

УДК 615.014.4:591.477:599.731.1-035.51

**Волков К.С., Довбуш А.В., Чабан Г.П., Федонюк Л.Я., Бігуняк Т.В.**  
**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНИЙ СТАН АУТОДЕРМОТРАНСПЛАНТАТІВ ПРИ ЗБЕРІГАННІ**  
**В ГЛІЦЕРИН-ФОРМАЛІНОВІЙ ТА ГЛІЦЕРИН-ЖОВТКОВІЙ СУМІШАХ**

Тернопільський державний медичний університет ім.І. Я.Горбачевського;  
Міська клінічна лікарня №3 м. Тернопіль;

*Було виконано дослідження гістологічного стану і життєздатності аутодермотрансплантатів при зберіганні в гліцерин-формаліновому і гліцерин-жовтковому розчині. Отримані результати свідчать про недоцільність зберігання шкіри у вищезазначених консервуючих сумішах більше, ніж 7 днів у зв'язку з погіршенням морфологічного стану і життєздатності епідермісу і дерми.*

Ключові слова: субмікроскопічна будова, аутодермотрансплантат, шкіраконсервуючий розчин.

### Вступ

У загальній структурі травматизму навіть у мирний час невпинно зростає питома вага опіків [1]. Однією з актуальних і не до кінця вивчених проблем сучасної комбустіології залишається закриття опікової рани та відновлення шкіряного покриву на ділянках із глибоким і великим ураженням шкіри.

Неможливість одночасного забору необхідної кількості аутошкіри та підготовки рани для її трансплантації обумовлюють віддалену в часі аутопластику. Тому для зберігання аутодермотрансплантатів застосовують різні методи консервування.

У літературі є дані про застосування різних способів для консервації тканин, в тому числі й розчини формаліну [2]. Але збереженість морфологічної організації шкіри при використанні формаліну не завжди свідчить про її життєздатність [3]. В останні роки для консервування дермотрансплантатів застосовують слабкі розчини формаліну (0,25-0,5%), які давали непогані результати [4]. Крім цього, є дані про успішне застосування гліцерин-жовткової суміші, особливо, при подальшому зберіганні шкіри в рідкому азоті [1]. Проте детальні гістологічні дослідження в динаміці, особливо з використанням електронної мікроскопії відсутні.

Метою дослідження було визначити терміни консервування аутошкіри, її структурну збереженість та життєздатність при використанні гліцерин-формалінової та гліцерин-жовткової суміші.

### Матеріали та методи

Лоскути аутодермотрансплантатів забирали дерматомом зі стегон опікових хворих і маленькі шматочки консервували при гіпотермічних умовах в холодильнику (від 0 до +4°C) у гліцерин-формаліновій та гліцерин-жовтковій сумішах [3]. Для гістологічних досліджень зрізи фарбували гематоксиліном та еозином і вивчали в мікроскопі МБД-6. Для дослідження ультраструктури невеликі шматки шкіри попередньо фіксували в 2,5% розчині глютаральдегіду на фосфатному

буфері (рН 7,3-7,4). Постфіксацію матеріалу здійснювали 1% розчином чотириокису осмію, потім зневоднювали та заливали в епоксидні смоли згідно загальноприйнятої методики. Ультратонкі зрізи шкіри контрастували цитратом свинцю згідно методу Рейнольдса та вивчали в електронному мікроскопі ЕМВ-100ЛМ.

Для визначення життєздатності консервованої шкіри нами запропонований спосіб, згідно якого з суспензії окремо розділених епідермоцитів виготовляли мазки клітин, які зафарбовували трипановим синім. Мікропрепарат досліджували у світловому мікроскопі МБД-6 та підраховували кількість зафарбованих (нежиттєздатних) і незафарбованих (життєздатних) епідермоцитів. Морфологічний стан і життєздатність аутошкіри при зберіганні у вищеписаних сумішах вивчали на 3, 7, 14 та 21 доби.

