

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ВНЗ «ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМ. І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО»

На правах рукопису

Гребеник Інна Мар'янівна

УДК 617.713:599.731.1:615.381.018.48

**МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНІ ВЛАСТИВОСТІ РОГІВКИ СВИНІ
ПРИ РІЗНИХ МЕТОДАХ КОНСЕРВУВАННЯ**

14.03.01 – нормальна анатомія

ДИСЕРТАЦІЯ

на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Науковий керівник
Волков Костянтин Степанович,
доктор біологічних наук, професор

Тернопіль – 2010

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ	4
ВСТУП	5
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ .	13
1.1. Сучасні погляди на будову людської рогівки	13
1.2. Біологічні властивості трансплантатів рогівки при різних методах зберігання	23
1.3. Гістоморфологічні і функціональні зміни рогівки при консервації	28
РОЗДІЛ 2. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ	38
2.1. Постановка досліду і об'єкт дослідження	38
2.2. Методи дослідження та їх обґрунтування	40
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ	46
3.1. Морфологічна, морфометрична та ультраструктурна характеристика ксенорогівки у нормі	46
3.2. Морфологічні, морфометричні та ультраструктурні зміни ксенорогівки при різних методах консервації.....	63
3.2.1. Морфологічний, морфометричний та ультраструктурний стан кріоконсервованих ксенотрансплантатів рогівки без використання кріопротектора	64
3.2.2. Морфологічний, морфометричний та ультраструктурний стан кріоконсервованих з кріопротектором ксено-трансплантатів рогівки	71
3.2.3. Морфологічний, морфометричний та ультраструктурний стан ліофілізованих ксенотрансплантатів рогівки	81
3.2.4. Морфологічний, морфометричний та ультраструктурний стан ліофілізованих з кріопротектором ксенотрансплантатів рогівки	88

3.3. Біохімічні зміни ксенорогівки при кріоконсервації та ліофілізації	98
3.4. Світлооптичні характеристики інтактно́ї та консервованої різними способами ксеногенної рогівки	100
РОЗДІЛ 4. АНАЛІЗ І УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕНЬ	110
ВИСНОВКИ	127
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	130
ДОДАТКИ	151

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СИМВОЛІВ, СКОРОЧЕНЬ І
ТЕРМІНІВ

ГЕС	-	грануляційна ендоплазматична сітка
ГЖС	-	гліцерин-жовткова суміш
КП	-	кріопротектор
КГ	-	комплекс Гольджі
М	-	мітохондрії
ПГ	-	протеоглікани
ХС	-	хондроїтин-сульфат

ВСТУП

Актуальність теми. Життєдіяльність людини пов'язана зі сприйняттям інформації, що забезпечують органи чуття. Периферійна ланка зорового аналізатора – око повинно здійснювати якісне світлосприйняття. На жаль, структурні компоненти органа зору пошкоджуються, як із віком, так і при їх захворюваннях.

За даними наукової і медичної літератури патологія рогівки займає одне з чільних місць серед причин сліпоти і слабобачення [55, 85], а за даними ВООЗ – входить до трійки основних чинників втрати зору, частка якої становить 6,6-39,3 % [96].

Найчастіше ураження рогівки є наслідком травм та опіків, які належать до найважчої патології органа зору [70, 94]. Зокрема, травми рогівки у осіб працездатного віку в структурі первинної інвалідності складають 29 %, а частота опіків очей за даними різних авторів, становить до 38,4 % всіх видів травм органа зору. Незважаючи на досконалість методів консервативного та хірургічного лікування, 40 % постраждалих стають інвалідами. Серед них більшість становлять люди молодого працездатного віку.

Не меншу проблему складають гнійні виразки рогівки, які в структурі захворювань зовнішньої оболонки ока складають 36,6 % [81]. Таким чином, адекватне лікування травм органа зору та гнійних кератитів є актуальною медичною, соціальною та економічною проблемою.

Існуючі методи консервативного лікування частково дозволили знизити відсоток ускладнень травматичних пошкоджень очей [70, 96]. Проте, у цілому, загальноприйняте консервативне лікування опіків очей та виразок рогівки не завжди є ефективним [79]. Безуспішність консервативних методів лікування часто пов'язана з порушеннями репаративно-регенеративних процесів, які призводять до перфорації та загибелі ока. Тому патологія

рогівки, у ряді випадків, вимагає термінового хірургічного втручання, особливо при прогресивному лізисі і загрозі перфорації рогівки [39].

Зважаючи на високі регенеративні властивості рогівки, існує думка про необхідність проведення операцій з використанням лікувального біологічного покриття. З цією метою використовуються різноманітні донорські матеріали: рогівка, склера, тверда мозкова оболонка, фасції, амніон [6, 7, 30, 38, 41, 58, 66, 104].

Пересадка рогівки ока – найпоширеніша в наші дні операція з трансплантації, яка проводиться вже біля ста років [8, 42]. Проте, таке оперативне втручання з самого початку стикалось з такими проблемами, як забезпечення повноцінного якісного донорського матеріалу, удосконалення техніки пересадки, боротьба з так званою хворобою трансплантанта, викликану несумісністю між донором і реципієнтом. Збір донорського матеріалу пов'язаний із рядом організаційних труднощів. У багатьох країнах розроблені юридичні засади для забору трупного аллотрансплантаційного матеріалу, які у нашій державі поки ще не вирішені [119].

Глибоке розуміння біології рогівки, разом із вражаючим прогресом у мікрохірургічній техніці, а також використання протизапальних препаратів без сумніву покращили наслідки кератопластики. У результаті, пересадка рогівки стала найкращим засобом боротьби з сліпотою, спричиненою помутнінням рогівки [44, 57].

У сучасних умовах на тлі різкого збільшення промислового, дорожнього і побутового травматизму, порушення екологічного балансу біосфери, загострення регіональних і міжнаціональних конфліктів та відповідно, зростання частки патології рогівки, постала нагальна проблема дефіциту донорського матеріалу. Це стало стимулом до пошуку різних методик приготування та використання ксеногенного донорського матеріалу [51, 56, 92, 130].

На жаль, не завжди результат кератопластичних операцій є позитивним. Очевидно, це залежить в якійсь мірі від морфофункціонального стану трансплантаційного матеріалу. Оскільки донорська рогівка піддається дії фізичних і хімічних чинників при зберіганні, а морфологія ксенотрансплантанту в умовах консервації є маловідомою [118, 194], перспективним і доцільним є вивчення морфологічного і функціонального стану свинячої рогівки при різних методах консервування [36, 50, 60].

Існуючі способи консервації донорської рогівки мають свої позитивні сторони і недоліки. Ще у 1933 році, В.П. Філатов запропонував простий і надійний метод вологої камери – короткочасна консервація при температурі від $+2$ до $+4^{\circ}$ С. С.Н. Федоров і В.Г. Копаєва використовували неконсервовану рогівку, впродовж перших 12 годин після смерті. Проте, дані методи мають ряд обмежень, пов'язаних з отриманням донорського матеріалу, лімітом часу між взяттям матеріалу та проведенням втручання, неможливістю створення банку рогівок [18, 32].

В останні десятиліття успішно використовується метод тривалої кріоконсервації, який полягає в глибокому охолодженні (-196° С) у рідкому азоті цілого очного яблука [14]. Метод використовується в діяльності банків органа зору, але він має дуже складну технологію та, на жаль, є малодоступним в умовах реальної клінічної практики.

Інші методи короткочасної консервації рогівки в середовищі McCarey-Kaufman (середовище Т-199, декстран-40, Нерес-буфер і гентаміцин) [143], чи К-Sol (Т-199, хондроїтинсульфат, Нерес-буфер і гентаміцин) [106], дозволяють зберігати донорський матеріал тривало, проте, розраховані на забезпечення життєдіяльності ендотелію рогівки, що створює певні труднощі в їх стерилізації [116]. Метод ліофілізації донорського матеріалу Pauca (ліофілізація силікогелем) [191] забезпечує добре приживлення рогівки, яка в короткі терміни заміщається строною рогівки реципієнта і зберігає прозорість у більшості випадків. За даним деяких авторів [20], даний метод

консервації гальмує ріст патогенного золотистого стафілокока. Проте, при ліофілізації залишаються невирішеними питання стерильності і антигенності донорського матеріалу [37, 89, 217].

Таким чином, проблема пересадки рогівки пов'язана з цілою низкою вагомих правових, організаційних, методичних і медичних проблем. Труднощі з придбанням аллогенного трансплантаційного матеріалу [33, 47, 60, 88], за умови постійного зростання попиту, вимагає пошуку і розробки нових методів його консервації, яка забезпечила б не тільки абсолютну стерильність, але й можливість отримувати трансплантат без будь-яких протипоказань та перехід на альтернативний забір від інших біологічних видів, власне ксеногенний матеріал. При цьому ставляться високі вимоги до забезпечення абсолютної стерильності, необмеженості забору донорського матеріалу, альтернативного використання матеріалу від тварин (ксеногенний матеріал) [39,80].

Використання ксеногенного матеріалу, у свою чергу, вимагає вирішення низки питань, що стосуються методик консервації, збереження морфологічної структури, функціонального стану клітин, стерильності, антигенності та ін.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертаційна робота виконана в рамках наукових програм кафедри гістології, цитології та ембріології і загальної та оперативної хірургії з курсом комбустіології Тернопільського державного медичного університету імені І.Я. Горбачевського на тему “Зміни в ксенодермотрансплантах при впливі на них фізичних чинників та ефективність їх використання у хворих з опіковою травмою” (номер державної реєстрації 0105U004112) та кафедри оториноларингології, офтальмології та нейрохірургії “Діагностика та лікування патологічних процесів голови, шиї та хребта” (номер державної реєстрації 0107U004459). Автор є співвиконавцем зазначених науково-дослідних робіт.

Тема дисертаційної роботи затверджена Проблемною комісією МОЗ і АМН України “Морфологія людини” 17 лютого 2009 року (протокол № 91).

Мета роботи – встановити ступінь морфофункціональних змін структурних компонентів рогівки ока свиней при різних методах консервування.

Завдання дослідження:

1. Провести детальні морфологічні дослідження структурних компонентів рогівки свині в нормі.

2. Дослідити гістологічний, електронномікроскопічний, морфометричний стан структурних компонентів ксенорогівки при кріоконсервуванні.

3. Встановити морфофункціональні зміни структурних компонентів ліофілізованих ксенотрансплантатів рогівки.

4. Вивчити світлооптичні властивості та деякі біохімічні показники (вміст глікопротеїнів, сіалових кислот, гіалуронової кислоти, хондроїтинсульфату) ксенорогівки при різних методах консервування.

Об’єкт дослідження: рогівка ока свині при різних методах консервування.

Предмет дослідження: морфофункціональний стан ксенорогівки при кріоконсервуванні та ліофілізації.

Методи дослідження: гістологічні (світлооптичні, електронномікроскопічні), які дозволили встановити якісні зміни структурних компонентів рогівки; морфометричні, які забезпечили отримання кількісних параметрів компонентів рогівки; біохімічні, поляризаційна флюоресценція, спектральний аналіз, які дозволили оцінити функціональний стан рогівки; статистичні, які дозволили провести аналіз достовірності отриманих числових даних.

Наукова новизна одержаних результатів. Уперше проведені комплексні дослідження особливостей структури рогівки свині в нормі та її

морфофункціонального стану при різних методах консервування. На електронномікроскопічному рівні встановлено, що особливістю структурної організації власної речовини інтактної рогівки є наявність трьох типів кератоцитів.

Уперше встановлено особливості структурних, морфометричних і біохімічних змін кріоконсервованої ксенорогівки, що відображають її життєздатність. Уперше встановлені морфологічні, морфометричні та біохімічні показники ліофілізованої ксенорогівки.

Уперше з використанням методик поляризаційної флюоресценції та спектрального аналізу отримано дані про ступінь прозорості рогівки при різних методах консервування.

Практичне значення одержаних результатів. Проведені комплексні дослідження з застосуванням гістологічних, морфометричних, електронномікроскопічних, біохімічних, статистичних методів дозволили встановити ступінь морфофункціональних змін ксенорогівки при різних методах консервування. Отримані дані дозволяють теоретично обґрунтувати доцільність використання кріоконсервованої і ліофілізованої рогівки свині в офтальмології.

Отримані нові науково обґрунтовані результати можуть бути використані при читанні лекцій і на практичних заняттях, при написанні посібників, атласів і монографій з нормальної анатомії, гістології, офтальмології.

Основні положення і висновки наукової роботи впроваджені в навчальний процес на кафедрах анатомії людини, патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною ДВНЗ „Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського”, кафедрі гістології цитології та ембріології ВДНЗ “Українська медична стоматологічна академія”, кафедрах анатомії людини Харківського національного медичного університету, Одеського державного медичного університету, Луганського

державного медичного університету та Дніпропетровської державної медичної академії, науково-дослідному центрі та кафедрі гістології, цитології та ембріології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, кафедрі анатомії людини та гістології Ужгородського національного університету, кафедрі анатомії людини та курсі гістології Буковинського державного медичного університету.

Особистий внесок здобувача. Автором самостійно проаналізована спеціальна література за темою дисертації, освоєні методики та проведені гістологічні та морфометричні дослідження матеріалу, виконана статистична обробка даних та проаналізовані отримані результати, самостійно написані усі розділи роботи. Планування досліджень, інтерпретація наукових положень і висновків проведено спільно з науковим керівником.

У наукових працях, опублікованих у співавторстві, а також актах впровадження, що стосується науково-практичної новизни викладені дані отримані автором у процесі виконання дисертаційної роботи.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації оприлюднені на XII, XIII Міжнародному конгресі студентів і молодих вчених (Тернопіль, 2008, 2009), науково-практичній конференції “Морфологічні основи компенсаторно-приспосувальних процесів і їх структурне забезпечення” (Тернопіль, 2008).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 7 наукових робіт, які повністю відображають зміст проведеного дослідження. з них 4 статті у фахових виданнях, рекомендованих ВАК України, 3 тез у збірниках робіт наукових конференцій.

Структура і об’єм дисертації. Дисертаційна робота викладена на 162 сторінках комп’ютерного набору (основний обсяг становить 129 сторінок) і складається зі вступу, огляду літератури, опису матеріалу і методів дослідження, розділу власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, списку використаних джерел (223 бібліографічних

описів, із них – 100 кирилицею та 123 – латиною), додатків. Дисертація ілюстрована 5 таблицями і 58 рисунками.

РОЗДІЛ 1

ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ

Пересадка рогівки ока – найпоширеніша в наші дні операція по трансплантації, яка проводиться вже біля ста років. Пересадка рогівки з самого початку стикалась з такими проблемами, як забезпечення повноцінного якісного донорського матеріалу, вдосконалення техніки пересадки, боротьба з, так званою, хворобою трансплантата, викликаною несумісністю між донором і реципієнтом. Забір донорського матеріалу пов'язаний з рядом організаційних труднощів [49, 45, 140]. У багатьох країнах існують юридичні основи для забору трупного аллотрансплантаційного матеріалу. Це стало стимулом до пошуку різних методик приготування та використання ксеногенного донорського матеріалу [11, 14, 43, 74, 98, 100].

1.1. Сучасні погляди на будову людської рогівки

Завдяки новим, сучасним методам дослідження (морфологічним, біохімічним, фізіологічним, фізичним та функціональним) знання про будову рогівки постійно розширюються і поглиблюються. Вивчення особливостей регенерації структурних компонентів рогівки після травми, кератопластики, різного фізичного впливу на цю структуру ока є важливим не тільки з теоретичної, але й з практичної точки зору. Широке використання рефракційної хірургії було стимулом до вивчення ролі кератоцитів у біохімічній організації строми рогівки [152]. Використання в офтальмології лазерного випромінювання виявило необхідність більш детального вивчення внутрішнього епітелію рогівки. Власне клінічні проблеми в теперішній час є стимулом глибокого вивчення її структури.

На мікроскопічному рівні рогівка людини в нормі досить детально вивчена. Встановлено, що її товщина в центрі рівна 0,52 мм, а по периферії – 0,67 мм [163]. Морфологічно в рогівці розрізняють п'ять шарів: передній епітелій, передня погранична (боуменова) пластинка, власна речовина рогівки, задня погранична (десцетова) пластинка і задній епітелій рогівки (ендотелій). Ряд авторів виділяють ще один шар – слізну плівку, яка має велике фізіологічне значення, але в гістологічному розумінні не є структурним компонентом рогівки [4, 151].

Передній епітелій у відповідності з гістологічною номенклатурою, відноситься до багат шарового плоского незроговілого епітелію. Товщина переднього епітелію рогівки дорівнює 50,7 мкм. Він складається із 5-6 вкриваючих один одного клітинних шарів. Клітини найбільш поверхневого шару мають плоску форму, у зв'язку з чим, передній епітелій і отримав свою назву. Довжина плоских клітин дорівнює 45 мкм, а товщина – 4 мкм. Ці клітини мають найбільшу площу, яка збільшується в напрямку до периферії рогівки (850 мкм^2 – на периферії і 560 мкм^2 – у центрі) [76, 161]. Між епітеліоцитами визначається велика кількість десмосом. Обернена назовні клітинна поверхня епітеліоцитів, утворює велику кількість мікроросинок висотою 1-2 мкм і мікроскладок, вкритих глікокаліксом [191]. Глікокалікс складається з глікопротеїдів і багаточисленних мікрофіламентів, довжиною 150 нм [136]. Мікрофіламенти прикріплюються до цитоплазматичної мембрани клітин. Основною функцією мікроросинок є стабілізація слізної плівки на поверхні рогівки [48].

Електронномікроскопічно встановлено, що цитоплазма епітеліоцитів поверхневого шару насичена органоїдами (тонофіламенти, грануляційна ендоплазматична сітка (ГЕС), комплекс Гольджі (КГ), вільні рибосоми). Мітохондрії (М) мають невеликі розміри і зустрічаються рідко. Це свідчить про низький рівень аеробного окислення та залежність дихання клітин від пентозного шляху метаболізму. В цитоплазмі встановлені включення

глікогену у вигляді дрібнодисперсних грудок розмірами 20-30 нм. Кількість зерен глікогену помітно зменшується при гіпоксії епітеліоцитів і при регенерації клітин у посттравматичному періоді [200]. У поверхневих клітинах переднього епітелію встановлені чисельні пухирці зв'язані з КГ.

Середній (перехідний) шар переднього епітелію складається з 2-3 шарів клітин остистої форми. Їх діаметр дорівнює 12-15 мкм. Ядра цих клітин довгою віссю орієнтовані паралельно поверхні рогівки. Короткі цитоплазматичні відростки проникають між плазмолемами сусідніх клітин. Цитоплазма насичена органоїдами [124].

Базальний шар представлений одним шаром високих полігональних клітин, розміром 18x10 мкм. Ядра клітин базального шару мають у діаметрі 5-7 мкм і зміщені в апікальну частину клітин. У вказаному шарі визначається мітотичний поділ клітин [117, 120, 200]. За даною ознакою цей шар клітин називають ще гермітативним. У базальному шарі переднього епітелію можна виявити клітини неепітеліального походження – дендритні клітини. Виділяють два типи таких клітин [150, 152, 195]. Перший тип відноситься до меланоцитів, а другий – до так званих клітин Ларгенганса. Клітини Ларгенганса виконують функцію імунокомпетентних клітин. Власне вони розпізнають чужерідний антиген і передають отриману інформацію лімфоцитам [146, 210]. Ці клітини появляються в стромі рогівки досить рано. У базальному шарі встановлена наявність лімфоцитів [212].

Встановлено, що базальна мембрана переднього епітелію при проведенні ШИК-реакції фарбується в рожевий колір (PAS-позитивна). Товщина її коливається від 75 до 100 нм [131]. Ця структура складається з двох компонентів – гранулярного і волокнистого. Глибокий шар осміофільний має товщину 30-60 нм. Називають цей шар «темна пластинка». Товщина поверхневого шару – 24 нм. Поверхнева пластинка базальної мембрани представляє собою аморфну пластинку, спаяну з плазмолемою

епітеліоцитів напівдесмосоми. Такі структури складаються із колагену VII типу.

Боуменова оболонка (передня погранична пластинка) розміщена під епітелієм. Товщина її дорівнює 8-14 мкм, вона виявляється при мікроскопічному дослідженні тільки у приматів, частини птахів і рептилій, а також у риби. Її відсутність у нижчих тварин впливає на еластичність рогівки.

Ультраструктурно боуменова оболонка складається із безладно розміщених і щільно упакованих колагенових фібрил діаметром 14-27 нм і довжиною 240-270 нм. Періодичність поперечної смугастості волокон дорівнює 64 нм. Основна речовина рогівки має такий же склад, як і основна речовина строми. Оболонка Боумена складається із колагену I типу, основного структурного компоненту рогівки і склери, а також колагену V, VI, III і VII типів [170, 182]. Ряд дослідників виявили колаген IV типу. Передня поверхня боуменової оболонки, яка межує з базальною мембраною епітеліальних клітин, гладка, а задня поверхня – нерівна [163]. У нормі ця оболонка не містить клітин. Першою ознакою розвитку патологічного стану рогівки є поява в цій структурі клітин [187].

Власна речовина (строма) рогівки складає 90 % товщини рогівки (450 мкм в центральних ділянках), в ній розрізняють три компоненти: колагенові пластини, клітини і основну речовину. У відповідності з гістологічною номенклатурою, строма представляє собою щільну оформлену сполучну тканину. Існує дві теорії, які пояснюють прозорість строми рогівки. Перша [172], говорить про те, що колагенові волокна рогівки формують решітчасту структуру, зменшуючи світлорозсіювання в результаті загальної інтерференції від кожної фібрили. До тих пір, поки фібрили розміщені в решітці рівномірно і проміжок між ними менше довжини хвилі видимого спектру (400-700 нм), рогівка залишається прозорою. Коли ж відстань між фібрилами збільшується, загальна інтерференція вже не має місця і рогівка мутніє. Друга теорія стверджує, що рогівка прозора внаслідок того, що

фібрили доволі малі по відношенню до довжини світла і не заломлюють світло при проходженні через них до тих пір, поки вони не більше половини довжини хвилі світла [139].

У теперішній час прозорість строми рогівки пов'язують з низкою структурних її особливостей і хімічним складом. Велике значення має строга орієнтація колагенових пластин [121, 198, 201]. Має також значення визначене співвідношення між колагеном і матричними білками – протеогліканами (ПГ) [108, 128]. Порушення цього взаємовідношення призводить до помутніння рогівки.

Особливістю структурної організації стромальних пластин є те, що кожна з них складається з пучків колагенових волокон, орієнтованих паралельно один одному. Фібрили володіють типовою смугастістю, рівній 64 нм і характерній для колагенових волокон других типів сполучної тканини. Колагенові волокна складаються, в основному, із колагену I типу, хоча виявлений і колаген III, VI і XII типів [103, 135, 182]. Відмічається унікальна однорідність діаметру фібрил, хоча і виявляється невелике збільшення їх діаметру в залежності від глибини стромальної пластини [158]. Число колагенових пластин рівне 300 в центральних ділянках рогівки і збільшується до 500 по периферії [193].

Стромальні пластини задніх відділів рогівки, розташовуються циркулярно вздовж лімба, формуючи «циркулярну зв'язку» [121, 186, 193]. Паралельне розміщення пластин передніх відділів строми рогівки і збереження подібного розміщення на границі із задніми шарами дозволяють виконувати міжпластинчасте розшарування рогівки при кератопластиці [193].

Передні і задні шари строми відрізняються не тільки будовою, але й фізико-хімічними властивостями. Так, задні шари строми більш впорядковані [133], більш гідратовані [190], володіють більш низьким заломлюючим індексом. Окрім цього, колагенові пластини задніх шарів строми ширші і

товщі (100-200 мкм – ширина і 1,0-2,5 мкм – товщина) передніх шарів (0,5-30 мкм – ширина і 0,2-1,2 мкм – товщина) [163, 180, 181]. Стромальні пластини занурені в основну речовину, яка представлена різними типами ПГ. Гідрофільна частина основної речовини глікозаміногліканів, в яку занурені колагенові волокна, набуває форму ПГ шляхом ковалентного сполучення глікозаміногліканів з білками. ПГ мають доволі різноманітну хімічну будову [171, 174]. Молекули глікозаміногліканів окутують волокна і орієнтуються перпендикулярно колагеновому волокну. Власне, зв'язок між волокнами і ПГ забезпечує прозорість рогівки [205].

У біохімічному відношенні встановлено, що власна речовина, яка складає 9/10 усієї товщини рогівки, представлена білком колагеном та аморфною міжклітинною речовиною, що складається з ПГ [71]. Останні утворені невеликою білковою частиною (5-10 %) і глікозаміногліканами (90-95 %). Останні приєднуються до білкової молекули ковалентними зв'язками по ОН-групі серину, теоніну або NH₂-групі аспарагіну. Глікозаміноглікани – це гетерополісахариди, які побудовані з великої кількості однакових дисахаридних одиниць, до складу яких входять два різні мономери [108]. Звичайно, дисахаридна одиниця складається з аміноцукру (N-ацетил-глюкозаміну чи N-ацетил-галактозаміну) й уронової кислоти (глюкуронової або ідурунової). До аміноцукрів у 4-му чи 6-му положенні часто приєднаний залишок сульфату. Відомі 8 головних типів глікозаміногліканів, які відрізняються за мономерами, типом глікозидних зв'язків, а також за кількістю й місцем приєднання сульфатних груп.

Серед усіх глікозаміногліканів найбільшу молекулярну масу (10⁵-10⁷ Да) має гіалуронова кислота [223]. Основною функцією гіалуронової кислоти в сполучній тканині є зв'язування води, завдяки чому міжклітинна речовина набуває характеру

желеподібного матриксу. Зв'язування води і обумовлене ним набухання, визначає біологічну роль гіалуронової кислоти в регуляції проникності тканин.

До нессульфатованих глікозаміногліканів належить також хондроїтин – сульфат (ХС) основний полісахарид протеогліканів. Найважливішими компонентами є хондроїтин-4-сульфат та хондроїтин-6-сульфат, які різняться за фізико-хімічними властивостями, а також – розподілом у різних видах сполучної тканини [142, 157].

Кератансульфати існують як два різновиди – кератан-сульфат I та кератансульфат II, що відрізняються амінокислотним складом білка, до якого вони приєднані, сумарним вмістом вуглеводів та локалізацією в тканинах. На противагу іншим глікозаміногліканам (ХС) не містять ані глюкуронової, ані ідурунової кислот. Кератансульфат I, виділений із рогівки ока, містить також фруктозу, сіалову кислоту і манозу [157].

У рогівці глікозаміноглікани ковалентно з'єднані з білками, створюючи макромолекулярні протеогліканові агрегати [5]. Основну міжклітинну речовину складають протеогліканові агрегати з гіалуронової кислоти, низькомолекулярних зв'язуючих білків та великої кількості мономерних субодиниць ПГ. На останні припадає до 99 % маси агрегатів. Протеогліканова субодиниця побудована з поліпептидного остова («корового» білка) і ковалентно зв'язаних з ним полісахаридних ланцюгів сульфатованих глікозаміногліканів. Основним ПГ є агрекан. В агрекані до білка приєднується приблизно 150 молекул ХС і кератансульфатів. Молекули агреканів нековалентно зв'язані з довгою молекулою гіалуронової кислоти за допомогою зв'язуючих низькомолекулярних білків. Протеогліканові мономери розміщені перпендикулярно до нитки гіалуронової кислоти. При зовнішньому тискові полісахаридні ланцюги зближуються, а якщо його зняти, форма і об'єм гідратованих агрегатів відновлюються. Отже, якщо колагенові волокна надають міцності, то основна міжклітинна речовина

(желеподібна структура з ПГ) забезпечує тургор, пружно-еластичні властивості [110].

У тканинах організму ПГ постійно оновлюються [71, 144]. За допомогою радіоактивних ізотопів було встановлено високу швидкість обміну ПГ. Розпад відбувається у лізосомах, куди вони потрапляють у результаті ендоцитозу. Білкова частина розщеплюється лізосомальними протеїназами, а вуглеводна – глікозидазами. Гіалуронідаза ссавців гідролізує β -1,4-глікозидні зв'язки між дисахаридними одиницями в гіалуронової кислоті, а також у ХС, з утворенням тетрасахаридів, які під дією інших глікозидаз розпадаються до моносахаридів [87]. Встановлено, що в організмі дорослої людини за добу розпадається близько 250 мг ПГ.

Основним клітинним компонентом строми рогівки є кератоцит. Ці клітини за походженням і будовою подібні до фіброцитів [134, 169]. Виявляються вони у всіх ділянках строми, але з різною щільністю. Для кератоцитів характерні довгі відростки, які орієнтовані паралельно колагеновим пластинам. Товщина кератоцитів дорівнює, приблизно, 2 мкм. При цьому ядро виглядає непропорційно великим, відносно цитоплазми [141].

Цитоплазма кератоцитів бідна органоїдами. Навколо багатьох клітин наявні скупчення фібрилярного і зернистого матеріалу, який є структурним компонентом майбутніх колагенових волокон і власної речовини. Основною функцією кератоцитів є синтез міжклітинної речовини і її колагенових фібрил у період ембріогенезу, після пошкодження рогівки, а також підтримка метаболізму строми протягом усього життя [203].

Birk і Trelstad встановили, що поверхня фібробластів відповідає за просторову орієнтацію колагенових фібрил. Власне завдяки цій властивості формуються їх пучки. У стромі рогівки зустрічаються лімфоцити, макрофаги і поліморфноядерні лейкоцити.

Задня погранична (десцеметова) пластинка на гістопрепаратах у світловому мікроскопі має вигляд безструктурної мембрани, яка покриває задню поверхню строми рогівки. У гістогенетичному і структурному поняттях вона представляє собою базальну мембрану заднього епітелію рогівки (ендотелію), який її продукує. Еластичність є однією із важливих характеристик цієї структури. Як і інші базальні мембрани, десцеметова оболонка PAS-позитивна і складається із коротких і тонких фібрил (10 нм). Фібрили, у свою чергу, утворенні колагеном, IV типу і вміщені в глікопротеїнову основну речовину [131].

При ультраструктурному дослідженні в мембрані виділяють дві ділянки [154, 155]. Передня її третина має товщину 1-4 мкм, а задні дві третини – 5-15 мкм.

Передній шар десцеметової пластинки, який контактує із власною речовиною рогівки, має багат шаровий пластинчастий вигляд, а задній – гранульований. Власне передній шар виникає в ембріональному періоді першим. На тангенціальних зрізах цей шар складається із однорідних колагенових фібрил, які утворюють рівносторонні трикутники. Задні $\frac{2}{3}$ мембрани утворюються вже після народження і складаються із гомогенного фіброгранулярного матеріалу. У мембрані, окрім переважаючого колагену IV типу, знайденні колагени III, V, VI і VIII типів [141, 210].

Задній епітелій рогівки – ендотелій за будовою представлений одним шаром плоских гексагональних клітин (плоский одношаровий епітелій), розміщених на десцеметовій оболонці. Ендотелій рогівки розглядається, як один із найбільш важливих структурних компонентів, які забезпечують прозорість рогівки [177, 197, 210]. При цьому показано, що забезпечення прозорості рогівки пов'язане із структурною організацією самої клітини, характеру міжклітинних контактів і розміщенням епітеліоцитів [109, 122, 123]. Однією з функцій ендотеліальних клітин також є підтримка постійного гідростатичного тиску строми рогівки. Власне важлива роль ендотелію в

збереженні прозорості рогівки і є причиною багаточисельних досліджень, спрямованих на вивчення будови і функції цієї структури ока. Останні дослідження показали, що у дорослих кількість ендотеліальних клітин обмежена і доволі постійна [45]. У молодих людей розмір клітин рівний 18-20 мкм (висота – 5-6 мкм), а в більш пізньому віці – 40 мкм. Появляється бімодальність розподілу клітин, як за розмірами, так і за складом ДНК ядер [218].

Ендотеліальні клітини рогівки приєднуються до десцеметової оболонки за допомогою напівдесмосом [149]. Поряд лежачі клітини щільно приєднуються одне до одного і сполучені десмосомами і замикальними пластинками. Останні розміщені по колу апікальної поверхні клітин і відмежовують міжклітинний простір, забезпечуючи бар'єрну функцію ендотелію [113]. Поряд лежачі клітини сполучаються також за допомогою “пальцевих вдавлень”, які представляють собою цитоплазматичні вирости, які вдавлюються в тіло сусідньої клітини. Наявність контактів між клітинами передбачає вибірково пропускну властивість ендотеліального шару. Вони обмежують пасивний транспорт в строму рогівки. На апікальній поверхні кожної ендотеліальної клітини розміщується від 20 до 30 мікрворсинок висотою 0,5-0,6 мкм і шириною 0,1-0,2 мкм [159]. Власне ці утворення значно збільшують площину контакту клітинної поверхні з вологою передньої камери ока. Виявлені війки, які частіше є по периферії рогівки. Виявлення війок Hogan, Alvarado, Weddell дозволило стверджувати, що ендотеліальні клітини мають однакове походження з клітинами трабекулярної сітки. Цитоплазма ендотеліоцитів багата М, які забезпечують енергією активний транспорт, секрецію і високий рівень синтезу протеїнів. Ендотеліоцити містять М в значно більшій кількості чим інші клітини ока за виключенням рецепторних клітин. Встановлена добре розвинена ГЕС, багаточисленні вільні рибосоми. Поблизу ядра розташований КГ. Центріолі з війками розміщуються в апікальній частині клітин. У великій кількості

визначаються лізосоми. Відмінною ознакою ендотеліоцитів є наявність багаточисельних цитоплазматичних пухирців, зв'язаних з цитоплазматичною мембраною. Імуногістохімічно в цитоплазмі цих клітин виявлені основні глікозаміноглікани рогівки – хондроїтин-6-сульфат, хондроїтин-4-сульфат, гепаран-сульфат [172, 173].

1.2. Біологічні властивості трансплантатів рогівки при різних методах зберігання

Ще в кінці минулого століття в 1887 році Е.В.Адамюком було опубліковано повідомлення про пересадку рогівки курки кроликам і людині, що закінчилось відносним успіхом. Пересадку рогівки кролика людині виконували Хісхолм і Міхель в 1888 році і Гарденіго в 1889 році. Автори спостерігали прозоре приживлення протягом деякого часу.

У 1938 році В.П.Філатовим і В.В.Скородинською були опубліковані результати спостереження за трьома хворими, двом із яких була пересаджена рогівка від курки і одному – від кішки [92]. Рогівка тварин пересаджувалась в отвір, утворений у прозорій рогівці сліпого ока після взяття із неї трансплантата для другого ока з більмом. Очі курки зберігались перед трансплантацією рогівки при температурі від 2-4° С, 3-5 діб, очі кішки – 44 години. Пересаджена рогівка у всіх трьох хворих прижилась. У одного хворого, якому була пересаджена рогівка від курки, спостерігалась значна прозорість трансплантата впродовж трьох місяців.

У зв'язку із непередбаченими наслідками ксеногенної пересадки рогівки, а також відкриттям Jean Dausset у 1956 році системи клітинних мембранних антигенів гістосумісності HLA, у дослідників різко знизився інтерес до використання ксеногенного донорського матеріалу.

Цей факт свідчить про те, що рогівка володіє високою антигенністю і що на її клітинах є високо специфічні антигенні системи HLA. Але із-за актуальності проблеми забезпечення очних клінік донорським матеріалом, проблема ксеногенної трансплантації рогівки не втратила свою теоретичну і практичну цінність [83, 102, 107, 136, 115].

Willey В.Е., Maguen Е і співавт. (1978), пересаджуючи кролику ліофілізовану чи свіжу рогівкову пластинку, взяту від свині і використовуючи чутливий метод виявлення імунізації (ELISA), прийшли до висновку, що на результат операції впливає не стільки походження трансплантата, скільки місце його пересадки в рогівку реципієнта. Сенсibiliзація кроликів мала місце при периферичній пересадці. Автори приходили до висновку, що ліофілізована рогівка не може викликати імунну відповідь у реципієнта, якщо навіть вона належить іншому виду. Використовуючи інший метод консервації, 90-95 % дегідратований мед, Cher L. і Jin-Tang X. у 1987 році повідомили про результати поширової ксеногенної пересадки. При пересадці консервованої в меді до 125 днів рогівки від кролика кролику, від курки кролику і від кішки кролику, автори виявили прозоре приживлення більшості трансплантатів. Дезінтеграція і зникнення кератоцитів трансплантата проходила протягом місяця, залишаючи колагеновий матрикс, який поступово заміщався колагеном реципієнта. При пересадці рогівки людини мавпам породи *Macacus Rhesus* автори получили два прозорих приживлення, термін спостереження 9 і 12 місяців.

З часів Нажотта (1900-1948 рр.) відомо два типа пересадженої тканини. Тканини першого типу складаються головним чином із епітеліальних клітин з високо розвинутим метаболізмом (наприклад, залозисті тканини); можлива тільки ауто трансплантація таких тканин. Клітини трансплантата до моменту пересадки повинні бути живими. Тканини другого типу складаються переважно з основної речовини, з дуже великою кількістю клітин і мають

простий метаболізм. Вони можуть бути з успіхом пересажені гомопластично і навіть гетеропластично. До цієї групи відносять сполучну тканину, кісткову тканину, хрящ, зв'язки [1].

Рогівка за її епітелієм і ендотелієм належить до першого типу тканин, а по стромі – до другого. Строма рогівки – це сполучна тканина, її можна зберігати тривалий час, навіть, якщо її клітини мертві. При пересадці таких тканин основна речовина трансплантата включається в тканину хазяїна, і клітини трансплантата більш чи менш швидко заміщаються клітинами хазяїна. Клітини трансплантата можуть бути мертві під час пересадки. Єдина умова успіху пересадки – структура тканини трансплантата повинна бути ідентичною структурі тканини хазяїна. Таким чином, очевидно, що строму рогівки можна зберігати тривалий час любим методом, при якому зберігається її гістологічна будова.

Для того щоб бути прозорим, трансплантат повинен зберігати свою правильну гістологічну організацію. Ендотелій абсолютно необхідний рогівці більшості видів тварин і особливо людини. Якщо ендотелій нежиттєздатний під час пересадки, трансплантат набухає і мутніє [153].

Існують різні методи консервації донорської рогівки, які мають свої позитивні сторони і недоліки. Ще у 1933 р. В.П. Філатов запропонував простий і надійний метод вологої камери – короткочасна консервація при температурі від +2 до +4° С. С.Н.Федоров і В.Г.Копаєва використовували не консервовану рогівку, протягом перших 12 годин після смерті.

Відомо три типи консервації рогівки для пошарової кератопластики: заморожування, ліофілілізація чи висушування заморожуванням, просте висушування.

Заморожування повинно бути глибоким і швидким при температурі нижче (-40°) С. Тканина повинна зберігатись при низькій температурі до її використання. Magitot (1911) провів перший дослід по консервації ока при температурі (-4)–(-6)° С. Однак, ці досліді не були успішними. Thomas,

Smeleser, Ozanics (1946) консервували рогівку при температурі (-185°) С. Basy, Ormsbu (1956) проводили експерименти по інтерламелярній пересадці рогівки, використовуючи заморожену рогівку, яка зберігалась протягом 7 місяців. Успішні результати таких пересадок автори пов'язують із зниженням антигенної активності замороженої рогівки.

Ліофілізацією називають метод заморожування висушуванням тканин. Метод ліофілізації більш зручний, так-як рогівка може зберігатись при кімнатній температурі [10, 86, 53, 54]. Ліофілізація дає хороші результати, але вона небезпечна. При ліофілізації рогівку заморожують шляхом поміщення її в рідкий кисень чи азот при температурі (-185°) С (швидкий метод) або в суміші сухого льоду із спиртом при температурі (-79°) С (більш повільний). Висушування проводиться у вакуумі протягом 12-36 год до 4-5 діб і більше. Перед застосуванням рогівку поміщають у фізіологічний розчин на 1-1,5 год.

Szwarc (1940) досліджував у ліофілізованій рогівці вітамін С, рибонуклеїнову і дезоксирибонуклеїнову кислоти, глікоген, гіалуронову і аденозинтрифосфорну кислоти і не виявляв різниці у вмісті цих інгредієнтів у ліофілізованій і неліофілізованій тканинах. Це ж відносилось до деяких ферментних систем. Кількість цитохромоксидази і дегідрогенази, за даними Morone (1971), однакові і в свіжій, і в ліофілізованій тканині. Ліофілізована рогівкова тканина знаходить використання при пошаровій кератопластиці. За даними Remku, трансплантати висушені по методу Raugaу(1960) рогівки при пошаровій пересадці не відрізняються від свіжої рогівкової тканини. У кінці 50-х початку 60-х років Raugaу запропонував метод консервації донорського матеріалу ґрунтований на ліофілізації силікогелем [69, 191]. Метод забезпечує добре приживлення рогівки, яка в короткі терміни заміщується строною рогівки реципієнта і дає прозоре приживлення в більшості випадків. Досліди Raugaу показують, що висушування над силікогелем впливає на зниження антигенних властивостей тканини, у зв'язку з цим для

кератопластичних цілей може бути використана не тільки гомогенна, але й гетерогенна тканина.

За даним деяких авторів [37], ліофілізація гальмує ріст патогенного золотистого стафілокока. Проте, метод ліофілізації залишає невирішеними такі питання, як стерильність і антигенність донорського матеріалу. Ніхто із авторів не використовував ліофілізацію з метою переходу на використання ксеногенного матеріалу в клінічній практиці. Роботи, присвячені використанню ксеногенної ліофілізованої рогівки, малочисельні і носять в основному експериментальний характер (Moore M.V. et al., 1987, Paugau et al., 1959).

Метод висушування формолом і другими хімікаліями не забезпечує повного зберігання гістологічної будови рогівки. Тому їх не слід застосовувати. Висушування тканини слід проводити дуже м'яко, без хімічних реакцій. Допускається лише фізична адсорбція [77].

Торкаючись механізму приживлення зневоднених трансплантатів Г.П.Попов (1964), ґрунтуючись на своїх гістологічних дослідженнях, відмічав, що в найближчі дні після кератопластики проходить розпад і розсмоктування клітинних елементів трансплантата з наступним заселенням строми клітинами рогівки реципієнта.

Слід відмітити, що ряд авторів пропонували й інші методи консервації: у фізіологічному розчині, розчині Рінгера-Локка, цільній гемолізованій крові, в сироватці крові, в лізоцимі, у водному розчині брильянтового зеленого, у розчині Рінгера з білком курячого яйця і лізоцимом, у бджолиному меді і ін. [75, 93, 137, 147]. Більшість рідких середовищ виявились непридатними для консервації ока, так як при зберіганні в них рогівка швидко набухає і втрачає свою прозорість.

У останні десятиліття успішно використовується метод тривалої кріоконсервації, який ґрунтується на глибокому охолодженні (-196°) С у рідкому азоті [11, 38, 95, 209]. Метод використовується в діяльності банків

органа зору. Хоча криоконсервація є задовільним методом заготівлі донорської рогівки, проте на кожному її етапі існує потенціальна можливість помилок.

Із створенням середовища Mc Carey-Kaufman [183] істотно змінилась проблема короткочасного зберігання донорської рогівки. Метод простий і надійний. Рогівка в цьому середовищі зберігається з значно меншим пошкодженням у порівнянні з замороженою рогівкою. Компонентами складу середовища McCarey-Kaufman є Т-199, декстран - 40, Herpes-буфер і гентаміцин. Середовище дозволяє зберегти донорську рогівку протягом 4 днів при температурі +4° С. Окрім середовища McCarey-Kaufman для створення банку рогівок в останні роки широко використовується склад K-Sol, який вміщує середовище Т-199, (ХС), Herpes-буфер і гентаміцин. Перше повідомлення про використання (ХС) для тривалого зберігання рогівки появилось ще 30 років тому в Японії. Дані методи хоч і дозволяють зберігати донорський матеріал тривало, розраховані на збереження життєдіяльності ендотелію рогівки, що складає певні труднощі в їх стерилізації [183, 184, 185].

Основою до відновлення робіт у напрямку ксенотрансплантації послужили деякі дані про те, що явища несумісності тканин, які проявляються при використанні гетерогенного матеріалу, можуть бути знижені шляхом використання нових методів консервації.

1.3. Гістоморфологічні і функціональні зміни рогівки при консервації

Властивість тканини рогівки до приживлення поза організмом, а також ті процеси, які проходять в ній, представляють великий інтерес з точки зору питання про долю рогівкового трансплантата і сутність змін, що спостерігаються в ньому. Розглядаючи ці зміни, слід мати на увазі,

збільшення клітин у стромі трансплантата і появу в ній активних клітинних елементів, властивих тканині, яка регенерує. На користь того, що в тканинах рогівкового шматка можуть проходити згадані вище процеси, говорить уже той факт, що життєдіяльність рогівки після видалення її з організму тривалий час зберігається як при консервації на холоді, так і при утриманні при більш високій температурі [16].

