівки, кір та бактеріальні інфекції, є провідними причинами сліпоти, яку можна вилікувати шляхом пересадки

рогівки. В Україні щорічно потрібно приблизно 4000 рогівок для пересадки, тоді як на рік виконують лише близько 500 пересадок рогівки [3, 4].

Трансплантація донорської рогівки людини, а саме кератопластика, є основою для лікування рогівкової сліпоти. Проте глобальний дефіцит донорської рогівки залишає близько 12,7 мільйона осіб у списках очікування, при цьому лише 1 із 70 пацієнтів лікується [2, 5].

Однак застосування такого радикального лікування, як кератопластика, ускладнюється ризиком відторгнення при антигенній несумісності між трансплантатом і господарем та через низьку доступність адекватного донорського матеріалу, тому розробка альтернатив донорській рогівці людини має велике значення [2, 6].

У зв'язку з цим, важливо розглянути можливість використання рогівки свині як ксенотрансплантата для людини, оскільки вона найбільше нагадує рогівку людини щодо антигенного складу тканин [6–8].

В останні роки проведено експериментальні дослідження потенційних можливостей застосування для кератопластики рогівки свині як такої, що за своїми морфологічними й імунологічними властивостями достатньо наближена до рогівки людини [9, 10].

Важливим є те, що після децелюляризації ксенотрансплантат повинен бути подібним до нативної рогівки людини щодо імунологічної характеристики, біосумісності, механічної міцності та прозорості, створюючи таким чином оптимальне мікроекспериментальне досліджуване середовище для подальшої міграції стромальних і епітеліальних клітин.

Тому розробка та вдосконалення методів для децелюляризації донорської рогівки з метою розвитку біоінженерних моделей рогівки з наступною кератопластикой є завданням, що дозволить вирішити актуальну проблему трансплантології – отримання донорського матеріалу [2, 6–13].

Оскільки на даний час не існує надійного, стандартизованого протоколу децелюляризації рогівки людини, наявність зазначених проблем зумовила актуальність проведеного дослідження та визначила мету цієї роботи.

Мета дослідження – вивчити елементний склад еквівалента строми рогівки, видаленої з очей свиней та отриманої методом децелюляризації з метою подальшої можливості її застосування як матеріалу для кератопластики.

**МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ.** Технологія отримання донорського матеріалу була стандартною. Забір рогівок проводили в цеху забою тварин з дотриманням принципів біоетики відповідно до

Загальних етичних принципів експериментів на тваринах (Київ, 2001), узгоджених з положеннями Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей (Страсбург, 1986), і Директиви Європейського Союзу 2010/10/63 ЕУ щодо експериментів на тваринах, а також Науково-практичних рекомендацій з утримання лабораторних тварин та роботи з ними [14].

Рогівкову оболонку, отриману з видалених очей свиней, розміщують у середовищі для культивування тканини, після чого проводять її децелюляризацію таким чином: обробляють 0,5 % розчином додецилсульфату натрію за умов постійного струшування при температурі, не вищій 4 °С, потім – ультразвуком (використовують ультразвуковий диспергатор УЗДН-М 750) протягом 5 хв, здійснюють інкубацію за наявності ензимного 0,1 % розчину папаїну (рН 6,5) упродовж 2,5 год при 30 °С, промивають у калій-фосфатному 0,1 м буфері (рН 6,5) трикратно по 5 хв. Знову обробляють ультразвуком протягом 5 хв, потім – 0,5 % розчином додецилсульфату натрію двічі впродовж 3 год, промивають у калій-фосфатному 0,1 м буфері (рН 6,5) трикратно по 5 хв. Ще раз обробляють ультразвуком протягом 5 хв, промивають у калій-фосфатному буфері (рН 6,5) п'ятикратно по 5 хв. Центрифугують (ROTOFIX 32-A) при 3000 г 15 хв з декантацією трикратно і переносять у середовище для зберігання – у 2 % розчин полівінілпіролідону при температурі 0 °С (пат. 101707 U, 2015) [15].

З метою проведення хімічного аналізу проби рогівки ока забирали шматочки рогівки. Для подальших досліджень використано фізичні, хімічні й фізико-хімічні методи аналізу.

Для визначення елементного складу біологічних зразків у роботі застосовано фотоколориметричний та атомно-абсорбційний методи аналізу [16–18].