### Результати та їх обговорення

Проведені дослідження показали, що на 3 добу консервування шкіри в гліцерин-формаліновій та гліцерин-жовтковій сумішах світлооптично спостерігається подібна і мало змінена структурна організація епідермісу та дерми. Зберігається пошарове розташування епідермоцитів відносно хвилястої чіткої базальної мембрани. Ядра росткового шару клітин виглядають дещо ущільненими, зменшеними і фарбуються базофільно інтенсивніше, ніж у нормі. В шкірі, консервованій в гліцерин-жовтковій суміші, в окремих епідермоцитах остистого та зернистого шарів встановлені невеликі просвітлені ділянки цитоплазми в перинуклеарній зоні.

Електронномікроскопічні дослідження на 3 добу зберігання у вказаних сумішах не виявили суттєвих змін тонкої будови епідермісу та дерми. Епідермоцити щільно прилягають до базальної мембрани, в якій чітко виражені два шари: темний та світлий. Останній з'єднаний з клітинами напівдесмосомами, а темний шар контактує з якірними фібрилами дерми. Епідермоцити базального шару видовженої форми, мають овальне ядро, їхня цитоплазма містить дрібні мітохондрії, рибосоми, а також тонофібрили, які утворюють

густу сітку. В місцях контакту з сусідніми клітинами тонофіламенти щільно підходять до десмосом. Цитоплазма клітин остистого шару має електроннощільні та світлі гранули. Темні гранули меланіну розміщені в навколядерній зоні, а світлі обмежені мембранами кератиносоми у всій цитоплазмі. Міжклітинний простір остистого та зернистого шарів помірно розширений, його пронизують чітко виражені десмосоми. Цитоплазма епідермоцитів зернистого шару містить великі помірно осміофільні та дрібні темні гранули. Роговий шар складений зроговілими лусочками, позбавлених ядер і органел і місцями відшарований. Сосочковий шар дерми пронизаний тов-

тими колагеновими та тонкими еластичними волокнами. Фібробласти розміщені поодинокі, мають кілька відростків та містять ядра з інвагінаціями, їхня цитоплазма багата рибосомами, каналцями гранулярної ендоплазматичної сітки (ГЕС), диктіосомами комплексу Гольджі, окремими електроннопрозорими вакуолями. В сітчастому шарі дерми пучки товстих колагенових волокон утворюють густу сітку.

При визначенні життєздатності окремо виділених епідермоцитів встановлена висока збереженість 86,3% в гліцерин-формаліновій та 88,1% в гліцерин-жовтковій сумішах (табл. 1).

Таблиця 1.

Життєздатність епідермоцитів при консервуванні в гліцерин-формаліновій та гліцерин-жовтковій сумішах.

Суміш	Доба дослідю			
	3	7	14	21
Гліцерин-формалінова, %	86,3	42,6	26,2	17,1
Гліцерин-жовткова, %	88,1	73,6	39,4	23,8

На 7 добу зберігання аутодермотрансплантатів в гліцерин-формаліновому розчині морфологічні зміни стають помітнішими. Ядра більшості епітеліоцитів інтенсивніше базифільно забарвлені. Просвітлені ділянки цитоплазми навколо ядер частини клітин свідчать про цитолізис. У шкірі, збереженій у гліцерин-жовтковій суміші, деструктивні зміни вираженіші, в багатьох епідермоцитах спостерігається вакуолізація цитоплазми в навколядерній зоні, причому ядра цих клітин пікнотично змінені та забарвлені інтенсивніше. Шар зроговілих лусочок відсутній, що можливо пов'язано з його відшаруванням під дією консерванта. Цитоплазма зернистих кератиноцитів набуває базифільного забарвлення, можливо внаслідок руйнування мембрани кератогалінових гранул.