Існує визначена циклічність у змінах тинкторіальних властивостей, як епітелію, так і клітин строми рогівки, які розвиваються по мірі зберігання її в умовах зниженої температури. Протягом перших 3 діб консервації рогівка по своїй структурі і тинкторіальних властивостях не відрізняється від нормальної рогівки. З 4-го по 6-ий день консервації відмічається поліморфізм клітин епітелію і строми. Частина епітеліальних клітин помітно збільшується проти норми, поверхневі шари епітелію прокрашуються слабше базальних. Десцеметовий ендотелій зберігається тільки на окремих ділянках. На 8-у добу консервації епітелій рогівки зберігається, але клітини його зморщені, ядерні структури погано виявляється, строма набухає, рогівкові клітини пікнотично змінюються, ендотелій відсутній. На 10-у добу консервації клітини епітелію і строми збільшуються в розмірах, вони набувають округлої форми і погано фарбуються. Окрім цього, після 8-го дня консервації в стромі появляються клітини, які по своїй формі, величині і характеру забарвлення нагадують лімфоцити, плазмоцити, макрофаги і нейтрофільні поліморфноядерні лейкоцити [75, 219].

На основі даних морфологічного аналізу, можна припустити, що поряд з деструктивними процесами в консервованій рогівці здійснюються й активні процеси життєдіяльності, які виражаються в розмноженні клітин і в переміщенні частини їх із одних ділянок у інші [9, 188].

Гістохімічні дослідження ДНК у консервованій рогівці показали, що протягом перших 3-4 днів перебування ізольованої тканини в умовах зниженої температури кількість ДНК і її розміщення в ядрах істотно не

змінюється [40]. По мірі збільшення терміну консервації сітчаста структура стає більш рихлою. В ядрі з'являються пустоти, які нагадують вакуолі. У подальшому частина ядер ущільнюється і починає фарбуватись гомогенно в яскраво фіолетовий колір. Таким чином, зміни в клітинному ядрі, супроводжуються зменшенням основної її субстанції. Слід зазначити, що навіть, у препаратах рогівок, консервованих протягом 8-10 днів в умовах зниженої температури, виявляється значна кількість ядер, які за своїми структурними особливостями і тинкторіальними властивостям мало що відрізняються від нормальних [61, 62].

Клітинні елементи рогівок, як холонокровних, так і теплокровних тварин протягом перших 3-4 днів консервації в умовах зниженої температури по характеру розміщення РНК не представляють значних відмінностей від клітин свіжої тканини. Особливо це відноситься до базального і проміжного шару епітелію [40]. Помітні зміни в забарвленні рогівок виникають лише після більш тривалих термінів консервації – для теплокровних починаючи з 4-5-го, для холонокровних починаючи з 5-6 дня.

Гістохімічні спостереження свідчать про те, що в періоді 10-12-денного перебування тканини в умовах консервації, у клітинах починають переважати деструктивні процеси, які супроводжуються помітним порушенням обмінних функцій. Таким змінам піддаються не всі клітини одночасно. Навіть у тканинах, які тривало зберігаються, залишаються окремі вогнища мало змінених і життєздатних клітинних елементів [63, 97].

Клітинні органоїди консервованої рогівки – М і КГ відіграють значну роль у процесі життєдіяльності клітин.

В епітелії рогівки мітохондрії представлені у вигляді дрібних круглих утворень, рідше – у вигляді коротких паличок, більша частина яких локалізується навколо ядра і в надядерній зоні. Базальні клітини епітеліального шару рогівки містять велику кількість М у порівнянні з більш поверхнево розташованими клітинами. У клітинах власної речовини рогівки

М в цитоплазмі мають вигляд круглих утворень. При консервації в перші дні структура і топографія М мало змінюється. Після 3-4-денної консервації кількість М у клітинах рогівки помітно збільшується. Вони стають крупніші та в деяких випадках набувають форму круглих, інтенсивно забарвлених утворень. В епітеліальних клітинах рогівок 7-8-денної консервації кількість М зменшується. Вони стають меншими за розмірами і розміщуються навколо ядер. До 14-16 доби консервації М в клітинах рогівок зникають [56].

КГ в епітелії рогівки розміщується у верхньому полюсі ядра. Його фрагменти розташовуються в напрямку до екватора. Дослідження клітин рогівки, консервованій при 2-4° С вище нуля протягом 1-4 днів показали, що структура нижніх шарів епітеліальних клітин, особливо базального, мало відрізняється від тієї, яку зазвичай спостерігають в епітеліальних елементах свіжих рогівок. У клітинах поверхневих шарів епітелію структура КГ змінена [78].

Нервові структури рогівки і теплокровних, і холоднокровних тварин при зберіганні очей в умовах зниженої температури зберігають свою морфологічну структуру, не відрізняючись від елементів свіжої рогівки [13]. Тривалість зберігання цих властивостей не однакою в рогівці теплокровних і холоднокровних тварин. У загальному, елементи рогівки холоднокровних (жаб) виявляються після тривалих термінів консервації в порівнянні з рогівками очей теплокровних. По мірі подовження терміну зберігання ока зміни в нервових елементах проявляються в двох напрямках. З одного боку, відмічаються дегенеративні зміни в крупних нервових стовбурах, переважно з початку їх входження в рогівку; ці зміни виражаються у втраті ними можливості до фарбування, у гомогенізації усього пучка. З іншого боку, змінюється здібність до сприйняття фарби нервовими волокнами, які глибоко залягають. Нервові елементи рогівки зберігають свою структуру і можливість до забарвлення метиленовою синькою протягом визначеного періоду (8-10 днів).

Таким чином, дефект рогівки може епітелізуватись упродовж певного часу й після смерті тварин. Тканини рогівки у вказаних умовах не втрачають повністю своєї життєздатності і мають здатність пристосовувати деякі свої функціональні властивості до різких змін зовнішнього середовища [153].

Дослідження підтверджують, що в умовах консервації клітини рогівки зберігають свої життєві функції, зокрема, можливість до активного транспорту[104]. Травматизація ізольованої тканини викликає визначену реакцію зі сторони її клітинних елементів, особливо тих із них, які розташовані безпосередньо біля вогнища пошкодження. При цьому виникають зміни аналогічні до тих, які спостерігаються в живих клітинних структурах [213].

Одним із факторів, що визначає функціональну діяльність клітин, є їх стійкість в гіпотонічних середовищах [75]. Осмотичний тиск оточуючого середовища є найважливішим чинником зберігання клітинних елементів консервованої рогівки. Жива клітинна структура у відповідь на зміну концентрації солі у зовнішньому розчині реагує низкою морфологічних і функціональних перетворень, характер яких відрізняється строгою постійністю і в значній мірі зумовлений вихідним станом тканини. Ось чому при вивченні функціональних властивостей клітинних елементів тканини, методи визначення стійкості останньої до розчинів із низьким осмотичним тиском знаходять часте застосування.

Більшість авторів[56, 85] вважає, що пересаджена рогівка – мертва, але після регідрації відновлюється її фізична і гістологічна структура майже до норми. Проведені дослідження показали, що мертві трансплантати рогівки можуть приживатись і при цьому, як правило, після трансплантації залишаються прозорими [22]. Отримані результати довели, що життєздатність пересадженої тканини зовсім не обов'язкова, а необхідно лише зберегти її архітекtonіку. Автори розглядають трансплантат як сполучнотканинний скелет, який заселяється клітинами хазяїна. Слід

зазначити, що на користь приживлення трансплантата із збереженням його специфічних біологічних властивостей також наводиться ряд істотних доказів. Так, наприклад, Offret [189] вважає, що при сприятливому результаті кератопластики, коли трансплантат залишається прозорим, має місце виживання більшості компонентів трансплантата. В якості доказів автор приводить наступні положення: 1) коли трансплантат насичується клітинами реципієнта, він мутніє, відповідно, у випадках, коли трансплантат залишається прозорим, він не наводнюється клітинами реципієнта (із рогівки чи райдужки); 2) новоутворені капіляри в рогівці реципієнта часто доходять до краю трансплантата і в його тканину не проникають; 3) трансплантат зазвичай не приймає участі в рецидиві захворювання, яка викликала помутніння рогівки; 4) трансплантат “хворіє по-своєму, своїми захворюваннями”, що свідчить про його біологічну індивідуальність; 5) трансплантат сприятливо впливає на оточуючу мутну рогівку. Проте, автор визнає, що в рідких випадках прозорість трансплантату може зберігатись і в результаті заміни його елементів рогівкою реципієнта, як це іноді буває в дослідах пересадки в рогівку мертвого матеріалу.

В.П. Філатов спостерігав досить чітку гістологічну картину повного приживлення рогівкового трансплантату у людини. Дослідження показали наступне. Епітелій, як трансплантата, так і рогівки реципієнта, має нормальну будову. Боуменова оболонка в трансплантаті без істотних змін, а у оточуючому більмі видно лише поодинокі невеликі її залишки. Строма трансплантата також має нормальну будову, в ній видно лише слабку клітинну інфільтрацію. В оточуючій рогівці реципієнта строма значно змінена: рогівкові клітини лежать неправильно, має місце доволі велика клітинна інфільтрація і васкуляризація тканини. Десцеметова оболонка трансплантата лежить правильно. В рогівці реципієнта вона складчаста. Рогівковий ендотелій у препаратах не знайдений, очевидно це пов'язано із злушенням його під час гістологічної обробки ока [63, 90].

Встановлено, що тканина рогівки в умовах зберігання її при температурі 2-4° С вище нуля залишається життєздатною не менше 10-12 діб. У випадках зберігання рогівки в ізольованому від ока стані і за відсутності її зволоження, результат виходив кращий. А саме, з консервованої таким чином рогівки вдавалось частіше отримати ріст клітин у культурі тканини. Помічений ріст епітелію, клітин строми та ендотелію також у випадку, коли консервували розшаровану рогівку [82, 99].

Роегтом (A. de Roethth) було проведено порівняльне вивчення дихання і деяких ланок обмінних процесів в рогівці, яка зберігалась разом з оком в ізольованому вигляді при температурі 2° С (використовувались рогівки бика, кролика і кішки). Спостереження показали, що перші ознаки аутолітичних процесів наступають раніше в рогівці, яка зберігалась разом з оком, ніж при її зберіганні в ізольованому вигляді. У останньому випадку також відмічалось значне зменшення набухання рогівки, на відміну від консервації разом з оком. Дихання рогівки, яке визначалось по методу Варбурга, було нормальним до шостого дня консервації, як при ізоляції її, так і при зберіганні цілого ока. Важливі дані свідчать про можливість активних клітинних реакцій в рогівці, які зберігаються на холоді та виявляються за допомогою гістоморфологічних досліджень. Можна припустити вірогідність міграції клітин строми рогівки в умовах зберігання ізольованих очей при температурі 2-4° С вище нуля.

Рогівка теплокровних тварин і жаб при консервації очей в умовах 1-5°С вище нуля залишається життєздатною не менше 12-15 діб. При такій низькій температурі в ній спостерігається міграція клітин сполучної тканини, регенерація епітелію при його пошкодженні під час консервації, а також ділення клітин шляхом мітозу [92].

По-перше, міграцію клітин доводить накопичення їх у периферичній частині рогівки під час консервації, що найбільш сильно виражено з 7-8-ої доби. По-друге, міграцію клітин підтверджує утворення густих клітинних

інфільтратів в рогівках, які зберігаються на холоді, після зараження її стафілококом і після термічного опіку. У консервованій рогівці знаходять клітинні елементи, які мають характер видозмінених рогівкових клітин, лімфоцитів, гістіоцитів. Поліморфно ядерні лейкоцити зустрічаються дуже рідко і тільки поблизу лімбальних кровоносних судин.

Згідно досліджень Н.В. Савушкіна (1952), рогівки, консервовані при температурі (-5°) С, потовщенні і мутні. Епітелій у них на значному протязі відсутній. На деяких ділянках можна спостерігати накопичення епітелію і відшарування його від нижче лежачих шарів, неправильне розміщення клітин з грубозернистою протоплазмою. У базальних рядах зустрічались окремі набухаючі клітини з центральним розміщенням ядра. В окремих випадках клітини базального ряду підлягали розпаду, набували вигляд набухаючих глибоких мас. Строма рогівки зазвичай зафарбовувалась нерівномірно. Рогівкові пластини були розміщені неправильно [78]. Відмічалось неправильне розміщення ядер клітин рогівки, які мали неправильну форму. Відмічалось потовщення і нерівномірне зафарбування десцеметової оболонки. Ендотелій відсутній на всьому протязі зрізів. Рогівки, які консервовались при температурі (-10°) С, були у кращому стані. Рогівки консервовані при температурі (-20°) С протягом двох тижнів, зберігались добре. Неоднорідність зафарбовування епітелію була виражена дуже слабо. В епітелії цих рогівок спостерігалось набухання клітин і ядер із збереженням хроматинової сітки. В рогівках деяких очей спостерігалась наявність витягнутих епітеліальних клітин з грубозернистою протоплазмою і гіперхромними ядрами, а також крупних порожнин на місці клітин, які зазнали дії плазмолізу і каріолізу. Строма рогівок у спостереженнях цієї групи зберігалась краще епітелію. Рогівкові пластини були правильно розміщені, мали чіткі контури. Велика кількість ядер рогівкових клітин була звичайної форми і забарвлення. Десцеметова оболонка мала чіткі контури. Покриваючий її ендотелій, майже не відрізнявся від ендотеліальних клітин

контрольних препаратів. Рогівки кроликів зберігались гірше рогівок людини [78].

Установлено, що по мірі збільшення терміну консервації від 4 до 14 тижнів, структурні зміни рогівки прогресивно наростали і були яскраво вираженні в рогівках після 14 тижнів зберігання [56,15].

В рогівках, консервованих при температурі -80°C , виявлені зміни в епітелії і стромі. В епітелії спостерігались деструктивні зміни, які характеризувались їх вакуолізацією і зернистістю протоплазми. У стромі – зміна забарвлення і деструктивні зміни були вогнищевого характеру. Зміна забарвлення менш виражена в рогівках при коротких термінах консервування [207, 222]. В результаті нейрогістологічних досліджень рогівки було встановлено, що в нервовій тканині консервованих трупних рогівок настають дистрофічні зміни, яскравіше вираженні в міалінових волокнах ніж у неміалінових.

Оптимальним є варіант, коли вся рогівка життєздатна і функціонує як одне ціле, у протилежному випадку, на думку Duke-Elder, Leigh, трансплантат набухає, мутніє і васкуляризується. Життєздатність тканини визначають різними методами: 1) морфологічно; 2) культури тканини; 3) можливість рогівкових клітин синтезувати РНК і ферменти; 4) визначення життєздатності по зафарбовуванню нейтральним червоним; 5) гістохімічне вивчення активності ферментів; 6) оцінка тканинного дихання (манометрично і поліграфічно; за допомогою цих методів визначається рівень енергетичного обміну у всіх шарах рогівки); 7) біомікроскопія рогівкового трансплантата.

Прозорість – це необхідна умова і один із найбільш широко застосовуваних методів оцінки успішності консервації, придатності рогівки для кератопластичних цілей і ефективності проведення трансплантації [145, 153]. Згідно даних Colombre, Potts, прозорість рогівки зменшується зі

збільшенням її товщини. Товщину рогівки можна визначити за допомогою пахометра, мікрометра, вимірюванням ваги і іншими методами [166].

На думку Pakarinen, при оцінці життєздатності ендотелію слід враховувати три основні критерії, такі як забарвлення ядра клітин, забарвлення цитоплазми, цілісність ендотелію при фарбуванні трипаном синім.

Вище перераховані методи не є ідеальними, враховуючи це, можна зробити висновок, що жоден із існуючих у теперішній час методів не може бути єдиним критерієм оцінки життєздатності рогівки.

Проведений аналіз наукової літератури показує, що до цього часу існує необхідність поглибленого вивчення гістофізіології рогівки в нормі. Встановлення особливостей морфології і функції структурних компонентів рогівки свині необхідно для порівняльного аналізу і визначення ступеня її збереженості при різних методах консервування.

Аналіз літератури також свідчить про необхідність розробки нових технологій консервування рогівок з якісним забезпеченням морфо-функціональних властивостей її структурних компонентів.

РОЗДІЛ 2

МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

2.1. Постановка досліду і об'єкт досліджень

Дисертаційна робота виконана в рамках наукової програми кафедри гістології, цитології та ембріології і загальної хірургії з курсом комбустіології ДВНЗ “Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського на тему “Зміни в ксенодермотрансплантах при впливі на них фізичних чинників та ефективність їх використання у хворих з опіковою травмою ” (планова НДР, номер державної реєстрації 0105U004112) та кафедри оториноларингології, офтальмології та нейрохірургії “Діагностика та лікування патологічних процесів голови, шиї та хребта ” (планова НДР, номер державної реєстрації 0107U004459). Автор є співвиконавцем розділу науково-дослідної роботи.

Об'єкт дослідження – 78 свинячих рогівок. Технологія отримання донорського матеріалу була стандартною. Забір рогівок проводився в цеху забою тварин [8], 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). Комісією з біоетики ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я Горбачевського» (протокол №1 від 18.01.2010р.) порушень морально-етичних принципів при виконанні дисертаційної роботи не виявлено.

У залежності від методики консервації, ксенорогівки були розділені на п'ять груп: 1-а – інтактні рогівки (n=16), 2-а – кріоконсервовані рогівки (n=15), 3-я – кріоконсервовані ксенорогівки з кріопротектором (n=16), 4-а –

ліофілізовані роги́вки (n=15), 5-а – ліофілізовані роги́вки, які попередньо кріоконсервувались з використанням кріопротектора (n=16).

Кріоконсервовані роги́вки (2-а група) отримували шляхом погруження їх у рідкий азот при температурі (-198°) С [11]. Для кріопротекції (3-тя група) роги́вки в стерильних умовах поміщали в поліетиленові пакети і заливали консервантом, що включав 100 мл дистильованої підігрітої до 40° С води, 11,5 мл лактози, 5 мл гліцерину та жовток із курячого яйця 20 мл. У консерванті розправляли роги́вку, видаляли повітря з пакетів і їх герметизували. Для екви́лібрації матеріалу пакети поміщали в холодильник на 3 години при температурі (+4)-(+6)° С. Після цього їх переносили в пару рідкого азоту на 10 хвилин при t (-120°) С з наступним переміщенням для зберігання в чан з рідким азотом [12]. Для отримання ліофілізованої ксенороги́вки (4-а група), перед проведенням етапу ліофільної сушки, субліматори і розкладальні етажерки апарату обробляли 96° етиловим спиртом, а лотки і фіксувальні сітки стерилізували в автоклаві. Попередньо кріоконсервовані ксенороги́вки розкладали на дно лотка, фіксуючи їх сіткою, яка виготовлена із нержавіючої сталі. Після цього вільну етажерку занурювали в субліматор, підключали до електромережі холодильну установку і доводили температуру в ній до рівня (-30)-(-35)° С включно. Потім завантажували лотки етажерками з розміщеними на них ксенороги́вками. З метою дотримання умов технологічного процесу, на кожен полицю етажерки встановлювали здавачі контролю ліофілізації. Субліматори закривали при працюючій холодильній установці. Вмикали вакуумну помпу і знижували температуру до (-45°) С при вакуумі з тиском у 4 Па. У наведеному режимі установка працювала 3 години, після цього вмикали систему підігріву етажерки і доводили температуру до (+20°) С. Після 4 годин роботи температуру в субліматорі доводили до (+45°) С. Весь процес ліофілізації здійснювали під апаратним наглядом з реєстрацією показників у протоколі сушки тканин. Кріоліофілізовані роги́вки у вигляді висушеного

клаптя вміщували у два поліетиленові пакети і герметизували. Ліофілізовані рогівки, які попередньо кріоконсервувались з використанням кріопротектора – гліцерин-жовткової суміші (ГЖС), згідно вище описаної методики, склали 5-у групу дослідження.

2.2 Методи дослідження та їх обґрунтування

Для гістологічного дослідження матеріал фіксували в 10 % нейтральному формаліні з наступною заливкою у парафінові блоки. Отримані на санному мікротомі зрізи, товщиною 5-6 мкм, забарвлювали гематоксиліном і еозином [52]. Мікропрепарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа ЕНАМЕД та фотодокументували за допомогою відеокамери Vision CCD Camera. Цей метод дозволив вивчити структуру компонентів рогівки в нормі, а також характер морфологічних змін при різних методах консервування.

Для електронно-мікроскопічних досліджень шматок ксенорогівки фіксували попередньо в 2,5 % розчині глутаральдегіду з активною реакцією середовища рН 7,2-7,4, приготовленому на фосфатному буфері Міллоніга . Фіксований матеріал через 50-60 хвилин переносили в буферний розчин і промивали протягом 20-30 хвилин. Постфіксацію шматків ксенорогівки здійснювали 1 % розчином чотириокису осмію на буфері Міллоніга протягом 60 хвилин, після чого проводили їх дегідратацію в спиртах і ацетоні та заливали в суміш епоксидних смол згідно загальноприйнятої методики. Для вибору місця дослідження та орієнтації матеріалу робили напівтонкі зрізи, які забарвлювали метиленовим синім [2].

Ультратонкі зрізи ксенотрансплантатів, виготовлені на ультрамікротомі УМПТ-7, забарвлювали 1% водним розчином уранілу ацетату, контрастували цитратом свинцю, згідно методу Рейнольдса та вивчали в електронному мікроскопі EM-125K.

Істотне місце серед морфологічних досліджень посідають морфометричні та кількісні методи, які дають можливість об'єктивно оцінити морфофункціональний стан гістологічних структур в нормі, а також встановити закономірності морфологічних змін у досліді.

Морфометричні та кількісні дослідження проводили [2, 3], використовуючи систему візуального аналізу гістологічних препаратів, програму Відео Тест 5.0 КААРА Image Base та Microsoft Exel на персональному комп'ютері. Визначали товщину рогівки, переднього епітелію, власної речовини, розміри базальних клітин і площу їх ядер. Для визначення ступеня диференціації епітеліоцитів, а також з метою встановлення характеру і глибини морфофункціональних змін вираховували ядерно-цитоплазматичне співвідношення.

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

Визначення вмісту глікопротеїнів: розчин фруктози (при кип'ятінні глюкоза перетворюється на фруктозу) у присутності амонію молібдату та концентрованої кислоти дає синє забарвлення, інтенсивність якого залежить від кількості глікопротеїнів. Хід роботи: у пробірку вносять по 0,2 мл 10 % гомогенату рогівки, 0,4 мл H_2O , 1 мл 20 % трихлороцтової кислоти. Суміш ретельно перемішують, закривають центрифужною пробіркою, кип'ятять на водяній бані 20 хв, після чого охолоджують і центрифугують. По 1 мл центрифугату перемішують з 3,5 мл робочої суміші й кип'ятять на водяній бані 20 хв. Після охолодження проби колориметрують на ФЕКу в кюветі з товщиною шару 10 мм при червоному світлофільтрі.

Контролем є проба, оброблена так само, як і дослідна, але замість гомогенату в ній беруть 0,2 мл H_2O . Показниками служать значення екстинкції (умовні одиниці).

Визначення вмісту сіалових кислот: при додаванні трихлороцтової кислоти до гомогенату рогівки та нагріванні відбувається м'який гідроліз глікопротеїнів з відщепленням N-ацетилнейрамінової кислоти, яка потім вступає в реакцію з розчином резорцину в хлороводневій кислоті з утворенням хромогену синього кольору (табл. 2.1).

Розрахунок здійснюють за калібрувальним графіком.

Таблиця 2.1

Визначення вмісту сіалових кислот по реакції з резорцином

Компоненти	Дослідна проба, мл	Контрольна проба, мл
Трихлороцтова кислота, 5% розчин	1,9	
Гомогенат, 10 %	0,1	
Пробу перемішують, кип'ятять на водяній бані 7 хв, охолоджують під проточною водою до кімнатної температури, профільтровують		
Фільтрат	0,5	
Дистильована вода	0,5	1,0
Резорциновий реактив	1,0	1,0
Закривши пробірки, вміщують їх у водяну баню на 15 хв, охолоджують під проточною водою		
Розчин для екстракції	3,0	3,0

Визначення вмісту хондроїтинсульфатів: хондроїтинсульфати викликають помутніння сироватки крові в присутності риванолу, яке пропорційне їх концентрації. Хід роботи: у пробірку вносять 5 мл буфера (№ 3) та 0,1 мл 10 % гомогенату рогівки. Потім додають 0,1 мл риванолу. Вимірювання проводять через 5 хв на ФЕКу в кюветі з товщиною робочого шару 10 мм при зеленому світлофільтрі, порівнюючи з контрольною пробою.

Контрольну пробу обробляють так само, як і дослідну, але замість сироватки додають 0,1 мл H₂O.

Розрахунок здійснюють за формулою:

$$X = \frac{E \times 10}{C}, \quad (2.1)$$

де С – концентрація хондроїтинсульфатів за стандартом.

Визначення вмісту глікозаміногліканів: цетилтриметиламоній бромистий з глікозаміногліканами утворює у кислому середовищі осад білого кольору. Хід визначення: до 0,5 мл 10 % гомогенату додають 1 мл цетилтриметиламонію і залишають на 30 хв. Результат оцінюють за калібрувальним графіком і виражають у мг на 1 кг маси рогівки.

Виходячи з розуміння важливості, для вирішення завдань вибору оптимальної за біофізіологічними параметрами біологічного імплантату, на основі використання ксеногенної рогівки, адекватних методів його дослідження, цілком логічним зроблено акцент на методах світлооптичного дослідження. Беручи до уваги еволюційну детермінованість особливостей структурної будови рогівки, як тканини, підпорядкованої, окрім бар'єрної, виконанню специфічної функції – світлопропусканню, питання дослідження її прозорості для потоку світлооптичного випромінювання посідає важливе місце. Із зазначених позицій, не викликає сумніву, що саме світлооптичні властивості рогівки є визначальними, як для вирішення суто клінічних завдань діагностичного і лікувально-профілактичного спрямування, так і низки завдань біотехнологічного процесу, пов'язаних перш за все з розробленням і впровадженням перспективних методів імплантаційного хірургічного лікування в сучасній офтальмології.

З огляду на це, світлооптичну прозорість тканини рогівки визначали фотометричним методом з використанням фотометричної насадки ФМЭЛ-1 до мікроскопу ЛЮМАМ 8 ЗМ. Принцип методики полягає у реєстрації фотоструму, індукованого потоком світла, що пройшов через рогівку. Прозорість останньої виражають у відносних фотометричних одиницях. До

переваг застосованого в роботі методу слід віднести можливість визначення і аналізу динаміки змін прозорості рогівки на етапах її технологічного виготовлення (кріоконсервування, ліофілізація, повторне висихання після зволоження кріоліофілізованого продукту тощо) у порівнянні з нормою.

Виходячи з сучасних уявлень про фізичні і біофізичні властивості біологічних макромолекул взагалі, а клітинних макромолекулярних структур – зокрема, основу яких складають ліпіди і нуклеїнові кислоти – сполуки з рідкокристалічними властивостями, зростає інтерес до методу цитолоюмінесцентного аналізу на принципових засадах поляризованої флуоресценції. Відповідно до фізичної сутності цього методу, за якою ліпідам мембран, нуклеїновим кислотам ядер клітин та іншим макромолекулярним структурам живих клітин, як оптично активним сполукам із рідкокристалічними властивостями притаманна здатність індукувати еліптичну поляризацію світла, що проявляється залежним від довжини хвилі явищем кругового дихроїзму, поляризаційна флуоресценція забезпечує низку не тільки методичних, але й методологічних переваг у клініко-лабораторній діагностичній практиці [22].

Принцип роботи полягає в наступному. На чисте знежирене предметне скло вміщували тканинний субстрат рогівки і досліджували у полі зору мікроскопу. Світловий потік через оптичний зонд діаметром 3 мм спрямовували на фотоелектронний перетворювач ФЭУ 39А, встановлений у фотометричній насадці ФМЭЛ 1, і реєстрували світлооптичну прозорість за допомогою цифрового мікроамперметра. При спрямуванні поляризованого світла, що пройшло через рогівки, на фотоелектронний перетворювач ФЭУ 39А у насадці ФМЭЛ-1 з використанням послідовного ряду інтерференційних світлофільтрів реєстрували спектральний склад випромінювання тканини на принципових засадах поляризованої флуоресценції. Зображення рогівки у процесі її флуоресценції фотодокументували, а кількісну інформацію про інтенсивність світіння і

спектральний склад випромінювання їх у поляризованому світлі опрацьовували програмними засобами на персональному комп'ютері. Картину поляризованої флуоресценції вірців тканини та спектральний склад випромінювання їх у поляризованому світлі обробляли програмними засобами на персональному комп'ютері за технологією „Програмне забезпечення обробки зображень SEO Image Lab (SEO) ImageLab BIO, SEO Image Lab Met; SEO Image Lab EM)” наданою розробником – виробничо-комерційною фірмою “Sumy Electron Optics” (м. Суми, Україна).

Метод дослідження поляризаційної флуоресценції відрізняється від світлооптичної мікроскопії можливістю дослідження нативної біотканини із живими і переживаючими клітинами. Від інших методів люмінесцентного аналізу поляризаційна флуоресценція відрізняється усуненням необхідності фарбування живого субстрату зазвичай токсичними люмінофорами. До того ж належність біомакромолекул до анізотропних сполук, властивістю яких є не однаковий характер змін під впливом фізичних чинників у різних напрямках їх просторової структури, що, власне відносить їх до сполук із рідкокристалічними властивостями, розкриває значні методичні і методологічні можливості як вивчення основних властивостей біосубстрату, так і розроблення принципово нових способів перспективних біотехнологій.

Статистична обробка цифрових даних, отриманих при морфометричних і біохімічних дослідженнях, проводилась за допомогою таблиць Excel з використанням програми Statistica[®] Version 6. (StatSoft, Inc., США). Для порівняння середніх значень між групами використовували неспарений t-тест з оцінкою за критерієм Стюдента в разі нормального розподілу, ідентифікованого F-критерієм Фішера та модифікованим тестом Levene або за непараметричним ранговим критерієм Мана-Уїтні [3].

РОЗДІЛ 3

РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

3.1. Морфологічна, морфометрична та ультраструктурна характеристика ксенорогівки у нормі

Проведенні гістологічні дослідження свинячої рогівки показали, що вона представлена багат шаровою структурою, з чітко означеним епітеліальним і стромальним компонентами. Мікроскопічно в інтактній рогівці спостерігаються п'ять шарів: передній епітелій, передня погранична пластинка (мембрана Боумена), власна речовина, задня погранична пластинка (мембрана Десцемета), задній епітелій (ендотелій) рогівки (рис. 3.1).

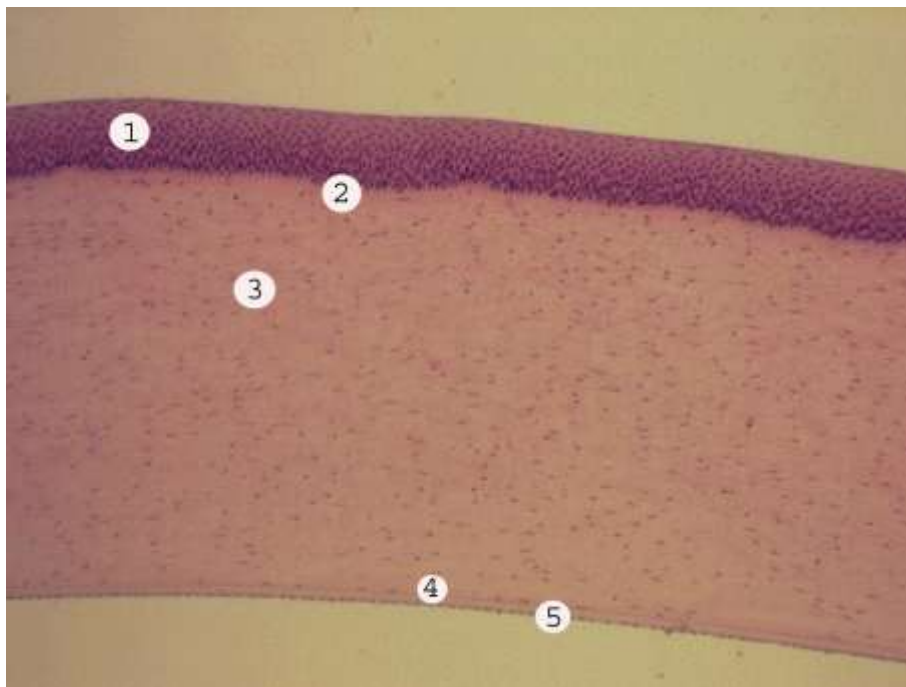


Рис. 3.1. Мікроскопічна будова рогівки свині в нормі: передній епітелій (1), передня погранична пластинка (2), власна речовина рогівки (3), задня погранична пластинка (4), задній епітелій (ендотелій) рогівки (5). Зabarвлення гематоксиліном-еозином. $\times 100$

Проведені морфометричні дослідження встановили, що середнє значення товщини рогівки свині в нормі дорівнює (934,9±8,2) мкм (табл. 3.1).

Таблиця 3.1

**Морфометричні показники структурних компонентів
ксенорогівки (M±m)**

Структурні компоненти ксенорогівки	Значення
Загальна товщина рогівки, мкм	934,9±8,2
Товщина переднього епітелію, мкм	52,2±1,8
Площа базальних клітин, мкм ²	119,4±2,0
Площа ядер базальних клітин, мкм ²	22,4±1,4
Товщина передньої пограничної пластинки, мкм	0,9±0,5
Товщина власної речовини, мкм	867,4±8,5
Товщина задньої пограничної пластинки, мкм	9,7±0,2
Товщина заднього епітелію, мкм	4,7±0,2

Передній епітелій рогівки є зовнішнім її шаром і за будовою представлений багатошаровим плоским незроговілим епітелієм. Епітеліоцити в ньому розміщені кількома шарами і щільним пластом лежать на базальній мембрані. Остання відмежовує поверхневий епітелій від передньої пограничної пластинки і власної речовини рогівки.

Морфометричні дослідження встановили, що середнє значення товщини переднього епітелію рогівки свині в нормі становить (52,2±1,8) мкм (табл. 3.1).

Мікроскопічні дослідження переднього епітелію ксенорогівки показали наявність трьох шарів клітин: поверхневого, середнього (проміжного) і

базального. Епітеліоцити поверхневого шару мають плоску, витягнуту форму і на повздовжньому перерізі орієнтовані паралельно поверхні рогівки. Ядра таких клітин еліпсоподібної форми орієнтовані вздовж їх довгої вісі. Каріолема чітко контурується, а каріоплазма фарбується базофільно. Цитоплазма займає невелику площу, нешироким обвідком оточує ядро і фарбується оксифільно.

Середній (перехідний) шар переднього епітелію представлений 3–4 шарами клітин остистої форми. Чітко контуровані базофільні, округлої форми ядра цих клітин розташовані переважно центрально. Оксифільна цитоплазма епітеліоцитів має більшу ніж у поверхневих клітин площу. Короткі цитоплазматичні відростки у вигляді шипів проникають між плазмолемами сусідніх клітин. Клітинні оболонки щільно прилягають одна до одної, міжклітинна речовина відсутня.

Базальний шар має епітеліоцити циліндричної форми, розташовані щільно і одним шаром на базальній мембрані. Їх базофільні округлої форми ядра часто зміщені в апікальну частину клітин.

Морфометричні дослідження встановили, що площа базальних клітин дорівнює $(119,4 \pm 2,0)$ мкм². Їх ядра мають діаметр $(22,4 \pm 1,4)$ мкм². Ядерно-цитоплазматичне співвідношення при цьому становить 0,232 (табл. 3.1).

У базальному шарі визначається мітотичний поділ клітин. За цією ознакою цей шар клітин називають ще гермітативним. Наявні також клітини неепітеліального походження. Це так звані клітини Ларгенганса і поодинокі лімфоцити. Епітеліоцити щільно прилягають до базальної мембрани на всьому протязі (рис. 3.2).

На світлооптичному рівні виявлено, що базальна мембрана при забарвленні гематоксиліном і еозином має вигляд рожевої хвилястої лінії. Чітко виражена передня погранична пластика, яка також відмежовує передній епітеліальний шар від основної речовини.

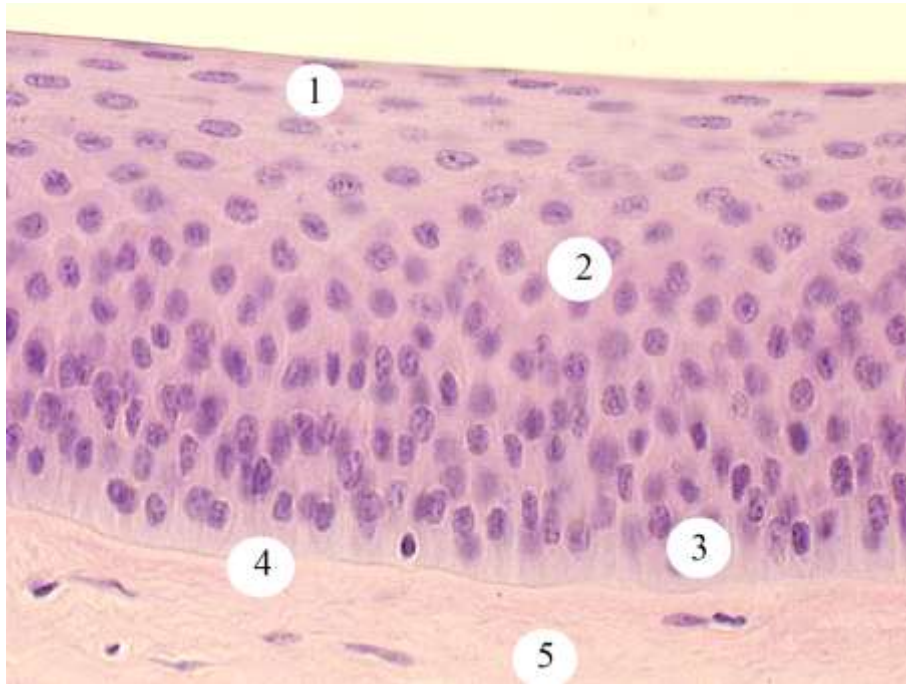


Рис. 3.2. Мікроскопічна будова переднього епітелію ксенорогівки в нормі. Шар поверхневих клітин (1), середній шар (2), базальні клітини (3), передня погранична пластинка (4), власна речовина (5). Забарвлення гематоксиліном-еозином. $\times 400$

Власна речовина рогівки представлена щільною оформленою сполучною тканиною і утворена трьома компонентами: колагеновими пластинами, клітинами і основною речовиною. Особливу увагу заслуговує строга орієнтація колагенових пластин, що, очевидно, впливає на забезпечення прозорості ксенорогівки. Стромальні пластини погружені в аморфну основну речовину, яка представлена різними типами ПГ. Поміж стромальних пластин виявленні клітинні елементи строми рогівки – кератоцити, які за структурою подібні на фіброцити. Кератоцити власної речовини рогівки мають подовгасту форму, довгі вузькі відростки, які орієнтовані паралельно колагеновим пластинам. У клітинах добре виражені невеликі витягнутої форми базофільні ядра, а цитоплазма займає незначну площу і вузьким обвідком оточує останні (рис. 3.3).

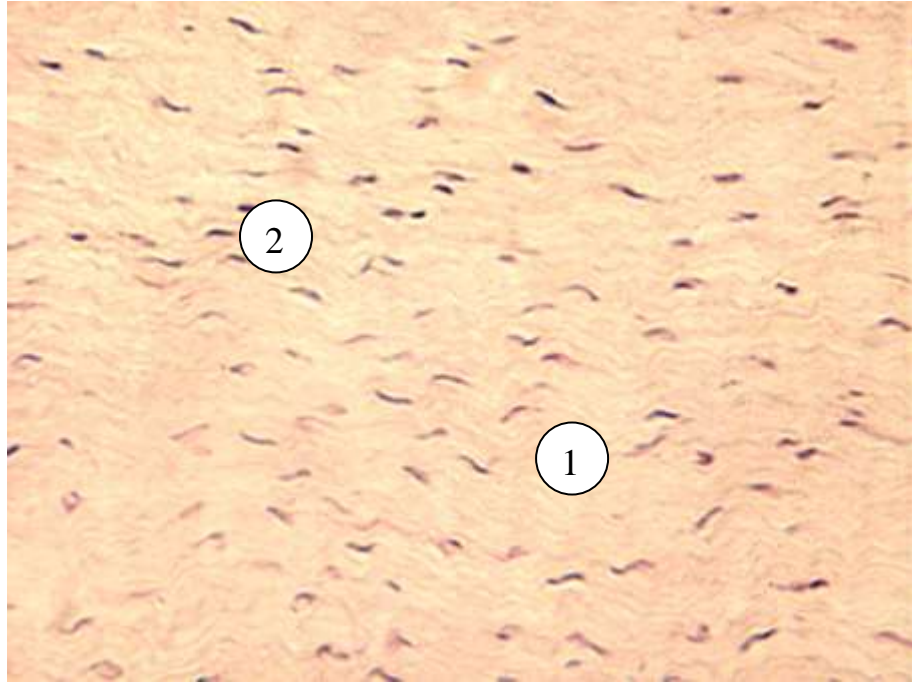


Рис. 3.3. Мікроскопічна будова власної речовини ксенорогівки в нормі. Сполучно-тканині пластинки (1), фіброцити (2). Зabarвлення гематоксиліном-еозином. $\times 400$

Морфометричні дослідження встановили, що товщина власної речовини становить $(867,4 \pm 8,5)$ мкм.

Задня погранична пластинка (мембрана Десцемета) на мікроскопічному рівні виглядає безструктурною смужкою, яка покриває задню поверхню власної речовини ксенорогівки. У гістогенетичному і структурному поняттях, вона представляє собою базальну мембрану заднього епітелію рогівки – ендотелію. При фарбуванні гематоксиліном і еозином ця пластинка забарвлюється в рожевий колір. Передній шар Десцетової оболонки, який контактує із стромою, має фібрилярний вигляд, а задній – гранулярний.

Гістологічно встановлено, що задній епітелій ксенорогівки представлений одношаровим плоским епітелієм і утворюється правильно розміщеними в один шар плоскими епітеліоцитами. Клітини щільно

прилягають одна до одної і щільно прилягають до задньої пограничної пластинки на всьому протязі. Чітко виражені еліпсоподібної форми базофільні ядра, а рожевого кольору, гомогенна цитоплазма має помірний об'єм.

Морфометрично встановлено, що товщина заднього епітелію становить $(4,67 \pm 0,18)$ мкм (табл. 3.1).

Субмікроскопічні дослідження роگیвки свиней в нормі показали, що її передній епітелій представлений шаром клітин, які залежно від розташування відносно передньої пограничної мембрани мають різну форму і будову.

Епітеліоцити поверхневого шару мають плоску, витягнуту форму, а їх ядра еліпсоподібну і розташовані в центральній частині цитоплазми та повздовжній вісі клітин.

Епітеліоцити між собою розташовані щільно, практично відсутня міжклітинна речовина (вузькі міжклітинні проміжки). Проте, клітини об'єднанні між собою щільними десмосомальними контактами, яких досить багато. Можна описати ці контакти в нормі.

У апікальній поверхні епітеліоцитів наявні щільні замикальні контакти, які утворені за рахунок зближення плазматичних мембран сусідніх клітин. Такі щільні замикальні контакти забезпечують повне відмежування від зовнішнього середовища.

Десмосомальні контакти забезпечують максимальну міцність міжклітинних зв'язків і сформовані пластинками кріплення, які утворенні філаментами і кортикальним шаром цитоплазми епітеліоцитів. Міжклітинний простір у десмосомі має високу електронну щільність, тому десмосома на невеликому збільшенні електронного мікроскопа виглядає інтенсивно чорною структурою.

Апікальна поверхня епітеліоцитів поверхневого шару має мікроворсинки, які утворенні невисоким вип'ячуванням плазмолемі. Наявні

також неглибокі інвагінації клітинної оболонки. У цитоплазмі цього типу клітин спостерігається висока щільність органел, та наявні включення. Органели загального призначення представлені короткими каналцями ГЕС, невеликими за площею диктіосомами пластинчастого КГ, які включають непротяжні цистерни, окремі вакуолі і пухирці. Невеликі округло-овальної форми М розташовані поодинокі або перинуклеарно групами, мають помірної електронної щільності матрикс і нечисельні кристи. Гіалоплазма клітин насичена вільними рибосомами і полісомами, тонкими сітчастої форми тонофіламентами. Останні є характерними для цитоплазми структурами, що складають цитоскелет клітин і приймають участь в утворенні десмосом.

Ядра поверхневих епітеліоцитів залежно від площі перерізу мають округло-овальну або подовгасту еліпсоподібну форму. Каріолема на більшості ділянок рівна, але утворює поодинокі неглибокі інвагінації. Перинуклеарний простір між ядерними мембранами – неширокий, рівномірний. Каріоплазма помірно осміофільна, відносно рівномірно забарвлена (рис. 3.4).

