

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ РЕПАРАТИВНИХ ЗМІН У РОГІВЦІ КРОЛІВ ПІСЛЯ ЇЇ ОПІКІВ ЛУГОМ ТА КОРЕКЦІЇ ЕКСТРАКТОМ КРІОЛІОФІЛІЗОВАНОЇ ШКІРИ СВИНІ

Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського

(м. Тернопіль)

Робота виконана в рамках планової НДР кафедри анатомії людини Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського «Ремоделювання кровоносних русел внутрішніх органів та тканин при різних патологічних станах в експерименті», № держ. реєстрації 0111U008026.

Вступ. Проблема лікування опіків очей була і продовжує залишатися гострою і актуальною. Щодо наслідків травм ока, то вони складають найбільш поширену інвалідизуючу патологію очей [4]. Перспективним у їх лікуванні на сьогоднішній день стає застосування пептидних біорегуляторів [6], а також аlogenних цитокінів, які стимулюють репаративні процеси в рогівці ока, сприяючи активації фібробластичних елементів, перешкоджають розвитку запального процесу, розростанню рубцевої тканини, вrostанню судин у рогівку, прискорюють процес заміщення некротизованої тканини рогівки фіброзною тканиною, сприяють активному вторгненню новоутворених кератобластів між рогівковими пластинами [7, 9].

Разом з тим, сьогодні вже загальновідомо, що біологічні тканини також проявляють свою активність не тільки за рахунок їхніх живих клітин, але і за рахунок гомогенатів та екстрактів із них. Тому за останні роки у багатьох країнах відбувається бурхливий розвиток біотехнологій, присвячених одержанню біологічно активних сполук, зокрема, створенню препаратів на основі фетальної сировини, а також ксеоноорганів: селезінки, печінки, наднирників і т. д. [8]. Одним з напрямів у клітинній терапії травм рогівки може бути використання екстрактів кріоліофілізованої шкіри, які містять біологічно активні речовини [3]. Ці речовини можуть проявляти регуляторний вплив як на епітеліальну, так і на сполучну тканину, вони також необхідні для регуляції процесів загоєння та ефективнішої терапії патологічних процесів [1, 5].

Мета дослідження – встановити ефективність застосування екстракту кріоліофілізованої шкіри свині при опіках рогівки лугом в експерименті.

Об'єкт і методи дослідження. Експерименти виконано на 30 кролях віком в 2 роки і з масою тіла від 2,5 до 3,0 кг. З них 6 тварин склали інтактну контрольну групу. Утримання тварин та

експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

24 кролям наносили опіки рогівки лугом – 10% NaOH. Після 5-хвилинної експозиції промивали кон'юнктивальний мішок дистильованою водою і спостерігали на 14 і 28 доби після опіку. З них у 12 здійснювали корекцію опіків із застосуванням екстракту кріоліофілізованої шкіри свині, який протягом першого дня експерименту вводили по 1 краплі у кон'юнктивальний мішок через кожні 2 години, а в подальшому – 3 рази на день. Інших 12 кролів спостерігали без проведення корекції.

Для ультраструктурних досліджень забирали шматочки рогівки, які фіксували у 2,5% розчині глутаральдегіду з активною реакцією середовища рН 7,3-7,4, приготовленому на фосфатному буфері Міллоніга. Фіксований матеріал через 50-60 хвилин переносили у буферний розчин і промивали протягом 20-30 хвилин. Постфіксацію здійснювали 1% розчином чотириокису осмію на буфері Міллоніга протягом 60 хвилин, після чого проводили його дегідратацію в спиртах і ацетоні та заливали в суміш епоксидних смол і аралдиту. Ультратонкі зрізи, виготовлені на ультрамікротомах УМПТ-7, забарвлювали 1% водним розчином ураніацетату, контрастували цитратом свинцю згідно методу Рейнольдса [2] та вивчали в електронному мікроскопі ПЕМ-125К.

Результати досліджень та їх обговорення. На 14 добу експериментального дослідження у тварин з опіками рогівки без корекції в епітеліоцитах пограничної ділянки вже проявлялися ознаки відновлення функціональної активності, які розвивалися на тлі дистрофічних процесів. Тобто, при наявності структурно дезорганізованих органел і підсиленої вакуолізації цитоплазми, ядра таких клітин набували овальної форми, їх каріолема не утворювала інвагінацій, хроматин рівномірно розподілявся по всій площі зрізу ядра (рис. 1). Крім того, в електронно-щільній цитоплазмі спостерігалось новоутворення мітохондрій.

