

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
"ТЕРНОПІЛЬСЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
ІМЕНІ І.Я. ГОРБАЧЕВСЬКОГО"

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

АВТОРЕФЕРАТ
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Тернопіль – 2010

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у державному вищому навчальному закладі “Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського” МОЗ України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор **Волков Костянтин Степанович**, державний вищий навчальний заклад “Тернопільський державний медичний університет ім. І. Я. Горбачевського” МОЗ України, завідувач кафедри гістології, цитології та ембріології.

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор **Макар Богдан Григорович**, Буковинський державний медичний університет, завідувач кафедри анатомії людини;

доктор медичних наук, професор **Шепітько Володимир Іванович**, державний вищий навчальний заклад “Українська медична стоматологічна академія”, завідувач кафедри гістології, цитології та ембріології.

Захист відбудеться 28 травня 2010 року о 13 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 58.601.01 у державному вищому навчальному закладі “Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського” МОЗ України (46001, м. Тернопіль, Майдан Волі, 1).

З дисертацією можна ознайомитися в бібліотеці державного вищого навчального закладу “Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського” МОЗ України (м. Тернопіль, вул. Січових Стрільців, 8).

Автореферат розісланий 23 квітня 2010 року.

Вчений секретар

спеціалізованої вченої ради Д 58.601.01

доктор медичних наук, професор

Я.Я. Боднар

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

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 медичної літератури патологія рогівки займає одне з чільних місць серед причин сліпоти і слабобачення (Сухина Л.А., 2006), а за даними ВООЗ – входить до трійки основних чинників втрати зору, частка якої становить 6,6-39,3 % (Юревич В.Р., 2006). Існуючі методи консервативного лікування частково дозволили знизити відсоток ускладнень травматичних пошкоджень очей (Петруня А.М., Юревич В.Р., 2006). Проте, у цілому, загальноприйняте консервативне лікування опіків очей та виразок рогівки не завжди є ефективним (Салдан Й.Р., Присяжна С.В., 2006). Безуспішність консервативних методів лікування часто пов'язана з порушеннями репаративних процесів структур ока, що призводить до перфорації та загибелі органа зору. Тому патологія рогівки, у ряді випадків, вимагає термінового хірургічного втручання, особливо при прогресивному лізисі і загрозі перфорації рогівки (Каспаров А.А., Розінова В.Н., 1990).

Враховуючи високі регенеративні властивості рогівки, існує думка про необхідність проведення операцій з використанням лікувального біологічного покриття. З цією метою застосовують різноманітні донорські матеріали: рогівка, склера, тверда мозкова оболонка, фасції, амніон (Батманов Ю.Е., 1990; Дронов М.М., 1997; Azuago-Blanco A., 1999; Каспаров А.А., 2003; Новицкий И.Я., 2003). Пересадка рогівки ока – найпоширеніша в наші дні операція з трансплантації, яка проводиться вже біля ста років. Проте, дане оперативне втручання з самого початку стикалось з такими проблемами, як забезпечення повноцінного якісного донорського матеріалу, удосконалення техніки пересадки, боротьба з так званою хворобою трансплантата, викликаною несумісністю між донором і реципієнтом.

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 виготовлення та використання ксеногенного донорського матеріалу (Neronovi A., 2005). На жаль, результат кератопластичних операцій не завжди є позитивним. Очевидно, це залежить і від морфофункціонального стану трансплантаційного матеріалу. При різних методах зберігання донорська рогівка піддається дії фізичних і хімічних чинників, а морфологічний стан ксено-трансплантату в умовах консервації є маловивченим. Тому перспективним і доцільним є

встановлення морфологічного і функціонального стану свинячої рогівки при різних методах консервування (Муслимов С.А., 1984; Bohnke M., Egglі P., 1999).

Таким чином, проблема пересадки рогівки пов'язана з цілою низкою вагомих правових, організаційних, методичних і медичних проблем. Труднощі з придбанням аллогенного трансплатаційного матеріалу (Федоров С.Н., 1992; Зайкова М.В., 1995), 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, його структурної збереженості.