Проміжний шар клітин переднього епітелію рогівки складають епітеліоцити неправильної, остистої форми. Плазмолемі їх також утворюють десмосомальні контакти. Світлі міжклітинні простори помірно розширенні і обмеженні осміофільними десмосомами. Ядра в цитоплазмі епітеліоцитів розташовані переважно в центрі, мають округлу овальну форму, чіткі контури каріолеми і вузькі перинуклеарні простори. Для ядер цього шару клітин характерним є наявність ядерця, одного великого, або двох, трьох менших розмірів. У каріоплазмі багато рибосомальних гранул, вона однорідна, помірно осміофільна, проте, біля ядерця і каріолеми можливі ділянки скупчення рибосомальних гранул (рис. 3.5).

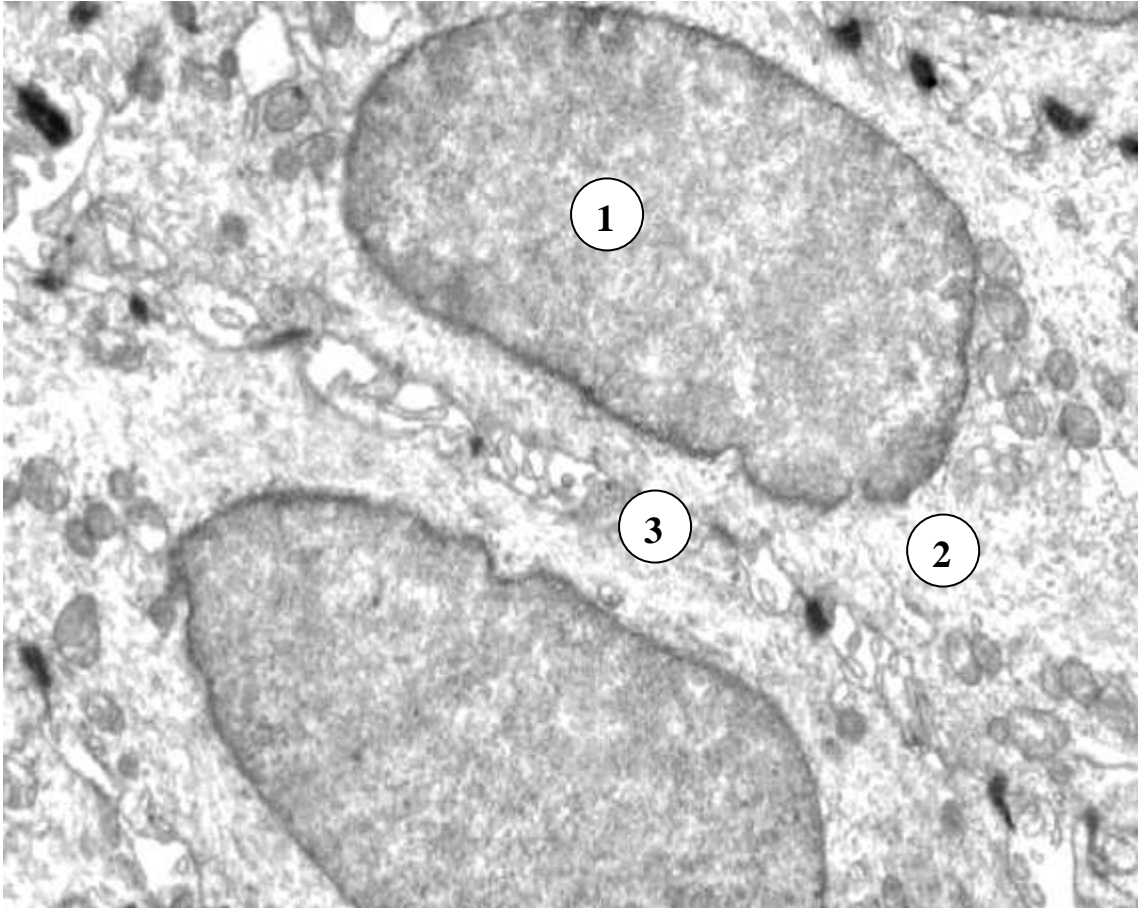


Рис. 3.4. Субмікроскопічна організація епітеліоцитів поверхневого шару переднього епітелію рогівки в нормі. Еліпсоподібне ядро (1), цитоплазма (2), десмосомальний контакт (3). $\times 10000$

Цитоплазма, як і клітини поверхневого шару, має багато рибосом і полісом, тонофіламентів. Нечислені М мають округлу форму, розсіяні по цитоплазмі, частіше розташовані біля ядра.

Базальні епітеліоцити рогівки – це розташовані в один шар клітини, які прикріпленні плазмолемою до базальної мембрани напівдесмосомами. Ці структури виділяються невеликою осміювальною частиною та мікрофіламентами з боку цитоплазми епітеліоцитів. Округло-овальні ядра розташовані перинуклеарно базальної мембрани. Їх каріолема має чіткі рівні контури, поодинокі неглибокі інвагінації. У помірно електронно-щільній каріоплазмі, що складається з еухроматину і рибосомальних гранул наявне осміювальне ядерце. Перинуклеарні простори вузькі і рівномірні, а ядерна оболонка має багато ядерних пор

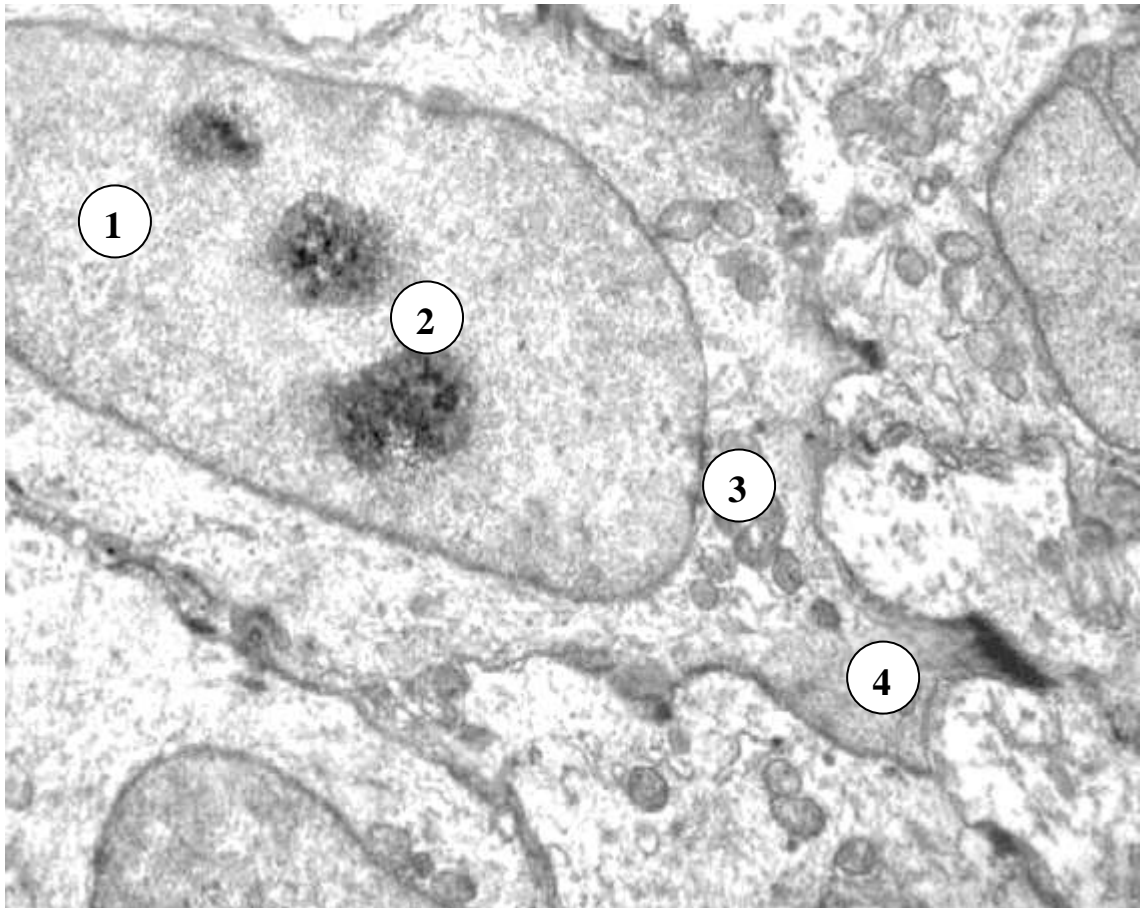


Рис. 3.5. Ультраструктура остистих епітеліоцитів проміжного шару переднього епітелію інтактної рогівки. Округло-овальне ядро (1), ядерця (2), цитоплазма (3), короткий відросток (4). $\times 9000$

Цитоплазма базальних епітеліоцитів включає багато органел. Вони невеликі, округлої форми, їх більше ніж у клітинах поверхневих шарів. Вони можуть розташовуватись групами, стрічками, перинуклеарно. У помірно осміофільному мітохондріальному матриксі спостерігаються чіткі кристи, але їх небагато. У цитоплазмі багато рибосом, тонофібрил. Канальці ГЕС короткі, мають розширені ділянки. Диктіосоми КГ невеликі за розмірами, розташовані переважно перинуклеарно. Зустрічаються поодинокі первинні лізосоми та грудки глікогену.

Іноді, серед базальних епітеліоцитів виявляються клітини в стані мітозу з характерними ознаками фаз цього процесу. Базальний шар може включати також клітини не епітеліального генезу. Це клітини Лангергаса – різновид макрофагів, лімфоцити, можливі меланоцити.

Базальна мембрана, яка відмежовує передній епітелій являє собою гомогенну нешироку пластинку, аморфний компонент якої включає дрібно-фібрилярні структури. Останні утворюють своєрідну сіточку, – матрикс цієї мембрани (рис. 3.6.)

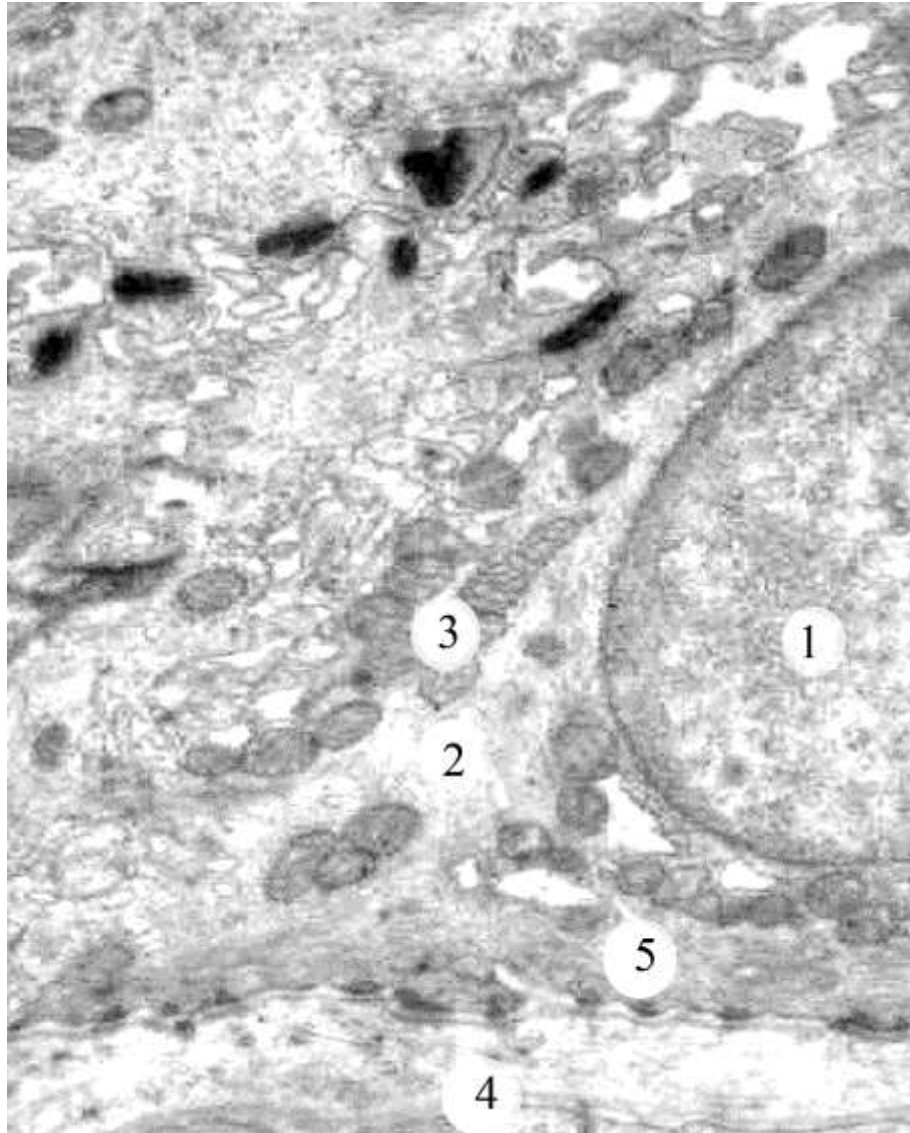


Рис. 3.6. Субмікроскопічна будова базальних епітеліоцитів переднього епітелію рогівки ока свині в нормі. Округло – овальне ядро (1), цитоплазма (2), мітохондрії (3), базальна мембрана (4), напівдесмосоми (5). $\times 1000$

За великого збільшення електронного мікроскопа встановлено, що базальна мембрана має два шари, глибокий темний, у вигляді осміофільної стрічки і поверхневий світлий. Через цей світлий шар базальної мембрани проходять якірні мікрофіламенти до напівдесмосом. Базальна мембрана переходить у досить широку передню пограничну пластинку – мембрану Боумена. На ультраструктурному рівні ця пластинка побудована з аморфної речовини і колагенових фібрил, які розташовані безладно, але можуть створювати окремі пучки.

Найширшою частиною рогівки є власна речовина, що має три компоненти. Це сполучнотканинні пластинки, основна речовина (аморфний компонент), клітини – фібробласти.

Колагенові волокна в складі сполучнотканинних пластин розташовані впорядковано паралельно, хвилястими нитчастими структурами і оточені аморфною речовиною. Субмікроскопічно, у початковій ділянці власної речовини рогівки (після передньої пограничної пластинки) сполучнотканинні пластинки вузькі або середньої товщини і переважно мають однаковий напрямок – паралельний мембрані Боумена (рис. 3.7).

У передній ділянці власної речовини рогівки пластинки мають приблизно однакову товщину, але різний напрямок. Тому, залежно від перерізу пластинки колагенові фібрили мають вигляд ниточок або крупиночок. Плазмолема фіброцита щільно контактує з пластинками власної речовини рогівки, його тіло має напрямок паралельний колагеновим фібрилам (рис. 3.8).

Між пластинками розташовані плоскі відростчасті клітини – фіброцити (кератоцити). Фіброцити і їх відростки розміщені паралельно пластинкам. Ядро такої клітини займає більший об'єм тіла, а цитоплазма вузьким обвідком оточує подовгасте ядро. У цитоплазмі таких клітин мало органел: поодинокі канальці ГЕС, невеликі М. Проте, багато рибосом, що свідчить про

синтетичну функцію фіброцитів, пов'язану з утворенням і фізіологічною регенерацією колагенових пластин (рис. 3.9).

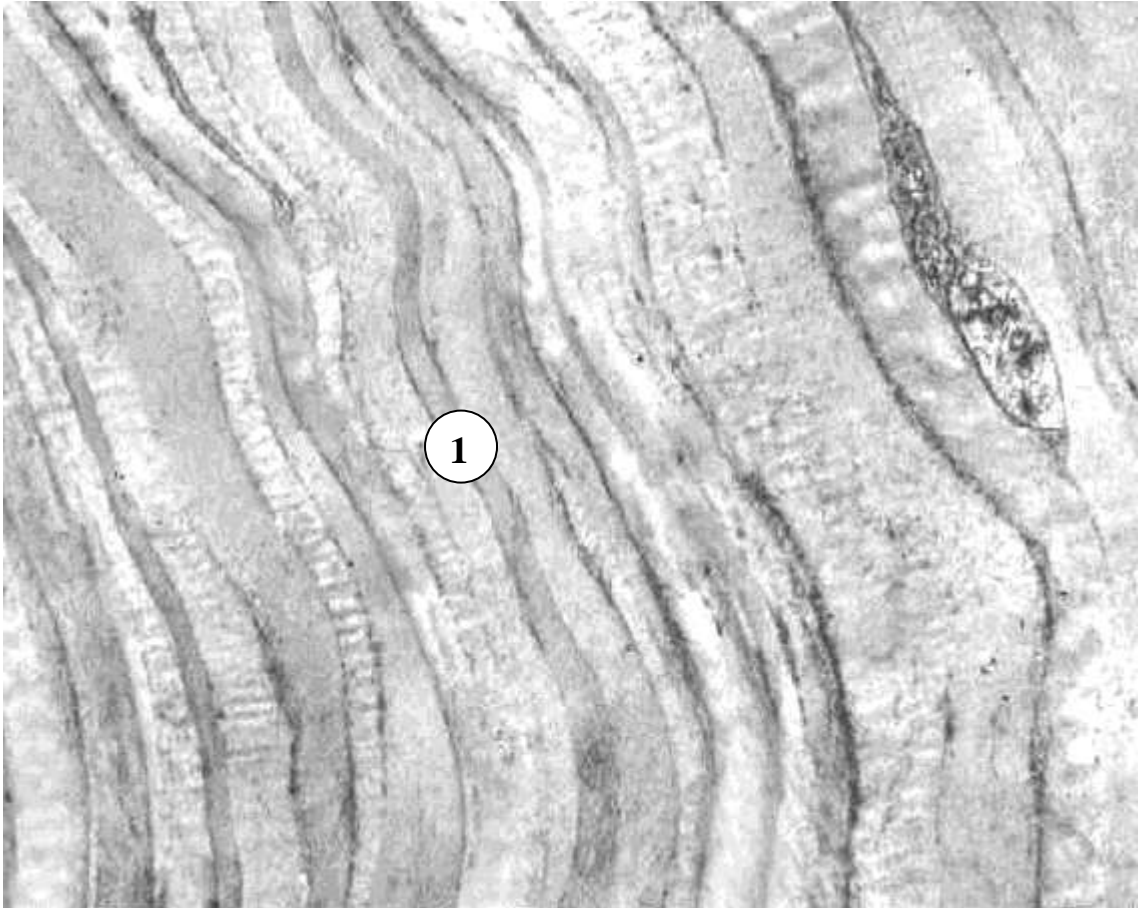


Рис. 3.7. Субмікроскопічна організація початкової ділянки власної речовини рогівки в нормі. Вузькі сполучнотканинні пластинки (1) розташовані переважно паралельно одна одній і мембрані Боумена. ×6000

У власній речовині рогівки встановлений ще інший різновид кератоцитів, який у площині повздожній до пластинок має більший об'єм цитоплазми в ядерній зоні та ширші відростки. Це – активно синтезуючі компоненти міжклітинної речовини клітини, які можна вважати зрілими фібробластами. Характерними ознаками таких клітин є добре розвинені органели, що відповідають за синтетичні процеси: ГЕС, рибосоми і полісоми.

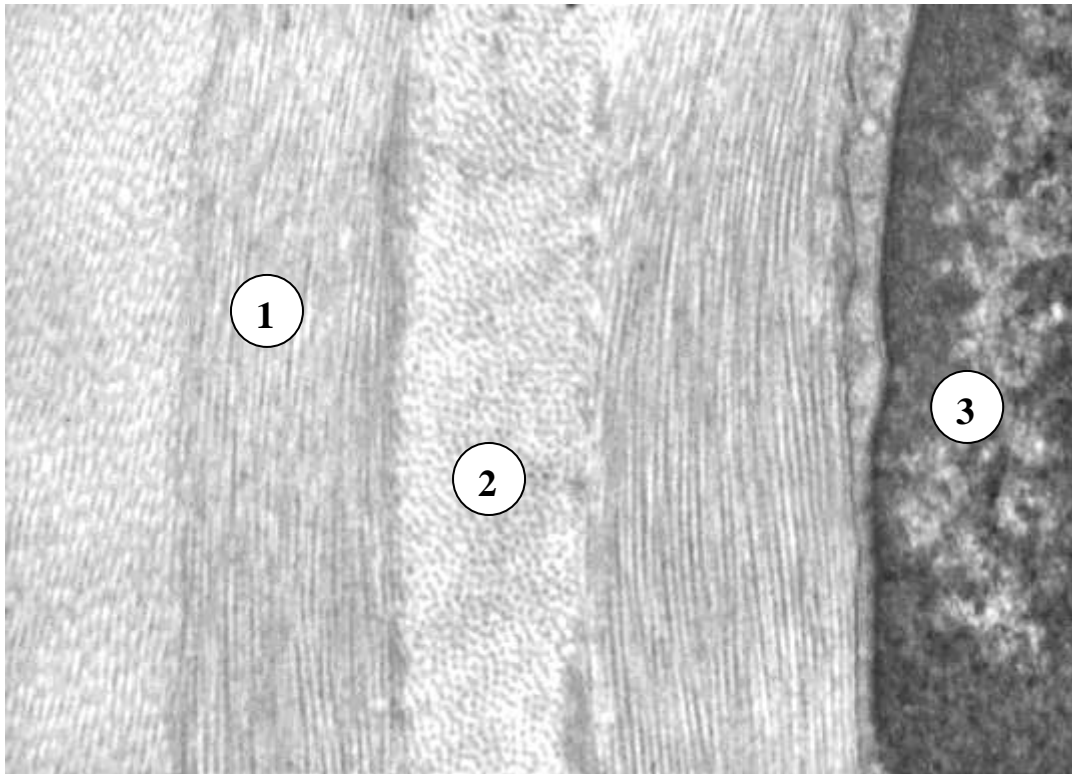


Рис. 3.8. Субмікроскопічна організація середньої ділянки власної речовини рогівки в нормі: різний напрямок розташування пластинок – повздовжній (1), поперечний (2); фіброцит (3) $\times 19000$

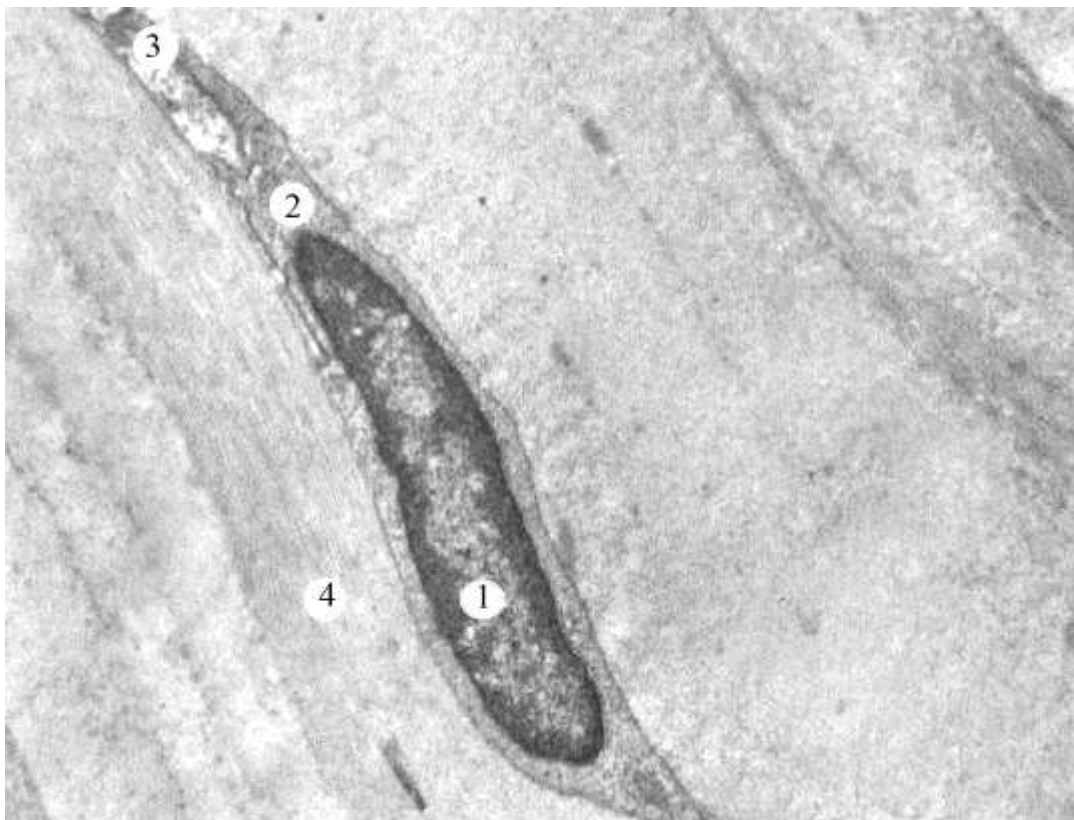


Рис. 3.9. Субмікроскопічна будова фіброцита в складі власної речовини рогівки. Ядро (1), цитоплазма (2), вузький відросток (3), сполучнотканинні пластинки (4). $\times 7000$

КГ. ГЕС представлена помірно розширеними канальцями, які анастомозують і утворюють сітку. На мембранах, що утворюють канальці, наявні рибосоми, кількість яких помірна. Вільні рибосоми утворюють скупчення – полісоми у цитоплазмі. Фрагменти КГ – диктіосоми, які є невеликих розмірів і складаються з цистерн, пухирців і вакуолей. М, що забезпечують синтетичні процеси енергією, мають малі і середні розміри, просвітлений матрикс і небагато крист (рис. 3.10).

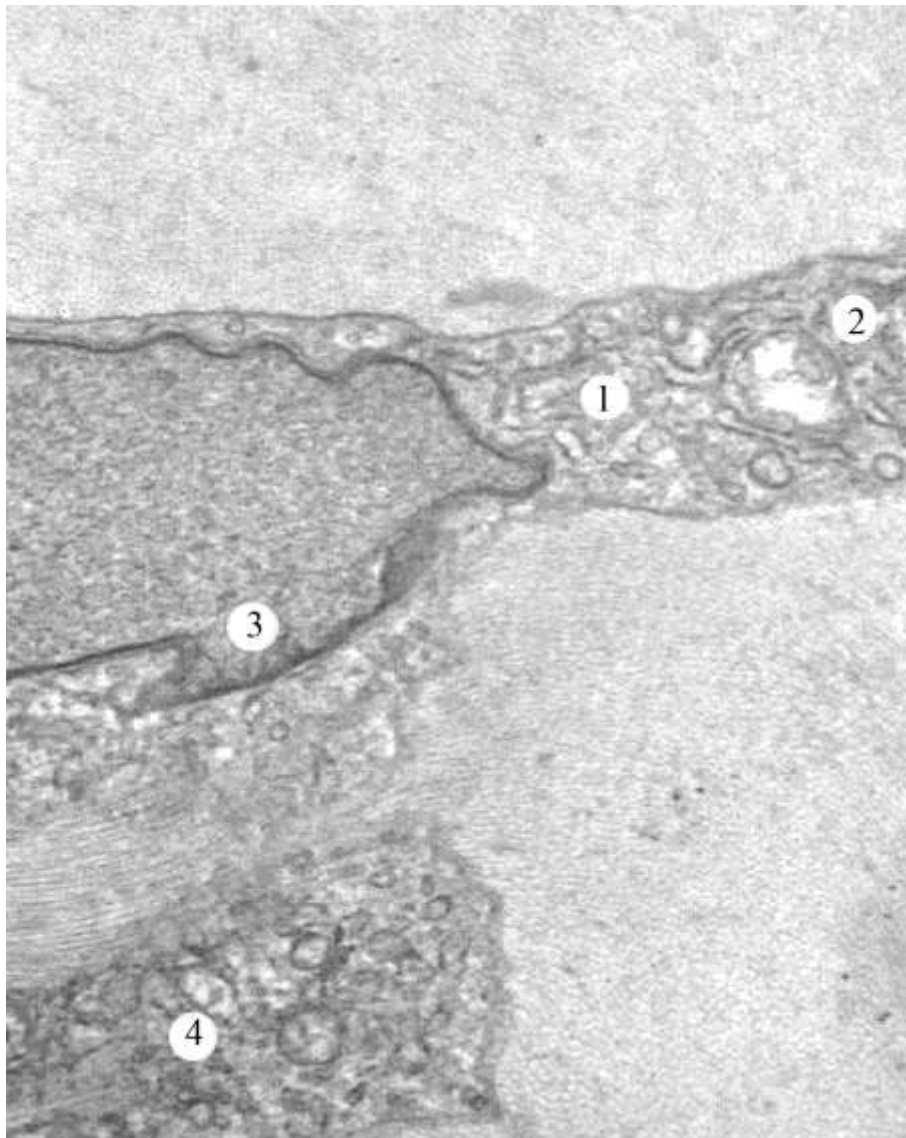


Рис. 3.10. Ультраструктура різновиду кератоцита з більшим об'ємом цитоплазми (1) широкими відростками (2). Ядро з інвагінаціями (3), багато органел (4) у цитоплазмі. $\times 10000$

Біля тіл і відростків зрілих фібробластів, особливо за великого збільшення електронного мікроскопа, чітко виявляються колагенові фібрили, що синтезовані такими клітинами (рис. 3.11).

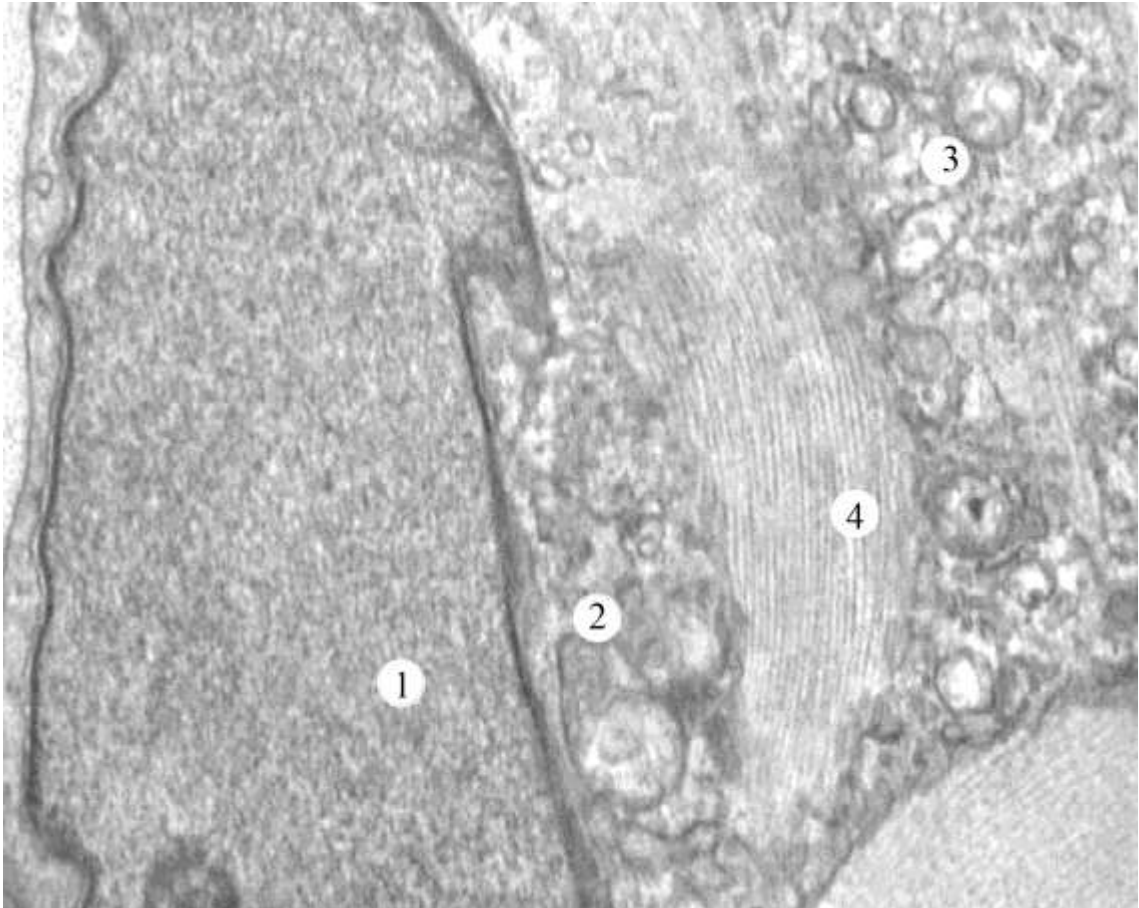


Рис. 3.11. Фрагмент ядра (1) і цитоплазми (2) зрілого фібробласта. Значна щільність органел (3), колагенові фібрили (4). $\times 17000$

У складі власної речовини рогівки, ближче до початкової ділянки субмікроскопічно виявляються, невеликі клітини подовгастої форми з еліпсоподібними ядрами. Такі клітини можна віднести за структурними ознаками до молодих камбіальних фібробластів. Цей різновид мало диференційованих кератоцитів має невеликий об'єм цитоплазми, бідний на органели, в основному це полісоми і рибосоми (рис. 3.12).

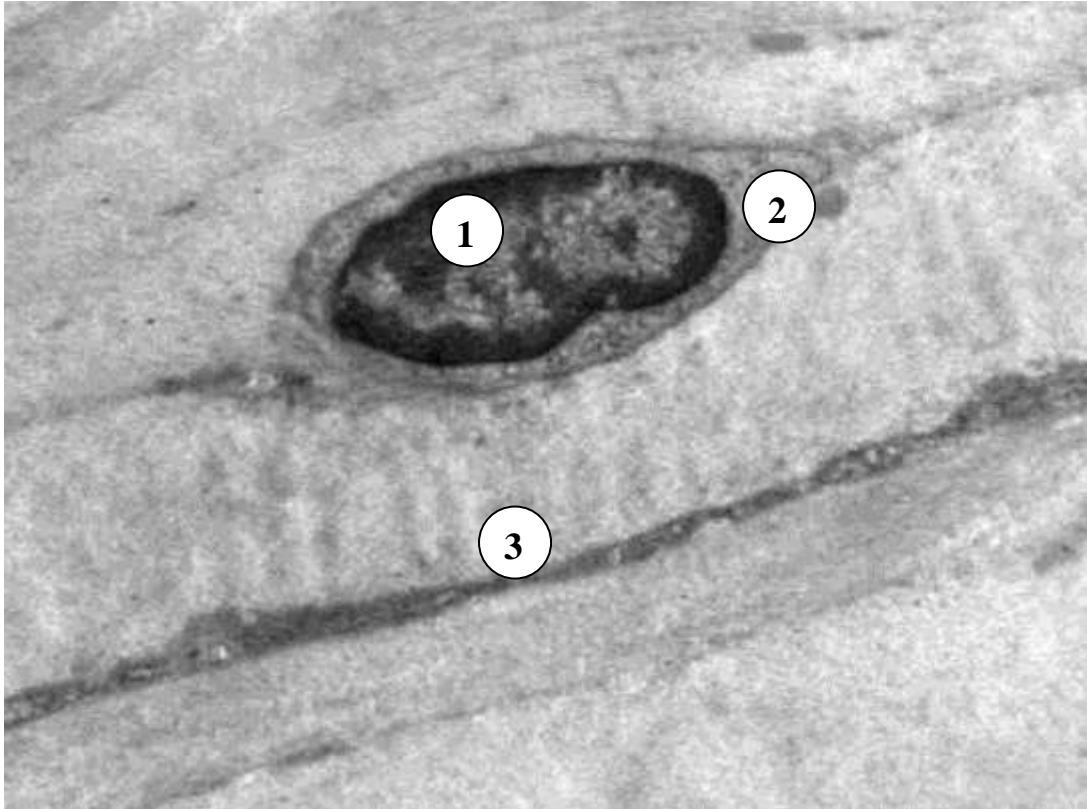


Рис. 3.12. Ультраструктурна організація молодого фібробласта власної речовини ксенорогівки. Еліпсоподібне ядро (1), вузька смужка цитоплазми (2), сполучнотканинні пластинки (3). $\times 8000$

Стромальні пластинки оточені аморфною речовиною, яка однорідна і електронно-світла. Тому утворюється своєрідна періодична структура – від чергування пластин і аморфної речовини.

За власною речовиною рогівки розташована задня погранична пластинка – мембрана Десцемета. Основою цієї пластинки є однорідний аморфний компонент, у який занурені тонкі фібрили з колагену. Передня частина оболонки має пластинчастий вигляд, складається з однорідних пластин колагенових волокон. Задня, яка ширша, має гранулярний вигляд.

Задній епітелій рогівки (ендотелій) утворений одним шаром плоских, витягнутих клітин. Такий одношаровий пласт епітеліоцитів з'єднується з задньою пограничною пластинкою за допомогою напівдесмосом, а між собою десмосомами та в апікальній частині замикальних пластинок.

Міжклітинний простір дуже вузький і утворений плазмолемами двох сусідніх клітин. На апікальній поверхні епітеліоцитів наявні короткі мікроворсинки. Ядра клітин мають округло-овальну або еліпсоподібну форму, відносно рівну каріолему, вузький перинуклеарний простір. Каріоплазма помірної електронної щільності внаслідок вмісту еухроматину, ядерця спостерігаються рідко. У цитоплазмі, яка має невелику площу, наявні невеликі М з чіткими кристами, окремі каналці ГЕС, вільні рибосоми. Виявляється невеликий КГ, багато пухирців і окремі круглі осміофільні лізосоми (рис. 3. 13).



Рис. 3.13. Субмікроскопічна організація заднього епітеліоцита (1) рогівки, розташованого на мембрані Десцемета (2). Фрагмент ядра (3), цитоплазма (4), каналці гранулярної ендоплазматичної сітки (5). $\times 9000$

Проведені детальні гістологічні, морфометричні та ультраструктурні дослідження ксенорогівки в нормі показали специфічність її морфологічної будови, як структури, яка забезпечує сприйняття інформації.

Встановлено, що у власній речовині інтактної ксенорогівки наявні три типи сполучнотканинних клітин – кератоцитів, які відрізняються розмірами, ультраструктурною організацією і функцією. Крім типових дефінітивних форм фіброцитів, виділені молоді камбіальні клітини – фібробласти та зрілі фіброцити, що активно синтезують компоненти міжклітинної речовини.

Отриманні результати комплексних морфологічних досліджень структурних компонентів рогівок свиней у нормі служать контролем і необхідні для співставлення та інтерпретації даних, отриманих при різних методах консервування ксенотрансплантатів рогівки.

3.2. Морфологічні, морфометричні та ультраструктурні зміни ксенорогівки при різних методах консервації

Донорська рогівка при тривалому зберіганні зазнає впливу фізичних і хімічних чинників, при цьому морфологія ксенотранспланту в умовах консервації є маловідомою. Тому, на наступному етапі дослідження, для реалізації поставленої мети і встановлення характеру морфофункціональних змін структурних компонентів рогівки ока свиней при її заготівлі і тривалому зберіганні, вивчено вплив різних методик консервування, зокрема – кріоконсервації у рідкому азоті, кріоконсервації з попередньою обробкою кріопротектором – гліцерин-жовтковою сумішшю, а також – при ліофілізації та ліофілізації з попередньою еквілібрацією в гліцерин-жовтковій суміші.

3.2.1. Морфологічний, морфометричний та ультраструктурний стан кріоконсервованих ксенотрансплантатів рогівки без використання кріопротектора

Результати гістологічного дослідження кріоконсервованих ксенорогівок після зберігання в рідкому азоті показали, що їхня загальна структурна організація зберігається. Чітко виражені шари переднього епітелію, пограничні мембрани і власна речовина рогівки (рис. 3.14).



Рис. 3.14. Мікроскопічна будова кріоконсервованої в рідкому азоті ксенорогівки. Передній епітелій (1), передня погранична пластинка (2), власна речовина (3), задній епітелій із пограничною пластинкою (4). Забарвлення гематоксиліном-еозином. $\times 100$

Морфометричні дослідження показали, що середнє значення товщини переднього епітелію достовірно збільшується у кріоконсервованій ксенорогівці в середньому на 10 % у порівнянні з нормою і дорівнює $(57,4 \pm 2,5)$ мкм (табл. 3.2). Детальні гістологічні дослідження за великого збільшення світлооптичного мікроскопа встановили поліморфізм клітин

епітелію. Епітеліоцити базального шару видовжені, ядра в них з високою базофілією каріоплазми. Цитоплазма клітин має більш оксифільне забарвлення в порівнянні з інтактною рогівкою. Базальні клітини збільшуються на 17 % і площа їх становить $(140,2 \pm 1,7)$ мкм² (в контролі – $(119,4 \pm 2,0)$ мкм², $p=0,001$), а їх ядра – на 19 % і площа їх складає $(26,8 \pm 1,3)$ мкм² (в контролі – $(22,4 \pm 1,4)$ мкм², $p=0,003$). Коефіцієнт ядерно-цитоплазматичного співвідношення становить 0,237, що статистично достовірно не відрізняється у порівнянні з показниками норми (0,232).

Таблиця 3.2

Морфометричні показники переднього епітелію кріоконсервованої ксенорогівки при різних методах консервування ($M \pm m$)

Показник	1 група (n=16)	2 група (n=15)	3 група (n=16)	p
	інтактна ксенорогівка	кріоконсервована ксенорогівка	кріоконсервована з кріопротектором	
Загальна товщина рогівки, мкм	934,9±17,4	1032,5±35,5	986,4±18,1	$p_{1-2} < 0,01$ $p_{1-3} > 0,05$
Товщина переднього епітелію, мкм	52,2±1,8	57,4±2,5	53,4±1,4	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} > 0,05$
Товщина власної речовини, мкм	867,4±8,5	965,2±23,8	923,3±24,3	$p_{1-2} < 0,01$ $p_{1-3} > 0,05$

Передня погранична пластинка не змінюється, але на окремих ділянках спостерігається відшарування епітеліального шару від останньої. У власній речовині в умовах звичайного кріоконсервування утворюються невеликі, неправильної форми світлооптичні порожнини. Сполучнотканинні пластинки, які складають основну масу власної речовини рогівки і фіброцити виглядають мало зміненими, зберігають правильну орієнтацію і впорядковане розміщення колагенових фібрил (рис. 3.15). Задній епітелій рогівки представлений одним шаром плоских клітин, що мають базofilні еліпсоподібної форми ядра, слабо рожеву цитоплазму, яка оточена чіткою плазмолемою.



Рис. 3.15. Мікроскопічна будова кріоконсервованої ксенорогівки. Передній епітеліальний шар (1), передня погранична пластинка (2), власна речовина (3). Забарвлення гематоксиліном-еозином. $\times 400$

Електронно-мікроскопічні дослідження кріоконсервованої рогівки показали, що для епітеліоцитів усіх шарів переднього епітелію характерним є просвітлення цитоплазми, невисокий вміст у ній органел. Більшість М мають

невеликі розміри, ущільнені, з темним матриксом і погано вираженими кристами. Вогнищево розширенні каналці ГЕС і КГ. У проміжному шарі остисті епітеліоцити щільно прилягають плазмолемами, осміюфільні десмосоми добре виявляються (рис. 3.16).