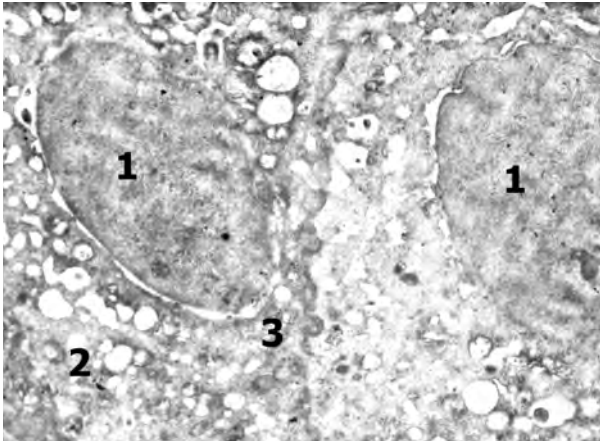


Рис. 1. Епітеліоцити крайової ділянки ока кроля через 14 днів після нанесення опіку лугом.
Електроннограма. x 9000.
Ядро – 1, вакуолі на місці зруйнованих органел – 2, новоутворені мітохондрії з електроннощільним матриксом – 3.

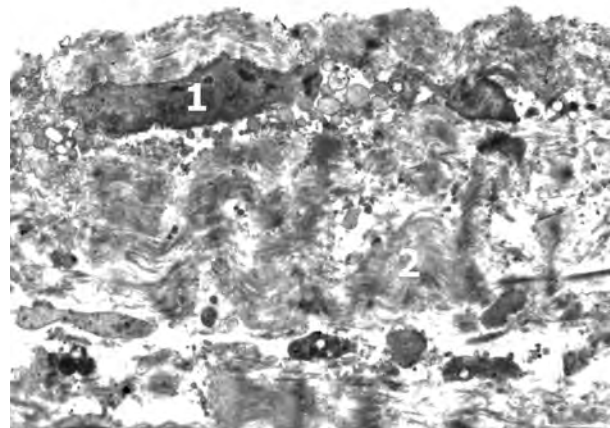


Рис. 2. Власна речовина рогівки ока кроля через 14 днів після нанесення опіку лугом.
Електроннограма. x 7000.
Залишки некротично зміненого фіброблеста – 1, відновлення колагенових структур -2.

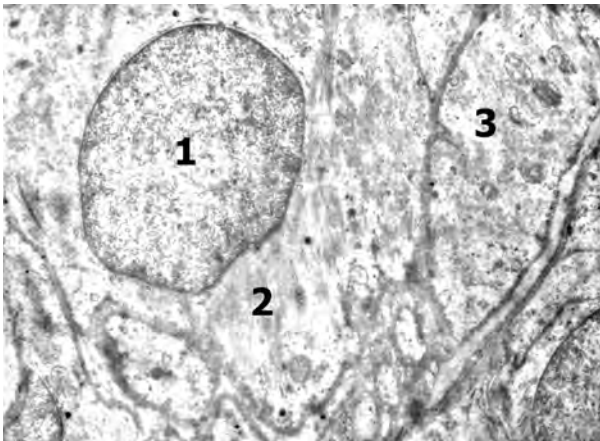


Рис. 3. Епітеліоцит рогівки ока кроля через 14 днів після нанесення опіку лугом з корекцією регенераторних процесів екстрактом кріоліофілізованої шкіри свині. Електроннограма. x 12000.
Ядро – 1, цитоплазма з фібрилярними структурами – 2, новоутворення мітохондрій – 3.

