

УДК: 617. 713: 599. 731.1]: 615. 014. 41

УЛЬТРАСТРУКТУРНА ХАРАКТЕРИСТИКА КСЕНОТРАНСПЛАНТАТІВ РОГІВКИ ЗА РІЗНИХ УМОВ ЗБЕРІГАННЯ

І.М. Гребенік, К.С. Волков
Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського, м.
Тернопіль

Проведенні дослідження показали, що кріоконсервування ксенорогівки після попередньої обробки в гліцерин - жовткової суміші, добре зберігає ультраструктуру всіх її компонентів. Встановленні помірні зміни епітеліальних шарів та власної речовини свідчать про те, що такий метод консервування можна рекомендувати для трансплантації при пошкодженнях рогівки.

При ліофілізації рогівки ультраструктурні зміни її компонентів свідчать про можливість використання виготовленого таким методом біоматеріалу для тимчасового закриття пошкоджень переднього відрізка ока.

Ключові слова: ксенорогівка, ультраструктура, кріоконсервація, ліофілізація.

Робота є фрагментом комплексної НДР “Діагностика та лікування патологічних процесів голови, шиї та хребта” № 0107U004459 державної реєстрації

Проведення віддаленої в часі кератопластики з метою попередження перфорації рогівки при її ураженнях, обумовлює використання ксенотрансплантатів [3]. Неможливість одночасного забору необхідної кількості трансплантату вимагає пошук методів, які дозволять якісно і тривалий час зберігати ксенорогівку [2].

В літературних джерелах наведено дані про різні способи консервації ксеноматеріалу: в середовищах з ходроїтинсульфатом, розчині Рінгера-Локка, цільній гемолізованій крові, в сироватці крові, в лізоцимі та ін. [4, 6]. Відомий метод кріоконсервації рогівки, в останні роки для тривалого зберігання біоматеріалу застосовують ліофілізацію [1]. Проте, детальні гістологічні і особливо електронномікроскопічні дослідження, які дозволяють показати ступінь збереженості структур при різних методах консервування, проведенні недостатньо [5, 7].

Метою роботи було встановлення електронномікроскопічного стану структурних компонентів субмікроскопічної організації при кріоконсервуванні і ліофілізації.

Матеріали і методи дослідження. Для досліджень була використана свиняча рогівка, яка забиралась в цеху забою свиней, з дотриманням правил, передбачених Європейською комісією по нагляду за проведенням лабораторних та інших дослідів з участю експериментальних тварин різних видів, а також згідно “Науково-практичних рекомендацій із утримання лабораторних тварин та роботи з ними” (Кожемякін Ю.М., 2002). Матеріал був поділений на наступні серії. Перша – інтактні ксенорогівки (5 штук), друга – кріоконсервовані рогівки, які проходили попередню обробку в гліцерин – жовткової суміші (5 штук), третя – ліофілізовані після кріоконсервації рогівки (5 штук). Для електронномікроскопічних досліджень [8] маленькі шматочки ксенорогівок фіксували у 2,5 % розчині глютаральдегіду. Фіксований матеріал переносили у буферний розчин і промивали. Постфіксацію здійснювали 1 % розчином тетраокису осмію на фосфатному буфері Мілонга, зневоднювали в спиртах та ацетоні і заливали в суміш епоксидних смол. Ультратонкі зрізи, виготовленні на ультрамікромомі УМПТ-7 забарвлювали 1 % водним розчином уранілу ацетату, контрастували цитратом свинцю згідно методу Рейнольдса та вивчали в електронному мікроскопі ПЕМ – 125К.

Результати дослідження і обговорення. Проведені електронномікроскопічні дослідження кріоконсервованої рогівки встановили, що у всіх її структурних компонентах наявні помірні зміни. Так, у епітеліюцитах поверхневого шару переднього епітелію цитоплазма вміщує невеликі і середніх розмірів світлі вакуолеподібні порожнини. Вони створені за рахунок нерівномірного потовщення каналців гранулярної ендоплазматичної сітки і цистерн комплексу Гольджі. Гіалоплазма зберігає електронну щільність, проте, органел у ній спостерігається небагато. Вільні рибосоми і полісоми мають зональне розташування. Невеликі мітохондрії розташовані поодинокі, а іноді групами, частіше перинуклеарно. Вони мають світлий матрикс і частково редуковані кристи. Такий стан органел в умовах даного консервування рогівки свідчить про пригнічення біосинтетичних і енергетичних процесів у клітинах поверхневого шару. В цитоплазмі епітеліюцитів гірше

контуруються тонофібрили, міжклітинні простори поширені, а десмосомальні контакти мають невеликі розміри і високу електронну щільність. Ядра епітеліоцитів зберігають структурну організацію їх компонентів. В каріоплазмі переважає еухроматин, контури мембран каріолеми чіткі, перинуклеарні простори вузькі і рівномірні.