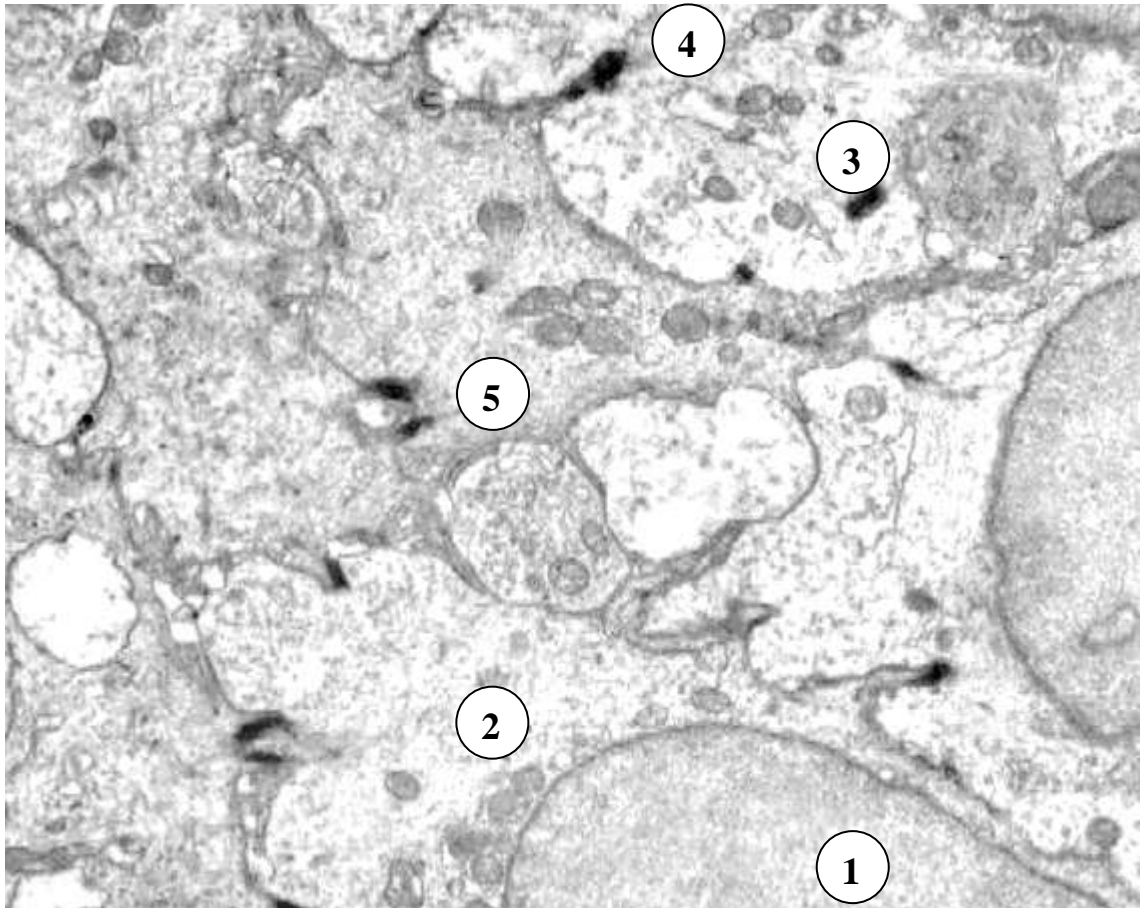


Рис. 3.16. Субмікроскопічні зміни епітеліоцитів проміжного шару переднього епітеліального шару кріоконсервованої рогівки. Округло-овальні ядра (1), невелике ядерце (2), електронно-світла гіалоплазма (3), деструкція органел (4), шилоподібні відростки (5).
×9000

Проте, у частини епітеліоцитів проміжного і базального шарів є вакуолеподібні структури, набряклі з просвітленим матриксом і пошкодженими кристами М. Між епітеліоцитами на окремих ділянках є розширені міжклітинні простори. Також спостерігаються ділянки пошкодження ядерних і плазматичних мембран епітеліоцитів.

Наявні також місця де, плазмолемі базальних епітеліоцитів не щільно прилягають до базальної мембрани і в таких ділянках напівдесмосоми не виявляються.

У власній речовині рогівки, особливо у середній ділянці, субмікроскопічно виявлені фіброцити з подовгастими ядрами, що мають значні інвагінації каріолеми, потовщені нечіткі ядерні мембрани, перинуклеарний простір вузький або не спостерігається. Цитоплазма оточує ядро вузьким обвідком, має світлі ділянки і мало органел. Наявні окремі короткі каналці ГЕС, іноді фрагменти КГ, мало рибосом і полісом (рис. 3.17). Такий стан фіброцитів свідчить про низьку їх функціональну активність.

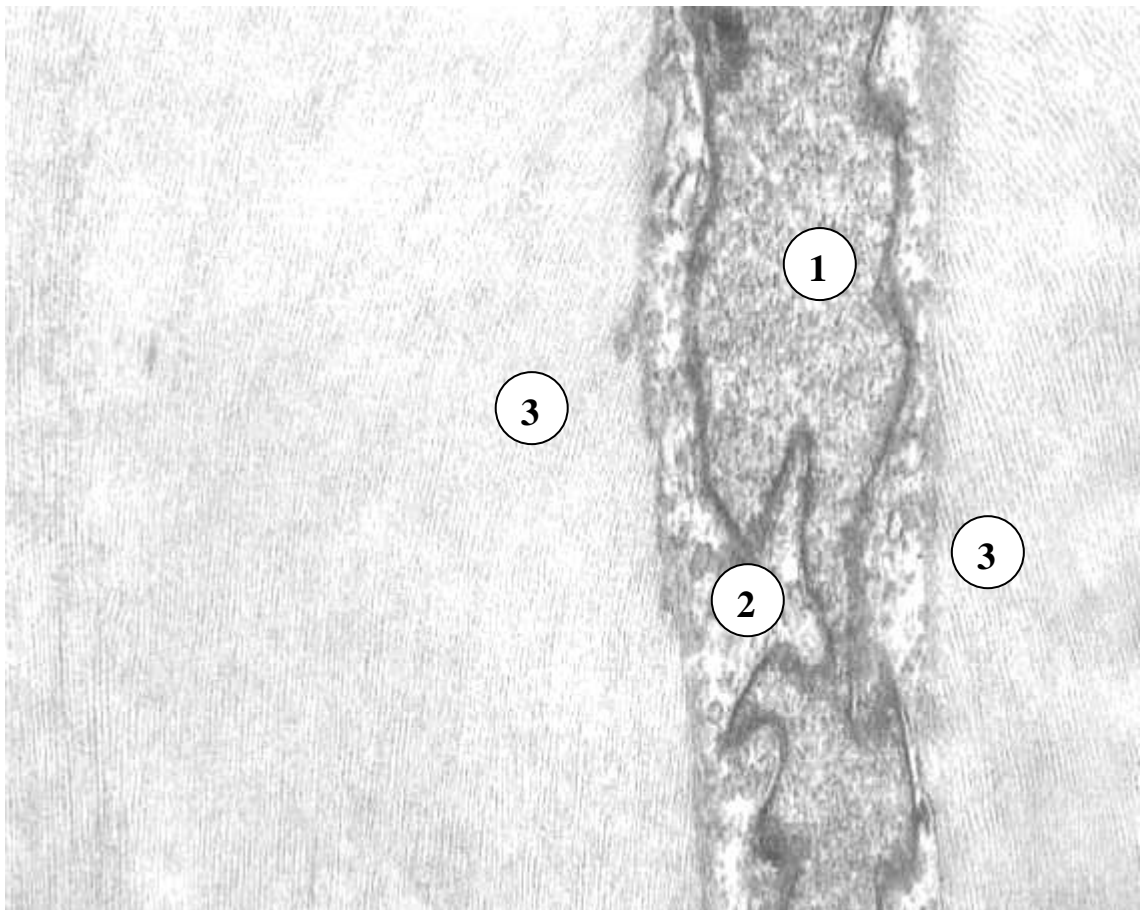


Рис. 3.17. Ультраструктурна організація власної речовини кріоконсервованої рогівки. Подовгасте з глибокими інвагінаціями ядро (1) фіброцита, вузька смужка цитоплазми (2), сполучнотканинні пластинки (3). $\times 17000$

Змінюється також ультраструктурна організація зрілих фібробластів. Їх ядра виглядають ущільненими, мають глибокі інвагінації, у каріоплазмі багато грудок гетерохроматину, пошкодженні органели, що відповідають за синтетичну функцію. Вакуолізовані і частково фрагментовані каналця ГЕС, цистерни КГ. На мембранах ГЕС мало рибосом, а в цитоплазмі вільних полірибосом. Частина М набрякла, з просвітленим матриксом, пошкодженими кристами. Між пластинками периферійних відділів власної речовини спостерігаються поодинокі мало диференційовані фіброцити подовгастої форми з осміофільним ядром і невеликим обвідком цитоплазми в якій мало органел.

Сполучнотканинні пластинки широкі, їх границі нечіткі, а колагенові фібрили погано контуруються. В окремих ділянках власної речовини рогівки спостерігаються електронно-прозорі, світлі сполучнотканинні пластинки, у яких мікрофібрили лізовані.

Передня і задня пограничні пластинки контуруються чітко, проте, виглядають гомогенними, тому що мікрофібрилярні структури в них погано виражені.

Епітеліоцити заднього епітеліального шару мають зменшені ядра, у яких каріолема з інвагінаціями. Мембрани ядерної оболонки потовщені, місцями нечіткі, перинуклеарний простір спостерігається не на всіх ділянках. У цитоплазмі встановлені пошкоджені органели, особливо мітохондрії. Вони мають світлий матрикс, значно зруйновані нечіткі кристи, а частково і зовнішні мітохондріальні мембрани. Частина мітохондрій гіпертрофована, а частина вакуолеподібна. Спостерігаються, як плоскі фрагменти каналців ГЕС, так і розширені їх просвіти. За рахунок них і цистерн КГ утворюються електронно-прозорі неправильної форми порожнини (рис. 3.18).

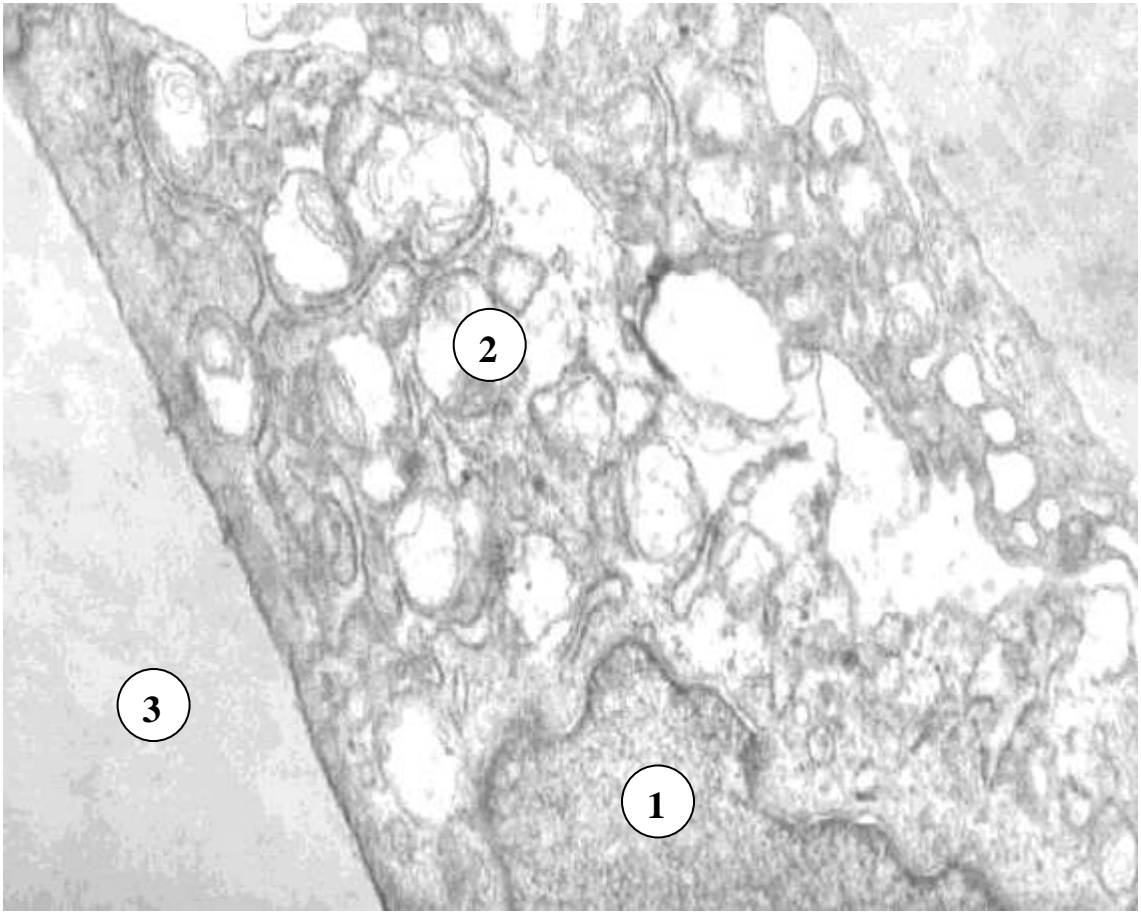


Рис. 3.18. Субмікроскопічні зміни епітеліоцита заднього епітеліального шару рогівки після кріоконсервації. Інвагінації ядра (1), деструкція органел цитоплазми (2), задня погранична пластинка (3). $\times 17000$

Рибосом і полісом у цитоплазмі епітеліоцитів мало, наявні мієлоподібні злипчасті структури. Апікальна частина плазмолемі має окремі мікроворсинки, а базальна частина потовщена і погано виражені напівдесмосоми.

3.2.2. Морфологічний, морфометричний та ультраструктурний стан кріоконсервованих з кріопротектором ксенотрансплантатів рогівки

Проведенні гістологічні дослідження кріоконсервованої рогівки, яка попередньо піддавалась еквілібрації в ГЖС світло-оптично спостерігається подібна до норми і мало змінена структурна організація її компонентів. На препаратах ксенорогівки встановлена висока збереженість усіх компонентів переднього епітелію та власної речовини рогівки. Чітко окресленні шари епітелію, передня і задня пограничні пластинки. Добре виражене пошарове розташування епітеліоцитів відносно передньої пограничної пластинки (рис. 3.19).

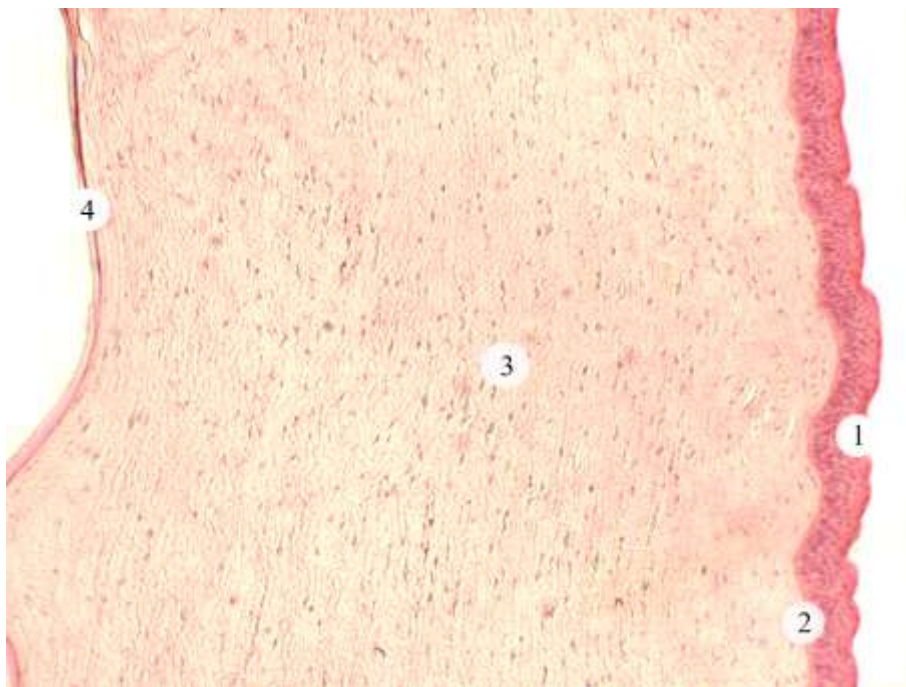


Рис. 3.19. Мікроскопічна будова кріоконсервованої ксенорогівки з попередньою обробкою в ГЖС. Передній епітелій (1), передня погранична пластинка (2), власна речовина рогівки (3), задня погранична пластинка з епітелієм (4). Зabarвлення гематоксиліном-еозином. $\times 100$

Форма епітеліоцитів, інтенсивність забарвлення цитоплазми і ядер така ж, як і в нормальній рогівці. Епітеліальний шар щільно прилягає до передньої пограничної мембрани. Морфометрично встановлено, що товщина поверхневого епітеліального шару дорівнює $(53,4 \pm 1,4)$ мкм, що статистично недостовірно відрізняється від норми (табл. 3.2). При використанні ГЖС площа базальних клітин теж не має суттєвих відмінностей від величини норми – $(119,4 \pm 2,0)$ мкм² і становить $(119,8 \pm 1,8)$ мкм². Не відмічається різниці середнього значення площі ядер клітин базального шару епітелію – $(22,9 \pm 1,2)$ мкм², у контролі – $(22,4 \pm 1,4)$ мкм². Ядерно-цитоплазматичне співвідношення складає 0,238 (в контролі – 0,232).

Для власної речовини ксенорогівки характерна збереженість загальної структурної організації. Вона точно зберігає ознаки щільної сполучної тканини (рис. 3.20).

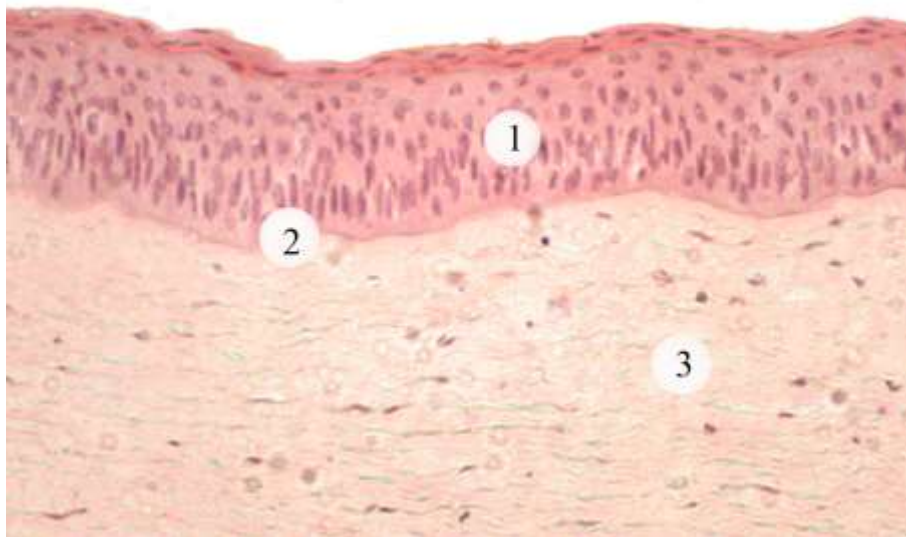


Рис. 3.20. Мікроскопічна картина кріоконсервованої ксенорогівки при попередній еквілібрації. Передній епітелій (1), передня погранична пластинка (2), власна речовина (3). Забарвлення гематоксиліном-еозином. $\times 400$

Сполучно-тканинні пластинки власної речовини зберігають свою правильну орієнтацію і погружені в основну речовину, яка представлена різними типами ПГ, а світлооптичні порожнини зустрічаються рідко і є невеликими. Добре виражені кератоцити з великими ядрами (рис. 3.20). Клітини заднього епітелію щільно прилягають до пограничної мембрани, зберігають плоску форму, базофільні еліпсоподібні ядра орієновані вздовж вісі клітин.

Ультраструктурно встановлено, що у всіх структурних компонентах рогівки спостерігаються помірні зміни. Так, у епітеліцитах поверхневого шару переднього епітелію цитоплазма вміщує невеликі і середніх розмірів світлі вакуолоподібні порожнини. Вони створені за рахунок нерівномірного потовщення каналців ГЕС і цистерн КГ (рис. 3.21).

Гіалоплазма зберігає електронну щільність, проте, органел у ній спостерігається небагато. Вільні рибосоми і полісоми мають зональне розташування. Невеликі М розташовані поодинокі, або іноді групами, частіше перинуклеарно. Вони мають світлий мітохондріальний матрикс і редуковані кристи. Такий стан органел в умовах даного консервування рогівки свідчить про пригнічення біосинтетичних і енергетичних процесів у клітинах поверхневого шару. У цитоплазмі епітеліоцитів гірше контуруються тонофібрили, міжклітинні простори поширені, а десмосомальні контакти мають невеликі розміри і високу електронну щільність (рис. 3.21). Ядра епітеліоцитів зберігають структурну організацію її компонентів. У каріоплазмі переважає еухроматин. Контури мембран каріолеми чіткі, перинуклеарні простори вузькі і рівномірні.

Електронномікроскопічні дослідження проміжного шару переднього епітелію рогівки показали, що в умовах цього методу консервування клітини зберігають свою форму, плазмолемі чітко контуровані, міжклітинні простори помірно розширенні, а десмосомальні контакти осміофільні і частково пошкоджені. У каріоплазмі багато рибосомальних гранул, наявні

крупні ядерця, а в окремих ядрах їх дублікація. Ядерні мембрани чіткі, а перинуклеарні простори вузькі.

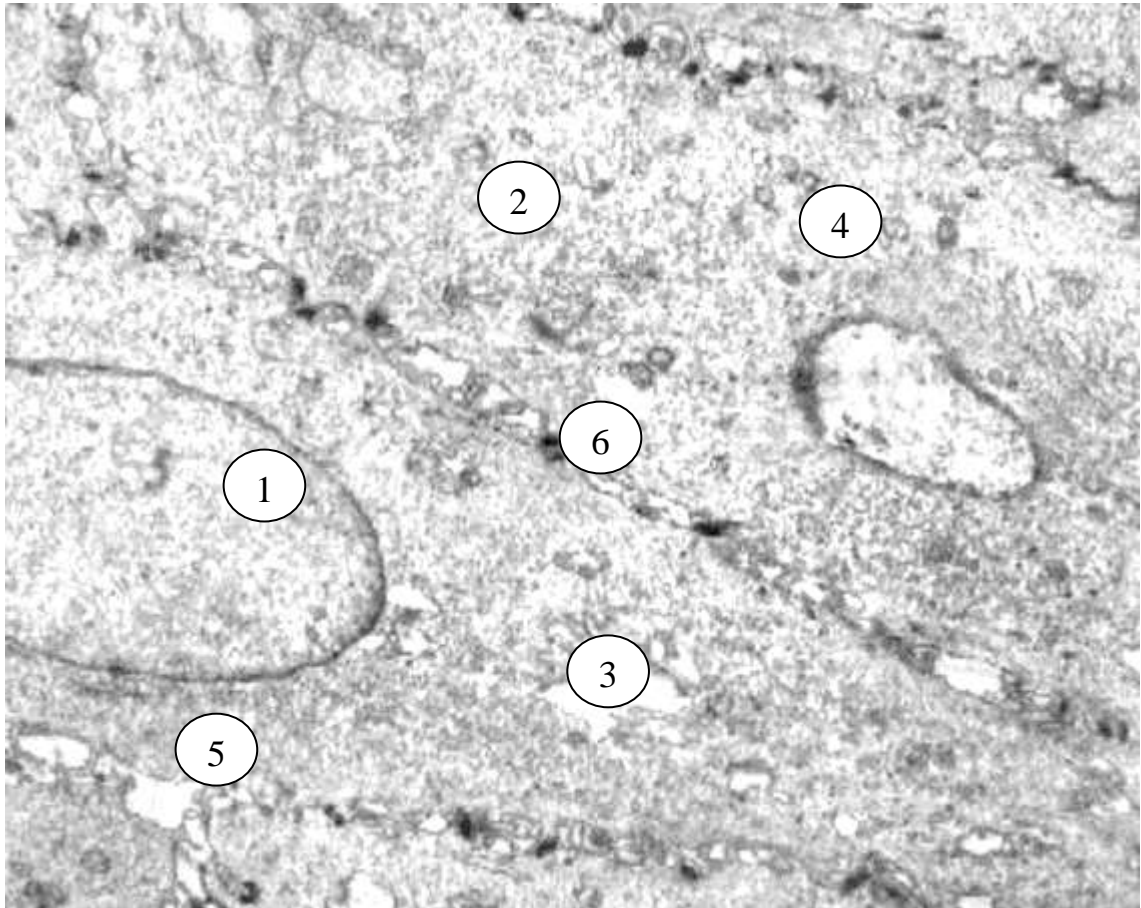


Рис. 3.21. Субмікроскопічний стан епітеліоцитів поверхневого шару переднього епітелію рогівки після її кріоконсервування з використанням ГЖС. Еліпсоподібне ядро (1), цитоплазма (2), світлі неправильної форми порожнини (3), змінені мітохондрії (4), міжклітинний простір (5), десмосома (6). $\times 8000$.

Органел у цитоплазмі епітеліоцитів проміжного шару небагато. Переважно це тонофібрили, які розташовані рихло, а біля плазмолемі окремими пучками. Як і у клітинах поверхневого шару, у гіалоплазмі наявні електронно-прозорі порожнини, переважно парануклеарно. Окремі непротяжні каналці ГЕС, вільні полісоми, невеликі М зі світлим матриксом, характерним для таких клітин (рис. 3.22).

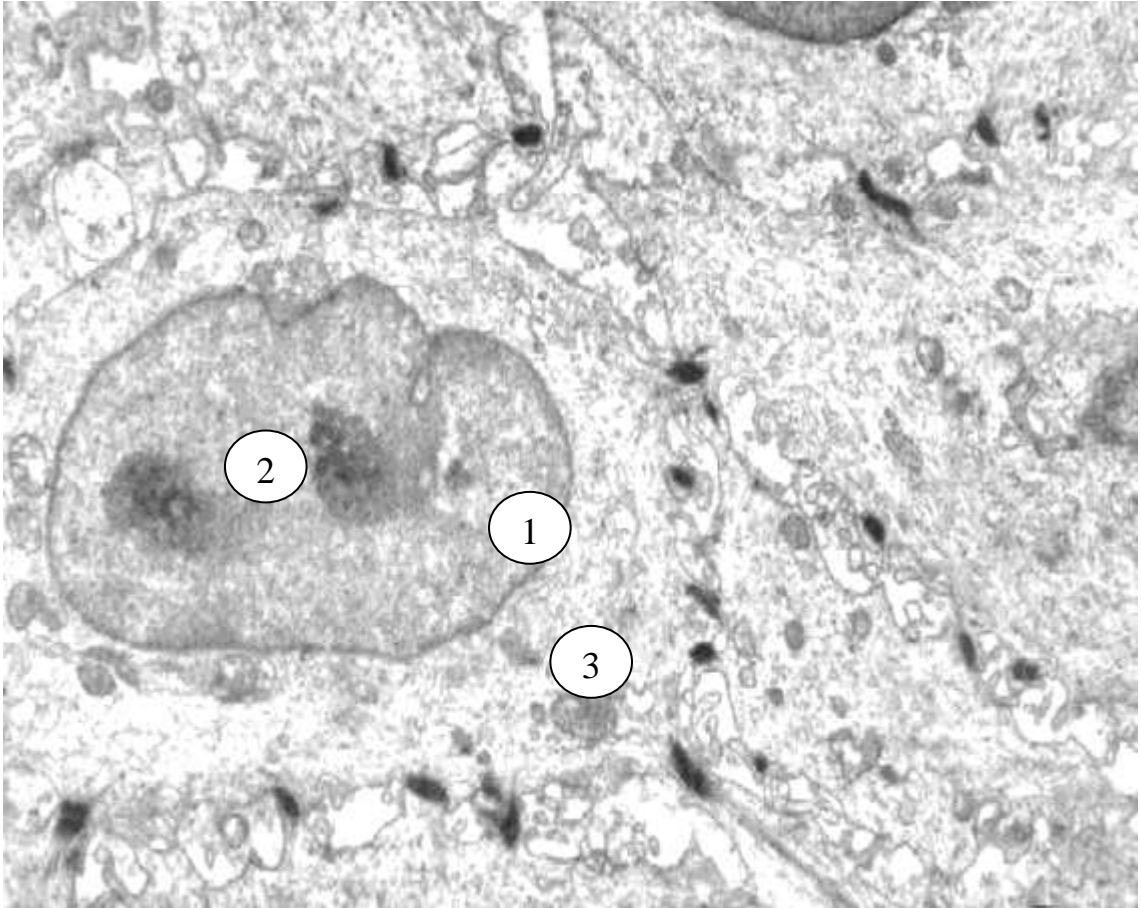


Рис. 3.22. Ультраструктурні зміни епітеліоцитів проміжного шару переднього епітелію рогівки при кріоконсервуванні з використанням ГЖС. Ядро (1) з одним або двома великими ядерцями (2), цитоплазма (3) з незначною кількістю органел. $\times 10000$.

Електронномікроскопічні дослідження епітеліоцитів базального шару показали, що структурна організація клітин добре збережена. Округло-овальні ядра орієнтовані переважно по довжині клітин, перпендикулярно до базальної мембрани. 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 хромосом (рис. 3.23).

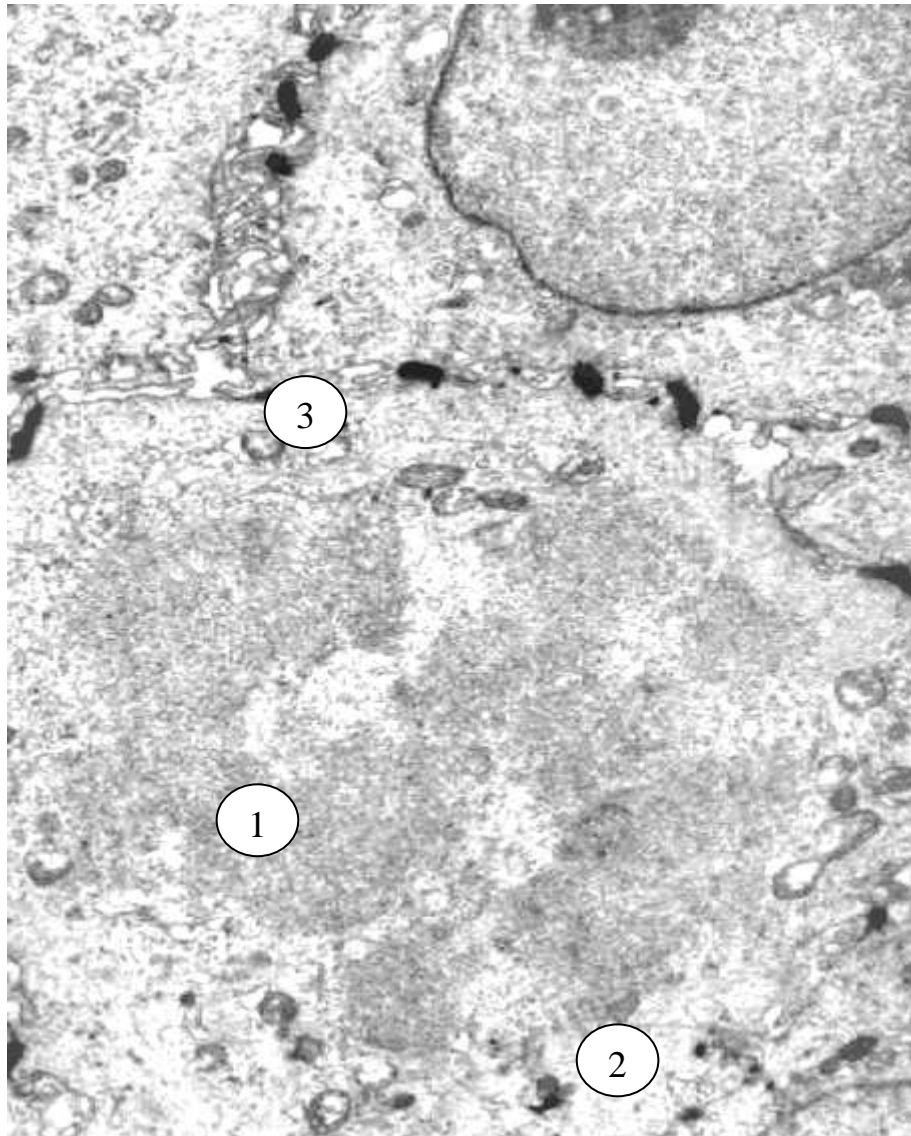


Рис. 3.23. Мітотичний поділ базального епітеліоцита. Рогівка після кріоконсервування з застосуванням ГЖС. Конденсація хроматину (1), цитоплазма (2), десмосома (3). $\times 10000$.

Зберігаються десмосомальні контакти між плазмолемами сусідніх епітеліоцитів і напівдесмосомальні з базальною мембраною, але вони виглядають ущільненими та тонофібрили біля них нечіткими.

У М базальних епітеліоцитів спостерігається часткове просвітлення матриксу та деструкція крист. Окремі М гіпертрофовані, а кристи в них частково редуковані. В цитоплазмі наявні також рибосоми, непротяжні каналці ГЕС, цистерни і вакуолі КГ, які помірно розширені. Тонофібрили частково лізуються і гірше контуруються.

В умовах кріоконсервації субмікроскопічно власна речовина рогівки добре збережена. Більшість сполучно-тканинних 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 (рис. 3.24).

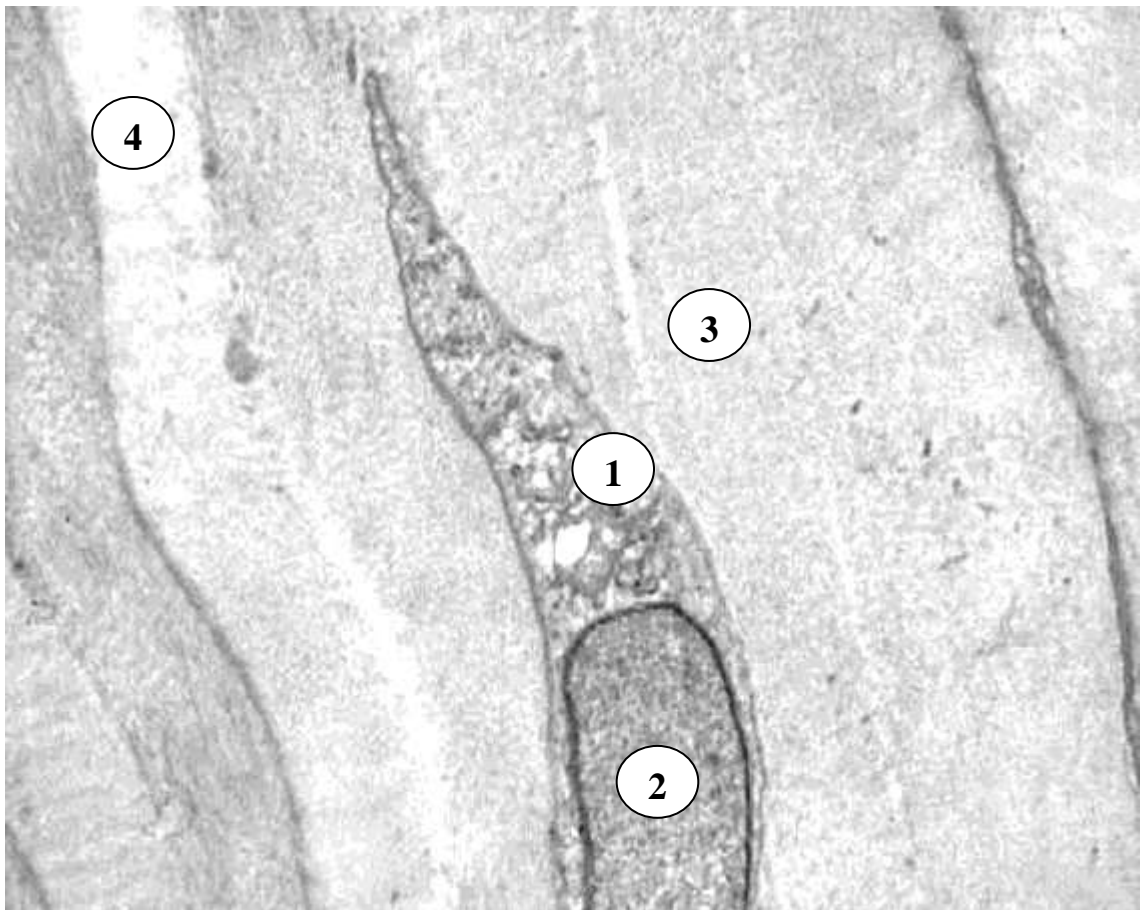


Рис. 3.24. Ультраструктурна організація власної речовини рогівки після її кріоконсервування. Подовгастої форми фібробласт (1), еліпсоподібне ядро (2), сполучно – тканинні пластинки (3), просвітлені ділянки пластинок (4). $\times 7000$

Органели, що розташовані переважно парануклеарно, мають помірні зміни. Короткі цистерни ГЕС частково розширені, рибосом і полісом небагато. Невеликі М мають середньої електронної щільності матрикс, окремі світлі його ділянки, кристи невеликі і частково пошкодженні. Наявні також невеликі світлі вакуолі і пухирці.

У складі власної речовини рогівки спостерігаються також зрілі, більші за площею тіла і відростків, фібробласти. Їх ультраструктурна організація свідчить про хорошу збереженість компонентів клітин при даному методі консервування. Проте, подовгасті ядра мають інвагінації каріолеми, вогнищево збільшені ділянки перинуклеарного простору, гетерохроматинові грудки у каріоплазмі, невеликі електроннощільні ядерця. У цитоплазмі наявні помірно розширені каналці ГЕС та цистерни КГ. М мають вогнищево просвітлений матрикс і добре збережені кристи. Біля плазмолеми таких клітин наявні утворенні ними пучки колагенових фібрил (рис. 3. 25).

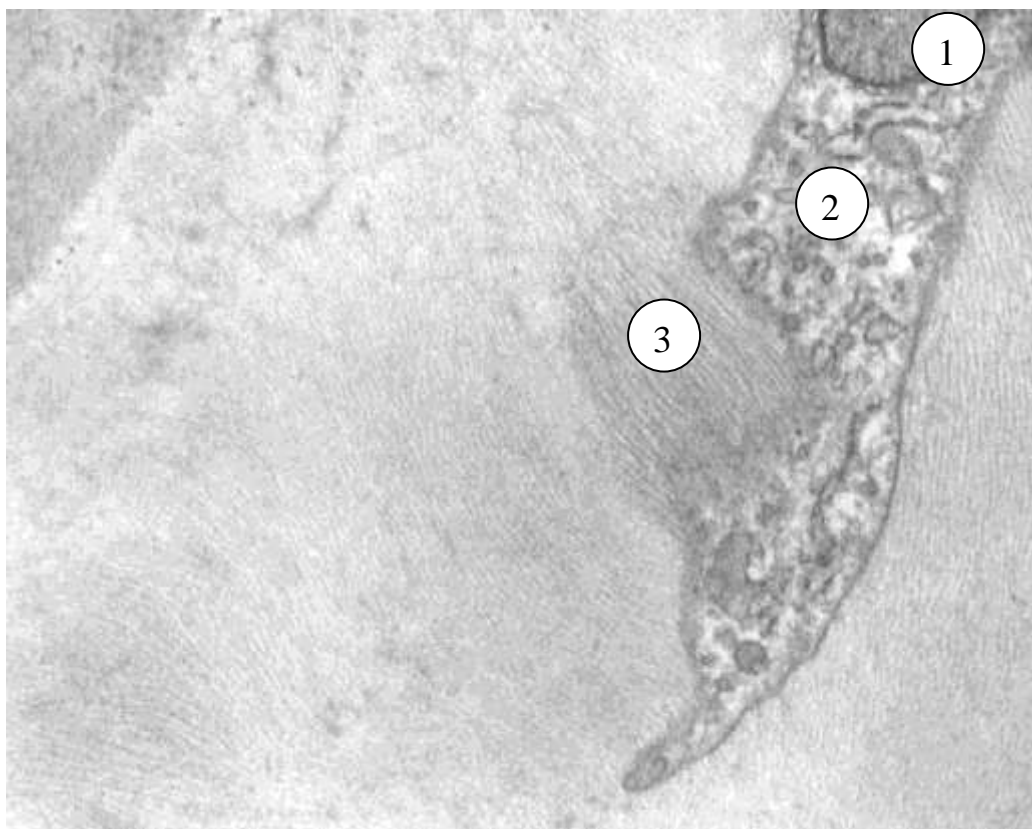


Рис 3.25. Субмікроскопічний стан власної речовини рогівки після кіроконсервування з КП. Фрагмент ядра (1), фрагмент цитоплазми (2), пучок мікрофібрил (3). $\times 10000$

Субмікроскопічні дослідження заднього епітелію рогівки при кріоконсервації після еквілібрації в ГЖС показали, що клітини зберігають всі компоненти, але вони відрізняються від норми. Ядра мають подовгасту форму, виглядають зменшеними, каріолема нерівна за рахунок неглибоких інвагінацій. Ядерні мембрани визначаються, але внутрішня потовщена і осміофільна, перинуклеарний простір вузький, а ядерні пори поодинокі і погано контуровані. Хроматин у каріоплазмі однорідний, має помірну електронну щільність, ядерця спостерігаються рідко, вони маленькі осміофільні. Плазмолема в апікальній частині епітеліоцита виглядає потовщеною, а мікроворсинки поодинокі і маленькі. Базальна частина плазмолеми чітка, контактує з задньою пограничною пластинкою щільно, але напівдесмосомальні контакти розташовані рідко. У цитоплазмі епітеліоцитів наявні вузькі каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, їх небагато, а на поверхні їх мембран мало рибосом, як і вільних полісом. КГ представлений окремими цистернами, біля них мало пухирців і вакуолей. Округло-овальні М виглядають набряклими, мають просвітлений матрикс і частково зруйновані кристи (рис. 3.26).

Мембрана Десцемета досить широка, більша її частина однорідна, помірно осміофільна, з дрібним гранулярним матеріалом. Неширока частина, яка контактує з власною речовиною рогівки більшої електронної щільності і на повздовжньому перерізі має нечіткі, тонкі фібрили (рис. 3.27).

Проведені у даному розділі детальні світлооптичні та ультраструктурні дослідження структурної організації кріоконсервованої ксенорогівки встановили помірну збереженість морфологічного стану епітеліальних шарів і власної речовини. Цей метод консервування викликає локальне пошкодження плазматичних ядерних і органоїдних мембран епітеліоцитів, розширюються міжклітинні простори, стають набряклі з просвітленим матриксом і пошкодженими кристами М. У клітинах встановлено просвітлення гіалоплазми. Сполучнотканинні пластинки частково

потовщуються, їх границі стають нечіткими, а колагенові фібрили погано контуруються. В окремих ділянках власної речовини рогівки спостерігаються електронно-прозорі, світлі сполучнотканинні пластинки.

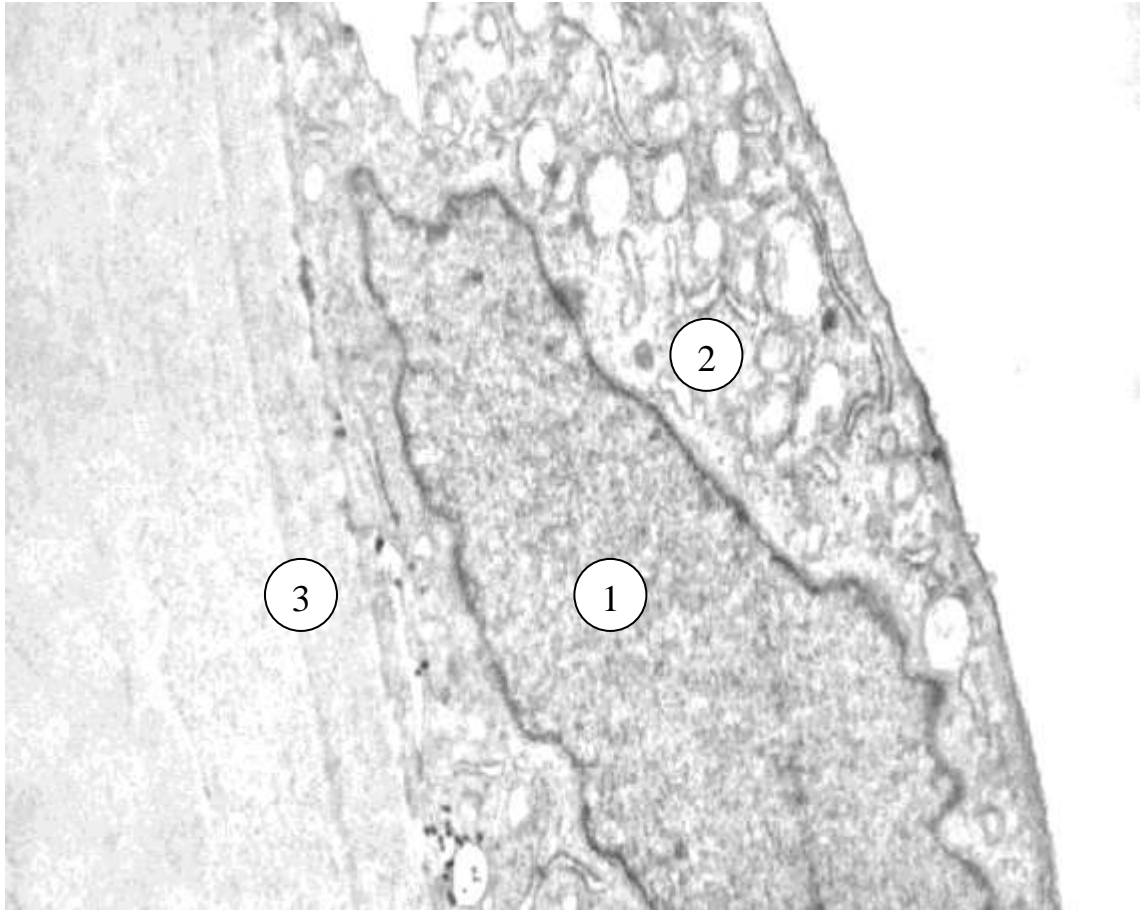


Рис. 3.26. Субмікроскопічна організація заднього епітелію рогівки при кріоконсервуванні з попередньою обробкою в ГЖС. Подовгасте ядро з інвагінаціями (1), цитоплазма (2), мембрана Десцемета (3) $\times 700$

Кріоконсервування ксенорогівки після попередньої її обробки КП добре зберігає структурну організацію усіх її компонентів. На субмікроскопічному рівні встановлена збереженість мембранних компонентів клітин, ядерних структур та органел. Помірно змінені сполучнотканинні пластинки власної речовини та пограничні пластинки.