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 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 інтактною 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.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. Об'єктом дослідження були 78 рогівок ока свині. Технологія отримання донорського матеріалу була стандартною. Забір рогівок проводився в цеху забою тварин, 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.

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

Для гістологічних досліджень рогівки свиней фіксували в 10 % нейтральному формаліні з наступною заливкою в парафінові блоки. Отримані за допомогою санного мікротома зрізи, товщиною 5-6 мкм, забарвлювали гематоксиліном і еозином (Меркулов Г.А., 1969)

Мікропрепарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа ЛОМО Біолам та фотодокументували за допомогою відео камери Vision CCD Camera.

Забір матеріалу для електронно-мікроскопічних досліджень проводили згідно загальноприйнятих правил (Саркісов Д.С., 1996). Матеріал фіксували у 2,5 % розчині глютаральдегіду з активною реакцією середовища рН 7,2-7,4, приготовленому на фосфатному буфері Міллоніга. 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 і аралдиту. Ультратонкі зрізи ксенотрансплантатів, виготовленні на ультрамікротомі УМПТ-7, забарвлювали 1% водним розчином уранілу ацетату, контрастували цитратом свинцю за методом Рейнольдса та вивчали в електронному мікроскопі EM-125K.

Морфометричні та кількісні дослідження проводили, використовуючи систему візуального аналізу гістологічних препаратів, програму Відео Тест 5.0 КАРА Image Base та Microsoft Exel на персональному комп'ютері. Визначали товщину рогівки, переднього епітелію, власної речовини, розміри базальних клітин і площу їх ядер, а також ядерно-цитоплазматичне співвідношення.

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

Визначення вмісту глікопротеїнів: розчин фруктози (при кип'ятінні глюкоза перетворюється на фруктозу) у присутності амонію молібдату та трихлороцтової кислоти дає синє забарвлення, інтенсивність якого залежить від кількості глікопротеїнів. 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. Визначення вмісту хондроїтинсульфатів: хондроїтинсульфати викликають помутніння сироватки крові в присутності риванолу, яке пропорційне їх концентрації. Визначення вмісту глікозаміногліканів: цетилтриметиламоній бромистий з глікозаміногліканами утворює у кислому середовищі осад білого кольору.

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 Стьюдента в разі нормального розподілу, ідентифікованого F-критерієм Фішера та модифікованим тестом Levene або за непараметричним ранговим критерієм Мана-Уїтні.

Світлооптичну прозорість тканини рогівки визначали фотометричним методом з використанням фотометричної насадки ФМЭЛ-1 до мікроскопа ЛЮАМ 8 ЗМ. Принцип методики полягає у реєстрації фотоструму, індукованого потоком світла, що пройшов через рогівку. Прозорість останньої виражають у відносних фотометричних одиницях. Для поляризаційної флуоресценції 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 фотонасадку 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 взірців 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”.

Основні результати досліджень та їх обговорення. Аналіз статистичних закономірностей поширеності різних форм патології зорового аналізатора вказує на прогресивне збільшення частки хворих із ураженнями рогівки, що вимагає планування і оптимізації допомоги даній категорії пацієнтів.

У науковій літературі широко висвітлена структурна організація рогівки людини (Вит В.В., Мальцев Е.В., 1998). Проте, у доступних нам літературних джерелах відсутні комплексні дослідження морфологічного стану рогівки свині.

Проведені гістологічні, електронномікроскопічні, біохімічні і фізичні дослідження рогівки свиней у нормі підтверджують загальні закономірності структурної організації її компонентів і біохімічного складу та подібність до рогівки людини. Детальні ультраструктурні спостереження встановили, що у власній речовині інтактної ксенорогівки наявні три типи сполучнотканинних клітин – кератоцитів, які відрізняються за розмірами, формою, субмікроскопічною організацією. Крім типових дефінітивних фіброцитів, виділені молоді камбіальні клітини-фіброласти та зрілі фіброласти з добре розвиненими органелами, що активно синтезують компоненти міжклітинної речовини. Отриманий комплекс гістологічних, морфометричних і біохімічних даних при вивченні структурної організації ксенорогівки в нормі був необхідний для проведення порівняльного аналізу з результатами наступних досліджень.