Субмікроскопічні дослідження шкіри, консервованої в гліцерин-формаліновому розчині 7 діб, вказують на погіршення її структурної організації. Епідермоцити щільно впорядкованими шарами розміщені на базальній мембрані. В клітинах остистого та зернистого шарів в навколядерній зоні спостерігаються дрібні світлі вакуолі, розширюється перинуклеарний простір. Цитоплазма окремих епідермоцитів базального шару містить мітохондрії з просвітленим матриксом, тонофібрили ущільнюються, злипаються, частково фрагментуються. Проте, частина фібробластів округлюється, має короткі відростки, містить ядра з глибокими інвагінаціями, розширені та фрагментовані каналці ГЕС та цистерни комплексу Гольджі.

При зберіганні аутодермотрансплантатів у гліцерин-жовтковій суміші електронномікроскопічно спостерігається місцями нещільне прилягання базальних епідермоцитів до потовщеної

базальної мембрани, тому утворюються світлі проміжки. Міжклітинні простори остистого та зернистого шарів локально розширені. Більшість ядер епітеліоцитів мають глибокі інвагінації, а просвітлена навколядерна зона остистого та зернистого шарів містить дрібні електроннощільні гранули меланіну, великі світлі ламелярні гранули. Тонофібрили ущільнюються, частково лізуються, у мітохондрій - просвітлений матрикс. Фібробласти виглядають зморщеними, їх ядра пікнотично змінені, каріолема утворює глибокі інвагінації, цитоплазма містить розширені каналці ГЕС, цистерни та вакуолі комплексу Гольджі. Міжклітинна речовина навколо них набрякла, просвітлена.

Життєздатність епідермоцитів на 7 добу консервування знижується: 42,6% в гліцерин-формаліновій та 73,6% в гліцерин-жовтковій сумішах.

Світлооптичні дослідження на 14 добу дослідю показали, що шкіра, яка зберігалась в гліцерин-формаліновому розчині, складається з чітко виражених шарів епідермісу, базальні клітини щільно прилягають одна до другої та до базальної мембрани. Проте клітини базального, остистого та зернистого шарів виглядають вакуолізованими, базифільні ядра зменшені, пікнотично змінені (рис.1.). Цитоплазма епідермоцитів базального шару, які знаходяться в телофазі або в О- періоді, світлооптично прозора. Збільшені міжклітинні простори, особливо, в остистому та зернистому шарах. В аутошкірі, збереженій 21 добу в цьому розчині, описані деструктивні зміни виражені яскравіше.

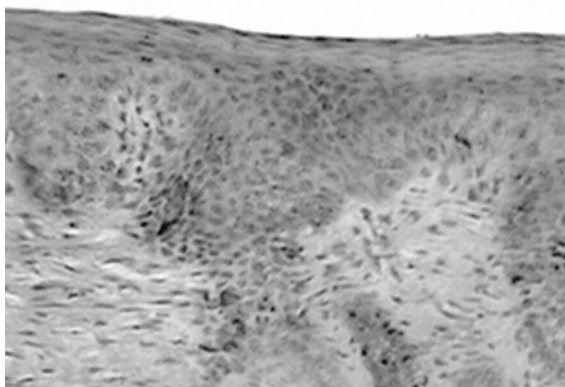


Рис. 1. Гістологічні зміни аутодермотрансплантатів на 14 добу зберігання в гліцерин-формаліновому розчині. Каріопікноз епідермоцитів та лізис міжклітинної речовини дерми. X 600

На 14, більшою мірою, на 21 добу консервування в гліцерин-жовткової суміші шкіра втрачає структурованість. Базальна мембрана нечітка, розширені міжклітинні простори остистого та зернистого шарів епідермісу, роговий шар відсутній. Цитоплазма базального та остистого шарів сильно вакуолізована, інтенсивно базофільні ядра пікнотично змінені. Дерма має вигляд пухкої маси, її фібробласти зморщені, навколо них спостерігаються набряк міжклітинної речовини. Такі ж набряки спостерігаються і в перикапілярному просторі.