З метою визначення хімічного складу біологічних зразків проведено підготовку проб. Пробопідготовку зразків сировини здійснювали методом сухого та мокрого (для визначення кадмію і плюмбуму) озолення [19]. Сухе озолення досліджуваної проби проводили шляхом спалювання у муфельній печі за температури 450–500 °С упродовж 5–8 год. Мокре озолення полягає в обробці певної наважки сировини концентрованою сірчаною кислотою і біхроматом калію. У наважку повітряно-сухої проби 0,1 г додавали 10 % розчин біхромату калію та обробляли під тягою 5–10 мл концентрованої сірчаної кислоти, кип'ятили доти, поки розчин не стане прозорим. Це буде свідчити про те, що вся органіка окиснилась (згоріла). Одержаний розчин висушували

в сушильній шафі, розчиняли у невеликій кількості води, використовували для подальшого аналізу і, згідно з методиками атомно-абсорбційного або фотоколориметричного аналізу, вимірювали елементи. Атомно-абсорбційний аналіз проводили на атомно-абсорбційному спектрофотометрі AA-7050 (EWA1 з автоматичним перемиканням режимів атомізації).

Атомізацію хімічних елементів здійснювали у повітряно-ацетиленовому полум'ї, аналітичний сигнал вимірювали при таких довжинах хвиль:  $\lambda=766,0$  нм (калій),  $\lambda=422,0$  нм (кальцій),  $\lambda=589,0$  нм (натрій),  $\lambda=372,0$  нм (залізо),  $\lambda=324,7$  нм (мідь),  $\lambda=285,2$  нм (магній),  $\lambda=279,5$  нм (марганець),  $\lambda=213,9$  нм (цинк),  $\lambda=283,3$  нм (свинець),  $\lambda=232,0$  нм (нікель),  $\lambda=228,8$  нм (кобальт, кадмій),  $\lambda=193,1$  нм (миш'як, хром, срібло).

Вміст ртуті у пробах рогики визначали атомно-абсорбційним методом безполуменевої атомізації за допомогою ртутної приставки ПР-115. Метод полягає у розкладанні ртуті в суміші кислот з подальшим відновленням хлоридом олова й аналізом безполуменевим методом холодної пари на атомно-абсорбційному спектрофотометрі. Використовували аналітичну лінію ртуті 257,7 нм, що відповідала резонансному поглинанню парів. Аналітичний сигнал ртуті вимірювали при довжині хвилі  $\lambda=253,7$  нм [20].

Концентрацію титану, лантану, кремнію визначали фотоколориметричним методом [21, 22].

Оптичну щільність розчину титану вимірювали на спектрофотометрі СФ-46 при довжині хвилі  $\lambda=385,0$  нм.

Оптичну густину кремнію вимірювали на спектрофотометрі ФЕК-2. Максимум оптичної густини в спектрі поглинання утвореної сполуки спостерігають при 410 нм [22].

Калібрувальну криву будували в залежності середніх значень поглинання розчинів порівняння солей металів від їх концентрації. Для кожного елемента було досягнуто строгої лінійності з використанням п'яти калібрувальних розчинів в інтервалі вимірюваних концентрацій. Максимальна відносна похибка вимірювання при довірчій імовірності 0,95 і п'яти паралельних вимірюваннях становила  $\pm 5\%$  [19].

**РЕЗУЛЬТАТИ Й ОБГОВОРЕННЯ.** Отриманий розчин рогики було досліджено на вміст макро- та мікроелементів Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Hg, Pb, Mn, Cd, Ni, Co, As, Cr, Zn, Si, Ag, Ti, La методом атомно-абсорбційної спектроскопії.

Як відомо, значна кількість порушень гомеостазу пов'язана з дефіцитом або надлишком того чи іншого елемента. Недостатня кількість макро- та мікроелементів в організмі зумовлює різно-

мантні перетворення у тканинах очного яблука [23, 24].

За результатами атомно-абсорбційного аналізу, в децелюляризованій рогиці свині ідентифіковано 14 макро- та мікроелементів (табл.).

Серед макроелементів найбільшою була кількість натрію – 8323 мг/кг повітряно-сухої проби, калію – 1163 мг/кг, магнію – 618 мг/кг, кальцію – 224 мг/кг.