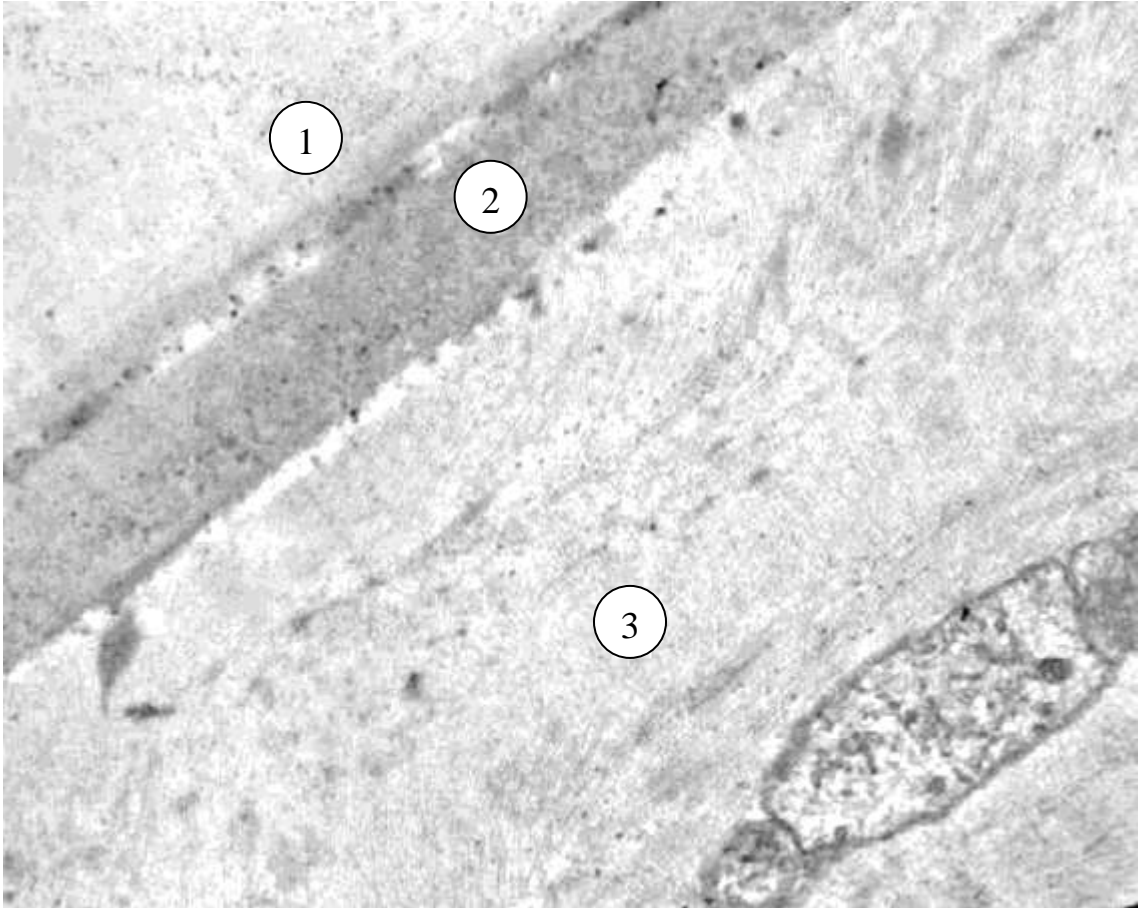


Рис. 3.27. Субмікроскопічна організація пластинки Десцемета при кріоконсервуванні рогівки з попередньо проведеною еквілібрацією. Ширший, гомогенний шар (1), темний, фібрилярний шар (2), власна речовина (3) рогівки $\times 8000$.

3.2.3. Морфологічний, морфометричний та ультраструктурний стан ліофілізованих ксенотрансплантатів рогівки

Проведенні гістологічні дослідження ліофілізованих ксенотрансплантатів рогівки встановили помітні деструктивні зміни її організації. Товщина переднього епітеліального шару виглядає зменшеною (рис. 3.28). Проведенні морфометричні дослідження встановили, що середнє значення товщини переднього епітелію у ліофілізованій ксенорогівці достовірно зменшується – в середньому на 27 % у порівнянні з нормою, $p < 0,001$ (табл. 3.3).

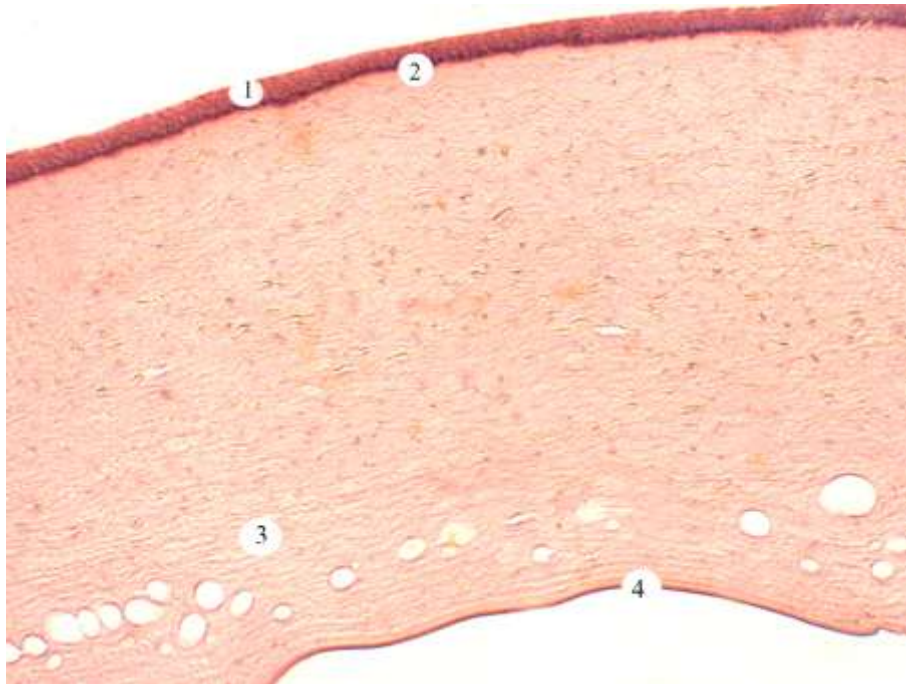


Рис. 3.28. Мікроскопічна будова ліофілізованої ксенорогівки. Передній епітелій (1), передня погранична пластинка (2), власна речовина (3), задня погранична пластинка (4). Забарвлення гематоксиліном-еозином. $\times 100$

Мікроскопічні дослідження за великого збільшення встановили поліморфізм змін клітин епітелію. Відмічається їх дезінтеграція, частина формує окремі скупчення, базальні клітини не мають упорядкованого розміщення, в окремих ділянках відшаровуються від передньої пограничної пластинки. Пікнотичні ядра епітеліоцитів базального шару забарвленні інтенсивно базофільно, парануклеарна зона цитоплазми просвітлена в порівнянні з клітинами інтактної рогівки.

Передня і задня пограничні пластинки чітко простежуються, проте, відмічено порушення структурного формування колагенових пластин, які їх утворюють. Товщина власної речовини також зменшується. Морфометрично встановлено її потоншення на 34 %, $p < 0,001$ (табл. 3.3).

Таблиця 3.3

Морфометричні показники переднього епітелію і власної речовини ліофілізованої ксенорогівки при різних методах консервування (M±m)

Показник	1 група (n=16)	4 група (n=15)	5 група (n=16)	p
	інтактна ксенорогівка	ліофілізована ксенорогівка	ліофілізована з кріопротектором ксенорогівка	
Загальна товщина рогівки, мкм	934,9±17,4	650,3±18,5	740,5±22,5	p ₁₋₄ <0,001 p ₁₋₅ <0,001
Товщина епітелію, мкм	52,2±1,8	38,0±1,1	44,7±1,4	p ₁₋₄ <0,001 p ₁₋₅ <0,001
Товщина власної речовини, мкм	867,4±8,5	570,2±7,2	680,0±7,8	p ₁₋₄ <0,001 p ₁₋₅ <0,005

У власній речовині ксенорогівки в умовах звичайної ліофілізації відмічені множинні оптичні пустоти, які неупорядковано розташовуються у цьому шарі. Просторова структура колагенових пластинок є значно порушеною (рис. 3.29). Виявлено зменшення числа фіброцитів, більшість з них мають пікнотично змінені ядра. Задня погранична пластинка на багатьох ділянках є відшарована від власної речовини. Задній епітеліальний шар рогівки також змінений, а на окремих ділянках відсутній.

Електронно-мікроскопічні дослідження ліофілізованої ксенорогівки встановили значні деструктивні зміни всіх її компонентів. У передньому епітелії спостерігаються пошкоджені клітини у всіх шарах. Епітеліоцити мають зменшені, пікнотично змінені ядра з нечіткими контурами каріолеми, у яких є інвагінації. Перинуклеарні простори не виявляються, як і ядерні пори. Каріоплазма і цитоплазма виглядають гомогенними. Органел мало і вони майже усі пошкоджені. Контури плазмолем нечіткі, значно розширені міжклітинні простори. Тонкофібрили або лізуються, або

зліпаються і утворюють осміофільні конгломерати. Десмосомальні контакти погано виявляються, значно пошкодженні (рис. 3.30). Плазмолемі базальних епітеліоцитів нещільно контактують з базальною мембраною, напівдесмосоми виявляються рідко.

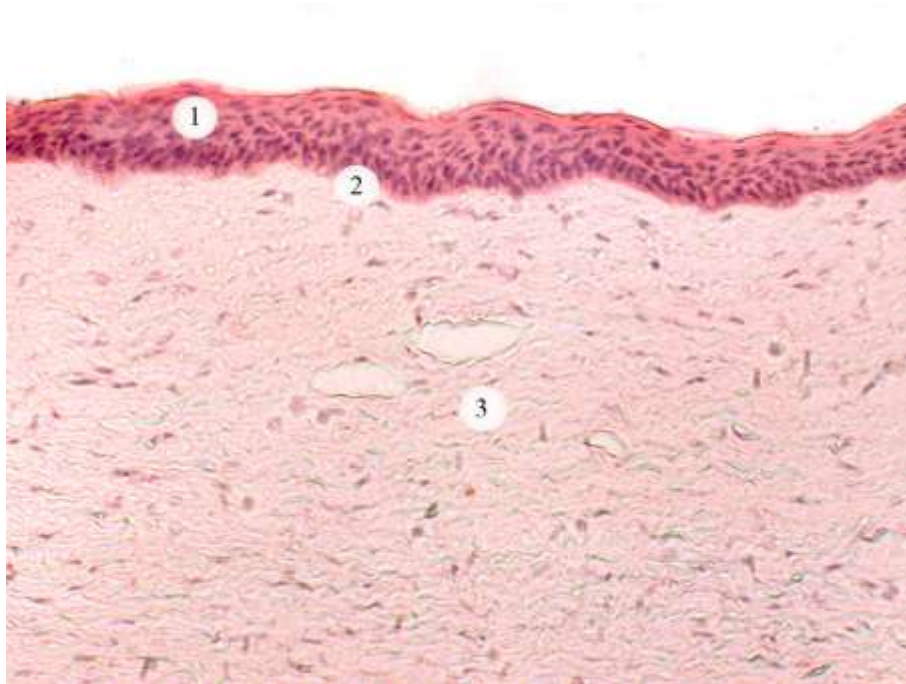


Рис. 3.29. Мікроскопічна будова ліофілізованої ксенорогівки. Передній епітелій (1), передня погранична пластинка (2), власна речовина (3). Забарвлення гематоксиліном-еозином. $\times 100$

Субмікроскопічно передня і задня пограничні пластинки втрачають свою структурованість, стають гомогенні, мікрофібрилярні компоненти не виявляються.

Власна речовина включає значно змінені фібробласти. Подовгасті ядра мають нерівні контури каріолеми, нечіткі ядерні мембрани і ядерні пори. Каріоплазма стає гомогенною, включає маленькі ядерця, або вони відсутні. Контури плазмолемі фібробластів нечіткі, потовщені, а відростки витончені. У цитоплазмі фіброцитів, яка нешироким обвідком оточує ядро, звертає увагу наявність чисельних вакуолеподібних структур. Органел мало і вони

пошкодженні. Канальці ГЕС і цистерни КГ фрагментовані. Виявляється мало М, вони мають світлий матрикс і зруйновані кристи, нагадують вакуолі. Також мало рибосом і полісом (рис. 3.31).

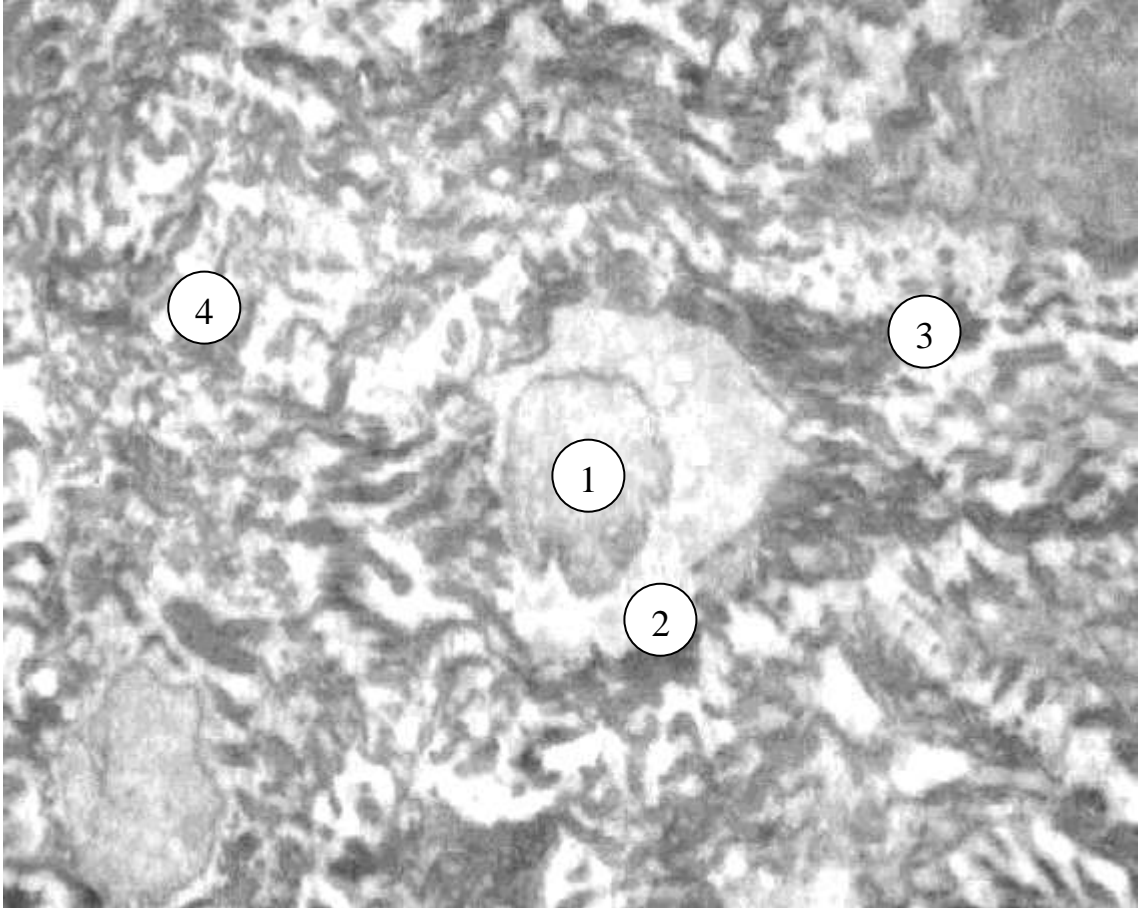


Рис. 3.30. Глибокі субмікроскопічні зміни епітеліоцитів переднього епітеліального шару рогівки після ліофілізації. Пікноз ядер (1), деструкція цитоплазматичних органел (2), ущільнення десмосом (3), розширенні міжклітинні простори (4). $\times 6000$

Сполучнотканинні пластинки широкі, неоднорідні за електронною щільністю, у них пошкодженні мікрофіламенти. Контури багатьох пластинок втрачають чіткість.

Субмікроскопічно епітеліоцити заднього епітеліального шару також значно деструктивно змінені.

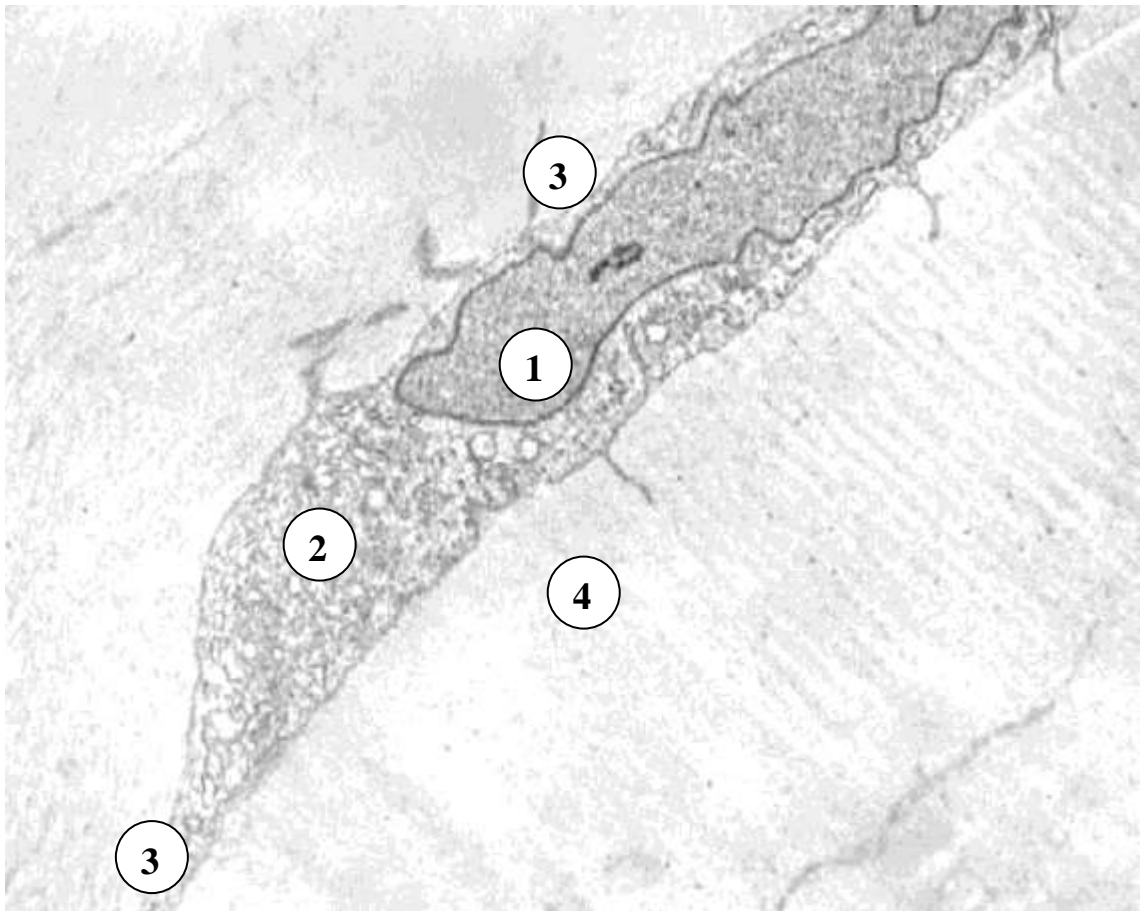


Рис. 3.31. Субмікроскопічний стан власної речовини ліофілізованої рогівки. Ядро (1) і цитоплазма (2) фіброцита, вузькі відростки (3), сполучнотканинні пластинки (4). $\times 5000$

Звертають увагу електронно-світлі вакуолеподібні і крупні, неправильної форми порожнини, які займають значну ділянку цитоплазми, іноді від задньої пограничної пластинки до апікальної частини клітин. Деструкція каналців ГЕС і цистерн КГ проявляється їх фрагментацією, вакуолізацією з пошкодженням мембран, що їх утворює. Окремі фрагменти структур цих органел ущільнюються, у таких ділянках гіалоплазма клітин стає осміофільною. Майже повністю зникають М, їх залишки нагадують вакуолі. У цитоплазмі мало рибосом і полісом, наявні осміофільні включення. Плазмолема апікальної частини епітеліоцитів нечітка, майже

немає мікрворсинок, спостерігаються поодинокі цитоплазматичні включення. Втрачається щільне прилягання базальної частини плазмолемі до задньої пограничної пластинки, наявні розмиті її контури та зруйновані ділянки (рис. 3.32). Ядра епітеліоцитів пікнотично змінені, неправильної форми з нерівною каріолемою. Каріоплазма електронно-щільна і гомогенна.

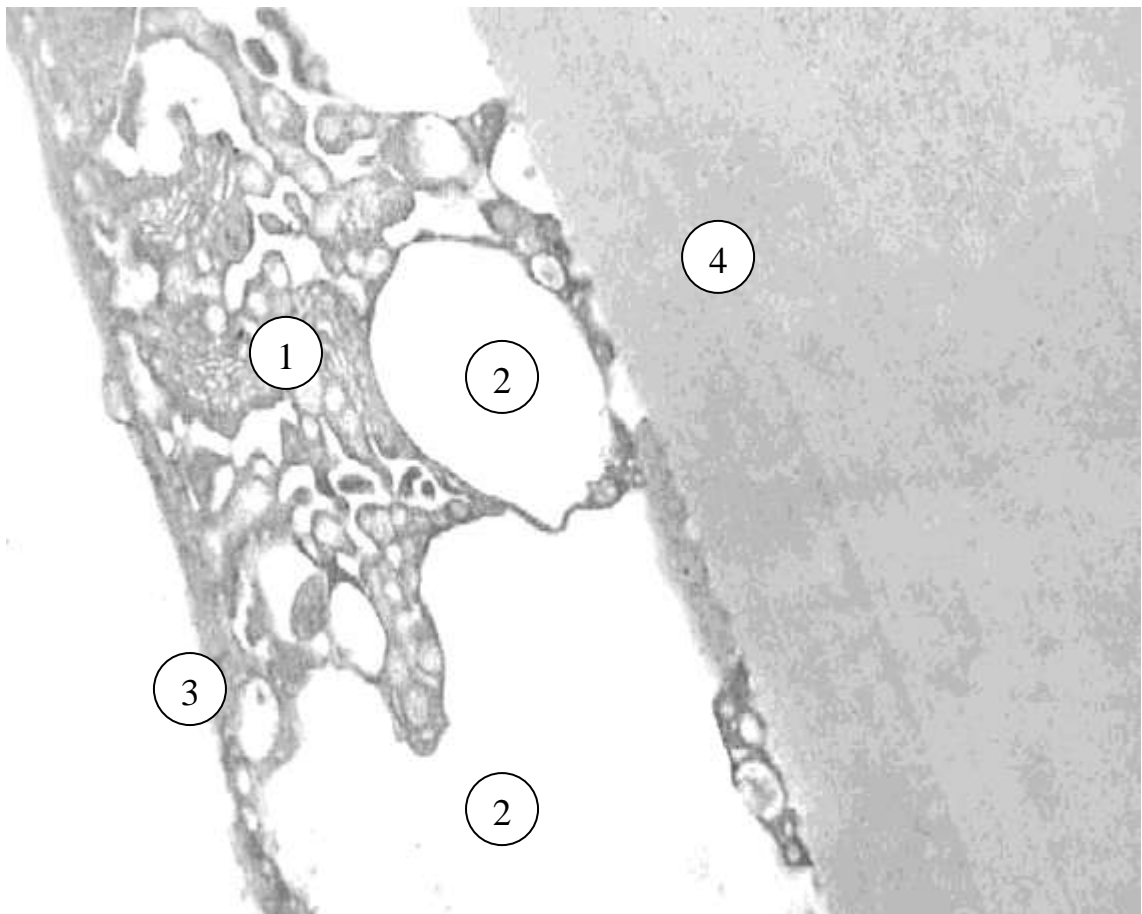


Рис. 3.32. Ультраструктурні зміни епітеліоцита заднього епітелію ліофілізованої рогівки. Глибока деструкція органел цитоплазми (1), значні вакуолеподібні порожнини (2), апікальна поверхня клітини (3), задня погранична пластинка (4). $\times 6000$

3.2.4. Морфологічний, морфометричний та ультраструктурний стан ліофілізованих з кріопротектором ксенотрансплантатів рогівки

Гістологічні і морфометричні дослідження структурної організації ліофілізованої ксенорогівки із попередньою еквілібрацією в ГЖС перед кріоконсервацією і ліофілізацією показали кращу збереженість компонентів трансплантата (рис. 3.33).

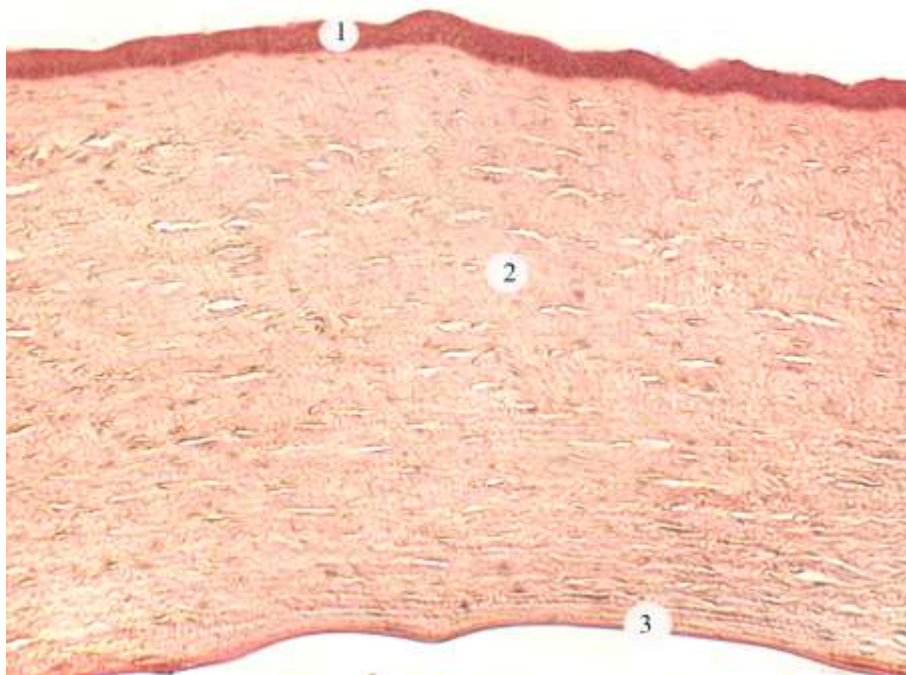


Рис. 3.33. Мікроскопічна будова ліофілізованої ксенорогівки після попередньої еквілібрації. Передній епітелій (1), власна речовина (2), задня погранична пластинка (3). Забарвлення гематоксиліном-еозином. $\times 100$

Після регідратації рогівки з використанням КП виявлено, що товщина переднього епітелію ксенорогівки дещо зменшилась і морфометрично товщина поверхневого епітеліального шару зменшувалась на 20 % у порівнянні з контролем ($p < 0,005$) (табл.3.3). Клітини цього шару зберігають свою форму. Передній епітелій щільно прилягає до пограничної пластинки. Округло-овальні ядра епітеліоцитів мають чіткі контури і забарвлені

базофільно менш інтенсивно. Задня погранична пластинка контурується краще чим передня, проте, структурна організація колагенових пластин зберігалась краще, ніж при звичайній ліофілізації. Що стосується власної речовини, то вона має пластинчасту структуру, але між пластинами колагену спостерігаються невеликі пусті щілини. Морфометрично товщина її зменшується на 27 % ($p < 0,005$) і становить $(680,0 \pm 7,8)$ мкм (табл. 3.3). Фіброцити мають веретеноподібну форму і паличковидні ядра. Задній епітеліальний шар рогівки представлений одношаровим плоским епітелієм із добре вираженим ядром зі світлою каріоплазмою (рис. 3.34).

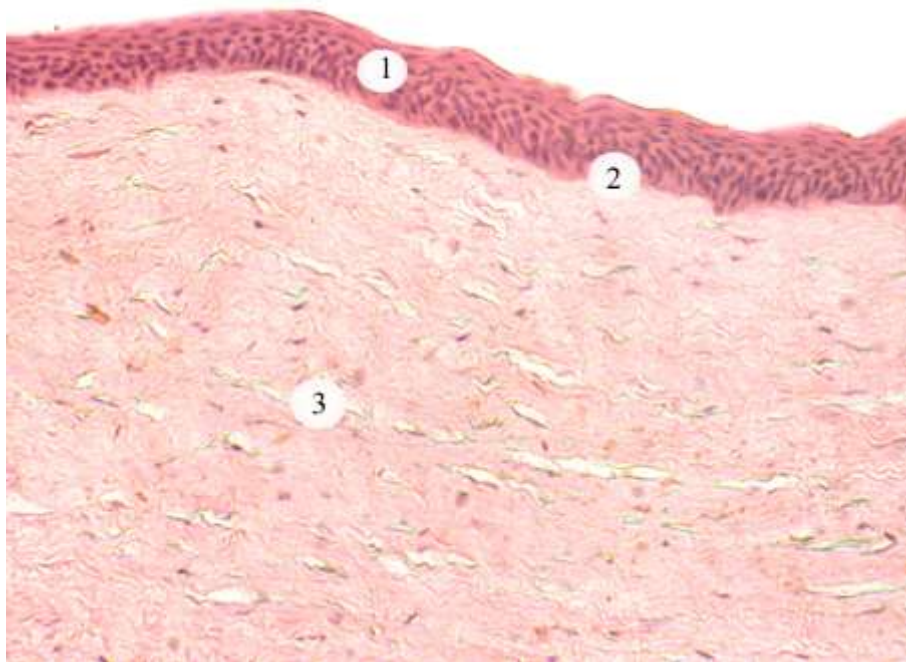


Рис. 3.34. Мікроскопічна будова ліофілізованої ксенорогівки після попередньої еквілібрації. Передній епітелій (1), передня погранична пластика (2), власна речовина (3). Забарвлення гематоксиліном-еозином. $\times 300$

Проведенні субмікроскопічні дослідження ліофілізованої після кріоконсервації рогівки встановили, що у всіх шарах переднього епітелію наявні зміни ядер і цитоплазми. Епітеліоцити поверхневого шару мають невеликі ущільнені ядра, окремі пікнотично змінені. Каріоплазма виглядає гомогенною, помірної електронної щільності, гетерохромія типових грудок

та ядерець не виявляється. Каріолема має нерівні контури, перинуклеарні простори дуже вузькі, а на окремих ділянках не виявляється тому, що зовнішня і внутрішня ядерні мембрани зливаються. Цитоплазма епітеліоцитів поверхневого шару займає невелику площу, у ній мало органел і вони частково пошкодженні. Тонкофібрили частково лізуються, або склеюються та утворюють конгломерати. Рибосом і полісом у цитоплазмі мало, а невеликі М поодинокі зі світлим матриксом та зруйнованими кристами. Міжклітинні простори частково збільшені та обмежені десмомами, які втрачають структурну організацію, стають гомогенно осміофільними (рис. 3.35).



Рис. 3.35. Субмікроскопічний стан епітеліоцитів поверхневого шару переднього епітелію рогівки після ліофілізації з використанням КП. Змінене ядро (1), світлі порожнини (2) у цитоплазмі. $\times 10000$.

Епітеліоцити проміжного шару переднього епітелію також змінені. Більшість ядер у клітинах мають нерівні контури за рахунок інвагінацій, каріолема місцями нечітка, перинуклеарні простори вузькі, на окремих ділянках внутрішня і зовнішня ядерні мембрани злипаються.

Плазмолеми виглядають потовщеними, на окремих ділянках втрачають чіткість. Спостерігається розширення міжклітинних просторів, руйнування частини десмосомальних контактів, лізис мікрофіламентів біля них. Цитоплазма епітеліоцитів виглядає просвітленою, у ній мало органел, значна частина їх пошкоджена. Тонкофібрил стає небагато, частина їх лізується. Частина утворює пучки за рахунок злипання. Характерними для епітеліоцитів цього шару є наявність у цитоплазмі різних розмірів вакуолеподібних структур, а також порожнин неправильної форми (рис.3.36).

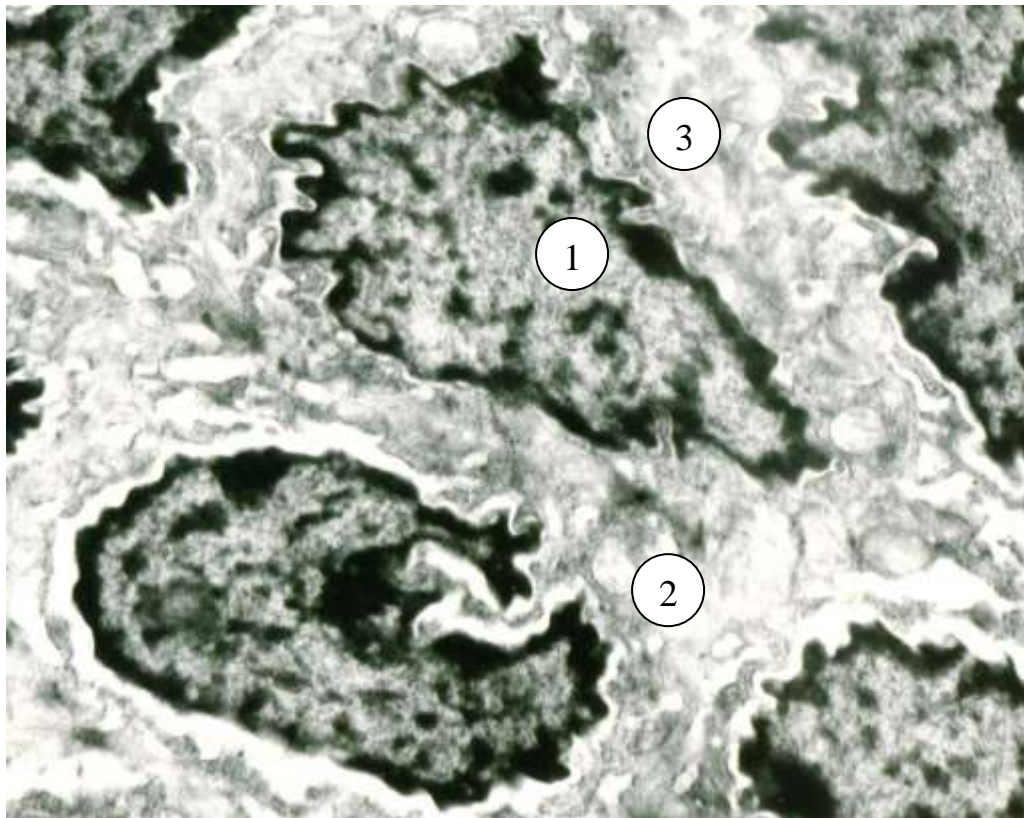


Рис. 3.36. Ультраструктурні зміни епітеліоцитів проміжного шару переднього епітелію ліофілізованої після кріоконсервування рогівки. Зменшені з гомогенною каріоплазмою ядра (1), вакуолеподібні структури цитоплазми (2), розширенні міжклітинні простори (3). $\times 9000$.

Субмікроскопічні дослідження епідермоцитів базального шару переднього епітелію рогівки встановили помірну збереженість плазмолем і каріолем у більшості клітин. Відмічається розширення міжклітинних просторів, які обмежені щільними, осміюфільними десмосомами. Ядра виглядають зменшеними, мають нерівні контури каріолеми за рахунок неглибоких інвагінацій. Каріоплазма має гомогенну структуру, у ній іноді є невеликі ущільнені ядерця. У цитоплазмі епітеліоцитів наявне злипання тонофіламентів, утворення електронно-світлих ділянок, у яких відсутні органели. Відмічається пошкодження органел, розширення і фрагментація каналців ГЕС, цистерн КГ. Встановлений поліморфізм структури М (рис. 3.37).

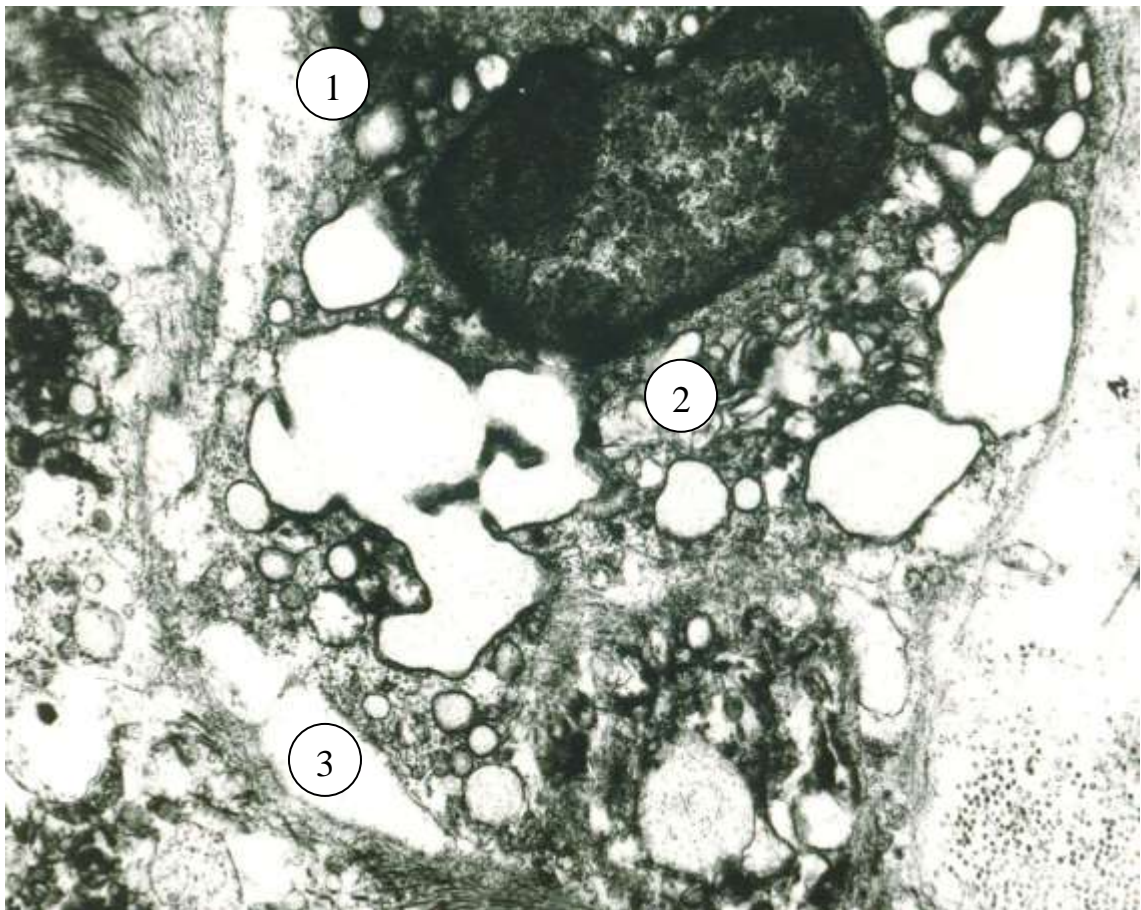


Рис. 3.37. Субмікроскопічний стан базальних епітеліоцитів ліофілізованої рогівки. Нечітка каріолема (1), пошкоджені структури цитоплазми (2), розширені міжклітинні простори (3). $\times 9000$.

Окремі з органел – невеликі з осміофільним матриксом і погано оконтурованими кристами, інші – збільшені, зі світлим матриксом і пошкодженими кристами. Напівдесмосомальні контакти з базальною мембраною виглядають нечіткими і їх небагато.

Субмікроскопічні дослідження власної речовини після кріоконсервування рогівки встановили, що змінюються, як фібробласти, так і сполучнотканинні пластинки. У передній частині власна речовина має неширокі пластинки частина яких має підвищену електронну щільність. Колагенові фібрили в них склеюються, гомогенізуються, втрачають упорядковане розташування. У частини пластинок спостерігається просвітлення матриксу та руйнування колагенових фібрил. Фібробласти цієї ділянки власної речовини значно витончені, мають незначну площу цитоплазми у навколоядерній зоні. Органел – мало, а підвищена осміофільність гіалоплазми не дозволяє їх чітко диференціювати. Ядро сильно витягнуте, добре контурується, проте, внутрішня ядерна мембрана потовщена, осміофільна, а перинуклеарний простір погано виявляється. Каріоплазма гомогенна, підвищеної електронної щільності, ядерце не спостерігається (рис. 3.38).

У середній ділянці власної речовини рогівки встановлена наявність більших за площею фібробластів, ті що в нормі активно функціонували. Вони також значно змінені і наявна деструкція їх компонентів.

Звертають на себе увагу ядра, що мають неправильну форму, значні інвагінації каріолеми. Ядерна оболонка потовщена, осміофільна, їх мембрани погано контуруються, а ядерні пори не виявляються. Каріоплазма однорідна, помірної електронної щільності. Невеликі ядерця досить осміофільні, невеликі, ущільнені. Навколо них відсутні рибосомальні гранули (рис. 3. 39).

Цитоплазма має помірну площу, але в ній просвітлена гіалоплазма і мало органел. Короткі, неширокі каналці ГЕС, невеликі цистерни комплексу Гольджі, окремі зі світлим матриксом мітохондрії, мало полісом свідчить про

низьку функціональну синтетичну активність фібробласта. Тому, біля плазмолеми не спостерігається таких колагенових фібрил, як це було встановлено в нормі.

Сполучнотканинні пластинки власної речовини у цій ділянці широкі, проте в них фібрилярні структури погано контуруються, тому виглядають гомогенізованими і просвітленими.

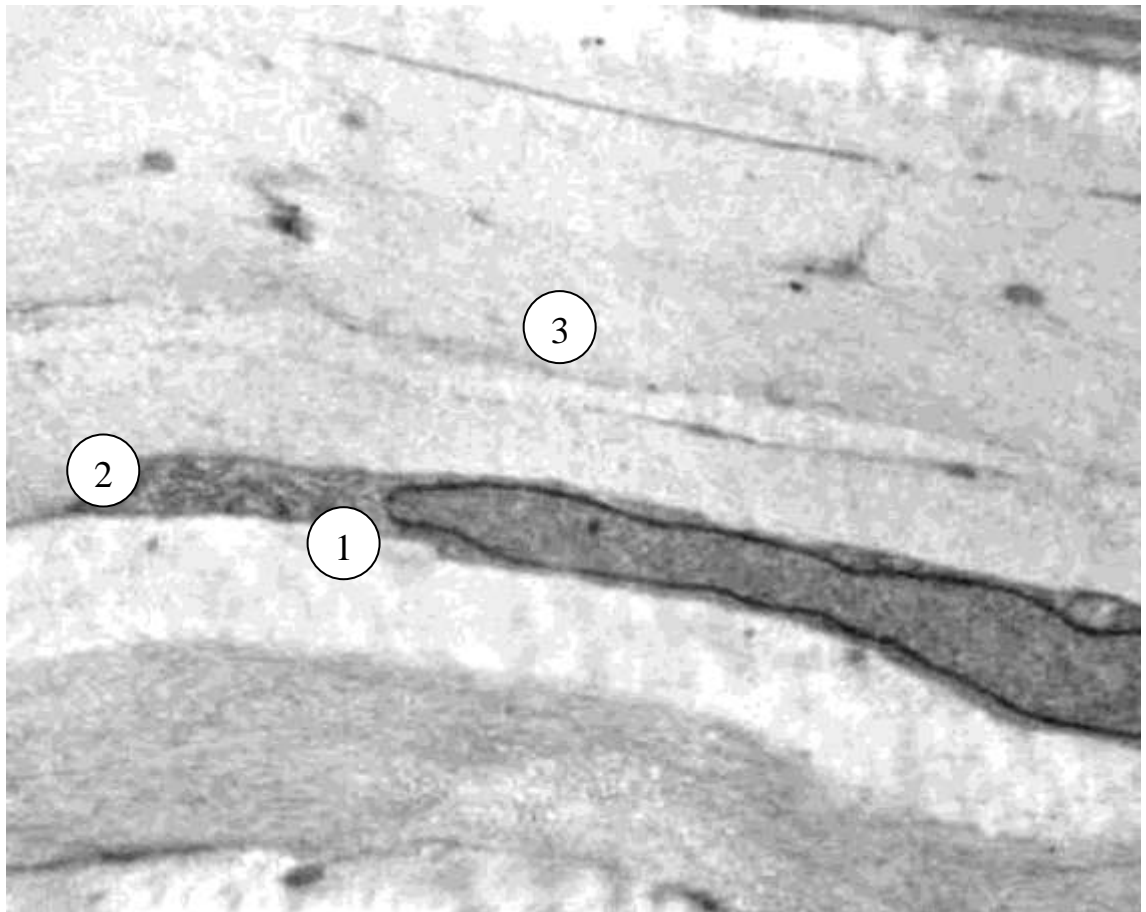


Рис. 3.38. Ультраструктурні зміни власної речовини рогівки після її кріоконсервування і ліофілізації. Фіброцит (1) з вузькими відростками (2), темні і світлі сполучнотканинні пластинки (3). $\times 5000$.