Електронномікроскопічні дослідження на 14 і, особливо, 21 добу зберігання в гліцерин-формаліновому розчині встановили глибокі деструктивні зміни аутодермотрансплантатів. Базальна мембрана втрачає цілісну будову, утворюються розширені просвіти між нею і клітинами базального шару (рис.2.). Ядра епідермоцитів пікнотично змінені, мають глибокі інвагінації, в навколоядерній зоні містяться світлі вакуолі. Матрикс поодиноких мітохондрій просвітлений, а кристи зруйновані. Пучки тонофібрил остистого і зернистого шарів злипаються, вони стають чітко помітними біля електроннощільних десмосомальних контактів. Пошкодження фібробластів проявляється в набряку цитоплазми, в розширенні диктіосом пластинчастого комплексу, канальців ГЕС, в глибокій інвагінації та каріопікнозі ядер. Волокнисті структури дерми лізуються, міжклітинна речовина виглядає набряклою.

У шкірі, консервованій 14 діб і, особливо, 21 добу в гліцерин-жовткової суміші, на ультраструктурному рівні виявлені глибокі деструктивні зміни, які мають незворотній характер: розпушеність базальної мембрани, розширення міжклітинних просторів, руйнування епідермоцитів та фібробластів. Каріопікноз супроводжується глибокими інвагінаціями та розширенням перинуклеарного простору внаслідок угинання внутрішнього листка каріолеми всередину.

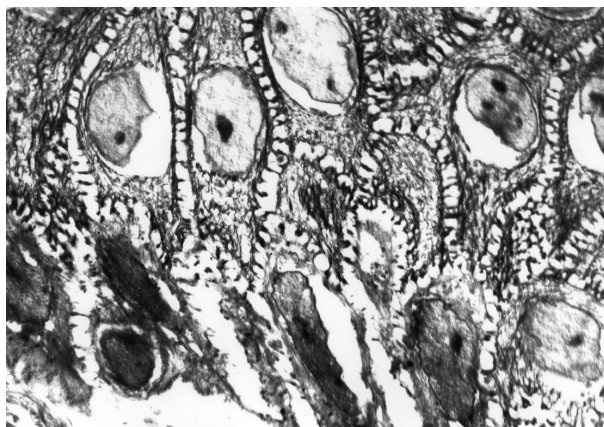


Рис. 2. Ультраструктурні зміни базального шару епідермоцитів в гліцерин-жовткової суміші. Розширені міжклітинні простори, світла перануклеарна зона, пошкоджені десмосоми. X 10 000

В цитоплазмі епідермоцитів тонофібрили злипаються, навколо ядра утворюється суцільна світла смужка, яка містить осміофільні гранули. Спостерігаються порушення в будові десмосомальних контактів: їхні периферійні ділянки утворені електроннощільними тонофібрилами, а внутрішня світла зона містить гомогенізовані філаменти. Фібробласти сосочкового шару дерми округлюються, їх цитоплазма містить великі світлі вакуолі, розширені фрагментовані цистерни ГЕС і комплексу Гольджі. Більшість ядер пікнотично зморщені, глибоко посічені інвагінаціями, мають осміофільну каріоплазму та погано виражені ядерні пори. Біля фібробластів спостерігаються мієлінові нашарування, волокнисті компоненти спостерігаються рідко, аморфна речовина набрякла. Збільшується периваскулярний простір і зменшуються просвіти гемокапілярів за рахунок набряклих епітеліоцитів.

На 14 добу дослідження життєздатність епідермоцитів зменшується: 26,2% при зберіганні в гліцерин-формаліновій та 39,4% в гліцерин-жовткової сумішах. Менший відсоток світлих (життєздатних) клітин свідчить про ще нижчу ступінь збереженості епідермісу на 21 добу у цих сумішах (див. табл. 1).