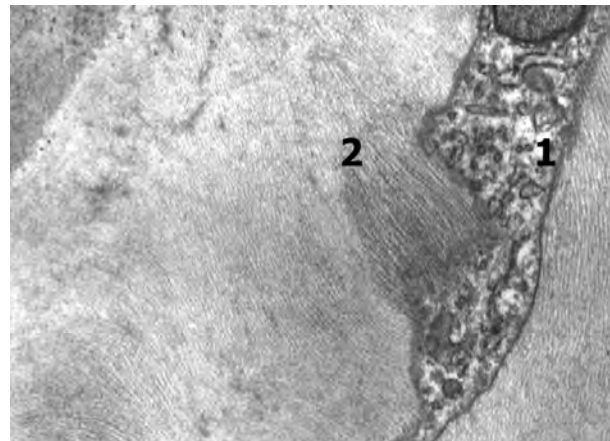


Рис. 4. Власна речовина рогівки ока кроля через 14 днів після нанесення опіку лугом з корекцією регенераторних процесів екстрактом кріоліофілізованої шкіри свині. Електроннограма. x 12000.
Фібробласт із збільшеною кількістю органел – 1 і підвищеною синтетичною активністю колагенових волокон – 2.

Щодо власної речовини рогівки, то тут у глибоких її шарах також спостерігалось часткове відновлення колагенових структур. Однак, при зменшенні ступеня фрагментації, їх орієнтація ще продовжувала залишатися неупорядкованою (**рис. 2**).

На відміну від цього, у тварин, яким застосовувалася корекція із введенням у кон'юнктиву екстрактів кріоліофілізованої шкіри свині, на 14-ту добу експерименту спостерігалася більш виражена активація регенераторних процесів. Це підтверджувалися виявленням новоутворених епітеліоцитів. Про їх новоутворення свідчило виявлення незрілих клітин безпосередньо в ділянці нанесення опіку лугом і наявність гіпертрофованих функціонально активних клітини у пограничній зоні. Незрілі епітеліоцити відрізнялися збільшеними розмірами і містили досить крупні ядра округлої форми. Каріоплазма і

цитоплазма таких клітин була помірно просвітленою. Каріолема мала рівномірні контури, а хроматин дифузно локалізувався по всій площі зрізу ядра. В цитоплазмі периферичних відділів клітин спостерігалися невеликих розмірів мітохондрії з чіткими кристами і електроннощільним матриксом. Кількість вільних рибосом була збільшеною. Звертали на себе увагу внутрішньоклітинні фібрилярні структури (**рис. 3**).

У власній речовині рогівки на цей термін спостереження у тварин із застосуванням корекції регенераторних процесів екстрактом кріоліофілізованої шкіри свині відмічалось посилення функціональної активності фібробластів з наростанням їх синтетичної здатності до новоутворення колагенових волокон. Такі фібробласти мали дещо потовщені за рахунок збільшення кількості органел периферичні

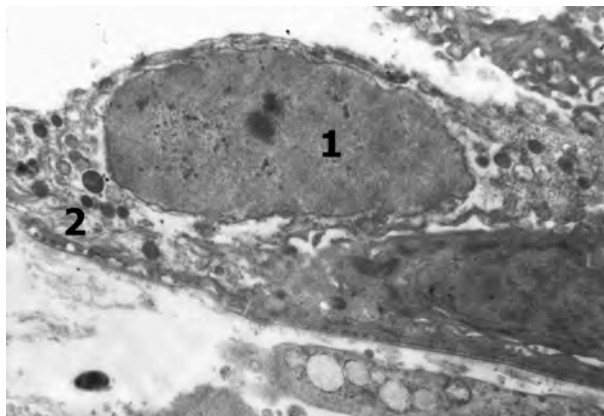


Рис. 5. Епітеліоцит рогівки ока кроля через 28 днів після нанесення опіку лугом. Електроннограма. x 9000.

Ядро епітеліоцита – 1, цитоплазма із збільшеною кількістю активних мітохондрій – 2.

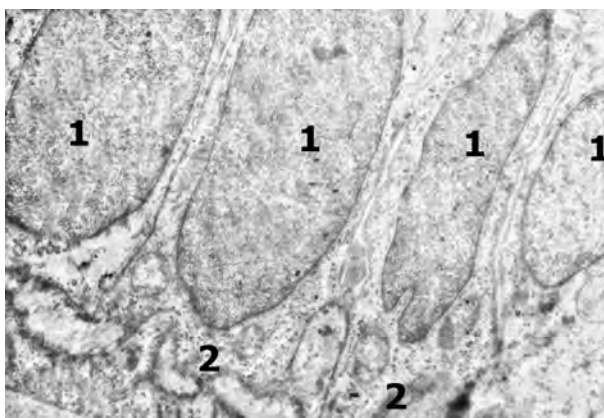


Рис. 6. Епітеліоцити рогівки ока кроля через 28 днів після нанесення опіку лугом з корекцією регенераторних процесів екстрактом кріоліофілізованої шкіри свині. Електроннограма. x 9000.