Субмікроскопічно в проміжному шарі переднього епітелію рогики клітини зберігають свою форму, плазмолемі чітко контуровані міжклітинні простори помірно розширенні, а десмосомальні контакти осміофільні і частково пошкоджені. У каріоплазмі багато рибосомальних гранул, є крупні ядерця, в окремих ядрах наявна їх дублікація. Ядерні мембрани чіткі, а перинуклеарні простори вузькі (рис. 1). Органел у цитоплазмі епітеліоцитів проміжного шару помірна кількість. Переважно це тонофібрили, які розташовані рихло, а біля плазмолемі окремими пучками. Як і в клітинах поверхневого шару, у гіалоплазмі наявні електроннопрозорі порожнини, переважно парануклеарно. Окремі непротяжні каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, вільні полісоми, невеликі мітохондрії зі світлим матриксом характерні для таких клітин. Електронномікроскопічні дослідження епітеліоцитів базального шару показали, що структурна організація клітин добре збережена. Округло-овальні ядра орієнтовані переважно по довжині клітин, перпендикулярно базальній мембрані. Ядерні мембрани чітко контуровані, а перинуклеарні простори на окремих ділянках помірно розширені. У каріоплазмі переважає еухроматин, наявні крупні ядерця і рибосомальні гранули. Іноді, спостерігаються базальні епітеліоцити в стані мітотичного поділу. У таких клітинах відсутня ядерна оболонка і відбувається конденсація хроматину. Зберігаються десмосомальні контакти між плазмолемами сусідніх епітеліоцитів і напівдесмосомальні з базальною мембраною, але вони виглядають ущільненими а тонофібрили біля них нечіткими. В мітохондріях спостерігається часткове просвітлення матриксу та деструкція крист. Окремі органели гіпертрофовані, а кристи в них частково редуковані. В цитоплазмі наявні також рибосоми, непротяжні каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, цистерни і вакуолі комплексу Гольджі, які помірно розширені. Тонкофібрили частково лізуються і гірше контуруються.

В умовах кріоконсервації власна речовина рогики добре збережена. Більшість сполучнотканинних пластинок мають притаманну їм будову і розташування колагенових фібрил або паралельними ниткоподібними структурами, або у вигляді крапок на перпендикулярному перерізі. Проте, на окремих ділянках пластинки мають вогнища просвітлення, де колагенові фібрили частково лізуються. Фібробласти переважно подовгастої форми з вузькими відростками. Еліпсоподібні ядра чітко контуровані мембранами каріолеми, перинуклеарні простори вузькі. Хроматин середньої електронної щільності, рівномірно заповнює каріоплазму. Органели, що розташовані переважно парануклеарно мають помірні зміни. Короткі цистерни гранулярної ендоплазматичної сітки частково розширені, рибосом і полісом небагато. Невеликі мітохондрії мають середньої електронної щільності матрикс, окремі його ділянки світлі, кристи невеликі і частково пошкоджені. Наявні також окремі світлі вакуолі і пухирці.

Дослідження ультраструктурної організації одношарового заднього епітелію також встановили помірні зміни його компонентів.

Електронномікроскопічні дослідження ксенорогівок після їх кріоконсервації і наступній ліофілізації встановили, що у всіх шарах переднього епітелію наявні зміни їх структурних компонентів. В умовах ліофілізації пластинки власної речовини різні за товщиною і електронною щільністю. Більш темні мають ущільнено розташовані колагенові фібрили, окремі змикаються з утворенням конгломератів. Світліші пластинки мають рихло розташовані колагенові фібрили і електронно - прозорі ділянки. Фіброцити зберігають подовгасту форму тіла і еліпсоподібні ядра в каріоплазмі яких багато гетерохроматину та іноді наявні невеликі ядерця. Цитоплазма вузьким обвідком оточує ядро, а відростки витончені та розташовані паралельно пластинкам (рис. 2).