Проведені гістологічні дослідження вказують на поступове наростання деструктивних змін в епідермісі та дермі із збільшенням терміну консервування. На 14 та особливо 21 добу дослідження виникають глибокі морфофункціональні зміни, які мають незворотній характер. Це підтверджено субмікроскопічними спостереженнями та методом визначення життєздатності окремо виділених епідермоцитів. Структурний стан шкіри, консервованої двома описаними сумішами, дає підставу стверджувати про порівняно кращу збереженість аутошкіри при консервуванні в гліцерин-формаліновій, ніж у гліцерин-жовткової

суміші. Проте результати визначення життєздатності епідермоцитів свідчать про вищий відсоток збереженості епідермоцитів в гліцерин-жовтковій суміші. Тому не завжди гістологічні дослідження можуть визначати життєздатність тканин, особливо при використанні формаліну як складника консервуючого розчину.

Отже, морфологічні дослідження аутодермотрансплантатів на позначення життєздатності епідермоцитів свідчать про погіршення їх морфофункціонального стану зі збільшенням терміну консервування і дають підставу зробити висновок про недоцільність зберігання шкіри в застосованих консервуючих сумішах довше 7 діб та рекомендувати використовувати консервування аутодермотрансплантатів у гліцерин-

жовтковій суміші.

### Література

1. Бігуняк В.В. Консервовані ауто- і ксенотрансплантати для відновлення втраченої шкіри у опечених хворих / Бігуняк В.В. – Дис ... докт. мед. наук - Тернопіль, 1994. – 275 с.
2. Бігуняк В.В. Біологічні і біофізичні властивості ліофілізованої шкіри свині: загальнобіологічні аспекти, проблеми, перспективи / В.В.Бігуняк, В.В.Дем'яненко, Н.В.Бігуняк // Матеріали XX з'їзду хірургів України. – Тернопіль, 2002. – Т. 2. – С. 536-538.
3. Волков К.С. Збереженість компонентів епідермальних проліферативних одиниць консервованих аутодермотрансплантатів / К.С.Волков, А.В.Довбуш, О.П.Андрішин [ та ін. ] // Матеріали XX з'їзду хірургів України. – Тернопіль, 2002. – Т. 2. – С. 654-655.
4. Бігуняк В.В. Ліофілізовані ксеродермотрансплантати – заміники шкіри людини / В.В.Бігуняк, Ю.П.Кузьмич, Н.В.Гуда // Матеріали наук.-практ. конф. "Створення, виробництво, стандартизація, фармакоекономіка лікарських засобів та біологічно активних добавок". – Тернопіль, 2004. – С. 321-324.

### Реферат

**МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ АУТОДЕРМОТРАНСПЛАНТАТОВ ПРИ ХРАНЕНИИ В ГЛИЦЕРИН-ФОРМАЛИНОВЫХ И ГЛИЦЕРИН-ЖЕЛТОЧНЫХ СМЕСЯХ**

Волков К.С., Довбуш А.В., Чабан Г.П., Федонюк Л.Я., Бігуняк Т.В.

Ключевые слова: ультраструктура, аутодермотрансплантат, кожа, консервирующий раствор.

Было проведено исследование гистологического состояния и жизненных способностей аутодермотрансплантатов при сохранении в глицерин-формалиновом и глицерин-желточном растворах. Полученные результаты свидетельствуют о нецелесообразности сохранения кожи у вышеобозначенных консервирующих смесях больше, чем 7 дней в связи с ухудшением морфологического состояния и жизнеспособностей эпидермиса и дермы.

### Summary

**MORPHOLOGICAL AND FUNCTIONAL CONDITION OF AUTOGRAFTS KEPT IN GLYCERIN-FORMALDEHYDE AND GLYCERIN-VITELLINE MIXTURE**

Volkov K.S., Dovbush A.V., Chaban H.P., Fedoniuk L.Ya., Bihuniak T.V.

Key words: ultrastructure, autograft, skin, preservation solution.

The investigation was aimed to study histological condition and viability of autografts kept glycerine-formalinum and glycerine-vitelline mixture. The results obtained point out it is not practical to preserve skin grafts in the above-mentioned preserving mixture longer than 7 days because of worsening their morphological condition and viability of epidermis and dermae.