Ядра епітеліоцитів – 1, цитоплазма з органелами – 2.



Рис. 7. Власна речовина рогівки ока кроля через 28 днів після нанесення опіку лугом з корекцією регенераторних процесів екстрактом кріоліофілізованої шкіри свині. Електроннограма. x 12000.

Ядро фібробласта – 1, міжклітинна речовина – 2, колагенові волокна – 3.

відділи, а синтезовані у їх цитоплазмі молоді колагенові волокна через цитолему детрузувалися у міжклітинний простір (рис. 4).

Подальше спостереження у 28-денний термін дозволило встановити прогресування регенераторних процесів у обох групах тварин. Однак, слід відмітити, що у тварин з корекцією екстрактом кріоліофілізованої шкіри свині ці процеси відбувалися значно інтенсивніше, ніж у тварин без застосування коригуючого впливу.

У тварин без корекції виявлялися лише ознаки формування переднього епітелію рогівки. Вони полягали в насуванні на зону опікового ураження одношарового епітеліального шару клітин з підвищеною функціональною активністю. Про підвищення функціональної активності таких клітин свідчили збільшені у розмірах електроннощільні ядра, які займали більшу частину площі. В цитоплазмі визначалася значна кількість органел, зокрема мітохондрій, які відрізнялися інтенсивним забарвленням і мали різні розміри (рис. 5).

Щодо власної речовини рогівки тварин з опіком без корекції, то у ній також відмічалася часткова реструктуризація. Однак повного відновлення не відбувалося навіть до кінцевого терміну спостереження. При електронноскопічному дослідженні тут виявлялися як деформовані із частково збереженими органелами фіброцити, так і залишки зруйнованих клітин із ознаками фібрилярного переродження. Міжклітинна речовина у більшості випадків була гомогенізованою, в ній виявлялися округлої і овальної форми везикули з електроннооднорідним вмістом.

На відміну від цього у тварин, яким здійснювалася корекція регенераторних процесів екстрактом кріоліофілізованої шкіри свині на даний термін спостереження в зоні ураження спостерігалось формування багатшарового епітелію з функціонально активних клітин з крупними овальної форми ядрами та рівномірно розподіленим у них хроматином. У цитоплазмі розташовувалися мітохондрії з оконтурованими кристами і чисельні рибосоми, а також мікропіноцитозні везикули (рис. 6).

Більш ефективним було і відновлення структурних елементів власної речовини рогівки. Тут виявлялися майже повноцінні фібробласти з чітко контурованими гіперхромними ядрами і органелами у цитоплазмі. Міжклітинна речовина була структуризованою, а розташовані у ній колагенові волокна мали вже у більшості чітку поздовжню орієнтацію. Проте про наявність ще у них обмінних порушень можна було судити з маргінального розташування ядерного гетерохроматину (рис. 7).

Таким чином, результати проведеного дослідження дозволили встановити, що застосування екстракту кріоліофілізованої шкіри свині дозволяє в значній мірі покращити регенераторні процеси в тканинах рогівки після її опіків лугами. Очевидно, що при застосуванні даного методу корекції відновлення поверхневого епітелію відбувається за рахунок поділу та міграції базальних епітеліоцитів рогової оболонки, а також трансформації та центробіжного

руху камбіальних (стовбурових) клітин лімба, що підкреслюється і в інших дослідженнях, проведених у цьому напрямку [Сухинин, 2009].

Висновки. Интракон'юнктивальне застосування екстракту кріоліофілізованої шкіри свині дозволяє значно покращити і пришвидшити регенераторні процеси в тканинах рогівки після її опіків лугами, що

може бути ефективним при застосуванні у клінічній офтальмологічній практиці.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати дають підстави для продовження подальших досліджень можливостей використання даного препарату в клінічних умовах.