У середній ділянці власної речовини рогики встановлена наявність більших за площею фібробластів, ті що в нормі активно функціонували. Вони також значно змінені і наявна деструкція їх компонентів. Сполучнотканинні пластинки власної речовини у цій ділянці широкі, проте в них фібрилярні структури погано контуруються, тому виглядають гомогенізованими і просвітленими. Ультраструктурна організація заднього епітеліального пласта рогики при ліофілізації суттєво змінюється. Каріоплазма ядер і гіалоплазма клітин

стають осміофільними, утворюються різної конфігурації і розмірів електронно світлі порожнини. Контури плазмолеми стають нечіткими, зливаються з цитоплазмою. Ядра значно змінюють форму, виглядають пікнотичними, каріолема нерівна, контури нечіткі, перинуклеарні простори збільшені і мають вигляд білої смужки з ділянками потовщення. Ядерні пори не виявляються, є місця злипання внутрішньої і зовнішньої ядерних мембран. Ядерця також не спостерігаються в осміофільній, гомогенній каріоплазмі (рис. 3).

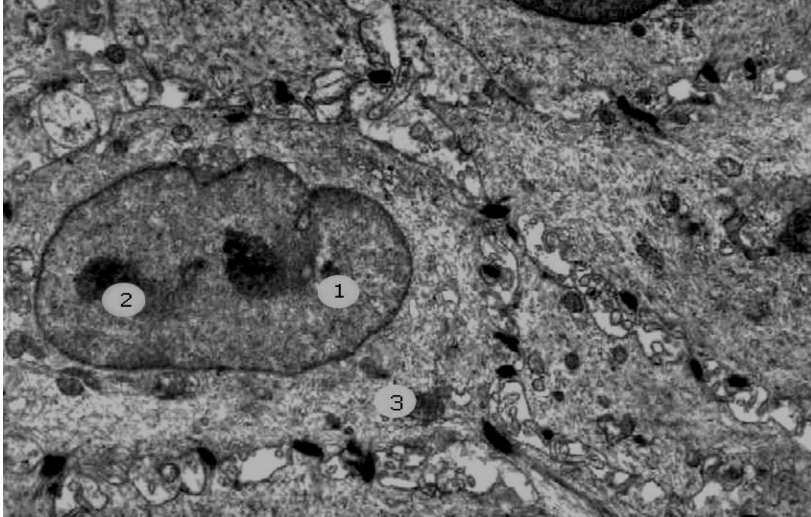


Рис. 1. Ультраструктурний стан епітеліоцитів проміжного шару переднього епітелію рогівки при кріоконсервуванні з використанням гліцерин – жовткової суміші. Ядро (1) з двома великими ядерцями (2), цитоплазма (3) з помірною кількістю органел, світла вакуолеподібна порожнина (4). x 10 000.



Рис. 2. Субмікроскопічний стан власної речовини рогівки після її кріоконсервування і ліофілізації. Фіброцит (1) з вузькими відростками (2), змінені сполучнотканинні пластинки (3). x5000.

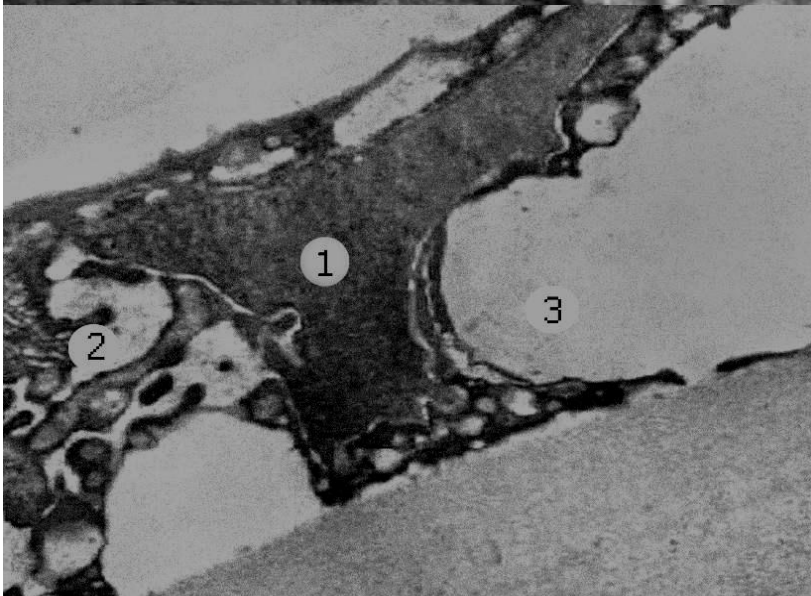


Рис. 3. Субмікроскопічні зміни заднього епітелію ліофілізованої після кріоконсервування рогівки. Деструкція ядра (1) і цитоплазми (2), крупні вакуолеподібні структури (3). x5000.