Згідно з поставленою метою і завданнями, були проведені дослідження морфологічного стану ксенорогівки при різних методах консервування, що ґрунтувались на кріоконсервації, ліофілізації, кріоконсервації з кріопротектором та ліофілізації після попередньої кріоконсервації (Бігуняк В. В., 2004).

Морфологічний стан епітеліального шару і власної речовини кріоконсервованої ксенорогівки подібний до норми, однак, наявні зміни її структурної організації. Встановлене достовірне морфометричне збільшення параметрів структурних компонентів рогівки, зокрема середнє значення товщини переднього епітелію достовірно збільшується на 10 % порівняно з нормою (табл. 1). Площа базальних клітин збільшується на 17 %, а їх ядер – на 19 % і становить $(140,2 \pm 1,7)$ і $(26,8 \pm 1,3)$ мкм², в контролі, відповідно, – $(119,4 \pm 2,0)$ і $(22,4 \pm 1,4)$ мкм², $p < 0,001$. Проте, коефіцієнт ядерно-цитоплазматичного співвідношення змінюється статистично недостовірно.

Епітеліоцити базального шару видовжені, ядра в них з високою базофілією каріоплазми, що субмікроскопічно підтверджується збільшеною кількістю гетерохроматину. Цитоплазма клітин має більше оксифільне забарвлення в порівнянні з інтактною рогівкою. Субмікроскопічно наявні ділянки пошкодження ядерних і плазматичних мембран епітеліоцитів. Матрикс мітохондрій епітеліальних клітин просвітлений, що свідчить про пригнічення енергозабезпечення життєздатності клітин. Між епітеліоцитами на окремих ділянках є розширені міжклітинні простори, порушені десмосомальні контакти.

Таблиця 1

Морфометричні показники кріоконсервованої ксенорогівки при різних методах зберігання ($M \pm m$)

Показник	1 група (n=16)	2 група (n=15)	3 група (n=16)	p
	інтактна ксенорогівка	кріоконсервована ксенорогівка	кріоконсервована з кріо-протектором	
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	$p_{1-2} < 0,01$ $p_{1-3} > 0,05$

У власній речовині в умовах звичайного кріоконсервування утворюються невеликі неправильної форми світлооптичні порожнини, що за даними електронної мікроскопії, пов'язані з лізісом мікрофібрили в складі сполучнотканинних пластинок. Субмікроскопічно виявлені

фіброцити з подовгастими ядрами, що мають значні інвагінації каріолеми, потовщені нечіткі ядерні мембрани, перинуклеарний простір вузький або не спостерігається. Цитоплазма оточує ядро вузькою смужкою, має світлі ділянки і мало органел.

Задній епітелій рогівки представлений одним шаром плоских клітин, що мають базофільні ущільнені ядра, у яких каріолема з інвагінаціями. Цитоплазма оточена чіткою плазмолемою, у якій наявні пошкоджені органели, особливо мітохондрії. Вони мають світлий матрикс, значно зруйновані нечіткі кристи, а частково і зовнішні мітохондріальні мембрани. Подібні зміни структурної організації спостерігали при кріоконсервуванні рогівки людини (Горгиладзе Т.У., Шульгина Н.С., 1978).

Результати проведених морфометричних досліджень кріоконсервованої рогівки свині з використанням гліцерин – жовткової суміші показали, що кріопротектор забезпечує високий ступінь збереження всіх її структурних компонентів. Як видно з табл.1, морфометрично товщина поверхневого епітеліального шару статистично недостовірно відрізняється від товщини відповідного шару інтактної рогівки. При такому методі консервування як площа базальних клітин – $(119,8 \pm 1,8)$ мкм², так і площа ядер клітин базального шару епітелію – $(22,9 \pm 1,2)$ мкм² не мають суттєвих відмінностей від аналогічних показників інтактної рогівки, відповідно, – $(119,4 \pm 2,0)$ і $(22,4 \pm 1,4)$ мкм². Ядерно-цитоплазматичне співвідношення складає 0,238, в контролі – 0,232.