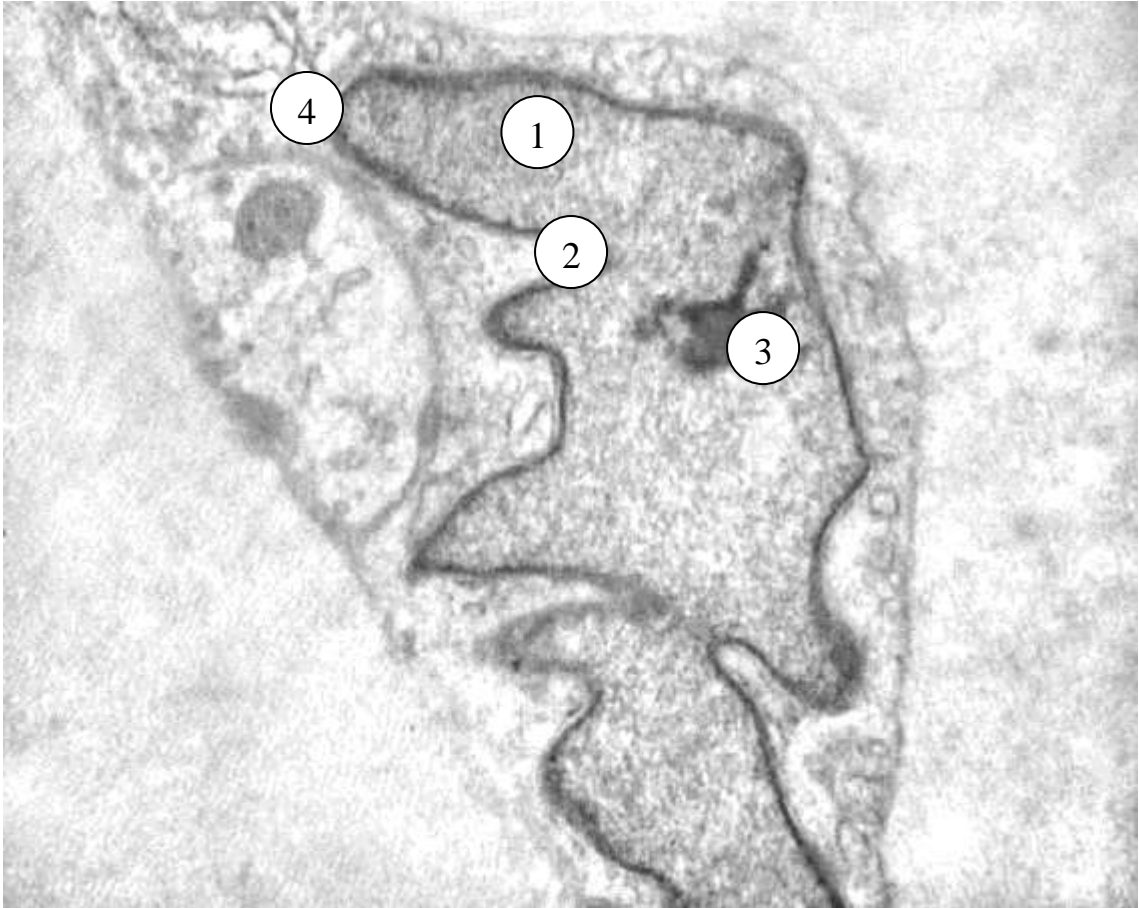


Рис. 3.39. Ультраструктурний стан власної речовини рогівки середньої частини ліофілізованої рогівки. Ядро (1) з глибокими інвагінаціями каріолеми (2), осміофільне ядерце (3), цитоплазма (4) фібробласта. $\times 15000$.

Ультраструктурна організація заднього епітеліального пласта рогівки при ліофілізації суттєво змінюється. Каріоплазма ядер і гіалоплазма клітин стають осміофільними, утворюються різної конфігурації і розмірів електронно освітленні порожнини. Контури плазмолем стають нечіткими, зливаються з цитоплазмою. На апікальній поверхні клітинної оболонки наявні вип'ячування і поодинокі невеликі мікроборсини. Ядра на окремих ділянках змінюють свою форму, мають інвагінації, каріолема нерівна, контури нечіткі, перинуклеарні простори місцями 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. Проте, хроматин не

так сильно конденсований і осміофільний, як при ліофілізації без КП (рис. 3.40).

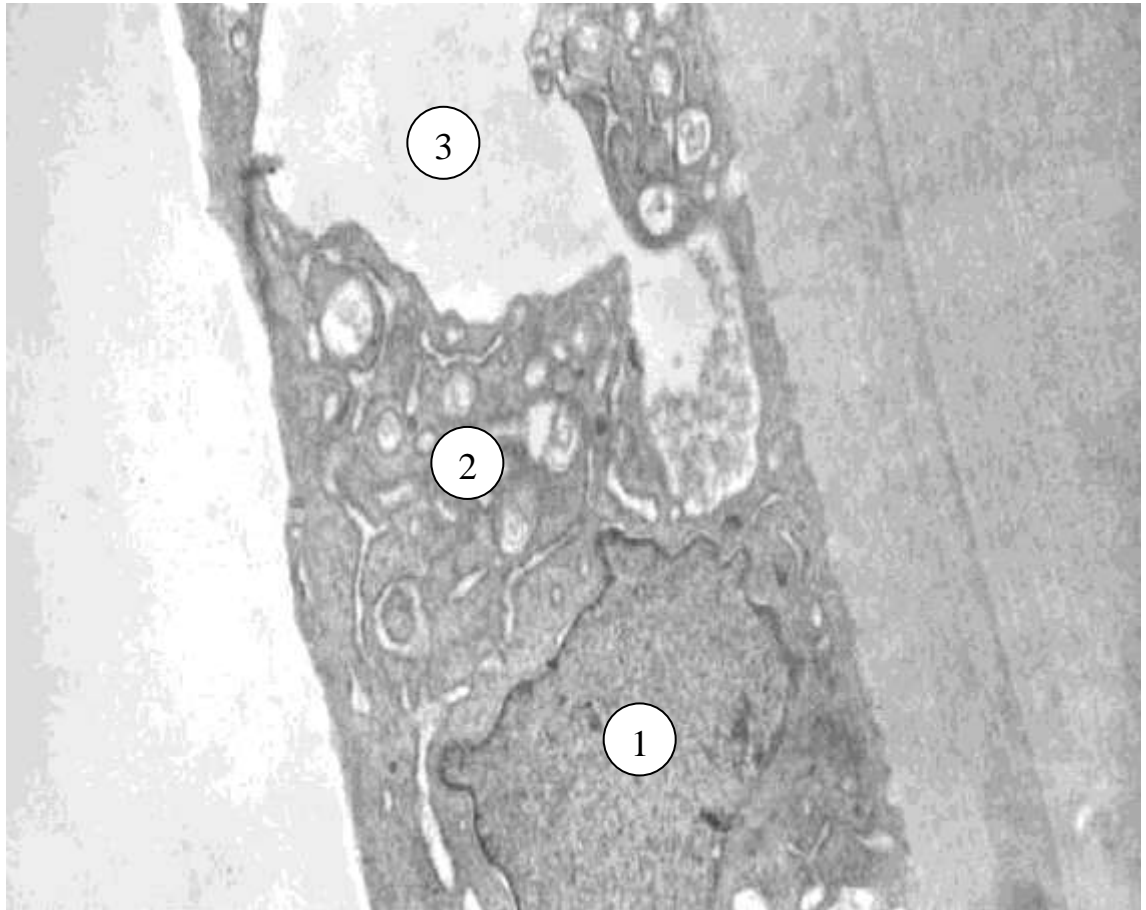


Рис. 3.40. Субмікроскопічні зміни заднього епітелію ліофілізованої ксенорогівки після кріоконсервування . Значна деструкція ядра (1) і цитоплазми (2), крупні вакуолеподібні структури (3). $\times 5000$.

Характерним є наявність в епітеліоцитах різних за розмірами вакуолеподібних структур. Вони біля задньої пограничної мембрани утворюють великі перетинки, неправильної форми. Частина таких структур утворюється за рахунок нерівномірного потовщення каналців ГЕС і цистерн КГ. Вакуолеподібними стають також М, у них пошкоджені кристи і світлий мітохондріальний матрикс. Між епітеліоцитами і пластиною Десцемета з'являється нерівномірна світла смужка і не простежуються напівдесмосомні пластинки.

Задня погранична пластинка зберігає однорідність, гомогенна, помірно осміофільна (рис. 3.40). Передня її частина, що розташована біля власної речовини рогівки, більшої електронної щільності і в ній фібрилярні структури погано виявляються.

Проведені дослідження ліофілізованої ксенорогівки показують, що такий метод консервування призводить до виражених морфологічних змін структурних компонентів рогівки. Встановлені деструктивні зміни незворотного типу, характеризуються ущільненням епітеліоцитів поверхневого шару, поліморфізмом змін клітин і ядер, вираженою руйнацією мембран ядра, органел, утворенням великих неправильної форми світлооптичних порожнин. У власній речовині рогівки наявні світлі пластинки з візованими фібрилами, значно змінені фіброцити.

Ліофілізована ксенорогівка після попередньої обробки в ГЖС і кріоконсервації, краще зберігає структуру всіх її компонентів на мікроскопічному і електронному мікрорівнях.

Встановлені зміни епітеліальних шарів та власної речовини свідчать про те, що такий метод консервування можна рекомендувати для застосування, як тимчасову біологічну пов'язку для закриття пошкоджених ділянок рогівки для її загоєння.

3. 3. Біохімічні зміни ксенорогівки при кріоконсервації та ліофілізації

Проведенні біохімічні дослідження показали, що інтактна ксенорогівка багата на протеоглікани (ПГ), які становлять $(0,86 \pm 0,03)$ у.о. Кріоконсервування призводить до зниження вмісту біохімічних показників, що вивчались. Так, вміст ПГ стає на 29,9 % меншим ($p < 0,001$). При ліофілізації рогівки цей показник знижується на 19,8 % від показника інтактної рогівки, $p < 0,01$ (табл. 3.4).

Таблиця 3.4 -

Вміст протеогліканів та їх складових компонентів у нормальній рогівці та при різних методах її консервації ($M \pm m$)

Показник	1 група, інтактна	2 група, кріоконсервована	3 група, ліофілізована	p
Протеоглікани, ум. од.	$0,86 \pm 0,03$	$0,61 \pm 0,04$	$0,69 \pm 0,03$	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} > 0,05$
Глікоз-аміноглікани, мг/кг	$80,8 \pm 2,8$	$70,4 \pm 1,9$	$70,6 \pm 2,9$	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
Сіалові кислоти, ммоль/кг	$6,58 \pm 0,13$	$4,02 \pm 0,29$	$4,75 \pm 0,29$	$p_{1-2} < 0,001$ $p_{1-3} < 0,01$ $p_{2-3} > 0,05$
Хондроїтин-сульфати, г/кг	$0,282 \pm 0,024$	$0,197 \pm 0,013$	$0,219 \pm 0,008$	$p_{1-2} < 0,05$ $p_{1-3} < 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$
Гіалуронова кислота, г/кг	$0,038 \pm 0,001$	$0,029 \pm 0,003$	$0,031 \pm 0,002$	$p_{1-2} > 0,05$ $p_{1-3} > 0,05$ $p_{2-3} > 0,05$

Аналогічна тенденція спостерігалась і при визначенні складових компонентів протеогліканів – глікозаміногліканів. У інтактній рогівці концентрація цієї біохімічної сполуки складає $(80,8 \pm 2,8)$ мг/кг сирової маси. Кріоконсервування та ліофілізація супроводжується зниженням концентрації

глікозаміногліканів, відповідно, на 16 % і 14 % ($p < 0,05$). Наведені результати, щодо зниження вмісту вуглеводної частини ПГ, вказують на більше ушкодження білкового компонента в молекулі ПГ у порівнянні з вуглеводневим компонентом.

Серед уронових кислот вуглеводневих компонентів глікозаміногліканів, у рогівці найбільш поширеною є гіалуронова кислота. Кріоконсервування і ліофілізація недостовірно знижують вміст гіалуронової кислоти у рогівці, відповідно, на 23,7 і 18,5 % від рівня інтактною рогівки, що вказує на здатність утримувати воду і зберігати свої нативні властивості.

При визначенні вмісту ХС, встановлені більші зміни показників у порівнянні з гіалурованою кислотою, однак зберігається подібна тенденція – менші зміни спостерігаються при ліофілізації рогівки.

Ще одним компонентом глікозаміногліканів є аміноцукри, вміст яких є критерієм руйнування ПГ. Проведені дослідження вказують на високий вміст сіалових кислот у рогівці – $(6,58 \pm 0,13)$ ммоль/л у перерахунку на N-ацетил нейрамінову кислоту (табл.3.4). При кріоконсервуванні і ліофілізації вміст сіалових кислот становить, відповідно, 61 % ($p < 0,001$) і 72 % ($p < 0,01$) від показника інтактною рогівки

Таким чином, проведені біохімічні дослідження засвідчили, що ксенорогівка характеризується значним вмістом ПГ. Задовільне збереження концентрації біохімічних сполук, що вивчались при кріоконсервуванні і ліофілізації, вказує на придатність таких способів консервування матеріалу з перспективою довготривалого зберігання.

3.4. Світлооптичні характеристики інтактної та консервованої різними способами ксеногенної рогівки

Виготовлення біологічного імплантату рогівки шляхом консервування ксеногенного субстрату вимагає неухильного дотримання технологічного регламенту, інакше готовий продукт відрізняється різко вираженими відмінностями світлооптичних параметрів, що є визначальним для кінцевого результату лікування на принципових засадах хірургічної чи оптичної пластики. Справедливість наведеного ствердження ілюструє зовнішній вигляд кріоліофілізованої рогівки (рис. 3.41) за умов неоднакового періоду витримування тканини перед зануренням у КП розчин.



Рис. 3.41. Зовнішній вигляд кріоліофілізованої рогівки свині: з запізненням моменту інкубації ізольованої тканини в кріопротекторному розчині (зліва) і своєчасно проведеної інкубації (справа).

Звертає увагу прозорість тканини консервованої рогівки при своєчасній обробці в кріопротекторному розчині (рис. 3.41 – справа) при повній непрозорості її за умов відстроченої інкубації (рис. 3.41 – зліва). При цьому слід відмітити, що спектральний склад випромінювання взірців прозорої і непрозорої ксенорогівок фактично залишається без суттєвих змін (рис. 3.42). Наведені зміни визначаються закономірностями фізичного та фізико-хімічного стану, який не супроводжується порушеннями хімічного складу біологічного субстрату. На це вказують результати дослідження спектрального складу поляризованої флуоресценції ксенорогівки при різних способах її технологічної обробки.

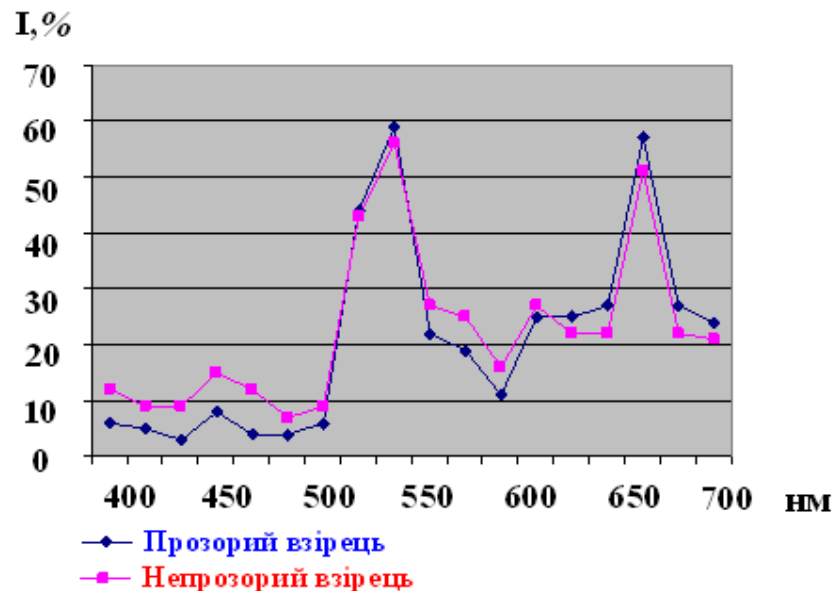


Рис. 3.42. Спектральний склад випромінювання кріоліофілізованих взірців рогівки свині: прозорого і непрозорого за методом поляризованої флуоресценції: ЛЮМАМ 8 МЗ/ФМЭЛ 1.

Дослідження світлооптичних властивостей ксенорогівки фотометричним способом виявило залежність їх від конкретного фізичного стану тканини. Проведенні дослідження показали, що рівень прозорості для потоку білого світла неоднаковий у інтактної, кріоконсервованої і

ліофілізованої рогівки. Підтверджено, що найвища прозорість належить інтактній ксенорогівці, зниженою вона зберігається у кріоконсервованій і найгіршою – у ліофілізованій рогівці.

Виходячи з цього, значний інтерес представляють дані реєстрації процесу прозорості інтактної ксенорогівки у процесі її висушування в звичайних умовах приміщення лабораторії, при 19°C і 70 % – вологості. Прозорість реєстрували фотометричним способом через кожні 30 с. Результати динаміки зміни світлооптичної прозорості рогівки в ході її підсихання наведені на графіку (рис. 3.43).

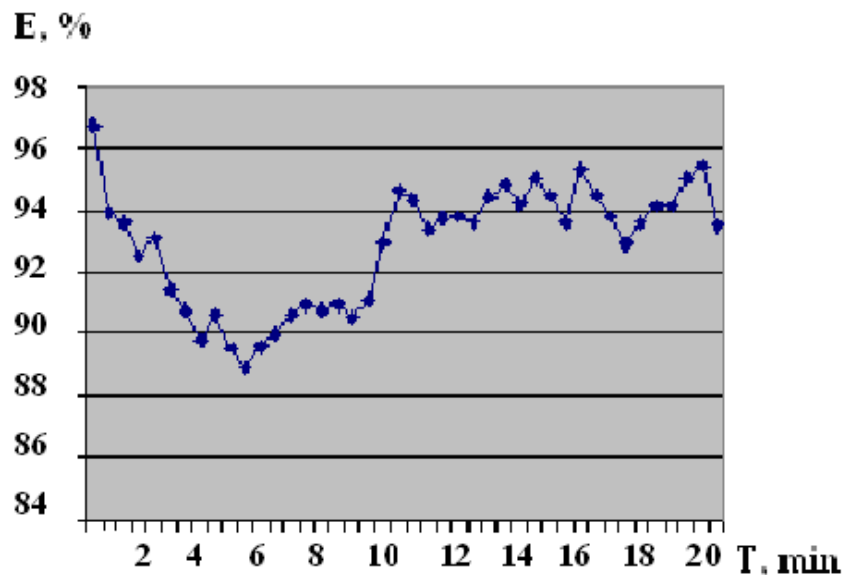


Рис. 3.43. Динаміка змін світлооптичної прозорості свіжо-отриманої кріоконсервованої ксенорогівки при денатурації, індукованої висушуванням.

Як видно із рисунка, прозорість тканини під час висихання має чітко виражений фазний характер. Легко помітити, що по мірі втрати вологи прозорість тканини рогівки суттєво падає, досягаючи максимального зниження в межах 6-7-хвилинного інтервалу. Проте поступово світлооптична прозорість знову зростає фактично до вихідного рівня.

Зменшення прозорості тканини у процесі висушування, пов'язане з деформацією її компонентів при дегідратації, що є загально визнаним фізичним процесом. Очевидно, із втратою води, якою була просочена

тканина, остання адекватно процесу дегідратації зазнає деформації. За відомими закономірностями фізико-хімічних процесів, що протікають у воді, в силу неминучого розриву водневих зв'язків між її молекулами у процесі випаровування зростають явища багато-кутового заломлення світла в тканині, яка містить набряклі водою волокна. Саме це спричиняє процес інтенсивного світлорозсіювання, який об'єктивно проявляється зниженням прозорості рогівки на вказаному етапі висушування. Наступний етап підвищення прозорості тканини, очевидно, є наслідком інтенсивнішого висихання тканини, волокна якої набувають більшої однорідності, в силу чого й настає ефект зменшення світлорозсіяння.

Встановлено, що взятим у дослідження взірцям інтактної, кріоконсервованої, а також кріоліофілізованої ксенорогівки притаманне характерне світіння у поляризованому світлі, що відображає їх вираженні анізотропні, а отже активні світлооптичні – рідкокристалічні властивості (рис. 3.44).



Рис. 3.44. Поляризована флуоресценція кріоконсервованої рогівки. Поляризаційний мікроскоп МС-200: об._x4; ок._x20

З наведених рисунків поляризованої флуоресценції кріоконсервованої ксенорогівки, видно поля з притаманним забарвленням переважно, у червоно-жовто-зеленій спектральній ділянці (рис. 3.45-3.47).



Рис. 3.45. Поляризована флуоресценція кріоконсервованої рогівки. Поляризаційний мікроскоп МС-200: об._x4; ок._x20



Рис.3.46. Поляризована флуоресценція кріоконсервованої рогівки. Поляризаційний мікроскоп МС-200: об._x4; ок._x20

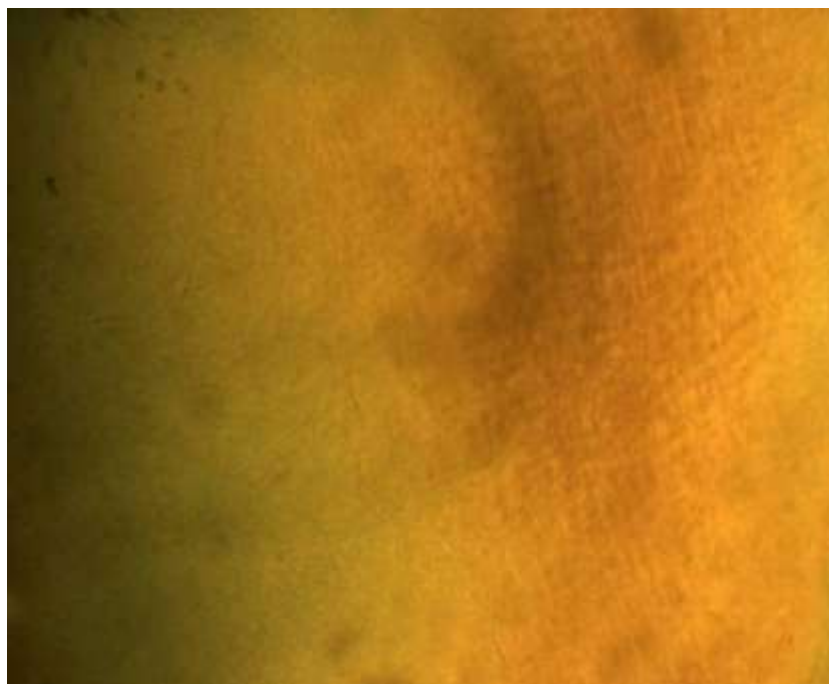


Рис. 3.47. Поляризована флуоресценція кріоконсервованої рогівки. Поляризаційний мікроскоп МС-200: об._x4; ок._x20

Спектральний склад випромінювання взірців ксенорогівки повністю відображає вказаний поліхромний розподіл взірців тканин у полі зору поляризаційного мікроскопу. Відповідно до встановлених спектральних характеристик відомих біологічно активних сполук, зокрема, ДНК і РНК, власне, наявність останніх у кріоконсервованій рогівці вказують дані проведеного спектрального аналізу (рис. 3.48-3.49).



Рис. 3.48 Поляризована флуоресценція кріоконсервованої рогівки. Поляризаційний мікроскоп МС-200: об._x4; ок._x20

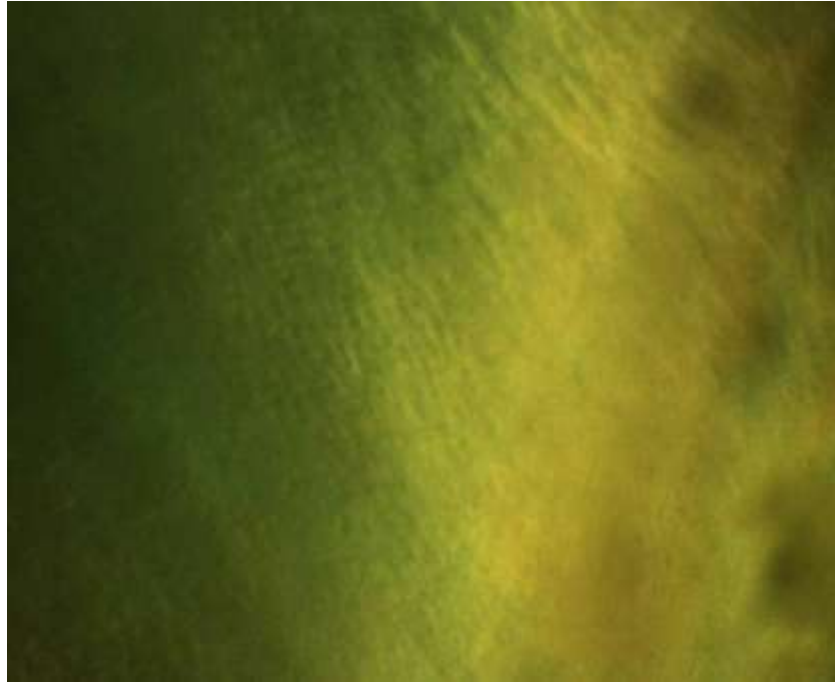


Рис. 3.49. Поляризована флуоресценція кріоконсервованої рогівки. Поляризаційний мікроскоп МС-200: об._x4; ок._x20

Так, піки кривих у ділянці 530 нм характеризують характер світіння ДНК-ядер клітин кріоконсервованої рогівки, тоді як криві в області 630 нм відображають вміст РНК-клітин. Проміжна ділянка пікових кривих (565-590 нм) характеризує наявність піримідинових основ, утворених, очевидно, у ході процесів реплікації ядерних ДНК.

Слід зауважити, що при збереженні принципових особливостей характеру спектрального складу випромінювання окремих взірців має деякі відмінності кількісного характеру, що є свідченням неоднорідності ксенорогівки за вмістом внутрішньоклітинних нуклеїнових кислот на різних ділянках. Вказана концентраційна неоднорідність за вмістом ДНК і РНК є лише свідченням високої біологічної активності ксенорогівки, що не спричиняє будь-яких проблем, щодо використання її, як біологічного імплантату при здійсненні оперативної кератопластики.

Особливий інтерес викликає характер світіння і загальна структура ліофілізованої ксеногенної рогівки на принципових засадах методу

поляризованої флуоресценції (рис. 3.50-3.53), для якого характерною є чітко виражена структура і переважне висвічування у зеленій ділянці спектру.



Рис. 3.50. Поляризована флуоресценція ліофілізованої рогівки. Поляризаційний мікроскоп МС-200: об._x4; ок._x20



Рис. 3.51 Поляризована флуоресценція кріоліофілізованої рогівки. Поляризаційний мікроскоп МС-200: об._x4; ок._x20

Очевидно, встановлені особливості поляризованої флуоресценції кріоліофілізованої ксенорогівки можуть бути взяті за критерій кондиційності при оцінці якісних властивостей біоімплантату, як виробу медичного призначення.

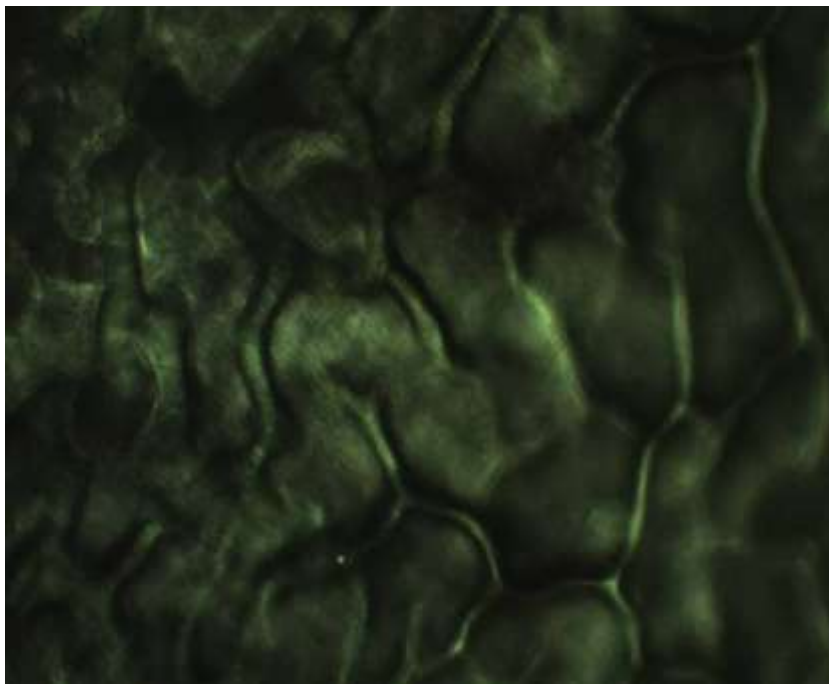


Рис. 3.52. Поляризована флуоресценція кріоліофілізованої рогівки. Поляризаційний мікроскоп МС-200: об._x10; ок._x20

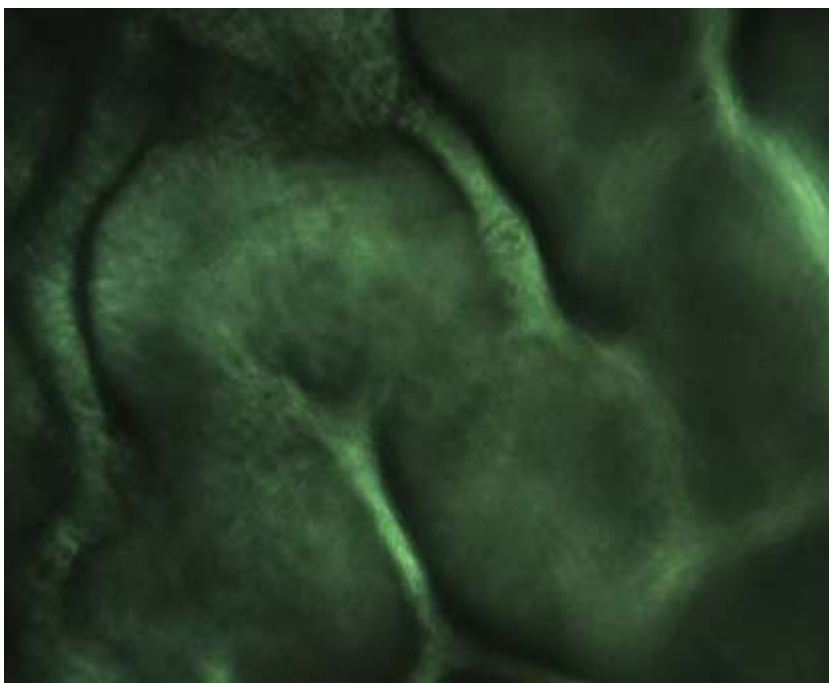


Рис. 3.53. Поляризована флуоресценція кріоліофілізованої рогівки. Поляризаційний мікроскоп МС-200: об._x20; ок._x20

Таким чином, цитоломінесцентний аналіз кріоконсервованої і ліофілізованої ксенорогівки встановив високий рівень нуклеїнових кислот, що є свідченням притаманного для них задовільного регенераторного потенціалу. Це підтверджується відповідністю характеру кривих спектрального складу випромінювання вмісту і біоенергетичному рівню ядерних ДНК і РНК. Феномен поляризаційної флуоресценції ксенорогівки вказує, що вона її макромолекули володіють властивостями рідких кристалів.

Дані цього розділу опубліковані у роботах: [23-29].

РОЗДІЛ 4

АНАЛІЗ ТА УЗАГАЛЬНЕННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ДОСЛІДЖЕННЯ

Аналіз статистичних закономірностей поширеності різних форм патології ока дозволяє прогнозувати прогресивне збільшення частки хворих із ураженнями рогівки, що вимагає планування і оптимізації допомоги даній категорії пацієнтів.

Доведено, що загальноприйняте консервативне лікування патології рогівки не завжди виявляється ефективним. Безуспішність консервативних методів лікування часто пов'язана з порушенням репаративно-регенеративних процесів, які призводять до загибелі ока [39, 220]. На основі даних про високі регенеративні властивості рогівки припускають необхідність у першу чергу використання операцій типу лікувального біологічного покриття [73]. З цією метою запропоновано використовувати різні донорські матеріали: рогівку, склеру, тверду мозкову оболонку, фасції, амніон [46, 59, 65, 68, 91, 114, 125, 126, 145, 175, 206, 211, 215].

Проте, від самого початку виникали такі проблеми, як забезпечення повноцінного якісного донорського матеріалу, вдосконалення техніки пересадки, боротьба з так званою хворобою трансплантата, викликаною несумісністю між донором і реципієнтом.

Звертає увагу те, що забір донорського матеріалу пов'язаний із низкою організаційних труднощів. Так, у багатьох країнах існують юридичні основи для забору трупного аллотрансплантаційного матеріалу. Дане питання поки остаточно не вирішене [64, 179, 168].

Глибоке розуміння біології рогівки, разом із вражаючим прогресом у мікрохірургічній техніці, а також використання протизапальних препаратів без сумніву покращили наслідки кератопластики. У результаті, сьогодні пересадка рогівки стала найкращим засобом боротьби з сліпотю, викликаною помутнінням рогівки [31, 34, 72, 84, 127, 167].

Таким чином, аналіз літератури вказує, що в питанні пересадки рогівки мають місце ряд невирішених вагомих правових, організаційних, методичних і медичних проблем. Труднощі з придбанням аллогенного трансплатаційного матеріалу, за умови постійного зростання попиту, вимагають пошуку і розробки нових методів його консервації, яка забезпечила б не тільки абсолютну стерильність, але й можливість отримувати трансплантат без будь-яких протипоказів та перехід на альтернативний забір від інших біологічних видів тварин, власне, ксеногенний матеріал [111, 129, 160, 164].

З огляду на вище вказане, висвітлюється актуальність проблеми, а проведене дослідження передбачає обґрунтування доцільності застосування свинячої рогівки для кератопластики на основі нових технологій консервації, зокрема, шляхом криогенної обробки, яка не змінює морфо-функціональний стан донорської ксенорогівки, із збереженням світлооптичних характеристик, зокрема прозорості.

На сьогодні, детальні гістологічні і особливо електронно-мікроскопічні дослідження, які дозволяють показати ступінь збереженості структур при різних методах консервування, проведенні недостатньо [101, 112, 162, 165, 138].

У представлений роботі комплексно вивчено морфо-функціональні властивості ксенорогівки при різних методах консервування. Наукові результати дозволять розробити технологію отримання консервованої рогівки з оптимальними властивостями для клінічного застосування.

Гістологічні дослідження ксенорогівки в умовах норми підтверджують загальні закономірності структурної організації її компонентів у порівнянні з рогівкою людини і висвітлені в багатьох літературних джерелах [13, 19, 148, 192, 208]. Епітеліоцити поверхневого шару зберігають строге пошарове розміщення. Базальні клітини щільним пластом лежать на чітко вираженій передній пограничній пластинці. У ксенорогівці зберігається специфічність

формування структурної організації власної речовини. Тобто, вона утворена трьома компонентами: колагеновими пластинами, клітинами і основною речовиною. Особливу увагу звертає строга орієнтація колагенових пластин, як і у рогівці людини, що описує більшість авторів [121].

На світлооптичному рівні виявлені особливості розміщення задніх епітеліальних клітин, які утворенні одношаровими клітинами, із чітко вираженими великими ядрами.

Результати наших досліджень підтверджуються даними літератури про субмікроскопічну будову ксенорогівки [98]. Її передній епітелій представлений трьома шарами клітин, які залежно від розташування відносно передньої пограничної мембрани, мають різну форму і будову та цілковито схожі за будовою з людською рогівкою [124].

Епітеліоцити поверхневого шару мають плоску, витягнуту форму, а їх ядра – еліпсоподібну і розташовані в центральній частині цитоплазми вздовж вісі клітин. Епітеліоцити розташовані щільно, клітини об'єднанні між собою щільними десмосомальними контактами, що характерно для нормальної рогівки. На апікальній поверхні епітеліоцитів наявні щільні замикальні контакти, які забезпечують повне відмежування від зовнішнього середовища. У цитоплазмі спостерігається висока щільність органел загального призначення. Вони представлені короткими каналцями ГЕС, невеликими за площею диктіосомами пластинчастого КГ, які включають короткі цистерни, окремі вакуолі і пухирці. Невеликі, округло-овальної форми мітохондрії розташовані поодинарно або перинуклеарно групами, мають помірної електронної щільності матрикс і не чисельні кристи. Встановлено, що ядра поверхневих епітеліоцитів характеризуються еліпсоподібною формою. Каріоплазма помірно осміофільна, відносно рівномірно забарвлена. Проміжний шар утворюють епітеліоцити неправильної, остистої форми. Плазмолемі їх також утворюють десмосомальні контакти. Ядра в цитоплазмі епітеліоцитів розташовані центрально мають округлу овальну форму, чіткі

контури каріолеми і вузькі перинуклеарні простори. Для ядер цього шару клітин характерним є наявність ядерця. Цитоплазма, як і клітини поверхневого шару має багато рибосом і полісом, тонофіламентів. Нечисельні мітохондрії мають округлу форму, розсіяні по цитоплазмі, частіше розташовані біля ядра.

Базальні епітеліоцити рогівки утворені одним шаром клітин, які прикріпленні плазмолемою до базальної мембрани напівдесмосомами. Округло-овальні ядра в них розташовані перинуклеарно базальної мембрани. Їх каріолема має чіткі рівні контури, поодинокі неглибокі інвагінації. Перинуклеарні простори вузькі і рівномірні, а ядерна оболонка має багато ядерних пор. Цитоплазма базальних епітеліоцитів включає багато органел. Виявлені поодинокі первинні лізосоми та грудки глікогену. Іноді, серед базальних епітеліоцитів виявляються клітини в стані мітозу, що характерно для гермінативного шару людської рогівки і описується в літературних джерелах [117, 118].

Встановлено, що базальна мембрана має два шари, глибокий – темний, у вигляді осміофільної стрічки і поверхневий – світлий. Базальна мембрана проходить у досить широку передню пограничну пластинку – мембрану Боумена. На ультраструктурному рівні ця пластинка побудована з аморфної речовини і колагенових фібрил, які розташовані безладно.

Найширшою частиною ксенорогівки, є власна речовина, яка складається з сполучнотканинних пластинок, основної речовини і клітин – фібробластів, як і людська рогівка [24, 25]. Колагенові волокна в складі сполучнотканинних пластин розташовані впорядковано, паралельно, хвилястими нитчастими структурами і оточені аморфною речовиною. Встановлено, що в початковій ділянці власної речовини рогівки (після передньої пограничної пластинки) пластинки вузькі або середньої товщини і переважно мають однаковий напрямок – паралельний мембрані Боумена. У передній ділянці власної речовини рогівки пластинки мають приблизно

однакову товщину, але різний напрямок [125]. Між пластинками розташовані плоскі відростчасті клітини – кератоцити. У результаті проведених досліджень встановлено, що в її власній речовині наявні три типи сполучнотканинних клітин – кератоцитів, які відрізняються за розмірами, ультраструктурною організацією і функцією. Крім типових дефінітивних форм фіброцитів, виділені молоді камбіальні клітини – фібробласти та зрілі фіброцити, що активно синтезують компоненти міжклітинної речовини.

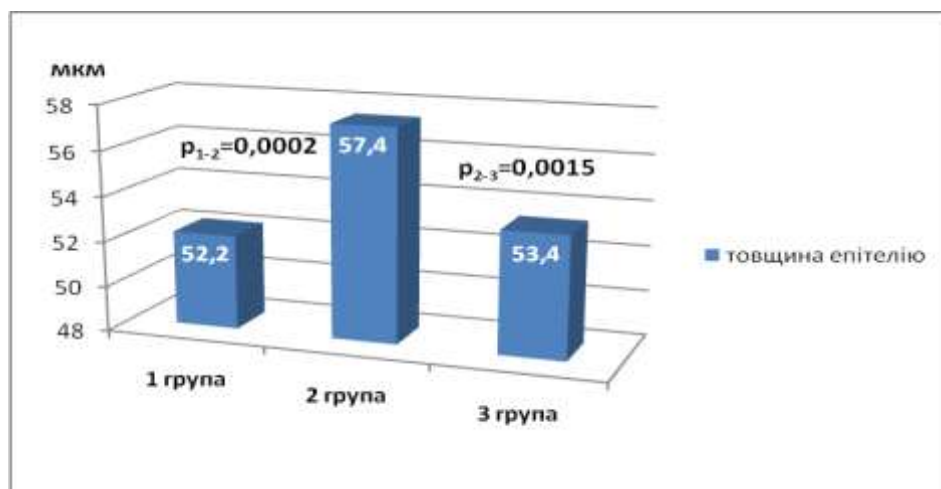
За власною речовиною рогівки розташована задня погранична пластинка – мембрана Десцемета. Основою цієї пластинки є однорідний, аморфний компонент, у який занурені тонкі фібрили з колагену. Передня частина оболонки має пластинчастий вигляд, складається з однорідних пластин колагенових волокон. Задня, яка ширша, має гранулярний вигляд, який описується в літературі [98].

Результати досліджень підтвердили дані зарубіжних науковців [101, 115, 116], що задній епітелій рогівки утворений одним шаром плоских, витягнутих клітин. На апікальній поверхні епітеліоцитів наявні короткі мікрворсинки. Ядра клітин мають округло-овальну або еліпсоподібну форму, відносно рівну каріолему, вузький перинуклеарний простір. Каріоплазма помірної електронної щільності, внаслідок вмісту еухроматину. У цитоплазмі наявні невеликі мітохондрії з чіткими кристами, окремі каналця ГЕС, вільні рибосоми.

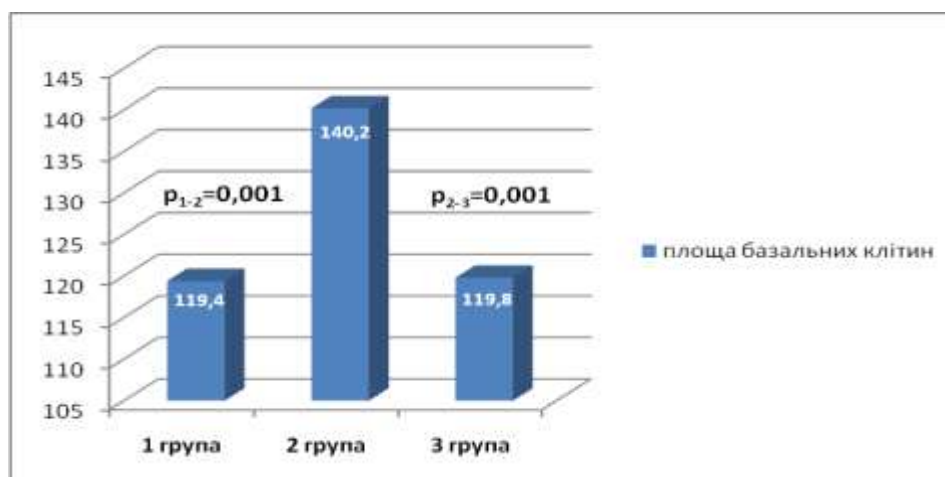
Згідно з поставленою метою і завданнями, були застосовані методи довготривалої консервації ксеноргівки, що ґрунтуються на кріоконсервації і ліофілізації після попередньої кріоконсервації. Згідно з даними літератури про збереженість трансплантатів при глибокому охолодженні (-196°C) в рідкому азоті цілого очного яблука (Capella Kaufman, Robbins) [107], застосовувалось кріоконсервування в рідкому азоті при температурі (-120°C).

