

Гребеник І.М., Волков К.С., Кліщ І.М.

## МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА І БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КСЕНОРОГІВКИ ПРИ КРІОКОНСЕРВАЦІ І ЛІОФІЛІЗАЦІ

Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського

**МОРФОЛОГІЧНА ХАРАКТЕРИСТИКА І БІОХІМІЧНІ ПОКАЗНИКИ КСЕНОРОГІВКИ ПРИ КРІОКОНСЕРВАЦІ І ЛІОФІЛІЗАЦІ** – Проведено комплексні морфологічні і біохімічні дослідження кріоконсервованих і ліофілізованих ксенорогівок із використанням криопротектора. Встановлено, що при попередній обробці матеріалу гліцерин-жовтковою сумішшю структурна організація і морфометричні показники компонентів кріоконсервовано ксенорогівки істотно не змінюються порівняно із нормою. Ліофілізована після кріоконсервації рогівка зберігає загальні закономірності будови компонентів. Застосовані методи консервації матеріалу суттєво не впливають на концентрацію глікопротеїнів і х складових-глікозаміногліканів у власній речовині рогівки, що вказує на можливість використання кріоконсервації і ліофілізації для тривалого зберігання і використання у практичній медицині.

**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА И БИОХИМИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ КСЕНОРОГОВИЦЫ ПРИ КРИОКОНСЕРВАЦИИ И ЛИОФИЛИЗАЦИИ** – Проведены комплексные морфологические и биохимические исследования кріоконсервованных и ліофілізованных ксенороговівок с использованием криопротектора. Установлено, что при предыдущей обработке материала глицерин-желточной смесью структурная организация и морфометрические показатели компонентов кріоконсервированной ксенороговівки существенно не изменяются в сравнении с нормой. Ліофілізованная после кріоконсервации рогівка хранит общие закономерности строения ее компонентов. Применены методы консервирования материала существенно не влияют на концентрацию гликопротеинов и их составляющих-гликозаминогликанов в собственном веществе рогівки, которая указывает на возможность использования кріоконсервации и ліофілізації для ее длительного хранения и использования в практической медицине.

**MORPHOLOGICAL CHARACTER AND BIOCHEMICAL INDICES OF CRYOCONSERVED AND LYOPHILIZED XENOCORNEAS** – Complex morphological and biochemical investigations of cryoconserved and lyophilized xenocorneas with using cryoprotectors have being made. It has being determined that structural organization and morphometric indices of cryoconserved corneas have not changed during preparing of material by yolk-glycerin blend. Lyophilization after cryoconservation corneas have saved their general structure. Using methods of conservation did not influence on concentration of glycoproteins and their components – glycosaminoglycans in corneal stroma. So they can be used in practical medicine for cryoconservation and lyophilization for their durated saving.

**Ключові слова:** ксенорогівка, морфологія, біохімічні показники, кріоконсервування, ліофілізація.

**Ключевые слова:** ксенороговічка, морфологія, биохимические показатели, кріоконсервирование, ліофілізація.

**Key words:** xenocornea, morphological state, cryoconservation lyophilization.

**ВСТУП** Використання ксеногенного трансплантаційного матеріалу в сучасних умовах широко визнане у різних сферах медицини. На фоні різкого збільшення людського травматизму, порушення екологічного балансу біосфери зростає частка патології рогівки, тому постала проблема дефіциту донорського матеріалу в офтальмології. Це стало стимулом до пошуку різних методик виготовлення та використання ксеногенних трансплантатів. Здатність рогівкової тканини до приживлення поза організмом [2], а також морфологічний стан при різних методах консервування представляють великий інтерес з точки зору життєздатності трансплантата. Важливим є також вивчення біохімічних показників рогівки та х змін при різних методах консервування. За даними Е.І. Ковальського (1980), рогівка містить 18 % колагену, близько 2 % глікозаміногліканів, білків, ліпідів, вітамінів, близько 80 % води. При порушенні цілісності епітелію рогівки вміст в ній вітамінів С, В<sub>2</sub> і глікозаміногліканів значно знижується [5]. Тому для якісного хірургічного лікування патології рогівки необхідне проведення комплексного вивчення структури і біохімічних складових компонентів.

Метою цього дослідження було встановлення морфологічного стану і біохімічних показників ксенорогівки при різних умовах зберігання.

**МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ** Об'єктом дослідження було 18 рогівок статевозрілих свиней, забір яких проводився в цеху забою тварин, відповідно до вимог біоетики Хельсинської декларації. Після енуклеації очей лезом розкривали очне яблуко з наступним викроєнням рогівки по лімбу. Отриманий матеріал було розділено на три групи. Першу групу складали 6 інтактних рогівок. Другу групу складали 6 кріоконсервованих рогівок, які попередньо проходили еквілібрацію в гліцерин-жовткової суміші, а потім х поміщали в рідкий азот [1]. Третю групу складали 6 ліофілізованих рогівок, які виготовлялись з кріоконсервованого матеріалу. Проводились гістологічні, морфометричні і біохімічні дослідження. Гістологічні дослідження виконано за загальноприйнятою методикою з фіксацією рогівки в 10 % нейтральному формаліні та послідовною заливкою в парафінові блоки. Отриманні на санному мікроскопі зрізи товщиною 5-6 мкм забарвлювали гематоксилином та еозином [3,4]. Гістологічні препарати вивчали і фотодокументували за допомогою світлооптичного мікроскопа ЕНАМЕД і відеокамери Vision CCD Camera. Для морфометричних та кількісних досліджень використовували систему візуального аналізу мікропрепаратів, програму Відео Тест 5.0 КААРА Image Base та Microsoft Excel на персональному комп'ютері. Визначали товщину переднього епітелію, площу базальних клітин і х ядер, а також товщину власної речовини рогівки.

Для біохімічних досліджень рогівку гомогенізували у відповідній кількості в 0,9 % розчині натрію хлориду протягом однієї години для отримання 10 % гомогенату. Визначили вміст глікопротеїнів, сіалових кислот, гіалуронової кислоти, хондроїтинсульфату.

Статистична обробка всіх цифрових даних при морфометричних дослідженнях проводилась з використанням методів варіаційної статистики. Відмінності між групами середніх величин і х похибками оцінювали за допомогою критерію Стьюдента (Авандилов Г.Г. 1990).

**РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕНЬ ТА Х ОБГОВОРЕННЯ** Гістологічні дослідження кріоконсервованої рогівки, яка попередньо піддавалась еквілібрації, показали, що структурна організація компонентів була мало зміненою. Чітко окреслені шари епітелію, передня і задня пограничні пластинки. Форма епітеліоцитів, інтенсивність забарвлення цитоплазми і ядер така ж, як в нормальній рогівці. Епітеліальний шар щільно прилягав до передньої пограничної мембрани. Сполучнотканні пластинки власної речовини зберігали свою правильну орієнтацію, а світлооптичні порожнини зустрічались рідко і були невеликими. Клітини заднього епітелію щільно прилягали до пограничної мембрани, зберігали плоску форму, базофільні еліпсоподібні ядра орієнтовані вздовж осі клітин.

Морфометричні дослідження показали, що застосування криопротектора при консервації ксенорогівки суттєво не впливало на товщину поверхнього епітеліального шару, його середнє значення дорівнювало (53,4±1,4) мкм, що статистично не достовірно відрізнялось від показника норми. Площа базальних епітеліоцитів не мала суттєвих відмінностей від величини норми і становила (119,8±1,8) мкм<sup>2</sup>. Також не відмічалось статистично достовірно різниці середнього значення площі ядер (22,9±1,2) мкм<sup>2</sup> клітин базального шару епітелію. Ядерно-цитоплазматичне співвідношення складало 0,238.

Гістологічні дослідження структурно організації ліофілізовано ксенорогівки, виготовлено після кріоконсервації, показали помітні зміни у компонентах трансплантата. Після регідрації рогівки з використанням кріопротектора виявлено, що товщина переднього епітелію ксенорогівки дещо зменшилась. Клітини цього шару зберігали свою форму. Передній епітелій щільно прилягав до погранично пластинки. Ядра епітеліоцитів мали чіткі контури, були округло-овальні і забарвлені базофільно менш інтенсивно, ніж у першій групі. Задня погранична пластинка контурувалась краще, ніж передня. Власна речовина мала пластинчасту структуру, але між пластинами колагену спостерігались пусті щілини. Фіброцити мали веретеноподібну форму і паличкоподібні ядра. Задній епітеліальний шар рогівки був представлений одношаровим плоским епітелієм із добре вираженим ядром зі світлою каріоплазмою.

Морфометричні дослідження встановили, що товщина поверхневого епітеліального шару зменшувалась на 20 %, середнє значення дорівнювало  $(41,7 \pm 1,4)$  мкм, що статистично достовірно відрізнялось від показника норми. Товщина власно речовини зменшувалась на 27 % і становила  $(680 \pm 7,8)$  мкм.

Проведенні біохімічні дослідження показали, що інтактна рогівка багата на протеоглікани, які становлять 0,86 ум.од. Кріоконсервування призводить до зниження вмісту біохімічних показників, що вивчались. Так, вміст протеогліканів стає на 29,9 % менше. При ліофілізації рогівки цей показник знижувався на 19,8 % від показника інтактно рогівки.