На ультраструктурному рівні у всіх морфологічних компонентах рогівки спостерігаються помірні зміни. Так, у епітеліюцитах 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 частково редуковані кристи. Такий стан органел в умовах кріоконсервування рогівки з використанням гліцерин – жовткової суміші свідчить про пригнічення біосинтетичних і енергетичних процесів у клітинах поверхневого шару. Ядра епітеліюцитів зберігають структурну організацію, в їх каріоплазмі переважає еухроматин. Клітини проміжного шару переднього епітелію рогівки в умовах цього методу консервування зберігають свою форму, плазмолема чітко контуровані, міжклітинні простори помірно розширенні, а десмосомальні контакти осміофільні і частково пошкоджені. Епітеліюцити базального шару також змінені незначно. 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 епітеліюцити в стані мітотичного поділу. У таких клітинах відсутня ядерна оболонка і відбувається конденсація хромосом. У мітохондріях базальних епітеліюцитів спостерігається часткове просвітлення

матриксу та деструкція крист. У цитоплазмі наявні також рибосоми, короткі каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, цистерни і вакуолі комплексу Гольджі, які помірно розширені.

Субмікроскопічно у власній речовині рогівки добре збережена більшість сполучно – тканинних пластинок, вони мають притаманну їм будову і розташування колагенових фібрил або паралельними ниткоподібними структурами, або у вигляді крапок на перпендикулярному перерізі. Проте, на окремих ділянках пластинки наявні ділянки просвітлення, де колагенові фібрили частково лізуються. Фіброцити мають переважно подовгасту форму, вузькі відростки. Їх еліпсоподібні ядра чітко контуровані мембранами каріолеми, а перинуклеарні простори вузькі.

Субмікроскопічні дослідження заднього епітелію рогівки при кріоконсервації після еквілібрації гліцерин – жовтковою сумішшю показали, що клітини зберігають структурну організацію, але мають відмінності у порівнянні з клітинами інтактною рогівки. Хроматин у каріоплазмі однорідний, помірної електронної щільності, ядрця спостерігаються рідко, вони маленькі осміофільні. Плазмолема в апікальній частині епітеліоцита виглядає потовщеною, а мікроворсинки поодинокі і невисокі. Подібна реакція заднього епітелію рогівки при використанні кріопротекторів описана і у роботах Hagenah M., Nelson J.D., 2001.

При проведенні комплексного морфологічного дослідження ліофілізованої ксенорогівки виявлено помітні деструктивні зміни її компонентів (табл. 2).

Таблиця 2

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

Показник	1 група (n=16)	4 група (n=15)	5 група (n=16)	р
	інтактна ксеноро-гівка	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

При морфометрії встановлено, що загальна товщина ліофілізованої ксенорогівки зменшується на 31 % (p<0,001), середнє значення товщини переднього епітелію достовірно зменшується на 27 %, а товщина власної речовини – на 34 % у порівнянні з контролем.

Спостерігається поліморфізм змін клітин переднього епітелію рогівки. Відмічається їх дезінтеграція, частина формує окремі скупчення, базальні клітини не мають впорядкованого

розміщення, в окремих ділянках відшаровуються від передньої пограничної пластинки. Міжклітинні простори епітеліоцитів базального шару розширюються, наявна базофілія пікнотично змінених ядер, парануклеарна зона цитоплазми – просвітлена. На ультраструктурному рівні зміни ядер характеризуються нерівними контурами каріолеми, розширенням перинуклеарного простору, осміофілією каріоплазми. Органел мало і вони значно пошкоджені. Субмікроскопічно передня і задня пограничні пластинки втрачають свою структурованість, стають гомогенними, мікрофібрилярні компоненти не виявляються. Власна речовина включає значно змінені фіброцити. Подовгасті ядра мають нерівні контури каріолеми, нечіткі ядерні мембрани. Каріоплазма стає гомогенною, включає маленькі ядерця, або вони відсутні. Органел в цитоплазмі клітин мало і вони пошкоджені. Канальці гранулярної ендоплазматичної сітки і цистерни комплексу Гольджі фрагментовані. Спостерігається мало мітохондрій, вони мають світлий матрикс і зруйновані кристи, нагадують вакуолі. У власній речовині ксенорогівки в умовах звичайної ліофілізації відмічені множинні оптичні пустоти, які хаотично розташовані. Просторове розміщення колагенових пластинок суттєво порушене. Ультраструктура клітин заднього епітеліального шару також значно деструктивно змінена. Звертають увагу електронно-світлі вакуолеподібні і крупні, неправильної форми порожнини, які займають значну ділянку цитоплазми, іноді від задньої пограничної пластинки до апікальної частини клітин. Ядра епітеліоцитів пікнотичні, неправильної форми з нерівною каріолемою. Каріоплазма електронно-щільна і гомогенна. На окремих ділянках епітеліоцити відшаровані від пограничної пластинки.