Масова частка мікроелементів у досліджуваному об'єкті перебувала в такій послідовності: залізо – 755 мг/кг, кобальт – 296 мг/кг, нікель – 103 мг/кг, титан – 13,2 мг/кг, цинк – 7,9 мг/кг, манган – 4,5 мг/кг, силіцій – 6,2 мг/кг, купрум – 5,7 мг/кг, лантан – 0,4 мг/кг.

Найменшою була кількість ультрамікроелемента срібла – 0,03 мг/кг.

Не визначено таких мікроелементів: ртуті, свинцю, кадмію, миш'яку, хрому.

Усі біохімічні процеси в організмі регулюються ензимами, а ті, у свою чергу, функціонують при наявності активаторів, роль яких частково відіграють такі елементи, як калій, натрій, магній, цинк, алюміній та інші, які у вигляді іонів входять до складу активного центру ензимів, збільшуючи швидкість біохімічних процесів, що регулюють метаболізм.

Так, іони калію входять до активного центру ензимів, що беруть участь у метаболічних процесах, – АТФ-ази, піруватфосфокінази, карбоангідрази тощо [23–25].

Калій, кальцій і хлор є важливими елементами, які беруть участь у регуляції та балансі

Таблиця – Хімічний аналіз проби рогики ока на вміст макро- і мікроелементів

№ з/п	Назва показника	Вміст, мг/кг
1	Натрій (Na)	8323
2	Калій (K <sup>+</sup> )	1163
3	Кальцій (Ca)	224
4	Магній (Mg)	618
5	Залізо (Fe)	755
6	Мідь (Cu)	5,7
7	Ртуть (Hg)	н/в
8	Свинець (Pb)	н/в
9	Марганець (Mn)	4,5
10	Кадмій (Cd)	н/в
11	Нікель (Ni)	103
12	Кобальт (Co)	296
13	Миш'як (As)	н/в
14	Хром (заг.(Cr))	н/в
15	Цинк (Zn)	7,9
16	Кремній (Si)	6,2
17	Срібло (Ag)	0,03
18	Титан (Ti)	13,2
19	Лантан (La)	0,4

Примітка. н/в – не визначено.

негативного або позитивного заряду роги́вки і можуть впливати на взаємодії молекул роги́вкового матриксу. Можливі зміни розвитку в іонному середовищі Cl, K і Ca лежать в основі змін у фізико-хімічній архітектурі роги́вки, а також допомагають зробити тканину роги́вки прозорою. Встановлено, що з віком та при катаракті в тканинах кришталика зменшується концентрація іонів калію [25].

Мікроелементи алюміній, титан і силіцій беруть участь в утворенні епітеліальних тканин та мембран клітин, надають їм щільності. Купрум, цинк і залізо проявляють синергічну дію один щодо одного, беруть активну участь в окисно-відновних процесах організму та мають антирадикальну активність. Встановлено інгібуючу дію срібла відносно біологічної активності мікроорганізмів [24].

Кератоцити – основні клітинні компоненти строми роги́вки – відіграють значну роль у підтриманні прозорості роги́вки, відновленні її при

ушкодженні, синтезі її компонентів. У неушкодженій роги́вці вони перебувають у неактивному стані й активуються при ушкодженні чи запаленні різного генезу. Значна роль у цьому процесі належить матриксним металопротеїназам, які, власне, сприяють ремодельованню тканини роги́вки після ушкодження. Матриксні металопротеїнази – це кальцієзалежні та цинковмісні позаклітинні протеїнази, які також допомагають підтримувати нормальну структуру роги́вки. Будь-який збій у високоорганізованому процесі загоєння може призвести до помутніння роги́вки, тому теж важливу роль відіграють кальцій та цинк [26].

**ВИСНОВОК.** Таким чином, результати дослідження розширяють і поглиблюють існуючі уявлення про елементний склад проби роги́вки, видаленої з очей свиней та отриманої методом децелюляризації на вміст макро- і мікроелементів з метою подальшої можливості її застосування як матеріалу для кератопластики.