Література

1. Гальченко С. Е. Спектрофлуориметрическое исследование экстрактов криоконсервированных фрагментов органов свиней. I. Собственная флуоресценция / С. Е. Гальченко, Т. С. Дюбко, Л. Д. Паценкер, Б. П. Сандомирский // Эксперим. і клініч. медицина. – 2006. – № 1. – С. 48–52.
2. Саркисов Д. С. Воспроизведение болезней человека в эксперименте / Д. С. Саркисов, П. И. Ремезов; под ред. А. А. Вишневого. – М., 1960. – 780 с.
3. Шкодовская Н. Ю. Влияние экстракта кожи новорожденных поросят на заживление ожоговых ран / Н. Ю. Шкодовская, С. Е. Гальченко, А. В. Мамонтова, Б. П. Сандомирский // Пробл. криобиологии. – 2004. – № 4. – С. 46–50.
4. Якименко С. А Стан надання спеціалізованої допомоги потерпілим з опіками очей в Україні / С. А Якименко // Офтальмолог. журн. – 2008. – № 6. – С. 79–83.
5. Effect of extracts of animal origin on regeneration of skin and oral mucous / N. Yermakova, A. Shinder, O. Synchykova [et al.] // Укр. біохім. журнал (спеціальний випуск). – 2009. – Т. 81, № 4. – С. 276.
6. Lee Y. C. Immunohistochemical study of subepithelial haze after phototherapeutic keratectomy / Y. C. Lee, I. J. Wang, F. R. Hu, W. W. Kao // J. Refract. Surg. – 2001. – Vol. 17, № 3. – P. 334–341.
7. Management of alkali burns: An 11-year retrospective review / Stephen C. Brodovsky, Catherine A. Mc Carty, Grant Snibson [et al.] // Ophthalmology. – 2000. – Vol. 107, Issue 10. – P. 1829–1835.
8. Sandomirsky B. P. Antioxidative properties of lactoferrin from bovine colostrum before and after its lyophilization / B. P. Sandomirsky, S. Ye. Galchenko, K. S. Galchenko // Cryo Letters. – 2003. – Vol. 24, № 5. – P. 275–280.
9. Wagoner M. D. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy / M. D. Wagoner // Surv. Ophthalmol. – 1997. – Vol. 41, № 4. – P. 275–312.

УДК 617. 7-001. 37-091. 8]-092. 9

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ОСОБЛИВОСТІ РЕПАРАТИВНИХ ЗМІН У РОГІВЦІ КРОЛІВ ПІСЛЯ ЇЇ ОПІКІВ ЛУГОМ ТА КОРЕКЦІЇ ЕКСТРАКТОМ КРІОЛІОФІЛІЗОВАНОЇ ШКІРИ СВИНІ

Романюк Т. І.

Резюме. У роботі представлені результати ультраструктурного дослідження рогівки ока кролів після її опіків лугом та при експериментальному використанні екстракту кріоліофілізованої шкіри свині з метою поліпшення регенераторних процесів. Отримані результати дозволили встановити, що застосування екстракту кріоліофілізованої шкіри свині дозволяє в значній мірі поліпшити репаративні процеси в тканинах рогівки після її опіків лугами. Швидше і якісніше здійснюється епітелізація ураженої ділянки. Це проявляється збільшенням кількості шарів епітеліальних клітин і їх швидшою диференціацією, а також підвищенням ступеня впорядкованості сполучнотканинних волокон, що має своїм результатом більш ефективне поліпшення оптичних властивостей ураженої ділянки.

Ключові слова: рогівка, опік, луг, кріоліофілізація, корекція.

УДК 617. 7-001. 37-091. 8]-092. 9

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНЫХ ИЗМЕНЕНИЙ В РОГОВИЦЕ КРОЛИКОВ ПОСЛЕ ЕЕ ОЖОГОВ ЩЕЛОЧЬЮ И КОРРЕКЦИИ ЭКСТРАКТОМ КРИОЛИОФИЛИЗОВАННОЙ КОЖИ СВИНЬИ

Романюк Т. И.

Резюме. В работе представлены результаты ультраструктурного исследования роговицы глаза кроликов после ее ожогов щелочью и при экспериментальном использовании экстракта криолиофилизированной кожи свиньи с целью улучшения регенераторных процессов. Полученные результаты позволили установить, что применение экстракта криолиофилизированной кожи свиньи позволяет в значительной степени улучшить репаративные процессы в тканях роговицы после ее ожогов щелочами. Быстрее и качественнее осуществляется эпителизация пораженного участка. Это проявляется увеличением количества слоев эпителиальных клеток и их быстрой дифференциацией, а также повышением степени упорядоченности соединительнотканых волокон, имеет своим результатом более эффективное улучшение оптических свойств пораженного участка.