Гістологічні дослідження ліофілізованої ксенорогівки, яка попередньо піддавалась еквілібрації в гліцерин-жовткової суміші і кріоконсервації показали кращу збереженість структурних компонентів. Як видно з табл. 2, за таких умов консервування загальна товщина ксенорогівки зменшується на 21 % ($p < 0,001$), середнє значення товщини переднього – на 14 % ($p < 0,001$), а товщина власної речовини – на 22 % ($p < 0,005$), у порівнянні з товщиною інтактною роگیвки, тобто зазнає менших змін, ніж при звичайній ліофілізації.

Клітини цього шару зберігають притаманну їм 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, а збереженість мікрофібрил є кращою, ніж при звичайній ліофілізації. Власна речовина має пластинчасту структуру, але між колагеновими пластинами спостерігаються невеликі оптично-прозорі щілини. Фіброцити мають веретеноподібну форму і паличкоподібні ядра. Задній епітеліальний шар роگیвки представлений одношаровим плоским епітелієм із добре вираженим ядром зі світлою каріоплазмою.

Проведенні електронномікроскопічні дослідження ліофілізованої після кріоконсервування роگیвки свині встановили, що зміни клітин епітеліальних шарів та компонентів власної речовини

не такі значні, як при звичайній ліофілізації рогівки. У всіх шарах переднього епітелію добре контуруються плазматичні і ядерні мембрани. Спостерігається розширення міжклітинних просторів, проте, вони обмежені осміофільними десмосомами, біля яких наявний лізис мікрофіламентів. Для ядер поверхневого, проміжного і базального шарів характерні інвагінації каріолеми, гомогенізація каріоплазми, підвищена її осміофілія, мало ядерних пор. Грудки гетерохроматину та ядерця виявляються рідко. У світлій цитоплазмі епітеліоцитів небагато органел, частина їх стає вакуолеподібними. Фрагментуються і потовщуються каналці гранулярної ендоплазматичної сітки та цистерни комплексу Гольджі. Частина мітохондрій втрачає кристи має електронно-прозорий матрикс, що відображає порушення енергетичної функції органел.

У власній речовині, цей метод консервування рогівки свині змінює структуру, як фіброцитів, так і сполучно-тканинних пластинок. У передній крайовій ділянці власної речовини частина пластинок має підвищену електронну щільність, їх колагенові фібрили гомогенізуються, втрачають впорядковане розміщення. Фіброцити мають плоску, витягнуту форму, тонкі відростки, осміофільну каріо- і цитоплазму, в останній – мало органел. У середній ділянці власної речовини рогівки містяться більші за площею фібробласти. Їх ядра мають неправильну форму, значні інвагінації каріолеми. Ядерна оболонка потовщена, осміофільна, а ядерні пори не контуровані. Каріоплазма однорідна, помірної електронної щільності. Цитоплазма має просвітлену гіалоплазму і мало органел. Короткі, неширокі каналці гранулярної ендоплазматичної сітки, невеликі цистерни комплексу Гольджі, окремі зі світлим матриксом мітохондрії та мало полісом свідчать про низьку синтетичну активність фібробласта.