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Oliva M. S. Turning the tide of corneal blindness / M. S. Oliva, T. Schottman, M. Gulati // *Indian J. Ophthalmol.* – 2012. – **60**, Issue 5. – P. 423–427. DOI: 10.4103/0301-4738.100540.
2. Pasyechnikova N. V. Experimental study of efficacy of intralamellar keratoplasty with corneal stromal substitute developed from decellularized porcine cornea / N. V. Pasyechnikova, B. M. Cogan, S. G. Kolomiichuk // *J. Ophthalmol. (Ukraine)*. – 2017. – No. 3. – P. 48–55.
3. Турчин М. В. Експериментальне обґрунтування і досвід використання ксенороги́вки при лікувально-тектонічній кератопластикі у хворих із виразками роги́вки різної етіології / М. В. Турчин, Н. В. Пасечникова // *Шпитальна хірургія. Журн. імені Л. Я. Ковальчука*. – 2017. – № 3. – С. 43–48.
4. LiQD Cornea: Pro-regeneration collagen mimetics as patches and alternatives to corneal transplantation / C. D. McTiernan, F. C. Simpson, M. Haagdoorens [et al.] // *Sci. Adv.* – 2020. – **6**, Issue 25. – eaba2187. DOI: 10.1126/sciadv.aba2187.
5. Global survey of corneal transplantation and eye banking / P. Gain, R. Jullienne, Z. He [et al.] // *JAMA Ophthalmol.* – 2016. – **134**, Issue 2. – P. 167–173. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2015.4776.
6. Cox A. Current advances in xenotransplantation / A. Cox, R. Zhong // *Hepatobiliary Pancreat. Dis. Int.* – 2005. – **4**, Issue 4. – P. 490–494.
7. Hara H. Xenotransplantation – the future of corneal transplantation? / H. Hara, D. K. Cooper // *Cornea*. – 2011. – **30**, Issue 4. – P. 371–378. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3181f237ef.
8. Corneal decellularization: a method of recycling unsuitable donor tissue for clinical translation? / S. L. Wilson, L. E. Sidney, S. E. Dunphy [et al.] // *Curr. Eye Res.* – 2016. – **41**, Issue 6. – P. 769–782. DOI: 10.3109/02713683.2015.1062114.
9. Морфологічні зміни еквівалента строми роги́вки, отриманої методом децелюляризації / М. Б. Данилюк, І. М. Кліщ, І. П. Кузьмак, С. Б. Крамар // *Мед. та клініч. хімія*. – 2020. – **22**, № 4 (86). – С. 32–38.
10. Decellularization methods for developing porcine corneal xenografts and future perspectives / A. Isidan, S. Liu, P. Li [et al.] // *Xenotransplantation*. – 2019. – **26**, Issue 6. – e12564. DOI: 10.1111/xen.12564.
11. A comparison of three methods of decellularization of pig corneas to reduce immunogenicity / W. Lee, Y. Miyagawa, C. Long, [et al.] // *Int. J. Ophthalmol.* – 2014. – **7**, Issue 4. – P. 587–593. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2014.04.01.
12. Реакция роговицы кролика на интраламеллярную имплантацию бесклеточного модуля строми роговицы человека / Н. В. Пасечникова, В. В. Вит, Н. Ф. Леус [и др.] // *Офтальмол. журн.* – 2011. – № 1. – С. 57–60.
13. Vabres B. Corneal Xenotransplantation: Anterior Lamellar Keratoplasty / B. Vabres, V. Vanhove, G. Blanco // *Method. Mol. Biol.* – 2020. – No. 2110. – P. 245–251. DOI: 10.1007/978-1-0716-0255-3\_16.
14. Науково-практичні рекомендації з утримання лабораторних тварин та роботи з ними / Ю. М. Кожем'якін, О. С. Хромов, М. А. Філоненко, Г. А. Сайфетдінова. – К. : Авіцена, 2002. – 156 с.
15. Пат. на корисну модель № 101707 Україна, МПК (2006.01) А 61 F 9/01, А 61 P 27/02, А 61 N 7/02 (2006.01). Спосіб отримання еквівалента строми роги́вки для кератопластики / Коган Б. М., Пасечникова Н. В., Насінник І. О., Коломійчук С. Г. ; заявник та патентовласник Держ. установа "Інститут очних

хвороб і тканинної терапії ім. В. П. Філатова НАМН України". – № u2015032153; заявл. 06.04.15; опубл. 25.09.15, Бюл. № 18/2015.