Морфологічний стан епітеліального шару і власної речовини кріоконсервованої ксенорогівки подібний до норми, однак, виявлені помірні

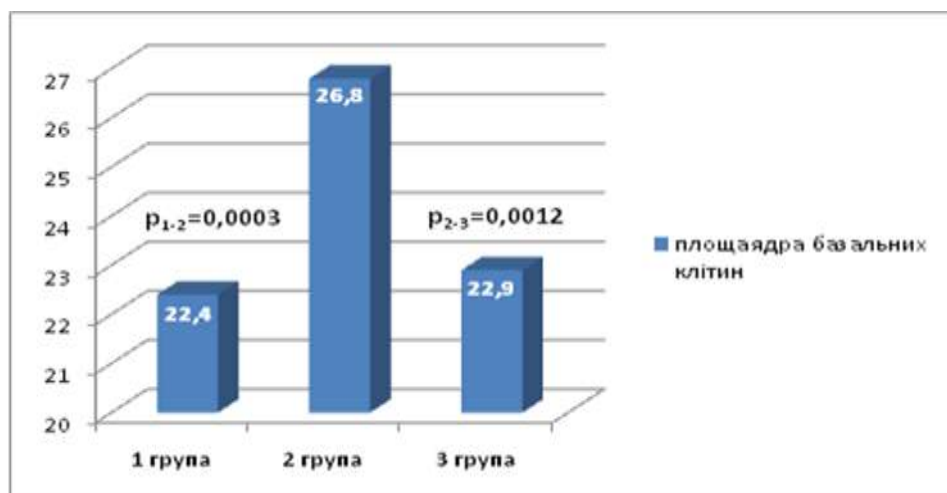
зміни її структурної організації. Встановлене достовірно морфометричне збільшення товщини структурних компонентів рогівки (рис. 4.1).



А



Б



В

Рис. 4.1. Морфометричні показники переднього епітелію ксенорогівки при різних методах зберігання: товщина епітелію (А), площа базальних клітин (Б), площа ядра базальних клітин (В)

Епітеліоцити базального шару видовжені, ядра в них з високою базофілією каріоплазми, що субмікроскопічно підтверджується збільшеною кількістю гетерохроматину. Цитоплазма клітин має більш оксифільне забарвлення в порівнянні з інтактною рогівкою. Матрикс мітохондрій епітеліоцитів просвітлюється, що свідчить про пригнічення функціональної активності клітин. Між епітеліоцитами на окремих ділянках є розширені міжклітинні простори. Також спостерігаються зони пошкодження ядерних і плазматичних мембран епітеліоцитів.

У власній речовині, в умовах звичайного кріоконсервування, утворювались невеликі неправильної форми електронно-прозорі порожнини, у яких мікрофібрили лізовані. Субмікроскопічно виявлені фіброцити з подовгастими ядрами, що мають значні інвагінації каріолеми, потовщені нечіткі ядерні мембрани, перинуклеарний простір вузький або не спостерігається. Цитоплазма оточує ядро вузьким обвідком, має світлі ділянки і мало органел.

Задній епітелій рогівки представлений одним шаром плоских клітин, що мають базофільні зменшені ядра, у яких каріолема з інвагінаціями. У цитоплазмі виявлені пошкоджені органели, особливо мітохондрії. Вони мають світлий матрикс, значно зруйновані нечіткі кристи, а частково і зовнішні мітохондріальні мембрани. слабо рожеву цитоплазму, яка оточена чіткою плазмолемою. Результати задовільно збереження структурної організації ксенорогівки відповідають даним, які вивчались при кріоконсервуванні рогівки людини [63].

Сучасна комбустіологія успішно використовує ГЖС для кріоконсервування [15, 26, 17]. Результати проведених досліджень доказали ефективність використання ГЖС і для консервування ксенорогівки. Отримані дані показали, що її структурна організація наближалась своїми показниками

до норми (рис. 4.1) і підтверджено окремими літературними джерелами [159, 174]

На препаратах ксенорогівки чітко виділені шари епітелію, передня і задня пограничні пластинки. Добре виражене пошарове розташування епітеліоцитів відносно передньої пограничної пластинки. Форма епітеліоцитів, інтенсивність забарвлення цитоплазми і ядер така ж, як у нормальній рогівці. У власній речовині ксенорогівки сполучно-тканинні пластинки зберігають свою правильну орієнтацію і погружені в основну речовину, а світлооптичні порожнини зустрічаються рідко і є невеликими. Добре виражені кератоцити з великими ядрами. Клітини заднього епітелію щільно прилягають до пограничної мембрани, зберігають плоску форму базофільні ядра.

Ультраструктурно встановлено, що у всіх структурних компонентах рогівки спостерігаються помірні зміни. Так, у епітеліцитах поверхневого шару переднього епітелію цитоплазма вміщує невеликі і середніх розмірів світлі вакуолоподібні порожнини. Гіалоплазма зберігає електронну щільність, проте, органел у ній спостерігається небагато. Мітохондрії мають світлий мітохондріальний матрикс і редуковані кристи. Такий стан органел в умовах даного консервування рогівки свідчить про пригнічення біосинтетичних і енергетичних процесів у клітинах поверхневого шару. Ядра епітеліоцитів зберігають структурну організацію її компонентів, в каріоплазмі переважає еухроматин. Клітини проміжного шару переднього епітелію рогівки показали, що в умовах цього методу консервування клітини зберігають свою форму, плазмолемі чітко контуровані, міжклітинні простори помірно розширенні, а десмосомальні контакти осміофільні і частково пошкоджені. Епітеліоцити базального шару добре збережені. Округло-овальні ядра орієнтовані переважно по довжині клітин, перпендикулярно до базальній мембрани. 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 хромосом. У мітохондріях базальних епітеліоцитів спостерігається часткове просвітлення матриксу та деструкція крист. У цитоплазмі наявні також рибосоми, короткі каналці ГЕС, цистерни і вакуолі КГ, які помірно розширені.

В умовах кріоконсервації субмікроскопічно, власна речовина рогівки добре збережена. Більшість сполучно-тканинних пластинок мають притаманну їм будову і розташування колагенових фібрил або паралельними ниткоподібними структурами, або у вигляді крупинок на перпендикулярному перерізі. Проте, на окремих ділянках пластинки мають вогнища просвітлення, де колагенові фібрили частково лізуються. Фібробласти мають переважно подовгасту форму, вузькі відростки. Еліпсоподібні ядра чітко контуровані мембранами каріолеми, перинуклеарні простори вузькі.

Субмікроскопічні дослідження заднього епітелію рогівки при кріоконсервації після еквілібрації ГЖС показали, що клітини зберігають усі компоненти, але вони відрізняються від норми. Хроматин у каріоплазмі однорідний, має помірну електронну щільність, ядерця спостерігаються рідко, вони маленькі, осміофільні. Плазмолема в апікальній частині епітеліоцита виглядає потовщеною, а мікрворсинки поодинокі і маленькі.

Результати проведених досліджень з використанням КП співвідносяться з даними зарубіжних авторів Hagenah M, Nelson JD і ін. [132, 133, 170,197, 105] про достатню збереженість ксенорогівки при кріоконсервації.

Описані критерії морфологічного стану кріоконсервованих ксенотрансплантатів підтверджують ефективність даного методу, яка полягає в тому, що низькотемпературний чинник та еквілібрація в ГЖС зумовлюють високу ступінь збереженості ксенорогівки.

При проведенні глибокого морфологічного дослідження ліофілізованої ксенорогівки, встановлено помітні деструктивні зміни її структурної організації. Товщина переднього епітеліального шару і власної речовини достовірно зменшувались.

Встановлено поліморфізм змін клітин епітелію. Відмічається їх дезінтеграція, частина формувала окремі скупчення, базальні клітини не мали впорядкованого розміщення, в окремих ділянках відшаровувались від передньої пограничної пластинки. Міжклітинні простори епітеліоцитів базального шару розширюються. Базофілія пікнотично змінених ядер клітин цього шару інтенсивніша, парануклеарна зона цитоплазми – просвітлена в порівнянні з клітинами інтактною рогівки. Каріоплазма і цитоплазма виглядають гомогенними. Органел мало і вони майже всі пошкоджені.

Субмікроскопічно передня і задня пограничні пластинки втрачають свою структурованість, стають гомогенні, мікрофібрилярні компоненти не виявляються. Морфометрично встановлено зменшення товщини власної речовини. Власна речовина включає значно змінені фібробласти. Подовгасті ядра мають нерівні контури каріолеми, нечіткі ядерні мембрани і ядерні пори. Каріоплазма стає гомогенною, включає маленькі ядерця, або вони відсутні. Органел мало і вони пошкоджені. Канальці ГЕС і цистерни КГ фрагментовані. Виявляється мало мітохондрій, вони мають світлий матрикс і зруйновані кристи, нагадують вакуолі. У власній речовині ксенорогівки в умовах звичайної ліофілізації відмічені множинні оптичні пустоти, які неупорядковано розташовувались у цьому шарі. Просторова структура колагенових пластинок є значно порушеною. Виявлено зменшення числа фіброцитів, більшість з них мають пікнотично змінені ядра.

Гольдфельд [32], коли вивчав гістологічну структуру ліофілізованих силікогелем рогівок, виявляв поодинокі деструктивні зміни кератоцитів. На запитання: «чому утворюються пусті простори між пластинками колагену?», можна відповісти наступним чином. При ліофілізації власну речовину

покидають ті молекули, які зустрічають на своєму шляху найменший опір, тобто молекули води, які займають міжпластинчастий “віртуальний” простір, що порушує осмотичний тиск на всіх рівнях. Для відновлення порушеної рівноваги вода переміщається з міжфібрилярного простору в міжпластинчастий. Вода вивільняється з міжпластинчастих просторів, звільняє рогівку, які першими починають заповнятися при регідратації.

Задня погранична пластинка на багатьох ділянках була відшарована від власної речовини. Субмікроскопічно епітеліоцити заднього епітеліального шару також значно деструктивно змінені. Звертають увагу електронно-світлі вакуолоподібні і крупні, неправильної форми порожнини, які займають значну ділянку цитоплазми, іноді від задньої пограничної пластинки до апікальної частини клітин. Ядра епітеліоцитів пікнотично змінені, неправильної форми з нерівною каріолемою. Каріоплазма електронно-щільна і гомогенна. Задній епітеліальний шар на окремих ділянках відсутній.

Гістологічні дослідження ліофілізованої ксенорогівки, яка попередньо піддавалась еквілібрації в ГЖС суміші показали кращу збереженість структурних компонентів трансплантата. Встановлено, що товщина переднього епітелію ксенорогівки дещо зменшилась (рис. 4.2).

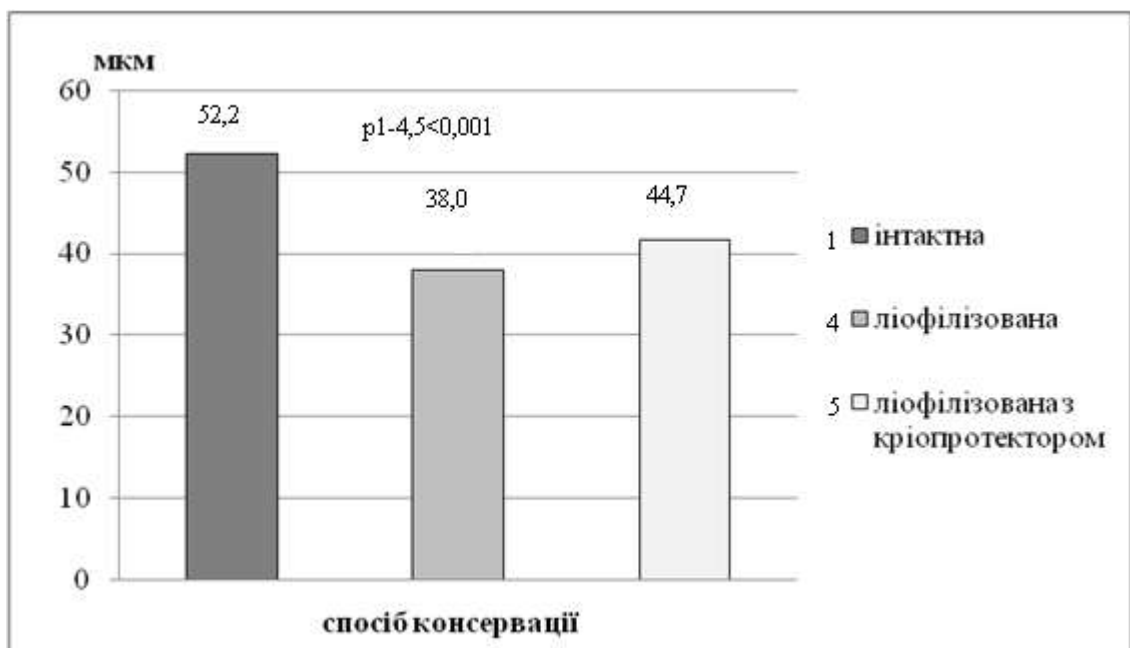


Рис. 4.2. Товщина епітелію рогівки при різних способах її консервації.

Клітини цього шару зберігали свою форму. Передній епітелій щільно прилягав до пограничної пластинки. Ядра епітеліоцитів мали чіткі контури з базофільним забарвленням. Виявлено, що задня погранична пластинка контурувалась краще, ніж передня. Проте, структурна організація колагенових пластин зберігалась краще, ніж при звичайній ліофілізації. Що стосується власної речовини, то вона мала пластинчасту структуру, але між пластинами колагену все ж були наявні невеликі пусті щілини. Морфометрично товщина її зменшувалась на 27 % (рис. 4.3). Фіброцити мали веретеноподібну форму і паличкоподібні ядра. Задній епітеліальний шар рогівки був представлений одношаровим епітелієм.

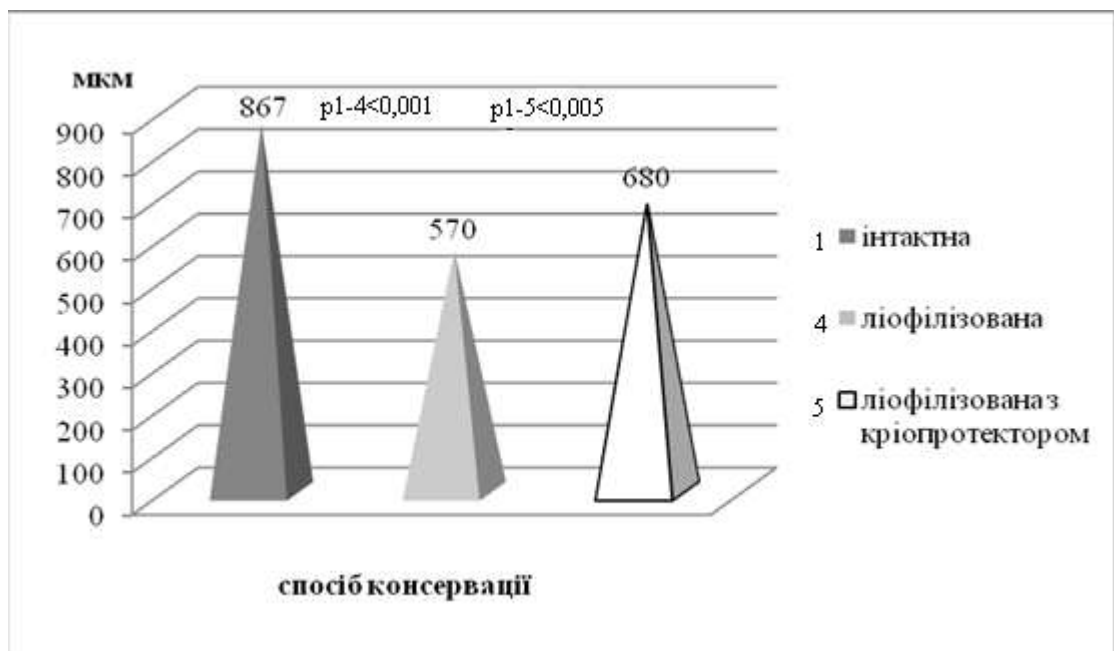


Рис. 4.3. Товщина власної речовини ксенорогівки при різних способах її консервації.

Ультраструктурно встановлено, що у всіх шарах переднього епітелію наявні зміни ядер і цитоплазми. Епітеліоцити поверхневого шару мають невеликі ущільнені ядра, окремі – пікнотично змінені. Каріоплазма виглядає гомогенною, помірної електронної щільності, гетерохромія типових грудок

та ядерець не виявляється. Каріолема має нерівні контури, перинуклеарні простори дуже вузькі, а на окремих ділянках не виявляється, тому що зовнішня і внутрішня ядерні мембрани зливаються. Цитоплазма епітеліоцитів поверхневого шару займає невелику площу, у ній мало органел і вони частково пошкодженні. Епітеліоцити проміжного шару переднього епітелію також змінені. Більшість ядер у клітинах мають нерівні контури за рахунок інвагінацій, каріолема місцями нечітка. Спостерігається розширення міжклітинних просторів, руйнування частини десмосомальних контактів, лізис мікрофіламентів біля них. Характерним для епітеліоцитів цього шару є наявність у цитоплазмі різних розмірів вакуолеподібних структур, а також порожнин неправильної форми. Субмікроскопічні дослідження епідермоцитів базального шару переднього епітелію рогівки встановили помірну збереженість плазмолем і каріолем у більшості клітин. Відмічається розширення міжклітинних просторів, які обмежені щільними, осміофільними десмосомами. Ядра виглядають зменшеними, мають нерівні контури каріолеми за рахунок неглибоких інвагінацій.

У власній речовині після кріоконсервування рогівки встановили, що змінюються, як фібробласти так і сполучнотканинні пластинки. У передній частині власна речовина має неширокі пластинки, частина яких характеризується підвищеною електронною щільністю. Колагенові фібрили в них склеюються, гомогенізуються, втрачають упорядковане розташування. Фібробласти цієї ділянки власної речовини значно витончені. У середній ділянці власної речовини рогівки встановлена наявність більших за площею фібробластів, тих, що в нормі активно функціонували. Вони також значно змінені, наявна деструкція їх компонентів.

Звертають на себе увагу ядра, що мають неправильну форму, значні інвагінації каріолеми. Ядерна оболонка потовщена, осміофільна, їх мембрани погано контуруються, а ядерні пори не виявляються. Каріоплазма однорідна, помірної електронної щільності. Цитоплазма має помірну площу, але в ній

просвітлена гіалоплазма і мало органел. Короткі, неширокі каналці ГЕС, невеликі цистерни КГ, окремі зі світлим матриксом мітохондрії, мало полісом свідчать про низьку синтетичну функціональну активність фібробласта.

Ультраструктурна організація заднього епітеліального пласта рогівки при ліофілізації суттєво змінюється. Каріоплазма ядер і гіалоплазма клітин стають осміофільними, утворюються різної конфігурації і розмірів електронно освітленні порожнини. Контури плазмолемми стають нечіткими, зливаються з цитоплазмою. Характерною є наявність в епітеліоцитах різних за розмірами вакуолеподібних структур. Вони біля задньої пограничної мембрани утворюють великі перетинки, неправильної форми. Частина таких структур утворюється за рахунок нерівномірного потовщення каналців ГЕС і цистерн КГ. Вакуолеподібними стають також мітохондрії, у них пошкодженні кристи і світлий мітохондріальний матрикс. Між епітеліоцитами і пластиною Десцемета з'являється нерівномірна світла смужка і не простежуються напівдесмосомні пластинки.

Виявлені в процесі кріоконсервації і ліофілізації морфологічні зміни в ксенорогівці пов'язані, головним чином, з втратою структурної води, а тому не супроводжуються суттєвими порушеннями трансконформаційних взаємовідносин на рівні біологічних макромолекул, особливо тих, що забезпечують новоствореному продукту властивості біотрансплантаційного матеріалу.

Вивчення біохімічного стану ксенорогівки, показали що вміст її біохімічних показників аналогічний складу людської рогівки, описаного Е.І. Ковальським (1980). Власна речовина рогівки, представлена білком колагеном та аморфною міжклітинною речовиною, що складається з глікопротегліканів, які в свою чергу, забезпечують прозорість ткинини. Проведенні дослідження показали, що інтактна ксенорогівка багата на ПГ. Кріоконсервування та ліофілізація супроводжуються зниженням

концентрації цієї біохімічної сполуки, що відмічено і іншими дослідниками [80]. Нами встановлено, що при кріоконсервуванні вміст їх зменшувався на 29,9 %, а при ліофілізації на 19,8 % (рис. 4.4).



Рис. 4.4. Вміст протеогліканів та їх складових компонентів у нормальній рогівці та при різних методах її консервації: 1гр. – норма; 2гр. – кріоконсервація; 3гр. – ліофілізація.

При дослідженні складових компонентів ПГ – глікозаміногліканів встановлено, що в інтактній ксенорогівці концентрація їх складала $(80,8 \pm 2,8)$ мг/кг сирової маси. При зберіганні в різних умовах вміст глікозамногліканів достовірно зменшувався. Аналізуючи представленні результати видно, що зниження вмісту вуглеводневої частини ПГ – глікозаміногліканів є меншим, ніж зменшення загальної фракції ПГ, що, у свою чергу, указує на більше ушкодження білкового компонента в молекулі ПГ.

Визначення вмісту сіалових кислот, які характеризують ступінь руйнування ПГ показали, що при консервуванні ксенорогівки, вміст цього показника достовірно зменшувався (рис.4.4).

Дослідження вмісту гіалуронової кислоти і ХС встановили, що внаслідок кріоконсервування і ліофілізації їхній вміст зменшувався.

Достовірність даних вказує на те, що при криоконсервуванні і ліофілізації здатність утримувати воду і зберігати свої нативні властивості зберігається (рис. 4.5).

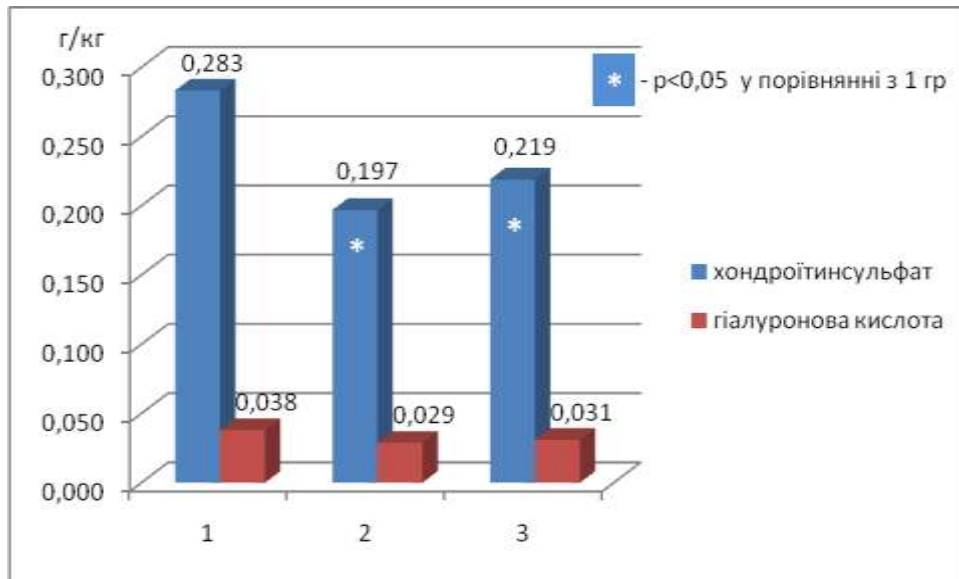


Рис. 4.5. Вміст складових компонентів протеогліканів (хондроїтинсульфату і гіалуронової кислоти) у нормальній рогівці та при різних методах її консервації: 1гр. – норма; 2гр. – криоконсервація; 3гр. – ліофілізація.

Отже, проведенні біохімічні дослідження встановили, що криоконсервація і ліофілізація суттєво не впливають на концентрацію глікопротеїнів і їх складових – глікозаміногліканів.

Особливої уваги заслуговують наукові дослідження про світлооптичні параметри консервованої ксенорогівки, з огляду на передбачене метою використання її, як біотехнологічного субстрату в пластичній офтальмології. Згідно з проаналізованими літературними даними [164, 165] встановлено, що світлооптичні властивості ксенорогівки залежать від її фізичного стану. Рівень прозорості для потоку білого світла неоднаковий у інтактної, криоконсервованої і ліофілізованої рогівки. У результаті дослідження встановлено, що найвища прозорість належить інтактній ксенорогівці,

зниженою вона зберігається у кріоконсервованій і найгіршою – у ліофілізованій рогівці.

Зниження прозорості тканини в процесі висушування, пов'язане з її деформацією при дегідратації і є загально визнаним фізичним процесом. Однак, подальше наростання світлооптичної прозорості відбувається за рахунок того, що при інтенсивному висихання тканини, її волокна набувають більшої однорідності, в силу чого й настає ефект зменшення світлорозсіяння.

У ході проведення поляризаційної флуоресценції кріоконсервованої і ліофілізованої ксенорогівок, встановлено, що їм характерні анізотропні властивості, тобто її макромолекулам притаманні особливості рідких кристалів.

За даними характеру спектрального складу випромінювання окремих взірців рогівки виявлено деякі відмінності кількісного характеру, що є свідченням неоднорідності її за вмістом внутрішньоклітинних нуклеїнових кислот на різних ділянках. Останній факт є свідченням високої біологічної активності ксенорогівки, що не спричиняє будь-яких проблем, щодо використання її, як біологічного імплантату при здійсненні оперативної кератопластики.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення і нове вирішення наукового завдання, що полягає у встановленні закономірностей морфологічних змін ксенорогівки при різних методах консервування. Результати проведених мікроскопічних, ультраструктурних, морфометричних, біохімічних та фізичних досліджень встановили ступінь збереження структурних компонентів рогівки при кріоконсервуванні і ліофілізації.

1. Комплексні морфологічні дослідження рогівки свиней у нормі не встановили видових особливостей у структурній організації її компонентів. Субмікроскопічно у власній речовині ксенорогівки виявлені три типи кератоцитів, які відрізняються за розмірами, формою та структурною організацією. Крім типових дефінітивних фіброцитів, наявні камбіальні клітини – фібробласти та зрілі фібробласти, які активно синтезують компоненти міжклітинної речовини.

2. Кріоконсервування ксенорогівки без кріопротектора призводить до морфологічних змін її структурної організації, що характеризується порушенням будови епітеліоцитів у всіх шарах переднього епітелію, пошкодженням плазматичних, ядерних і органоїдних мембран, утворенням неправильної форми світлооптичних порожнин у власній речовині, унаслідок лізису колагенових пластинок. Морфометрично параметри компонентів кріоконсервованої ксенорогівки статистично відрізняються від показників інтактною рогівки, зокрема, збільшується товщина переднього епітелію на 10 %, порівняно із нормою ($p < 0,01$), площа базальних клітин – на 17 %, а їх ядер – на 19 % ($p < 0,001$).

3. Кріоконсервування рогівок свиней з кріопротектором забезпечує високий ступінь збереженості клітин епітеліальних шарів та її власної речовини, структурованість мембран ядер і органел, сполучнотканинних пластинок і кератоцитів власної речовини. Морфометричні показники

структурних компонентів рогівки при її кріоконсервації з кріопротектором змінюються статистично недостовірно.

4. Ліофілізація ксенорогівки призводить до статистично значимих морфологічних змін усіх її структурних компонентів. Деструктивні зміни епітеліоцитів, кератоцитів і сполучнотканинних пластинок носять незворотній характер, проявляються пікнозом ядер, руйнуванням органел, утворенням неправильної форми світлооптичних порожнин у власній речовині. На 31 % зменшуються загальна товщина ксенорогівки, на 27 % – товщина епітеліальної пластинки, на 34 % – товщина власної речовини ($p < 0,001$).

5. Ліофілізація ксенорогівки після кріоконсервації з використанням кріопротектора зменшує ступінь пошкодження її структурних компонентів – плазматичних, ядерних і органоїдних мембран, компонентів власної речовини у порівнянні із звичайною ліофілізацією. Загальна товщина ксенорогівки зменшується на 21 %, епітеліальної пластинки на 14 %, власної речовини на 27 %, ($p < 0,001$).

6. Біохімічні дослідження інтактної рогівки встановили високий вміст неколагенових компонентів – протеогліканів у ксенорогівці в нормі ($0,86 \pm 0,03$) у.о. та їх складових – глікозаміногліканів ($80,8 \pm 2,78$) мг/кг сирої маси. Задовільне збереження при кріоконсервуванні і ліофілізації концентрації біохімічних сполук (протеогліканів, відповідно, ($0,61 \pm 0,04$) і ($0,69 \pm 0,03$) у.о., $p < 0,01$, глікозаміногліканів – ($70,4 \pm 1,98$) і ($70,6 \pm 2,99$) мг/кг, $p < 0,05$, а також хондроїтинсульфату і сіалових кислот ($p < 0,05$), вказує на можливість використання таких способів консервування рогівки свиней.

7. Фотометричні дослідженнями встановили поступове прогресуюче зниження прозорості при кріоконсервації і особливо при ліофілізації у порівнянні із прозорістю інтактної рогівки. Люмінісцентний аналіз кріоконсервованої з кріопротектором і ліофілізованої після кріоконсервування ксенорогівки встановив високий вміст нуклеїнових

кислот, що вказує на притаманність для неї хорошого регенераторного потенціалу.

8. Методи кріоконсервування і ліофілізації з кріопротектором можна рекомендувати для довготривалого зберігання донорських ксенорогівок і використання їх у практичній медицині, як кератопластичного матеріалу, з попереднім проведенням доклінічних досліджень в офтальмології.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Абрамов В. Г. Лечебная послойная кератопластика мелитированным материалом / В. Г. Абрамов, Н. А. Маркичева // Офтальмол. журн. – 1983. Т.–258, №2. – С.81–83.
2. Автандилов Г. Г. Введение в количественную патологическую морфологию / Г. Г. Автандилов. – М. : Медицина, 1980. – С. 216.
3. Автандилов Г. Г. Медицинская морфометрия /Г. Г. Автандилов. – М. : Медицина, 1990. – 384 с.
4. Афанасьева Ю. И. Гистология / Ю. И. Афанасьева, Н. А. Юрина. – М. : Медицина, 1999. – 745 с.
5. Бабенко Г. А. Микроэлементы в экспериментальной и клинической медицине / Бабенко Г. А. – Киев, 1965. – 200 с.
6. Батманов Ю. Е. Применение свежего амниона в лечении заболеваний роговицы / Ю. Е. Батманов, К. С. Егорова, Л. Н. Колесникова // Вестн. офтальмол. – 1990 – Т.106, №5 – С. 17–19.
7. Беляев В. С. Использование роговицы плода для рефракционной кератопластики / В. С. Беляев // Вестник офтальмологии. – 1972. – № 6. – С. 47–51.
8. Беляев В. С. Операции на роговой оболочке / В. С. Беляев. – М. : Медицина. – 1984. – 120 с.
9. Берлин Л. Б. Морфология кожи после ожогов и свободной пересадки / Л. Б. Берлин. – Л. : Медицина, 1966. – С. 223.
10. Бикбова Г. М. Эпикератопластика с использованием незамороженной донорской роговицы в лечении кератоконуса : Автореф. дис. ... к. мед. наук.. – Уфа. – 2007. – 23 с.
11. Бігуняк В. В. Консервування ауто- і ксенотрансплантанта для відновлення втраченої шкіри у опечених хворих: дис. ... доктора мед. наук / – Бігуняк Володимир Васильович. – Тернопіль, 1994. – С. 275.
12. Бігуняк Т. В. Ультраструктура ксенодермотрансплантантів при використанні гліцерин-жовткової суміші для низькотемпературного зберігання та кріоконсервування / Т. В.

- Бігуняк, А. В. Довбуш, К.С. Волков // Буковинський медичний вісник. – 2001. – Т.5, №3 – 4. – С. 16–17.
13. Вит В. В. Особенности репарации поврежденных эпителия роговицы и хрусталика у животных, подвергшихся хроническому воздействию малых доз ионизирующей радиации интенсивному световому облучению / В. В. Вит, Э. В. Мальцев // Офтальм. журн. – 1998. – №1.– С. 69–73.
14. Войно-Ясенецкий В. В. Тканевая несовместимость и пути ее преодоления / В. В. Войно-Ясенецкий. – М. : Медицина, 1965. – С. 112–151.
15. Войно-Ясенецкий В. В. Метаплазия тканей глаза при осложненном раневом процессе / В. В. Войно-Ясенецкий // В кн.: Условия регенерации органов и тканей у животных. – М., 1965. – С. 45–49.
16. Войно-Ясенецкий В. В. О природе и регенерационных свойствах клеток стромы и эндотелия роговицы / В. В. Войно-Ясенецкий // В кн.: Материалы 3-й конференции по вопросам регенерации клеточного размножения. – 1962. – С. 28–30.
17. Волков К. С. Ультраструктурний стан епідермоцитів ксенотрансплантантів при консервуванні у гліцерин-жовтковій суміші / К. С. Волков, Л. В. Якубишина, О. П. Андрійшин і співавт. // Здобутки клінічної та експериментальної медицини. – 2001. – №6. – С. 79–80.
18. Выленгала Э. Н. [Роль «глазных банков» в развитии кератопластики](#) / Э. Н. Выленгала, А. К. Донцов, А. К. Юревич // Русский мед. журнал. – 2001. – №4.– С. – 169–178.
19. Гистология. Введение в патологию / под. ред. Э. Г. Улумбекова, Ю. А. Челнышева. – М.: ГЭОТАР Медицина, 1998. – 949 с.
20. Гольдфельд Н. Г. Влияние высушивания силикогелем на стерильность донорской роговицы при ее экспериментальном заражении / Н. Г. Гольдфельд, Л. И. Писменник // Вестник офтальмологии – 1969. – № 2. – С. 45–51.
21. Гольдфельд Н. Г. Изучение иммунных реакций при частичной послойной пересадке высушенной роговице / Н. Г. Гольдфельд, Т. Л. Бажина // Вестник офтальмологии. – 1967. – №6. – С. 28–31.

22. Гольдфельд Н. Г. Исследование прозрачности консервированной роговицы с помощью монохроматора УМ 2 / Н. Г. Гольдфельд, К. Н. Лоскутов : материалы конф. [“Вопросы научно – медицинского общества офтальмологов”]. – Орджоникидзе. – 1970. – С. 150–152.
23. Гребеник І. М. Морфологічна характеристика і біохімічні показники ксенорогівки при кріоконсервації і ліофілізації / І. М. Гребеник, К. С. Волков, І. М. Кліщ // Вісн. наукових досліджень. – 2009. – № 3. – С. 67–69.
24. Гребеник І. М. Морфологічний стан ксенотрансплантатів рогівки при використанні гліцерин – жовткової суміші для кріоконсервування / І. М. Гребеник, К. С. Волков, М. В. Турчин // Вісник морфології. – 2008. – № 14 (1). – С. 138–141.
25. Гребеник І. М. Морфологічний стан ліофілізованих ксенотрансплантатів рогівки / І. М. Гребеник // Вісник морфології. – 2008. – № 14 (2). – С. 317–319.
26. Гребеник І. М. Морфологічний стан рогівки при її консервації в експерименті / І. М. Гребеник // XII міжнародний конгрес студентів та молодих вчених. – Тернопіль. – 2008. – С. 197.
27. Гребеник І. М. Морфологічні зміни ліофілізованих ксенотрансплантатів рогівки / І. М. Гребеник, К. С. Волков // Матеріали науково – практичної конференції. – Тернопіль. – 2008. – С. 25–27.
28. Гребеник І. М. Порівняльна гістологічна характеристика трансплантатів ксенорогівки при різних методах зберігання / І. М. Гребеник // XIII міжнародний конгрес студентів та молодих вчених. – Тернопіль. – 2009. – С. 191.
29. Гребеник І. М. Ультроструктурна характеристика ксенотрансплантатів рогівки за різних умов консервування / І. М. Гребеник, К. С. Волков // Медицина і світ. – 2010. – № 1. – С. 135–140.
30. Дронов М. М. О роговичных трансплантатах / М. М. Дронов // Руководство по кератопластике. – С-Пб.: Влазипресс, 1997. – 130 с.
31. Душин Н. В. [Клинические возможности межслойной кератопластики](#) / Н. В. Душин, В. С. Беляев, П. А. Гончар // Русский мед. журнал. – 2000. – №3. – С. 72–78.

32. Ерошева Т. И. О глазных банках для целей кератопластики / Т. И. Ерошева, Н. М. Яхина // Вестник офтальмологии. – 1973. – №6. – С. 3–5.
33. Зайкова М. В. Морфологическое исследование умбиликовоазоттрансплантатов в эксперименте / М. В. Зайкова, Н. Ф. Молокова, О. Ю. Гурина // Актуальные проблемы офтальмологии: Тез. докл. научн-практ. конф. – Ижевск, 1995. – С. 189–190.
34. Зайкова М. В. Пластическая офтальмохирургия / М. В. Зайкова. – М.: Медицина, 1980. – 208 с.
35. Земчихина В. Н. Индукционная характеристика белков, секретируемых клетками наружного эпителия роговицы / В. Н. Земчихина, Е. В. Гибалкина // Цитология. – 2005. – Т. 47, № 1. – С. 38–43.
36. Имамалиев А. С. Биологическая оценка трансплантируемых тканей / А. С. Имамалиев. – М.: Наука, 1975. – 184 с.
37. Индейкин Е. Н. Профилактика передачи вируса иммунодефицита человека в офтальмологической практике / Е. Н. Индейкин // Вестник офтальмологии. – 1990. – № 1. – С. 67–69.
38. Каспаров А. А. Использование консервированной амниотической мембраны для реконструкции поверхности переднего отрезка глаза / А. А. Каспаров, С. В. Труфанов // Вестн. Офтальмол. – 2003. – № 3. – С. 45–47.
39. Каспаров А. А. Отбор, методы стерилизации и консервации донорского материала для сквозной кератопластики / А. А. Каспаров, В. Н. Розина // МРЖ. – Сер. 8. – 1990. – № 10. – С. 4–7.
40. Кедровский Б. В. Нуклеиновые кислоты клеточной протоплазмы, их значение для роста и развития и их роль в заживлении ран / Б. В. Кедровский // Успехи совр. биол. – 1942. – № 15. – С. 305–309.
41. Клемент А. А. Экспериментальное и клиническое изучение консервированных гомотрансплантатов твердой мозговой оболочки: Автореф. дис. д-ра. мед. наук. – Л., 1967. – 20 с.

42. Коваленко П. П. Основы трансплантологии / П. П. Коваленко – Ростов–на–Дону: Изд. Ростовского университета. – 1975. – 180 с.
43. Комах Ю. А. Современное состояние проблемы повторной пересадки роговицы (Обзор литературы) / Ю. А. Комах, З. И. Мороз, С. А. Борзенко // Офтальмохирургия. – 1997. – №1. – С. 19–27.
44. Краснова М. М. Первый опыт имплантации искусственной роговицы (аллопластическое кератопротезирование) / М. М. Краснова, Е. М. Орлова // Вестник офтальмологии. – 1970. – №6. – С.11–16.
45. Красновид Т. А. Повреждение и восстановление функции клеток заднего эпителия роговой оболочки после экстракции катаракты / Т. А. Красновид, В. В. Вит // Офтальмол. журн. – 1995. – № 3. – С.158.
46. Крылов В.С. Пластическое устранение дефектов мягких тканей свободной пересадкой кожно-мышечных лоскутов с использованием микрососудистой техники / В. С. Крылов, А. И. Неробеев, Н. О. Миланов // Вестн. хирургии. – 1982. – Т. 129, № 7. – С. 8–12.
47. Куницын Я. В. Применение гомологичных костных трансплантатов, заготовленных в нестерильных условиях, стерилизованных и консервированных в растворе диоксида: Автореф. дис... канд. мед. наук. –М., 1973. – 24 с.
48. Куприянов В. В. Морфологические особенности путей микроциркуляции и их становление в пре- и постнатальном онтогенезе / В. В.Куприянов // В кн.: Морфологические основы микроциркуляции: Тр. 2-го МОЛГМИ. –1978. – Т. 65, № 4. – С. 3–16.
49. Лапчинский А. Г. Проблемы консервирования и трансплантации тканей и органов / А. Г. Лапчинский // Ортопедия и травматология – 1981.– №4. – С. 34–44.
50. Лимберг А. А. Биологические и патофизиологические проблемы пересадки собственной кожи / А. А. Лимберг. –Л: Наука, 1971. – 18 с.
51. Мацкеплишвили Т. Я. Пересадка лиофилизированных гомо– и гетерологических сухожилий в эксперименте / Т. Я. Мацкеплишвили // Стерилизация, консервирование и трансплантация тканей. – Волгоград, 1975. – С. 143–152.
52. Меркулов Г. А. Курс патологической техники / Г. А. Меркулов. –

Ленинград : Медицина, 1969. – 423 с.

53. Миллюдин Е. С. [Эффективность покрытия силиковысушенной пластифицированной амниотической мембраной при патологии переднего роговичного эпителия](#) / Е. С. Миллюдин // Рус. мед. журн. – 2007. – №1. – С. – 46–49.

54. Момозе А. Использование лиофилизированной амниотической оболочки человека для лечения поражений поверхности глазного яблока / А. Момозе, К. Ксяо–Хонг, А. Джунсуке // Офтальмология.– 2001.– №3.– С. 3–9.

55. Мороз З. И. Новая модель сквозного кератопротеза для лечения бельма роговицы / З. И. Мороз, О. С. Волкова, Е. В. Ковшун [и др.] // Офтальмохирургия. – 1991. – № 4. – С. 32–36.

56. Морозов Б. Д. О жизнедеятельности высушенных тканей позвоночных животных / Б. Д. Морозов // Журнал эксперим. биол. и мед. – 1931. – № 7. 4. – С. 379–391.

57. Мулдашев Э. Р. Некоторые пути подбора новых аллотрансплантатов для офтальмохирургии / Э. Р. Мулдашев, А. Г. Габбасов, Р. Т. Нигматуллин и др. // Актуальные вопросы пересадки органов и тканей / Тр. 2 МОЛГМИ им. Н.И.Пирогова. – М., 1978. – Т. 113. – Вып. 23. – С. 21–22.

58. Мулдашев Э. Р. Теоретические и прикладные аспекты создания аллотрансплантатов серии “Аллоплант” для пластической хирургии лица: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – С-Пб., 1994. – 40 с.

59. Мурзабекова Ф. А. Преимущества двойного кератоамино-покрытия и отдаленные результаты операции при различных заболеваниях роговицы / Ф. А. Мурзабекова // Рус. мед. журнал. – 2006. – №4.– С. – 26–30.

60. Муслимов С. А. Микроциркуляторное русло конъюнктивы глазного яблока в норме и при экспериментальной аллопластике: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Ярославль, 1984. – 20 с.

61. Муслимов С.А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии / С. А. Муслимов. – Уфа:Башкортостан, 2000. – 168 с.

62. Мучник С. Р. Цитологические исследования консервированной при пониженной температуре роговицы / С. Р. Мучник // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1957. – № 34. 3. – С. 74–82.
63. Неробеев А. И. Восстановление тканей головы и шеи / А. И. Неробеев. – М.: Медицина, 1988. – 272 с.
64. Нигматуллин Р. Т. Морфологические аспекты пересадки соединительно-тканых аллотрансплантатов: Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Новосибирск, 1996. – 40 с.
65. Николаева Л. Р. [Трансплантация стволовых клеток при ожогах роговицы в эксперименте](#) / Л. Р. Николаева, Е. В. Ченцова, Р. А. Полтавцева и др. // Рус. мед. журнал. – 2005. – №4. – С. – 150–158.
66. Новицкий И. Я. Место трансплантации амниотической оболочки в лечении заболеваний роговицы, сопровождающихся ее неоваскуляризацией / И. Я. Новицкий // Вестн. офтальмол. – 2003. – № 6. – С. 9–11.
67. О’Брайен Б. Микрососудистая восстановительная хирургия: Пер. с англ. – М.: Медицина, 1981. – 422 с.
68. Оганесян О. Г. Макаров П.В., Хорошилова – Маслова И.П. Илатовская Л.В. Новая модификация аутоконъюнктивальной пластики в неотложной хирургии роговицы / О. Г. Оганесян, Р. А. Гундорова, Ю. Ф. Майчук // Вестн. офтальмол. – 2002. – №1 – С. 18–22.
69. П. Пейро Консервация роговицы методом высушивания / Пауль Пейро // Проблемы пересадки роговицы: Тр. международного симпозиума по кератопластике 18-22 августа 1964г. – К.: Здоровье, 1966. – С. 278–281.
70. Петруня А. М. Эффективность липофлавона в комплексном лечении больных травматическими кератитами / А. М. Петруня, Фарук Исса Саид Ашур // Офтальмол. журнал. – 2006. – №3(II). – С. 102.
71. Пири А. Биохимия глаза / А. Пири, Р. ван Гейнинген. – М: Медицина, 1968. – 400 с.
72. Полянская Н. К. Тактика лечения пациентов с язвами роговицы на фоне тяжелой соматической патологии / Н. К. Полянская // Рус. мед. журнал. – 2007. – №1. – С. – 56–60.