Ультраструктурна організація заднього епітеліального пласта рогівки змінюється. Каріоплазма ядер і гіалоплазма клітин стають осміофільними, утворюються різної конфігурації і розмірів електронно світлі порожнини. Контури плазмолем на окремих ділянках стають нечіткими. Характерним є наявність в епітеліоцитах різних за розмірами вакуолеподібних структур. Частина таких структур утворюється за рахунок нерівномірного потовщення каналців гранулярної ендоплазматичної сітки і цистерн комплексу Гольджі. 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.

Визначення біохімічних показників рогівки свині показали, що їх вміст подібний до рогівки людини. Власна речовина представлена білком колагеном та аморфною міжклітинною речовиною, що складається з глікопротеогліканів, які в свою чергу забезпечують прозорість тканини.

Проведенні дослідження показали, що інтактна ксенорогівка багата на протеоглікани, які становлять $(0,86 \pm 0,03)$ у.о. Кріоконсервування та ліофілізація призводять до зниженням концентрації цієї біохімічної сполуки. Так, при кріоконсервуванні вміст їх зменшується на 29,9 %

до $(0,61 \pm 0,04)$ у.о., $p < 0,001$, а при ліофілізації – на 19,8 % до $(0,69 \pm 0,03)$ у.о., $p < 0,01$. При дослідженні складових компонентів протеогліканів – глікозаміногліканів встановлено, що в інтактній ксенорогівці концентрація їх складала $(80,8 \pm 2,8)$ мг/кг сирової маси. При методах зберігання, що вивчались, вміст глікозаміногліканів достовірно зменшується, відповідно, до $(70,4 \pm 1,9)$ і $(70,6 \pm 2,9)$ мг/кг, $p < 0,05$. Аналіз отриманих результатів виявив, що зниження вмісту вуглеводневої частини протеогліканів – глікозаміногліканів є меншим, ніж зменшення загальної фракції протеогліканів, що, у свою чергу, указує на більше пошкодження білкового компонента в молекулі протеогліканів.

Особливу увагу мають дослідження світлооптичних параметрів консервованої ксенорогівки, з огляду на передбачене метою використання її, як біотехнологічного субстрату в пластичній офтальмології. Згідно даних наукової літератури, фізичний стан рогівки зумовлює її світлооптичні властивості (Maurice D.M., 1990). 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 – в ліофілізованій рогівці. Зменшення прозорості тканини у процесі висушування, пов'язане з деформацією її компонентів при дегідратації, що є загально визнаним фізичним процесом.

При проведенні поляризаційної флуоресценції кріоконсервованої і ліофілізованої ксенорогівок встановлено, що для них характерні анізотропні властивості, тобто їх макромолекулам притаманні особливості рідких кристалів.

Аналіз спектрального складу випромінювання взірців рогівки виявив деякі відмінності кількісного характеру, що вказує на неоднорідність вмісту внутрішньоклітинних нуклеїнових кислот у різних ділянках. Наявність нуклеїнових кислот є свідченням високої біологічної активності ксенорогівки, що повинно забезпечити можливість її використання, 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 інтактної рогики, 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 рогинок 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 рогики 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 рогики 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 сирової 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 рогики 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 ПРАЦЬ ОПУБЛІКОВАНИХ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. 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. (Здобувач провела інформаційний пошук, виконала експериментальні дослідження, аналіз і узагальнення їх результатів, підготувала роботу до друку).

2. Гребеник І. М. Морфологічний стан ліофілізованих ксенотрансплантатів рогівки / І. М. Гребеник // Вісник морфології. – 2008. – № 14 (2). – С. 317-319.

3. Гребеник І. М. Морфологічна характеристика і біохімічні показники ксенорогівки при кріоконсервації і ліофілізації / І. М. Гребеник, К. С. Волков, І. М. Кліщ // Вісник наукових досліджень. – 2009. – № 3. – С. 67-69. (Здобувач провела експериментальні дослідження, здійснила аналіз та статистичну обробку їх результатів, оформила роботу до друку).

4. Гребеник І. М. Ультраструктурна характеристика ксенотрансплантатів рогівки за різних умов консервування / І. М. Гребеник, К. С. Волков // Світ медицина і біології. – 2010. – № 1. – С. 28-32. (Здобувач провела експериментальні дослідження, здійснила аналіз результатів, оформила роботу до друку).