Характерним є наявність в епітеліоцитах різних за розмірами вакуолоподібних структур. Вони біля задньої пограничної мембрани утворюють великі, неправильної форми перетинки. Вакуолоподібними стають також мітохондрії, в них світлий матрикс і пошкодженні кристи. Між епітеліоцитами і пластиною Десцемета з'являється нерівномірна світла смужка і не простежуються напівдесмосомні контакти.

Задня погранична пластинка зберігає однорідність, гомогенна, помірно осміофільна. Передня її частина, що розташована біля власної речовини рогівки, більшої електронної щільності, в ній фібрилярні структури погано виявляються. Таким чином, проведенні електронномікроскопічні дослідження структурної організації кріоконсервованої ксенорогівки з використанням кріопротектора свідчать про хорошу збереженість всіх структурних компонентів рогівки. Ліофілізовані після кріоконсервування рогівки характеризуються більшими змінами ультраструктури її компонентів.

Резюме

Проведенні дослідження показали, що кріоконсервування ксенорогівки після попередньої обробки в гліцерин - жовткової суміші, добре зберігає ультраструктуру всіх її компонентів. Встановленні помірні зміни епітеліальних шарів та власної речовини свідчать про те, що такий метод консервування можна рекомендувати для трансплантації при пошкодженнях рогівки. При ліофілізації рогівки ультраструктурні зміни її компонентів свідчать про можливість використання виготовленого таким методом біоматеріалу для тимчасового закриття пошкоджень переднього відрізка ока.

Перспективи подальших розробок у даному напрямку. Отриманні результати субмікроскопічних досліджень дозволяють застосовувати кріоконсервовані і ліофілізовані рогівки в клініці і проводити вивчення особливостей перебігу регенаторних процесів.

Література

1. Бігуняк В. В. Консервування ауто- і ксенотрансплантата для відновлення втраченої шкіри у опечених хворих: дис...доктора мед. наук: / - Бігуняк Володимир Васильович.- Тернопіль, 1994. - 275с.
2. Ерошева Т. И. О глазных банках для целей кератопластики / Т. И. Ерошева, Н. М. Яхина // Вестник офтальмологии. - 1973. - №6. - С.3-5.
3. Каспаров А. А. Отбор, методы стерилизации и консервации донорского материала для сквозной кератопластики / А. А. Каспаров, В. Н. Розина // Медицинский реферативный журнал. – Сер. 8. – 1990. - № 10. – С. 4-7.
4. Результаты применения кріоконсервированной роговицы для сквозной кератопластики в эксперименте / Т. У. Горгиладзе, Н. С. Шульгина, Т. Н. Юрченко [и др.] // Офтальмологический журнал. – 1978. - № 5. – С. 54-57.
5. Савушкина Н. М. Морфологические изменения роговицы при низких температурах / Н. М. Савушкина // Офтальмологический журнал. – 1952. - № 4. – С. 235-238.
6. Effect of postmortem duration on endothelial cell density in short-term culture with McCarey-Kaufman medium. An experimental study with Swine corneas / Hagenah M, Lenk C, Winter R at al. // Vet. Med. – 2005.- Vol. 50 (5). – P. 190-195.
7. Freund D.E. Ultrastructure in anterior and posterior stroma of perfused human and rabbit corneas. Relation of transparency / D. E. Freund, R. L. McCally, R. A. Farrell // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. — 1995. — Vol. 36. — P. 1508—1523.
8. Weakly B. (Уикли Б.) Электронная микроскопия для начинающих. /пер. С англ.. М.: Мир, - 1975. -324 с.

Реферати

УЛЬТРАСТРУКТУРНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КСЕНОТРАНСПЛАНТАТОВ РОГОВИЦЫ ПРИ РАЗЛИЧНЫХ УСЛОВИЯХ ХРАНЕНИЯ

Гребеник И.М., Волков К.С.

Произведены электронномикроскопические исследования ксенороговицы при кріоконсервации и лиофилизации. Установлено, что структурная организация хорошо сохранена при кріоконсервации с использованием глицерин – желточной смеси. Проведение лиофилизации после предыдущей кріоконсервации сохраняет общие закономерности строения ее компо-

ULTRASTRUCTURAL CHARACTERISTIC OF CORNEAL XENOTRANSPLANTS IN DIFFERENT CONDITIONS STORAGE

Grebenyk I.M., Volkov K.S.