73. Присяжна С. В. Ефективність використання консервованої амніотичної оболонки при бактеріальних виразках рогівки в експерименті / С. В. Присяжна, Ю. Й. Салдан, В. І. Корчистий // Вісник морфології. – 2008. – № 14 (1). – С. 148–151.
74. Пучковская Н. А. Биологическое покрытие как метод лечения тяжелых патологических процессов роговицы / Н. А. Пучковская // Эффективные методы диагностики и лечения при тяжелой патологии органа зрения: Тез. докл. междунар. конф. – Одесса, 1985. – С. 3–4.
75. Пучковская Н. А. Основы пересадки роговой оболочки / Наталья Андреевна Пучковская. – К.: Здоровье, 1971. – 277 с.
76. Румянцева О. А. [Изменение морфологической структуры роговицы человека с возрастом](#) / О. А. Румянцева, И. А. Спивак // Рус. мед. журнал. – 2004. – №4.– С. – 158–163.
77. Савельев В. И. К вопросу о жизнеспособности формализированных биотрансплантатов / В. И. Савельев // Ортопедия, травматология. – 1981. – № 11. – С. 38–55.
78. Савушкина Н. М. Гистологические изменения роговиц консервированных при низких температурах / Н. М. Савушкина, Е. Н. Донецкая // Тр. Куйбиш. мед. и-тута. – 1963. – № 23. – С. 140–148.
79. Салдан Й. Р. Дослідження консервації, морфології амніотичної оболонки для офтальмології та трансплантології / Й. Р. Салдан, С. В. Присяжна, Ю. Й. Салдан // Офтальмол. журнал. – 2006. – №3(II). – С. 138.
80. Самалонис Л. Отбор донорской роговичной ткани / Л. Самалонис // Eye World. – 2001. – № 2. – С. 46.
81. Сафонова Т. Н. Лечение прободных язв роговицы при синдроме Шёгрена / Т. Н. Сафонова, Н. В. Ермаков // Тез. докл. VII Съезда офтальмологов России. – М., 2000. – Т.2. – С. 42–43.
82. Серов В. В. Соединительная ткань (функциональная морфология и общая патология) / В. В. Серов, А. Б. Шехтер – М.: Медицина, 1981. – С. 312.

83. Слонимский А. Ю. [Современные проблемы сквозной реконструктивной пересадки роговицы](#) / А. Ю. Слонимский // Рус. мед. журнал. – 2002. – №4. – С. – 151–158.
84. Судалин А. В. [Применение кератопластики и пластики конъюнктивы в лечении глубоких кератитов \(Обзор литературы\)](#) / А. В. Судалин, Ю. Е. Батманов // Русский мед. журнал. – 2003. – №1. – С. – 8 – 16.
85. Сухина Л. А. Эффективность применения лечебно-тектонической пластики роговицы лоскутом аутосклеры при гнойной язве роговицы (экспериментальное исследование) / Л. А. Сухина, М. Б. Перекрестов // Офтальмол. журнал. – 2006. – №3(II). – С. 183.
86. Травкина А. Г. Особенности техники послойной пересадки роговицы и применение лиофилизированной роговицы в качестве трансплантационного материала / А. Г. Травкина, И. Н. Кулагин // Вестник офтальмологии. – 1986. – №4. – С.25 – 26.
87. Фалк И. Г. Мукополисахариды и белки при регенерации и трансплантации ахиллова сухожилия в эксперименте: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Барнаул, 1966. – С. 25.
88. Федоров С. Н. Оптимальные характеристики эндотелия роговиц донора для сквозной кератопластики / С. Н. Федоров, Т. И. Ронкина, Т. М. Явгинева // Офтальмохирургия. – 1992. – № 2. – С. 34–42.
89. Федоров С. Н. Специфическая оценка аутоиммунных процессов и реакции на имплантат при патологии глаза / С. Н. Федоров // Методические рекомендации. – М, 1990. – С. 30.
90. Федоров С.Н. Эндотелий роговицы человека / С. Н. Федоров, Т. Н. Ронкина, Т. М. Явишева. – М., 1993. –126 с.
91. Федорова Е. А. Применение лиофилизированной амниотической мембраны в лечении кератитов различной этиологии / Е. А. Федорова, Ю. А. Батманов // Научн. конф. молодых ученых СОГМА, 2–я: Тез. докл.– Владикавказ.–2003.
92. Филатов В. П. Гетеротрансплантация пересадки роговицы от далеких до близких видов животных / В. П. Филатов, В. В. Войно- Ясенецкий // Офтальмологический журнал. – 1957. – № 4. – С. 358–360.
93. Хилькин А. М. Коллаген и его применение в медицине / А. М. Хилькин, А.

Б. Шехтер, Л. П. Истранов и др. – М.: Медицина, 1976. – 228 с.

94. Ченцова Е.В. Система патогенетически обоснованного лечения ожоговой травмы глаз. Дис... д-ра мед. наук. М., 1996. – 304 с.

95. Шепітько Володимир Іванович. Структурно-функціональні показники кріоконсервованої печінки і вплив її трансплантації на морфофункціональний стан ряду внутрішніх органів. Дис... д-ра мед. наук: 14.01.35 - 2004.

96. Юревич В. Р. Эффективность этиотропной терапии травматических кератитов, усложненных бактериальной инфекцией / В. Р. Юревич, О. Ю. Юревич, И. Я. Новицкий // Материалы XI з'їзду офтальмологів України. – 2006. – С. 125–128.

97. Патент RU 2272289 С1 МПК G01 N 33/48 G 01 N 33/487 Способ определения степени поражения роговицы (Ю.А.Петрович, М.Н.Колединцев, Н.В.Майчук) – № 2005107440/15. Заявл. 17.03.2005. Оpubл. 20.03.2006.

98. Патент RU 2272635 С1 МПК А 61 К 31/737 А 61 К 31/70 А 61 Р 43/00 Фармакологически активная субстанция для офтальмологии (А.Е.Петренко, С.Н.Багров, Т.И.Ронкина) – № 2004136210/15. Заявл. 14.12.2004. Оpubл. 27.03.2006.

99. Патент UA 44040 А МПК А 61 В 5/0275 А 61 В 10/00 Спосіб визначення життєдіяльності клітин (А.В.Довбуш, К.С.Волоков). – № 20011031430. Заявл. 01.03.2001. Оpubл. 15.01.2002. Бюл. №1. – С. 3.

100. Патент UA 7217 U МПК А 01 N 1/00 G 05 D 11/16 Спосіб визначення оптимального режиму кріогенної обробки біотрансплантантів (Н.В.Бігуняк і Т.В.Бігуняк). – № 20041108922. Заявл. 01.11.04. Оpubл. 15.06.05. Бюл. №6. – С. 6.

101. Allaire E. Cell-free arterial grafts: morphologic characteristics of aortic isografts, allografts, and xenografts in rats / E. Allaire, C. Guettier, P. Bruneval // J. Vasc. Surg. – 1994. – Vol. 19, N 3. – P. 446–456.

102. Amano S. Antigenicity of porcine cornea as xenograft / S. Amano, N. Shimomura, Y. Kaji [et al.] // Curr. Eye Res. – 2003. – Vol. 26(6) – P. 313–318.

103. Anderson S. Developmental regulated appearance of spliced variants of type XII collagen in the cornea / S. Anderson, S. Sundar Raj, D. Fite, H. Wessel // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 2000. – Vol. 41. – P. 55–63.

104. Azuaro–Blanco A. Amniotic membrane transplantation for ocular surface reconstruction / A. Azuaro–Blanco, C. T. Pillai, S. Dua. Harminder // *Br. J. Ophthalmol.* – 1999. – No. 83. – P. 399–402.
105. Baasti S. Unusual intermediate-term outcome in three cases of limbal autograft transplantation / S. Baasti, U. Mathur // *Ophthalmology.* – 1999. – Vol. 106. – P. 958–963.
106. Bednarz J. Effect of three different media on serum free culture of donor corneas and isolated human corneal endothelial cells / J. Bednarz, V. Doubilei, P. C. Wollnik [et al.] // *Progress in retinal and eye research.* – 2007. – Vol. 26 – P. 359–378.
107. Beigel A. Immunologische Reaktion gegen konservierte Tracheal transplantate? Untersuchungen bei Ratteninzuchtstammen / A. Beigel, H. U. Wottge, Müller- W. Ruchholtz // *Laryngorhinootologie.* – 1991. – Vol. 70, № 11. – P. 630–634.
108. Berman E. R. *Biochemistry of the Eye* / E. R. Berman. – New York: Plenum Press, 1991. – 492 p.
109. Blatt H.L. Endothelial cell density in relation to morphology / H. L. Blatt, G. N. Rao, J. V. Aquavella // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1979. – Vol. 18. – P. 856–859.
110. Bleckmann H. The content of glycosaminoglycans in bovine corneal epithelium and precorneal fluid-film / H. Bleckmann // *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology.* – 1976. – Vol. 200. – P. 235–242.
111. Bohnke M. Transplantation of cultured adult human or porcine corneal endothelial cells onto human recipients in vitro. Part II: Evaluation in the scanning electron microscope / M. Bohnke, P. Eggli, K. Engelmann // [Experimental Eye Research](#). – 1999. – [Vol. 69](#). – P. 547–553.
112. Bourne W. M. Central corneal endothelial changes over a ten year period / W. M. Bourne, L. R. Nelson, D. O. Hodge // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1997. – Vol. 38. – P. 779–782.
113. Bourne W. M. Decreased endothelial cell survival after transplantation of corneas preserved by 3 modifications of corneal organ culture technique / W. M. Bourne, D. J. Doughman, R. L. Lindstrom // *Ophthalmology.* – 1999. – Vol. 106. – P. 1962–1965.

114. Brown B.C. The use of conjunctival flaps in the treatment of herpes keratouveitis / B. C. Brown, A. B. Nesburn, J. S. Nauhiem [et al.] // *Cornea* – 1992. – Vol. 11, N 1. – P. 44–46.
115. Bujia J. Comparative study of the effect of different chemical procedures on the antigenicity of allogenic transplants of the human trachea / J. Bujia, E. Wilmes, J. Bartual-Pastor // *Acta. Otorrinolaringo. Esp.* – 1993. – Vol. 44, N 3. – P. 209–216.
116. Capella J. A. Preservation of viable corneal tissue / J. A. Capella, H. E. Kaufman, J. E. Robbins // *Cryobiology.* – 1976. – Vol. 2. – P. 116–121.
117. Chang S. W. Changes in corneal autofluorescence and corneal epithelial barrier function with aging / S. W. Chang // *Cornea.* – 1993. – Vol. 12. – P. 493–499.
118. Cintron C. Proteoglycan distribution in developing rabbit cornea / C. Cintron, Covington H. I. // *J. Histochem Cytochem* – 1990. – Vol. 38. – P. 675–682.
119. Costa-Vila J. Eye Bank and Corneal Transplants / J. Costa-Vila, M. Canals, D. Pita // *Transplantation Proceedings.* – 1995. – N 27 (4). – P. 2419.
120. Danjo S. Conjunctival epithelium in healing of corneal epithelial wounds / S. Danjo, J. Friend, R. Thoft // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1987. – Vol. 28. – P. 1445–1449.
121. Daxer A. Collagen fibril orientation in the human corneal stroma and its implications in keratoconus / A. Daxer, P. Fratzl // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1997. – Vol. 38. – P. 121–129.
122. Doughty M. J. Prevalence of «non-hexagonal» cells in the corneal endothelium of young Caucasian adults and their inter-relationships / M. J. Doughty // *Ophthalm. Physiol. Opt.* – 1998. – Vol. 18. – P. 415–422.
123. Doughty M. J. Toward a quantitative analysis of corneal endothelial cell morphology: a review of techniques and their application / M. J. Doughty // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1989. – Vol. 66. – P. 626–642.
124. Dua H. S. Clinical observations on corneal epithelial cell migration in humans / H. S. Dua, J. V. Forrester, Cohen E. J. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1993. – Vol. 34. – P. 1017–1025.

125. Dua H. S. The amniotic membrane in ophthalmology / H. S. Dua, G. Gomes, A. King // *Surv. Ophthalmol.* – 2004. – Vol. 49(1). – P. 51–77.
126. Dua H. The corneoscleral limbus in human corneal epithelial wound healing / H. Dua, J. Forrester // *Am. J. Ophthalmol.* – 1990. – Vol. 110. – P. 646–656.
127. Duncker G. I. W. Keratoplastik and Hornhautbank / G. I. W. Duncker // *Ophthalmol.* – 1995. – Vol. 92. – P. 336–376.
128. Eberhard S. Thermomechanical Behavior of Collagen-Cross-Linked Porcine Cornea / Eberhard Spoerl, Gregor Wollensak, Dag-Daniel Dittert [at al.] // *Ophthalmologica.* – 2004. – Vol. 218, N 2..
129. Endo K. Porcine corneal epithelial cells consist of high- and low-integrin $\beta 1$ -expressing populations / Ken-isbi Endo, Takabiro Nakamura, Satoshi Kawasaki [at al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 2004. – Vol. 45, N 2. – P. 11–17.
130. Engelmann K. Transplantation of adult human or porcine corneal endothelial cells into human recipients in vitro / K. Engelmann, D. Drexler, M. Bohnke // *Exp. Eye Reserch.* – 1999. – Vol. 69 (5). – P. 547–553.
131. Fine B. S. Ocular Histology: A Text and Atlas / B. C. Fine, M. Yanoff. – Hagerstown: Harper & Row, 1984. – 260 p.
132. Frank K. Die Entwicklung des Sortiment und der Anforderungen an die Gewebebank des BI BT Leipzig / K. Frank, C. Muller // 3rd International Meeting of Tissue Bank Specialists. – Rostock. –1990. – Abst. N 3.
133. Freund D.E. Ultrastructure in anterior and posterior stroma of perfused human and rabbit corneas. Relation of transparency / D. E. Freund, R. L. McCally // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1995. – Vol. 36. – P. 1508–1523.
134. Freyman T. M. Fibroblast contraction of a collagen-GAG matrix / T. M. Freyman, I. V. Yannas // *Biomaterials.* – 2001. – Vol. 22. – P. 2883–2891.
135. Fukuda K., Differential distribution of subchains of the basement membrane components type IV collagen and laminin among the amniotic membrane, cornea, and conjunctiva / K. Fukuda, T. Chikama, M. Nakamura // *Cornea* – 1999. – Vol. 18, P.73–79.

136. Gan L. Expression of proliferating cell nuclear antigen in corneas kept in long term culture / L. Gan, P. Fagerholm, S. Ekenbark // *Exp. Eye Reserch.* – 2003. – Vol. 77 (2). – P. 211–217.
137. Gannaway W. // Preparation of amniotic membranes for surgical use with antibiotic solutions / W. Gannaway, A. Barry, J. Trefold // *Surgery.* – 1984. – Vol. 95 (5). – P. 580–584.
138. Goble E. M. Meniscal substitutes–human experience / E. M. Goble, D. Kohn // *Scand. J. Med. Sci. Sports.* – 1999. – Vol. 9, N 3. – P. 146–157.
139. Goldman J. N. The relationship between morphology and transparency in the non-swelling corneal stroma of the shark / J. N. Goldman, G. B. Benedek // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1967. – Vol. 127. – P. 334.
140. Griffith F. International Supply of Corneal Tissue / F. Griffith, C. T. Valmadrid // *Corneal Surgery* Mosby. – Year Book Inc., 1993. – P. 734–743.
141. Grignolo A. Studies on the submicroscopical structure of the ocular tissues / A. Grignolo // *Bull Ocul.* – 1954. – Vol. 33. – P. 513–521.
142. Hagenah M. Corneal cryopreservation with chondroitin sulfate / M. Hagenah, M. Bohnke // *Cryobiology.* – 2001. – Vol. 43 (1). – P. 71–80.
143. Hagenah M. Effect of postmortem duration on endothelial cell density in short-term culture with McCarey-Kaufman medium. An experimental study with Swine corneas / M. Hagenah, C. Lenk // *Ophthalmology.* – 1992. – Vol. 89. – P. 510–513.
144. Hagiwara H. Immunoelectron microscopic study of proteoglycans in rat epiphyseal growth plate cartilage after fixation with ruthenium hexamine trichloride / H. Hagiwara // *Histochemistry.* – 1992. – Vol. 98, N 5. – P. 305–309.
145. Hanada K. Multilayered amniotic membrane transplantation for severe ulceration of the cornea and sclera / K. Hanada, J. Shimazaki, S. Shimmura // *Am. J. Ophthalmol.* – 2001. – Vol. 131(3). – P. 324–330.
146. Hazlett L. D. Aging alters the phagocytic capability of inflammatory cells induced into cornea / L. D. Hazlett, F. B. Kreindler, R. S. Berk // *Curr. Eye. Res.* – 1990. – Vol. 9. – P. 129–138.

147. Hempel B. Use of a serum-free medium for long-term storage of human corneas. Influence on endothelial cell density and corneal metabolism / B. Hempel, J. Bednarz, K. Engelmann // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* – 2001. – Vol. 239 (10). – P. 801–805.
148. Hibino T. The effect of corneal epithelial cells on the collagen gel contraction by keratocytes / T. Hibino, Y. Wada, H. Mishima // *Jpn. J. Ophthalmol.* – 1998. – Vol. 42. P. 174–179.
149. Hirsch M. Quick-freezing technique using a «slamming», device for the study of corneal stromal morphology / M. Hirsch, P. Montcoumer, Y. Pouliquen // *Exp Eye Res.* – 1982. – Vol. 34. – P. 841–852.
150. Hishikawa K. Pulsatile stretch stimulates superoxide production in human aortic endothelial cells / K. Hishikawa, T. F. Luscher // *Circulation.* – 1997. – Vol. 96. – P. 3610–3616.
151. Hobden J. A. Aged mice fail to upregulate ICAM-1 after *Pseudomonas aeruginosa* corneal infection / J. A. Hobden, S. A. Masinick, R. P. Barrett // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1995. – Vol. 36. – P. 1107–1114.
152. Huang Y. Swelling studies on the cornea and sclera: the effects of pH and ionic strength / Y. Huang, K. M. Meek // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1999. – Vol. 39. – P. 1765–1774.
153. Jester J. V. The Cellular Basis of Corneal Transparency: Evidence for ‘Corneal Crystallins’ / J. Jester, T. Moller-Pedersen, J. Huang Sax [et al.] // *J. Cell. Sci.* – 1999. – Vol. 112. – P. 613–622.
154. Johnson D. H. The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal cornea / D. H. Johnson, W. M. Bourne, R. J. Campbell // *Arch. Ophthalmol.* – 1982. – Vol. 100. – P. 1942–1953.
155. Johnson K. A. Nitrous acid pretreatment of tendon xenografts cross-linked with glutaraldehyde and sterilized with gamma irradiation / K. A. Johnson, G. J. Rogers, S. C. // *Biomaterials.* – 1999. – Vol. 20, №11. – P. 1003–1015.
156. Jorge-Herrero E. Influence of different chemical cross-linking treatments on the properties of bovine pericardium and collagen / E. Jorge-Herrero, P. Fernandez, J. Turnay // *Biomaterials.* – 1999. – Vol. 20, № 6. – P. 539–545.

157. Kampmeier J. Thermal and biomechanical parameters of porcine cornea / J. Kampmeier, B. Radt, R. Birngruber [et al.] // *Cornea*. – 2000. – Vol. 19(3) – P.355–363.
158. Kanai A. Electron microscopic studies of corneal stroma: aging changes of collagen fiber / A. Kanai, H. Kaufman // *Ann Ophthalmol*. – 1973. – Vol. 5. – P. 285–292.
159. Kaufman H. E. The human corneal endothelium / H. E. Kaufman, J. A. Capella, J. E. Robbins // *Am. J. Ophthalmol*. – 1966. – Vol. 61. – P. 835–846.
160. Kim J.C. Transplantation of preserved human amniotic membrane for surface reconstruction in severely damaged rabbit corneas / J.C. Kim, S.C.G. Tseng // *Cornea*. – 1995 – Vol. 14. – P. 473–484.
161. Kim K. Morphometric analysis of the corneal endothelial cells in normal Korean / K. Kim, S. Park, J. Oh // *J Korean Ophthalmol. Soc.* – 1992. – Vol. 33. – P. 24–29.
162. Koizumi N. Cultivated epithelial stem cell transplantation in ocular surface disorders / N. Koizumi, T. Inatomi, T. Suzuki // *Ophthalmology* – 2001. – Vol. 108 (9). – P.1569–1574.
163. Komai Y. The three-dimensional organisation of collagen fibrils in the human cornea and sclera / Y. Komai, M. Ushiki // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1991. – Vol. 32. – P. 2244–2258.
164. Kustner M. The influence of transport on organ cultured corneas. An experimental study of porcine corneal endothelium / M. Kustner, T. Klug, S. Clemens // *Ophthalmology*. – 2005. – Vol. 102 (7). – P. 708–714.
165. Lindstrom R. L. Advances in corneal preservation / R. L. Lindstrom // *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.* – 1990. – Vol. 87. – P. 555–648.
166. Liuab Z. Evaluation of corneal thickness and topography in normal eyes using the orbiscan corneal topography system / A. Huanga, S. Pflugfelder // *Br J Ophthalmol*. – 1999. – Vol. 83. – P. 774–778.
167. Longmire W. R. General Surgical Problems of Tissue Transplantation / W. R. Longmire et al. // *Preservation and Transplantation of Normal Tissues: ACIBA Foundation Symposium*. – London. – 1954. – P. 23–43.
168. Maas-Reijs J. Eye Banking in Europe 1991–1995 / J. Maas-Reijs, E. Pels, A. B. Tullo // *Acta. Ophthalmol. Scand.* – 1997. – №75. – P. 541–543.

169. Maltseva O. Fibroblast Growth Factor Reversal of the Corneal Myofibroblast Phenotype / O. Maltseva, P. Folger, D. Zekaria [at al.] // *Invest. Ophthalmol. Visual Sci.* – 2001. – Vol. 42. P. 2490–2495.
170. Marshall G. £. Immunogold ultrastructural localization of collagens in the aged human outflow system / A. G. Konstas, W. R. Lee // *Ophthalmology.* – 1991. – Vol. 98. – P. 692–705.
171. Marzo J. M. Intraarticular fibrous nodule as a cause of loss of extension following anterior cruciate ligament reconstruction / J. M. Marzo, M. K. Bowen, R. F. Warren // *Arthroscopy.* – 1992. – Vol. 8, № 1. – P. 10–18.
172. Maurice D. M. Cohesive strength of corneal lamellae / D. M. Maurice, F. Monroe // *Exp. Eye. Res.* – 1990. – Vol. 50. – P. 59–63.
173. Maurice D. M. The structure and transparency of the cornea / D. M. Maurice // *J. Physiol.* – 1957. – Vol. 136. – P. 263–274.
174. Meek K. M. The organisation of collagen fibrils in the human corneal stroma: a synchrotron X-ray diffraction study / K. M. Meek, T. Blamires, G. F. Elliott // *Curr. Eye Res.* – 1987. – Vol. 6. – P. 841–846.
175. Meller D. Amniotic membrane transplantation for acute chemical or thermal burns / D. Meller, R. Pires, R. Mack // *Ophthalmology.* – 2000. – Vol. 107. – P. 980–989.
176. Messner K. Meniscal regeneration or meniscal transplantation / K. Messner // *Scand. J. Med. Sci. Sports.* – 1999. – Vol. 9, № 3. – P. 162 – 167.
177. Mishima S. Clinical investigations on the corneal endothelium / S. Mishima // *Am. J. Ophthalmol.* – 1982. – Vol. 93. – P. 1–29.
178. Moller-Pederson T. A comparative study of human corneal keratocyte and endothelial cell density during aging / T. Moller-Pederson // *Cornea.* – 1997. – Vol. 16. – P. 333–338.
179. Muldashev E. R., Basic research conducted on alloplant biomaterials / E. R. Muldashev, S. A. Muslimov, R. T. Nigmatullin et al. // *Eur. J. Ophthalmol.* – 1999. – Vol. 9, № 1. – P. 8–13.

180. Muller L. J. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes / L. J. Muller, E. Pels, G. F. Vrensen // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1995. – Vol. 36. – P. 2557–2567.
181. Muller L. Ultrastructural organization of human corneal nerves / L. Muller, L. Pels // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1995. – Vol. 37. – P. 476–488.
182. Nakayasu K. Distribution of types I, II, III, IV, and V collagen in normal and keratoconus corneas / K. Nakayasu, M. Tanaka, H. Konomi, T. Hayashi // *Ophthalmic. Res.* – 1986. – Vol. 18. – P. 1–15.
183. Nelson J. D. McCarey-Kaufman (MK) organ culture and MK medium-shifted corneas / J. D. Nelson, D. B. Lange, R. L. Lindstrom [et al.] // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1974. – Vol. 13. – P. 165–173.
184. Nelson L. R. In vitro comparison of Chen medium and Optisol-GS medium for human corneal storage / L. R. Nelson, D. O. Hodge, W. M. Bourne // *Cornea.* – 2000. – Vol. 19 (6). – P. 782–787.
185. Neronovi A. Cryoprotection of porcine cornea: a scanning electron microscopy study / A. Neronovi, P. Giurov2, M. Cholakovai [et al.] // *Vet. Med.* – 2005. – Vol. 50 (5) – P. 219–224.
186. Newton R. Circumcorneal annulus of collagen fibrils in the human limbus / R. Newton, K. Meek // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* – 1998. – Vol. 39 – P. 1125–1134.
187. Nিকেলেইট V. Healing corneas express embryonic fibronectin isoforms in the epithelium, subepithelial stroma, and endothelium / V. Nিকেলেইট, A. Kaufman // *Am. J Pathol.* – 1996. – Vol. 149. – P. 549–558.
188. Nørsgaard H. Distinction between differentiation and senescence and the absence of increased apoptosis in human keratinocytes undergoing cellular ageing in vitro / H. Nørsgaard B. F. Clark, S. I. Rattan // *Exp Gerontol.* – 1996. – Vol. 31. – P. 655–668.
189. Offret G. Quelques remarques sur le problème biologique de la keratoplastie / G. Offret // *Ann. Oculist.* – Paris, 1947. – Vol. 106. – P. – 613–618.
190. Patel S. Refractive index of the human corneal epithelium and stroma / S. Patel, L. Marshall, F. Fitzke // *J. Refract. Surg.* – 1995. – Vol. 11. – P. 100–105.

191. Payrau P. Conservation des corness par silicodessication / P. Payrau // *Ann. Oculist.* – 1960. – Vol. 193. – P. 309–345.
192. Postlethwaite A. F. Fibroblast. Inflammation basic principles and clinical correlates / A. F. Postlethwaite, A. H. Kang // Ed. J. Gallin. – N. Y.: Raven Press, 1988. – P. 577–597.
193. Radner W. Interlacing and cross-angle distribution of collagen lamellae in the human cornea / W. Radner, M. Zehetmayer, R. Aufreiter // *Cornea.* – 1998. – Vol. 17. – P. 537–543.
194. Reichl S. Human corneal equivalent as cell culture model for in vitro drug permeation studies / S. Reichl, J. Bednarz, C. C. Muller-Goymann // *Br. J. Ophthalmol.* – 2004. – N 88. – P.560–566.
195. Rieck P. W. Fibroblast growth factor-2 protects endothelial cells from damage after corneal storage at 4 degrees C / P. W. Rieck, R. M. von Stockhausen, S. Metzner // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophtalm.* – 2003. – Vol. 9. – P. 757–764.
196. Rodriguez-Ares M. Multilayered amniotic membrane transplantation in the treatment of corneal perforations / M. Rodriguez-Ares, R. Tourino, M. Lopes-Valladares // *Cornea.* – 2004. – Vol. 3 (6). – P. 577–583.
197. Rosenbaum K. Factors influencing corneal endothelium in organ cultures during transport / K. Rosenbaum, T. Reinhard, R. Sundmacher // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophtalm.* – 2008. – Vol. 246 (3). – P. 369–372.
198. Salamon A. Development of collagenous fibres in autologous and preserved homologous tendon grafts / A. Salamon, Hamori J. // *Acta. morphol. Acad. Sci. Hung.* – 1976 (1977). – Vol. 24, N1–2. – P. 11–22.
199. Schmidt T. Tarsusplastik mithondroplast / T. Schmidt, K. P. Leipert, C. Fellbaum // *Forts. Chr. Ophthalmol.* – 1991. – Vol. 88. – P. 279 – 282.
200. Segawa K. Electron microscopy of dendritic cells in the human comeal epithelium / K. Segawa // *Arch. Ophthalmol.* – 1964. – Vol. 72. – P. 650–659.
201. Seiffert K. E. Biological aspects of collagenous homografts / K. E. Seiffert // *Acta. Oto-rhino-laryngol.* – Belg. – 1970. – Vol. 24, N 1. – P. 27–33.

202. Seiffert K. Biologische Grundlagen der homologen Transplantation konservierter Bindegewebe / K. Seiffert // Springer-Verlag – Berlin, 1967. – P. 58–118.
203. Shino K., Collagen fibril populations in human anterior cruciate ligament allografts. Electron microscopic analysis / K. Shino, B. W. Oakes, S. Horibe et al. // Am. J. Sports. Med. – 1995. – Vol. 23, N 2. – P. 203–208.
204. Solomon A. Amniotic membrane transplantation for reconstruction of the conjunctival fornices / A. Solomon, E. Espana, S. Tseng // Ophthalmology – 2003. – Vol. 110 (1). – P. 93–100.
205. Sorgente O. Inhibition of endothelial proteoglycans immobilized on extracellular substrates / O. Sorgente, C. Dorey // J. Biol. Res. – 1980. – Vol. 128. – P. 63–71.
206. Sridar M. Amniotic membrane transplantation in acute chemical and thermal injury / M. Sridar, A. Bansal // Am. J. Ophthalmol. – 2000. – Vol. 130 (1). – P. 134–137.
207. Tauro J. Comparison of bovine collagen xenografts to autografts in the rabbit / J. Tauro, J. Parsons, J. Ricci. // Clin. Orthop. – 1991. – Vol. 266. – P. 271–284.
208. Timpl R. Immunological studies on collagen / R. Timpl // Biochemistry of collagen. – New York, 1976. – P. 319–365.
209. Tojo T. Epithelial regeneration and preservation of tracheal cartilage after tracheal replacement with cryopreserved allograft in the rat / T. Tojo, S. Kitamura, S. Gojo // J Thorac Cardiovasc. Surg. – 1998. – Vol. 116, N4. – P. 624–627.
210. Tripathy B. J. Neuroectodermal origin of corneal endothelium and keratocytes in human eye / B. J. Tripathy, R. C. Tripathi, K. Stefansson // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1985. – Vol. 26, N3. – P. 274–283.
211. Tseng S. Amniotic membrane transplantation for conjunctival surface reconstruction / S. Tseng, P. Prabhasawat, S. Lee // Am. J. Ophthalmol. – 1997. – Vol. 124. – P. 765–774.
212. Van Trappen L. Lymphocytes and Langerhans cells in the normal human cornea / L. Van Trappen, K. Geboes, L. Missotten // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1985. – Vol. 26. – P. 220–225.

213. Ventura A. Endotoxins modulate the autocrine function of organ cultured donor corneas and increase the incidence of endothelial cell death / A. Ventura, K. Engelmann, C. Dahinden [et al.] // *Ophthalm. Reserch* – 1999. – Vol. 31. – P. 416–425.
214. Von Versen R., Verfahren zur Herstellung von Weichteilpreparaten fur die Klinische Anwendung / R. Von Versen, G. Matthes, P. Schimmack. // 3rd International Meeting of Tissue Bank Specialists. – Rostock. – 1990. – Abst. №46.
215. Von Versen-Hoynck F. Application of sterilised human amnion for reconstruction of the ocular surface / F. Von Versen-Hoynck, U. Hesselbarth, D. Moller // *Cell and Tissue Banking*. – 2004. – V5, P. 57–65.
216. Vrabec M. P. Subconjunctival fibrosis after conjunctival autograft / M. Vrabec, R. Weisenthal, S. Elsing // *Cornea*. – 1993. – Vol. 12. – P. 181–183.
217. Wang Z. Relative quantitative analysis of corneal immunogenicity / Z. Wang, J. Ge, J. Xu // *Zhonghua Yan Ke Za Zhi* – 2002. – Vol. 38. – P. 535–538.
218. Waring G. O. The corneal endothelium. Normal and pathologic structure and function / G. O. Waring, W. M. Bourne, H. F. Edelhauser // *Ophthalmology*. – 1982. – Vol. 89. – P. 531–590.
219. Wiffen S. J. Lysosomal enzymes in corneal storage media and corneal graft outcome / S. J. Wiffen, D. O. Hodge, L. R. Nelson [at al.] // *Cornea*. – 1997. – Vol. 16 (2). – P. 169–176.
220. Williams K. A. Clinical and experimental aspects of corneal transplantation / K. Williams, D. Coster // *Trans. Rev.* – 1993. – Vol. 7. –P. 44–64.
221. Williams K. A. The Australian corneal graft registry / K. A. Williams, S. M. Muehlberg, R. F. Lewis, D. J. Coster // 1994 report. – 1995. P.– 96.
222. Wusteman M.C. Cryopreservation studies with porcine corneas / M. Wusteman, W. Armitage // *Current eye research*. – 1999. – Vol.19. – P. 228–233.
223. Yamagata M. Regulation of cellsubstrate adhesion by proteoglycans immobilized on extracellular substrates / S. Suzuki, S. Akiyama // *J. Biol. Chemistry*. – 1989. –Vol. 264. – P. 8012–8018.

Додаток А.1

“Затверджую”
 проректор з наукової роботи Буковинського
 державного медичного університету
 д.мед.н., професор О.І. Іващук
 “ 02 ” 2010 року



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** Морфофункціональний стан ксенорогівки при різних методах консервування.
2. **Установа-розробник:** Тернопільський державний медичний університет імені І.Я.Горбачевського, м. Тернопіль, вул. Руська, 12, кафедра гістології та ембріології.
3. **Автор:** Гребеник І.М.
4. **Джерело інформації:** матеріали кандидатської дисертації.
5. **Базова установа, яка проводить впровадження:** Буковинський державний медичний університет, кафедра медичної біології, генетики та гістології.
6. **Термін впровадження:** вересень 2009 – січень 2010 року.
7. **Форма впровадження:** у навчальний процес і наукову роботу курсу гістології.
8. **Зауваження та пропозиції:** зауважень немає.

Відповідальний за впровадження:

Завідувач курсу гістології,
 кандидат медичних наук, доцент

Л.Я. Федонюк

Підпис Головатий І.Р. завідувачу:
 Начальник відділу кадрів Буковинського
 державного медичного університету



Головатий І.Р.

Додаток А.2

"ЗАТВЕРДЖУЮ"
 Проректор з наукової роботи
 Харківського національного
 медичного університету
 д.мед.н. проф. В.В. М'ясоєдов
 " 15 лютого 2010 р.


АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

матеріалів дисертаційної роботи до навчального та наукового процесу

1. **Найменування пропозиції для впровадження:** морфофункціональний стан ксенорогівки при різних методах консервування.
2. **Установа, автор:** Тернопільський державний медичний університет імені І.Я.Горбачевського, кафедра гістології та ембріології, здобувач Гребеник І.М.
3. **Джерело інформації:** матеріали кандидатської дисертації.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра анатомії людини Харківського національного медичного університету.
5. **Форма впровадження:** у наукову роботу при вивченні ксенорогівки при різних методах консервування і навчальний процес – у матеріали лекцій та практичних занять при викладанні та вивченні ксенорогівки при різних методах консервування.
6. **Термін впровадження:** 2009- січень 2010 навчальний рік.
7. **Суть впровадження:** матеріали, подані здобувачем Гребеник І.М., мають теоретичне та практичне значення для розуміння структурних основ ксенорогівки при різних методах консервування.

Відповідальний за впровадження:
 завідувач кафедри анатомії людини,
 д.мед.н., професор



В.М. Лупир

Доцент кафедри
 анатомії людини
 к.мед.н.



В.П. Кучако

Доцент кафедри
 анатомії людини
 к.мед.н.

І.А. Колесник

Додаток А.3

Затверджую
 Проректор з навчальної роботи
 Дніпропетровської державної
 медичної академії



2010 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: “Морфофункціональний стан ксенорогівки при різних методах консервування”.
2. Установа-розробник: Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, кафедра гістології та ембріології, здобувач Гребеник І. М.
3. Джерело інформації: матеріали кандидатської дисертації.
4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра анатомії людини Дніпропетровської державної медичної академії.
5. Термін впровадження: вересень 2009 – січень 2010 рік.
6. Форма впровадження: в навчальний процес – матеріали лекцій та практичних занять з анатомії людини.
7. Зауваження та пропозиції:

Відповідальний за впровадження:

В.О. Завідувач кафедри анатомії людини,
 д-р мед. наук, професор

Мацгалір М. А.



Додаток А.4

Затверджую
 Перший проректор Одеського
 державного медичного університету
 Чл. кор. АМН України, професор
 Кресюн В.Й.
 2010р.



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: «Морфофункціональний стан ксенорогівки при різних методах консервування».
2. Установа-розробник: Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, кафедра гістології та ембріології, здобувач Гребеник І.М.
3. Джерело інформації: матеріали кандидатської дисертації.
4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра анатомії людини Одеського державного медичного університету.
5. Термін впровадження: вересень 2009 – січень 2010 рік.
6. Форма впровадження: в навчальний процес – матеріали лекцій та практичних занять з анатомії людини.
7. Зауваження та пропозиції:

Відповідальний за впровадження:
 ВО зав. кафедри анатомії людини
 Одеського державного медичного університету,
 доцент

Відпис(и) *О.Л. Холодкова*
 Завіряю
 вчений секретар Одеського
 державного медичного університету
 проф. *П.С. Ніков* Ніков П.С.



О.Л. Холодкова
 Холодкова О.Л.

Додаток А.5



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: "Морфофункціональний стан ксенорогівки при різних методах консервування".
2. Установа-розробник: Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, кафедра гістології та ембріології, здобувач Гребеник І. М.
3. Джерело інформації: матеріали кандидатської дисертації.
4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра анатомії людини Луганського державного медичного університету.
5. Термін впровадження: вересень 2009 – січень 2010 рік.
6. Форма впровадження: в навчальний процес – матеріали лекцій та практичних занять з анатомії людини.
7. Зауваження та пропозиції:

немає

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри анатомії людини,
д-р мед. наук, професор



Ковешніков В. Г.

Додаток А.6

“Затверджую”

Перший проректор з науково-педагогічної роботи
ВДНЗ України «Українська медична
стоматологічна академія», професор
В.М.Бобирьов



27» січня 2010 р.

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Пропозиція для впровадження:** матеріали дисертації І.М.Гребеник: «Морфологічний стан ксенорогівки при різних методах консервування»
2. **Установа – розробник, автор:** кафедра гістології, цитології та ембріології Тернопільського державного медичного університету. Завідувач кафедри - професор Волков Костянтин Степанович
3. **Джерело інформації:** стаття Гребеник І.М. Морфологічний стан ліофілізованих ксенотрансплантатів рогівки / І.М.Гребеник// Вісник морфології.-2008.- №14(2).- С.317-319.
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра гістології, цитології та ембріології ВДНЗ України «Українська медична стоматологічна академія».
5. **Форми впровадження:** в навчальний процес, у матеріали лекцій і практичних занять при викладанні та вивченні органу зору.
6. **Термін впровадження:** вересень 2009 року - січень 2010 року.
7. **Суть впровадження:** матеріали, що подані пошукувачем І.М.Гребеник мають теоретичне та практичне значення для розуміння морфології органів чуттів, а саме органу зору після різних методик її збереження.

Завідувач кафедри гістології,
цитології та ембріології,
д.мед.н., професор

В.І. Шепітько

Доцент кафедри гістології,
цитології та ембріології, к.б.н.,

С.М.Білаш

Доцент кафедри гістології,
цитології та ембріології, к.б.н.,

О.Д.Лисаченко



З. Г. Бойко

Додаток А.7

“ЗАТВЕРДЖУЮ”

Проректор з наукової роботи
Ужгородського національного університетуД.Ф.М.н., професор  Студеняк І.П.

2010 р.



АКТ ПРО ВПРОВАДЖЕННЯ

1. **Найменування пропозиції про впровадження:** “Морфофункціональний стан ксенорогівки при різних методах консервування”.
2. **Установа розробник, автор:** Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я.Горбачевського, кафедра гістології та ембріології, здобувач Гребеник І.М.
3. **Джерело інформації:** інформаційний лист за матеріалами кандидатської дисертації
4. **Базова установа, яка проводить впровадження:** кафедра анатомії людини та гістології медичного факультету Ужгородського національного університету.
5. **Терmini впровадження:** вересень 2009 - лютий 2010 року.
6. **Форма впровадження:** У матеріали лекцій та практичних занять з анатомії людини та гістології для студентів, а також в наукову роботу кафедри.

Завідувач кафедри анатомії людини
та гістології медичного факультету
Ужгородського національного університету,
доктор медичних наук, професор,
Заслужений працівник освіти України

А.С. Головацький.

Додаток А.8

Затверджую
Проректор з навчальної роботи
Вінницького національного
медичного університету
ім. М.І. Пирогова
проф. Гумінський Ю. Й.



[Handwritten signature]
23 07 2010 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: “Морфофункціональний стан ксенорогівки при різних методах консервування”.
2. Установа-розробник: Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, кафедра гістології та ембріології, здобувач Гребеник І. М.
3. Джерело інформації: матеріали кандидатської дисертації.
4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра гістології, цитології та ембріології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова.
5. Термін впровадження: вересень 2009 – січень 2010 рік.
6. Форма впровадження: в навчальний процес – матеріали лекцій та практичних занять з спеціальної гістології.
7. Зауваження та пропозиції:

Відповідальний за впровадження:
Директор наукового-дослідного центру
д-р мед. наук, професор

[Handwritten signature]
Гунас І. В.

Додаток А.9

Затверджую
 Проректор з наукової роботи
 Буковинського державного
 медичного університету
 професор  О.І. Іващук
 2010 року



АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: „Морфофункціональний стан ксенорогівки при різних методах консервування”.
 2. Установа-розробник: Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського, кафедра гістології та ембріології, здобувач Гребеник І.М.
 3. Джерело інформації: матеріали кандидатської дисертації.
 4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра анатомії людини Буковинського державного медичного університету.
 5. Термін впровадження: вересень 2009-січень 2010 рік.
 6. Форма впровадження: в науковий і навчальний процес – матеріали лекцій та практичних занять з анатомії людини.
 7. Зауваження та пропозиції:
-

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри анатомії людини

д.мед.н., професор



Макар Б.Г.

Додаток А.10

Затверджую
Проректор з навчальної роботи
Вінницького національного
медичного університету
ім. М.І. Пирогова
проф. Езміньський Ю.Й.



_____ 2010 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: “Морфофункціональний стан ксенорогівки при різних методах консервування”.
2. Установа-розробник: Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, кафедра гістології та ембріології, здобувач Гребеник І. М.
3. Джерело інформації: матеріали кандидатської дисертації.
4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра гістології, цитології та ембріології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова.
5. Термін впровадження: вересень 2009 – січень 2010 рік.
6. Форма впровадження: в навчальний процес – матеріали лекцій та практичних занять з спеціальної гістології.
7. Зауваження та пропозиції:

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри гістології, цитології
та ембріології,

д-р мед. наук, професор



Пушкар М. С.

Додаток А.11

Затверджую

Перший заступник ректора

Тернопільського державного

медичного університету

імені І. Я. Горбачевського

проф. Мисюк Р. П.



2010 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: “Морфофункціональний стан ксенорогівки при різних методах консервування”.
2. Установа-розробник: Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського, кафедра гістології та ембріології, здобувач Гребеник І. М.
3. Джерело інформації: матеріали кандидатської дисертації.
4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра патологічної анатомії з секційним курсом та судовою медициною Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського.
5. Термін впровадження: вересень 2009 – січень 2010 рік.
6. Форма впровадження: в навчальний процес – матеріали лекцій та практичних занять з патологічної анатомії при вивченні тем „Хвороби органів чуття”.
7. Зауваження та пропозиції: _____

Пропозиція обговорена і затверджена на методичній нараді кафедри (протокол № 7 від 14.02 2010р.).

Відповідальний за впровадження:

Завідувач кафедри патологічної анатомії
з секційним курсом та судовою медициною,
д-р мед. наук, професор

Боднар Я. Я.

Додаток А.12

Затверджую
Перший проректор
Тернопільського державного
медичного університету
імені І.Я. Горбачевського
проф. Мисула Т.Г.



2010 року

АКТ ВПРОВАДЖЕННЯ

1. Пропозиція для впровадження: “Морфофункціональний стан ксенорогівки при різних методах консервування”.
2. Установа-розробник: Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського, кафедра гістології та ембріології, здобувач І. М.Гребеник.
3. Джерело інформації: матеріали кандидатської дисертації.
4. Базова установа, яка проводить впровадження: кафедра анатомії людини Тернопільського державного медичного університету імені І. Я. Горбачевського.
5. Термін впровадження: вересень 2009 – січень 2010 рік.
6. Форма впровадження: в навчальний процес - матеріали лекцій та практичних занять при вивченні теми „Анатомія органів чуття”.
7. Зауваження та пропозиції:

Пропозиція обговорена і затверджена на методичній нараді кафедри (протокол № 4 від 17.02.2010р.).

Відповідальний за впровадження:
Завідувач кафедри анатомії людини,
д-р мед. наук, проф.



Герасимюк І. С.