5. Гребеник І. М. Морфологічний стан рогівки при її консервації в експерименті / І. М. Гребеник // XII міжнародний конгрес студентів та молодих вчених, 31 березня – 2 квітня 2008 р. : матеріали конгресу. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2008. – С. 197.

6. Гребеник І. М. Морфологічні зміни ліофілізованих ксенотрансплантатів рогівки / І. М. Гребеник, К. С. Волков // Морфологічні основи компенсаторно-приспосувальних процесів і їх структурне забезпечення : науково – практична конференція, 10-11 жовтня 2008 р. : матеріали конференції. – Тернопіль : Укрмедкнига, 2008. – С. 25-26. (Здобувач провела експериментальні дослідження, морфометричні виміри, здійснила статистичну обробку їх результатів).

7. Гребеник І. М. Порівняльна гістологічна характеристика трансплантатів ксенорогівки при різних методах зберігання / І. М. Гребеник // XIII міжнародний конгрес студентів та молодих вчених, 27 – 29 квітня 2009 р. : матеріали конгресу, Тернопіль: Укрмедкнига, 2009. – С. 177.

АНОТАЦІЯ

Гребеник І. М. Морфофункціональні властивості рогівки свині при різних методах консервування. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.01 – нормальна анатомія – Державний вищий навчальний заклад "Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського" МОЗ України, Тернопіль 2010.

Дисертація присвячена вивченню морфофункціонального стану рогівки свині в нормі та її змін при кріоконсервуванні і ліофілізації.

На основі проведених комплексних морфологічних досліджень встановлено, що кріоконсервування з використанням кріопротектора забезпечує високий ступінь збереженості структурних компонентів рогівки. Морфометричні показники товщини рогівки, переднього епітелію, власної речовини достовірно не відрізняються порівняно з нормою.

Ліофілізація після попереднього кріоконсервування з використанням кріопротектора зменшує ступінь пошкодження структурних компонентів рогівки, краще зберігає плазматичні, ядерні і органоїдні мембрани епітеліоцитів і кератоцитів. Морфометричні показники не так значно змінюються, ніж при звичайній ліофілізації.

При кріоконсервуванні і ліофілізації з використанням кріопротектора встановлено задовільне збереження концентрації біохімічних сполук (протеогліканів, глікозаміногліканів, хондроїтинсульфату, сіалових кислот). Результати проведеного люмінісцентного аналізу кріоконсервованої з кріопротектором і ліофілізованої ксенорогівки встановили високий рівень нуклеїнових кислот, що вказує на збереженість її регенераторного потенціалу.

Ключові слова: рогівка свині, морфологічний стан, кріоконсервування, ліофілізація.

АННОТАЦИЯ

Гребеник И. М. Морфофункциональные свойства роговицы свиньи при разных методах консервирования. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.03.01 – нормальная анатомия – Государственное высшее учебное заведение "Тернопольский

государственный медицинский университет имени И. Я. Горбачевского” МЗ Украины, Тернополь, 2010.

Диссертация посвящена изучению морфофункционального состояния роговицы свиньи в норме и ее изменений при использовании разных методов консервирования.

Установлены структурные компоненты ксенороговицы в норме, а также ее гистологические, электронномикроскопические, морфометрические изменения в процессе криоконсервирования и лиофилизации с использованием криопротектора и без такового. Также изучено влияние различных методик консервирования роговицы на светооптические свойства и содержание некоторых биохимических показателей (гликопротеинов, сиаловых кислот, гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата).

Для реализации программы исследования использованы гистологические (светооптические и электронномикроскопические), морфометрические, биохимические методы, поляризационную флюоресценцию и спектральный анализ функционального состояния роговицы.

Комплексные морфологические исследования роговицы свиней в норме не выявили видовых особенностей структурной организации ее компонентов. Субмикроскопически в собственном веществе ксенороговицы обнаружены три типа кератоцитов, которые отличаются размерами, формой и структурной организацией. Кроме типичных фиброцитов, имеются камбиальные клетки-фибробласты и зрелые фибробласты, которые активно синтезируют компоненты межклеточного вещества.