16. Брицке М. Э. Атомно-абсорбционный спектроскопический анализ / М. Э. Брицке. – М., 1982. – 375 с.

17. Тарасевич Н. И. Методы спектрального и химико-спектрального анализа / Н. И. Тарасевич, К. А. Семененко, А. Д. Хлыстова. – М. : Изд-во МГУ, 1973. – 276 с.

18. Анализ объектов окружающей среды. Инструментальные методы / под ред. Р. Сониасси ; пер. с англ. – М. : Мир, 1993. – 79 с.

19. Карпов Ю. А. Методы пробоотбора и пробоподготовки / Ю. А. Карпов, А. П. Савостин. – М., 2003. – 243 с.

20. МУК 4.1.1471-03. Атомно-абсорбционное определение массовой концентрации ртути в почвах и твердых минеральных материалах : метод. указания [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293766/4293766601.htm>.

21. ГОСТ 3240.9-76. Сплавы магниевые. Методы определения лантана. – 1982. – 375 с.

22. РД 52.24.433-2018. Массовая концентрация кремния в водах. Методика измерений фотометричес-

ким методом в виде желтой формы молибдокремниевой кислоты (с Поправкой № 1) [Электронный ресурс]. – Режим доступа : <https://files.stroyinf.ru/Index2/1/4293732/4293732924.htm>.

23. Турчин М. В. Амінокислотний та елементний склад кріоліофілізованої рогівки свині / М. В. Турчин, В. В. Бігуняк, С. С. Козачок // Фітотерапія. Часопис. – 2016. – № 1. – С. 60–64.

24. Агаева Т. С. Изучение свойств микроэлементов, входящих в состав алумена, применяемого в офтальмологии (обзор литературы) / Т. С. Агаева // Офтальмол. журн. – 2011. – 3, № 7. – С. 103–108.

25. Koudouna E. Structural and biochemical investigations of the cornea and the trabecular meshwork: Thesis submitted to Cardiff University for the degree of Doctor of Philosophy / Elena Koudouna. – UK, Cardiff: Cardiff University, 2013. Retrieved from: <https://orca.cardiff.ac.uk/56775/1/Koudouna%20-%20Elena%20-%20Thesis.pdf>.

26. Wilson S. E. Apoptosis in the initiation, modulation and termination of the corneal wound healing response / S. E. Wilson, S. S. Chaurasia, F. W. Medeiros // Exp. Eye Res. – 2007. – 85, Issue 3. – P. 305–311. DOI: 10.1016/j.exer.2007.06.009.

#### REFERENCES

1. Oliva, M.S., Schottman, T., & Gulati, M. (2012). Turning the tide of corneal blindness. *Indian J. Ophthalmol.*, 60 (5), 423-427. DOI: 10.4103/0301-4738.100540.

2. Pasyechnikova, N.V., Cogan, B.M., & Kolomiichuk S.G. (2017). Experimental study of efficacy of intralamellar keratoplasty with corneal stromal substitute developed from decellularized porcine cornea. *J. Ophthalmol. (Ukraine)*, 3, 48-55.

3. Turchin, M.V., & Pasechnikova, N.V. (2017). Experimental reasons and experience of the use of xenorought in treatment and tectonic cherat plasma in patients with varieties of different etiologies. *Hospital Surgery. Journal Named by L. Ya. Kovalchuk*, 3, 43-48. DOI: 10.11603/2414-4533.2017.3.8051 [in Ukrainian].

4. McTiernan, C.D., Simpson, F.C., Haagdoorens, M., Samarawickrama, C., Hunter, D., Buznyk, O., ..., & Griffith, M. (2020). LiQD Cornea: Pro-regeneration collagen mimetics as patches and alternatives to corneal transplantation. *Sci. Adv.*, 6 (25), eaba2187. DOI: 10.1126/sciadv.aba2187.

5. Gain, P., Jullienne, R., He, Z., Aldossary, M., Acquart, S., Cognasse, F., & Thuret, G. (2016). Global survey of corneal transplantation and eye banking. *JAMA Ophthalmol.* 134 (2), 167-173. DOI: 10.1001/jamaophthalmol.2015.4776.