Аналогічна тенденція спостерігалась і при визначенні складових компонентів протеогліканів – глікозаміногліканів. У інтактній рогівці концентрація цієї біохімічно сполуки складала 80,8 мг/кг від сирової маси. Кріоконсервування та ліофілізація супроводжувались зниженням концентрації глікозаміногліканів відповідно на 16 % і 14 %. Наведені результати зниження вмісту вуглеводно частини протеогліканів вказують на більше ушкодження білкового компонента в молекулі протеогліканів порівняно з вуглеводневим компонентом.

Серед уронових кислот вуглеводневих компонентів глікозаміногліканів у рогівці найбільш поширеною є гіалуронова кислота. Кріоконсервування і ліофілізація знижували вміст гіалуронової кислоти у рогівці (відповідно 23,7 % і 18,5 % від рівня інтактно рогівки), що вказує на здатність утримувати воду і зберігати свої нативні властивості. При визначенні вмісту хондро тинсульфату встановлені більші зміни показників порівняно з гіалурованою кислотою, однак тенденція була аналогічною – менші зміни спостерігались при ліофілізації рогівки.

Ще одним компонентом глікозаміногліканів є аміноцукри, вміст яких є критерієм руйнування протеогліканів. Проведені дослідження вказують на високий вміст сіалових кислот в рогівці – 6,58 ммоль/л у перерахунку на N-ацетилнейрамінову кислоту. При кріоконсервуванні і ліофілізації вміст сіалових кислот становив відповідно 61 % і 72 % від показника інтактно рогівки.

**Таблиця 1. Вміст протеогліканів та х складових компонентів у нормальній рогівці та за різних методів консервації ( $M \pm m$ )**

| Показник                  | 1 група<br>Інтактна | 2 група<br>Кріоконсервована | 3 група<br>Ліофілізована | p   |
|---------------------------|---------------------|-----------------------------|--------------------------|---|
| Протеоглікани, ум. од.    | 0,86±0,03           | 0,61±0,04                   | 0,69±0,03                | $p_{1,2} < 0,001$<br>$p_{1,3} < 0,01$<br>$p_{2,3} > 0,05$ |
| Глікозаміноглікани, мг/кг | 80,8±2,78           | 70,4±1,98                   | 70,6±2,99                | $p_{1,2} < 0,05$<br>$p_{1,3} < 0,05$<br>$p_{2,3} > 0,05$  |
| Сіалові кислоти, ммоль/кг | 6,58±0,13           | 4,02±0,29                   | 4,75±0,29                | $p_{1,2} < 0,001$<br>$p_{1,3} < 0,01$<br>$p_{2,3} > 0,05$ |
| Хондро тинсульфати, г/кг  | 0,282±0,024         | 0,197±0,013                 | 0,219±0,008              | $p_{1,2} < 0,05$<br>$p_{1,3} < 0,05$<br>$p_{2,3} > 0,05$  |
| Гіалуронова кислота, г/кг | 0,038±0,001         | 0,029±0,003                 | 0,031±0,002              | $p_{1,2} > 0,05$<br>$p_{1,3} > 0,05$<br>$p_{2,3} > 0,05$  |

**ВИСНОВКИ** Проведенні гістологічні і морфологічні дослідження показали, що метод кріоконсервації зберігає всі структурні компоненти рогівки. При ліофілізації ксенорогівки гістологічні і морфометричні дослідження встановили помірну збереженість структурних компонентів. Це дає підставу рекомендувати використання рогівок, виготовлених за такою методикою, як тимчасову біологічну пов'язку при ураженнях.

Біохімічні дослідження засвідчили задовільне збереження концентрації біохімічних сполук, що вивчались.

Отримані результати можуть бути використанні, як контрольні для проведення подальших експериментальних досліджень дії консервовано ксенорогівки на процеси регенерації при пошкодженнях ока.

**ЛІТЕРАТУРА**

1. Бігуняк В.В. Консервовані ауто- і ксенотрансплантати для відновлення втраченої шкіри у опечених хворих: Дис. ... д-ра мед. наук. – Тернопіль, 1994. – 275 с.
2. Войно-Ясенецький В.В. Тканевая несовместимость и пути ее преодоления. – Медицина. – 1965. – С. 112-151.
3. Меркулов Г.А. Курс патологической техники. – Ленинград: Медицина, 1969. – 423 с.
4. Руководство микроскопической техники / Под. ред. Д.С. Саркисова, Ю.М. Перова. – М.: Медицина, 1996. – С. 36-51.
5. Bleckmann H. The content of glycosaminoglycans in bovine corneal epithelium and precorneal fluid-film // Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology. – 1976. – Vol. 200. – P. 235-242.
6. Hibino T., Wada Y., Mishima H. and Otori T. "The Effect of Corneal Epithelial Cells on the Collagen Gel Contraction by Keratocytes" Jpn. J. Ophthalmol. – 1998. – 42. – P. 174-179.