Установлено, что криоконсервирование ксенороговицы без криопротектора приводит к морфологическим изменениям, которые характеризуются нарушением строения эпителиоцитов во всех слоях переднего эпителия, повреждением плазматических, ядерных и органоидных мембран, образованием неправильной формы светооптических полостей в собственном веществе, вследствие лизиса коллагеновых пластинок. Морфометрические параметры компонентов криоконсервированной ксенороговицы (общая толщина роговицы, толщина переднего эпителия и собственного вещества, площадь базальных клеток и их ядер) статистически достоверно отличаются от показателей интактной роговицы. Использование криопротектора при консервировании роговиц свиней способствует высокой степени сохранности клеток эпителиальных слоев, ее собственного вещества, структурированности мембран ядер и органелл, соединительнотканых пластинок и кератоцитов собственного вещества.

Лиофилизация ксенороговицы приводит к статистически значимым морфологическим изменениям всех ее структурных компонентов. Деструктивные изменения эпителиоцитов, кератоцитов и соединительнотканых пластинок носят необратимый характер, проявляются пикнозом ядер, разрушением органелл, образованием неправильной формы светооптических

полостей в собственном веществе. На 31 % уменьшаются общая толщина ксенороговицы, на 27 % – толщина эпителиальной пластинки, на 34 % – толщина собственного вещества ($p < 0,001$).

Лиофилизация ксенороговицы после криоконсервации с использованием криопротектора уменьшает степень повреждения ее структурных компонентов – плазматических, ядерных и органоидных мембран, компонентов собственного вещества в сравнении с обычной лиофилизацией. Общая толщина ксенороговицы уменьшается на 21 %, эпителиальной пластинки на 14 %, собственного вещества на 27 %, ($p < 0,001$).

Биохимические исследования интактной роговицы установили высокое содержание неколлагеновых компонентов (протеогликанов и их составляющих – гликозаминогликанов). Удовлетворительная сохранность концентрации биохимических соединений (протеогликанов, гликозаминогликанов, а также гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата и сиаловых кислот) при криоконсервировании и лиофилизации указывает на возможность использования указанных способов консервирования роговицы свиней.

Фотометрические исследования установили постепенное прогрессирующее снижение прозрачности при криоконсервации и, особенно, при лиофилизации в сравнении с прозрачностью интактной роговицы. Люминисцентный анализ криоконсервированной с криопротектором и лиофилизированной после криоконсервирования ксенороговицы выявил высокое содержание нуклеиновых кислот, что указывает на присущий ей регенераторный потенциал.

Ключевые слова: роговица свиньи, морфологическое состояние, криоконсервирование, лиофилизация.

SUMMARY

Hrebenyk I. M. The effect of different preservation methods on morphofunctional properties of porcine cornea. – Manuscript.

Thesis for a candidate of sciences degree in medicine in specialty 14.03.01 – normal anatomy. – State higher education institution “I. Horbachevsky Ternopil State Medical University”, Ternopil 2010.

The thesis is dedicated to the study of morphofunctional properties of normal porcine cornea and of the effects on it of cryopreservation and lyophilization.

Complex morphological studies established that cryopreservation with the use of a cryoprotectant permits to maintain a high degree of structural corneal integrity. With the use of this method the morphometric indices such as thickness of the entire cornea, anterior epithelium, and substantia propria do not differ significantly from the respective indices of a normal porcine cornea.

Lyophilization following cryopreservation with the use of a cryoprotectant permits to decrease the degree of structural corneal damage and to achieve better preservation of plasmatic, nuclear and organoid

membranes of keratocytes and epithelial cells. Morphometric indices alter to a lesser extent than after ordinary lyophilization.

Cryopreservation and lyophilization with the use of a cryoprotectant permit to retain sufficient concentrations of biochemical substances (glycosaminoglycans, hyaluronic acid, chondroitin sulfate, sialic acids). Preliminary luminescence analysis of cryopreserved with the use of a cryoprotectant and lyophilized xenocornea revealed a high level of nucleic acids, a marker of its sustained potential for regeneration.

Key words: porcine cornea, morphology, cryopreservation, lyophilization.