6. Cox, A., & Zhong, R. (2005). Current advances in xenotransplantation. *Hepatology Pancreat. Dis. Int.*, 4 (4), 490-494.

7. Hara, H., & Cooper, D.K. (2011). Xenotransplantation – the future of corneal transplantation? *Cornea*, 30 (4), 371-378. DOI: 10.1097/ICO.0b013e3181f237ef.

8. Wilson, S.L., Sidney, L.E., Dunphy, S.E., Dua, H.S., & Hopkinson, A. (2016). Corneal decellularization: a method of recycling unsuitable donor tissue for clinical translation? *Curr. Eye Res.*, 41 (6), 769-782. DOI: 10.3109/02713683.2015.1062114.

9. Danyliuk, M.B., Klishch, I.M., Kuzmak, I.P., & Kramar, S.B. (2020). Morphological changes in the equivalent of the cornea stroma obtained by the decellularization method. *Med. Clin. Chem.*, 4, 32-38. DOI: 10.11603/mcch.2410-681X.2020.i4.11736 [in Ukrainian].

10. Isidan, A., Liu, S., Li, P., Lashmet, M., Smith, L.J., Hara, H., Cooper, D., & Ekser, B. (2019). Decellularization methods for developing porcine corneal xenografts and future perspectives. *Xenotransplantation*, 26 (6), e12564. DOI: 10.1111/xen.12564.

11. Lee, W., Miyagawa, Y., Long, C., Cooper, D. K., & Hara, H. (2014). A comparison of three methods of decellularization of pig corneas to reduce immunogenicity. *Int. J. Ophthalmol.*, 7 (4), 587-593. DOI: 10.3980/j.issn.2222-3959.2014.04.01.

12. Pasyechnikova, N.V., Vit, V.V., Leus, N.F., Yakimenko, S.A., Buznyk, A.I., & Nasinnyk, I.O. (2011). The reaction of the rabbit cornea after intralamellar transplantation of the acellular stroma of the human cornea. *J. Ophthalmol.*, 1, 57-60 [in Russian].

13. Vabres, B., Vanhove, B., & Blanco, G. (2020). Corneal xenotransplantation: anterior lamellar keratoplasty. *Method. Mol. Biol.*, 2110, 245-251. DOI: 10.1007/978-1-0716-0255-3\_16.

14. Kozhemiakin, Yu.M., Khromov, O.S., Filonenko, M.A. & Saifetdinova, H.A. (2002). *Scientific and practical recommendations for maintenance laboratory animals and work with them*. Kyiv: Avitsenna [in Ukrainian].

15. Kogan, B.M., Pasechnikova, N.V., Nasinnyk, I.O., & Kolomiychuk, S.G. (2015). *Pat. Ukraine for utility model No. 101707, IPC (2006.01) A 61 F 9/01, A 61 P 27/02, A 61 N 7/02 (2006.01)*. The method of obtaining corneal stroma equivalent for keratoplasty. "The Filatov Institute of Eye Diseases and Tissue Therapy of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine"

inventors and assignee. No. u2015032153; stated. 06.04.2015; publ. 25.09.2015, Bull. No. 18/2015 [in Ukrainian].

16. Britske, M.E. (1982). *Atomic absorption spectrochemical analysis*. Moscow [in Russian].

17. Tarasevich, N.I., Semenenko, K.A., & Khlystova, A.D. (1973). *Methods of spectral and chemical-spectral analysis*. Moscow: Publishing House of Moscow State University [in Russian].

18. Soniassi, R. (Ed.). (1993). *Analysis of environmental objects. Instrumental methods*. Transl. from Engl. Moscow: Mir [in Russian].

19. Karpov, Yu.A., & Savostin, A.P. (2003). *Methods of sampling and sample preparation*. Moscow [in Russian].

20. MI 4.1.1471-03. Methodical instructions. Atomic absorption definition. mass concentration of mercury in soils and solid mineral materials. Retrieved from: <https://files.stroyinf.ru/Data2/1/4293766/4293766601.htm> [in Russian].

21. (1982). GOST 3240.9-76. *Magnesium alloys. Methods for the determination of lanthanum* [in Russian].

22. Guidance Document 52.24.433-2018. Mass concentration of silicon in waters. Photometric measurement method in the form of a yellow form of molybdosilicic acid (with Amendment No. 1). Retrieved from: <https://files.stroyinf.ru/Index2/1/4293732/4293732924.htm> [in Russian].