Ключевые слова: роговица, ожог, щелочь, криолиофилизация, корекция.

UDC 617. 7-001. 37-091. 8] -092. 9

Ultrastructural Peculiarities of Reparative Changes in Rabbit's Cornea after its Combustion with Alkali and Correction with the Extract of the Criolofilized Pig's Skin

Romaniuk T. I.

Abstract. The problem of eye combustion treatment has been acute and challenging. The usage of peptide bioregulators, which stimulate reparative processes in eye cornea, is promising. The usage of criolofilized skin extracts, which contain biologically active agents, may be a course in cell treatment of cornea injuries.

We examined 30 rabbits, 6 of them formed noninvolved control group, and the corneas of the other 24 rabbits were burn with alkali – 10% NaOH. After 5-minute exposure conjunctival sac was washed with purified water. Then we examined it on the 14th and 28th day after combustion. 12 rabbits were treated with the extract of the criolofilized pig's skin. Other 12 rabbits were just observed without correction. The cornea tissue was studied with an electronic microscope ПЕМ-125K.

On the 14th day of the experiment we found some evidences of capacity recovery, which developed in the setting of dystrophic processes, in the group of animals with cornea combustion without correction. In other words, in case of structurally deorganized organelles and cytoplasm vacuolization is boosted, nucleuses of these cells assumed oval shape, their karyolemma didn't form introsusception, chromatin was evenly distributed over the whole surface of the nucleus cut. Besides we found mitochondria growth at electron-dense cytoplasm. We also discovered partial collagen structure recovery in the deep layers of cornea proper substance. Though, while decreasing the level of fragmentation their orientation was still irregular.

In contrast to that, on the 14th day of the experiment we discovered more intense activation of regenerative processes in the group of animals, where we applied the extracts of the criolofilized pig's skin. New epithelial cells were representative of that fact. Immature cells in the immediate area of alkali combustion and hypertrophied functionally active cells in the marginal area certified their new formation. In the cornea proper substance we discovered the increasing fibroblast functional activity and their synthetic capacity to form new collagen fibers.

Due to the continuing 28-days study we discovered the improvement of regenerative processes in both groups of animals. But we should mention that these processes were more intense in the group of animals, which were treated with the extract of the criolofilized pig's skin, than in the group where correction was not applied.

In the group of animals without correction we found only traces of cornea frontal epithelium formation. They made themselves evident that monostratal epithelial layer of cells with hyperergy approached the area of combustion injury. The hyperergy was shown with enlarged electron-dense nucleuses, which occupied the larger part of the area. In cytoplasm there were a great number of organelles, mitochondria in particular, that were of deep colour and of different size. We also discovered partial restructuring at the cornea proper substance in the group of animals without correction. But the cornea didn't recover completely even till the end of the experiment. While studying with an electronic microscope we found distorted fibrocytes with partially residual organelles, and rests of the destroyed cells with traces of fibrillary regeneration as well. In general the intercellular substance was homogenized; we found round and oval vesicles with electron-homogeneous content.

In the contrast we discovered formation of multistratal epithelium with functionally active cells with large oval nucleuses and evenly-distributed chromatin at the injury area in the group of animals, which were treated with the extract of the criolofilized pig's skin. There were mitochondria with contouring cysts, numerous Palade's granules and micropinocytotic vesicles in cytoplasm. The recovery of the structural elements of the cornea proper substance was also more effective. We found almost full fibroblast with distinct contouring hyperchromatic nucleuses and organelles in the cytoplasm. Intercellular substance was well-structured, and collagen fibers were of longitudinal pointing. But marginal positioning of the nuclear heterochromatin represented metabolism derangement.

Consequently, due to the conducted investigation we discovered that the applying of the extract of the criolofilized pig's skin improves significantly the regenerative processes in cornea tissues after their combustion with alkali. It is obvious that this method of correction is as follows: the recovery of the surfacial epithelium takes place due to division and migration of the basal epithelial cells of the cornea, transformation and centrifugal motion of cambial (stem) cells of limb that is emphasized in other investigations in this field.

Keywords: cornea, combustion, alkali, criolofilization, correction.

Рецензент – проф. Єрошенко Г. А.

Стаття надійшла 12. 12. 2014 р.