Electronmicroscopic investigations of cryoconserved and lyophilized xeno-cornea were performed. The best safety of structural organization of equilibrated xeno-cornea was revealed. Lyophilization after cryoconservation corneas have saved their general structure. It makes possible to use such cornea as a

ментов. Поэтому ее можно использовать для кратковременного закрытия поврежденной передней отрезка глаза.

Ключевые слова: ксенороговица, ультраструктура, криоконсервация, лиофилизация.

temporal biological bandage to heal the wounds.

Keywords: xeno-cornea, ultrastructural, cryoconservation, lyophilization.

УДК 616.5-001.19:577.115:615.36

ВПЛИВ ЕКСТРАКТІВ ТВАРИННОГО ПОХОДЖЕННЯ НА ЗАГОЄННЯ ХОЛОДОВИХ РАН

~~Н.Ю. Єрмакова, А.В. Шиндер, О.Д. Рошаль, С.Є. Гальченко, Б.П. Сандомирський
Інститут проблем кріобіології і кріомедицини НАН України, м. Харків~~

При введенні ЕСС або ЕПБ в черевну порожнину не спостерігається активації ПОЛ в організмі щурів. Введення ЕСС або ЕПБ прискорює загоєння холодових ран в порівнянні з контрольними групами та сприяє нормалізації рівня ПОЛ в організмі. Досліджені екстракти можуть знайти застосування при розробці препаратів для лікування ран.

Ключові слова: холодова рана, загоєння, екстракт селезінки, екстракт підмору бджіл.

Робота виконана в рамках науково-дослідної теми Інституту проблем кріобіології і кріомедицини НАН України “Одержання екстрактів з кріоконсервованого ксеногенного матеріалу, їх склад та біологічна дія”, № держреєстрації 0107U000539.

Злоякісні пухлини зовнішньої локалізації, як правило, піддаються комбінованому лікуванню (передопераційний курс хіміо- або променевої терапії з подальшим оперативним втручанням). Для видалення пухлин часто використовують кріодеструкцію, оскільки цей метод є найменш травматичним, не має протипоказань для лікування злоякісних новоутворень [8, 10]. При цьому активується перекисне окислення ліпідів (ПОЛ), яке також уповільнює процес загоєння ран [7]. Таким чином, нормалізація процесу регенерації шкіри, скорочення термінів лікування після холодової травми є актуальною задачею. Сучасні засоби експериментальної і клінічної регенеративної медицини базуються як на застосуванні ствольних клітин, так і інших біологічно активних препаратів, до яких належать екстракти тканин тваринного походження [2, 9].

Раніше було показано, що екстракт кріоконсервованих фрагментів селезінки свиней (ЕСС) нормалізує імунний статус організму, зокрема систему Т-лімфоцитів [2], які приймають активну участь в регуляції регенерації [4], а також що екстракт підмору бджіл (ЕПБ) має виражену антиоксидантну активність [5]. Ці факти дозволили припустити, що вказані вище екстракти сприятимуть прискоренню і нормалізації загоєння холодових ран у тварин.

Метою роботи було дослідження складу ЕСС та ЕПБ та їх впливу на процес загоєння холодових ран.

Матеріали та методи дослідження. Експерименти проведено відповідно до «Загальних принципів експериментів на тваринах», схвалених II Національним конгресом з біоетики і узгоджених з положеннями «Європейської Конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментальних і інших наукових цілей» (Страсбург, 1985).

Екстракт селезінки свиней одержували за методом [9], а ЕПБ - екстракцією бджолиного підмору в апараті Сокслета. Екстракти вводили щурам у черевну порожнину по 1 мл один раз на добу. Концентрація пептидів в ЕСС становила 100 мкг/мл, а в ЕПБ – 0,25 мг сухої речовини/мл. Спектри флуоресценції екстрактів досліджували за допомогою спектрофлуориметра Varian Cary Eclipse. Проводилась автоматична корекція спектрів. Ширина вхідної та вихідної щілин монохроматорів становила 5 нм. Для усунення ефекту концентраційного тушіння зразки розводили так, щоб їх оптична щільність на довжині хвилі збудження не перевищувала 0,1 D. Всі вимірювання проводили при 20°C в стандартних кварцевих кюветах 1x1x3 см. Обробку спектрів проводили в програмі Microcal Origin 6.0.

Холодову травму шкіри моделювали на 18 щурах лінії Вістар і 18 щурах Сфінкс масою 190 - 210 г. Для визначення досліджуваних показників в нормі було використано по 6 тварин. Під поверхневим ефірним наркозом у дослідних щурів лінії Вістар видаляли шерсть на стегні. Холодову травму наносили охолодженим в рідкому азоті мідним аплікатором