23. Turchin, M.V., Bigunyak, V.V., & Kozachok, S.S. (2016). Amino acid and elemental warehouse of cryophilized pig horn. *Phytother. J.*, 1, 60-64 [in Ukrainian].

24. Agaeva, T.S. (2011). Study of properties of the microelements which are a part of the alumen applied in ophthalmology (review of the literature). *Oftalmol. J.*, 3, 7, 103-108 [in Russian].

25. Koudouna, E. (2013). Structural and biochemical investigations of the cornea and the trabecular meshwork. *Doctors thesis*. UK, Cardiff: Cardiff University. Retrieved from: <https://orca.cardiff.ac.uk/56775/1/Koudouna%20-%20Elena%20-%20Thesis.pdf>.

26. Wilson, S.E., Chaurasia, S.S., & Medeiros, F.W. (2007). Apoptosis in the initiation, modulation and termination of the corneal wound healing response. *Exp. Eye Res.*, 85 (3), 305-311. DOI: 10.1016/j.exer.2007.06.009.

M. B. Danyliuk<sup>1</sup>, I. M. Klishch<sup>1</sup>, I. P. Kuzmak<sup>1</sup>, A. P. Krasnopyorova<sup>2</sup>  
I. HORBACHEVSKY TERNOPIŁ NATIONAL MEDICAL UNIVERSITY<sup>1</sup>  
V. N. KARAZIN KHARKIV NATIONAL UNIVERSITY<sup>2</sup>

## CHEMICAL COMPOSITION OF THE EQUIVALENT OF THE CORNEAL STROMA OBTAINED BY THE DECELULARIZATION METHOD

### Summary

**Introduction.** As a result of increasing military, traffic and domestic injuries, the problem of shortage of donor material is particularly relevant. The huge shortage of donor material for keratoplasty forces us to look for additional sources of transplant material, methods of making and using xenogeneic grafts. One such material is the pig's cornea, which is similar in structure and biomechanical parameters to the human cornea.

**The aim of the study** – to research the chemical composition of the equivalent of the corneal stroma, removed from the eyes of pigs and obtained by the method of decelularization in order to further its use as a material for keratoplasty.

**Research Methods.** The corneal membrane obtained from the removed eyes of pigs is placed in a medium for tissue culture, followed by its decellularization. Treated with 0.5 % solution of sodium dodecyl sulfate with constant shaking; treated with ultrasound (three times), incubate in the presence of an enzyme solution of papain; washed with buffer solution (pH 6.5), centrifuged. Place in a solution of polyvinylpyrrolidone for storage. Photocolorimetric and atomic absorption methods of analysis were used to determine the elemental composition of biological samples.

**Results and Discussion.** The chemical composition of the equivalent of the corneal stroma obtained by the method of decelularization was studied. According to the results of atomic absorption analysis in the decellularized cornea of pig, 14 macro- and microelements were identified. Among macroelements, the largest amount is sodium – 8323 mg/kg of air-dry sample, potassium – 1163 mg/kg, magnesium – 618 mg/kg and calcium – 224 mg/kg. The mass fraction of microelements in the study object is in the following sequence: iron – 755 mg/kg, cobalt – 296 mg/kg, nickel – 103 mg/kg, titanium – 13.2 mg/kg, zinc – 7.9 mg/kg, manganese – 4.5 mg/kg, silicon – 6.2 mg/kg, copper – 5.7 mg/kg, lanthanum – 0.4 mg/kg. The smallest amount is argentum – 0.03 mg/kg.

**Conclusion.** Promising for further research is a comprehensive study and improvement of the method used to deceleralize the cornea of animals in order to obtain bioengineered samples for their subsequent keratoplasty, which solves the problem of transplantation – obtaining donor material.

KEY WORDS: pig cornea; decellularization; macro- and microelements; atomic absorption method of analysis; keratoplasty.

Отримано 10.11.21

Адреса для листування: І. П. Кузьмак, Тернопільський національний медичний університет імені І. Я. Горбачевського МОЗ України, майдан Волі, 1, Тернопіль, 46001, Україна, e-mail: kuzmak@tdmu.edu.ua.