

- preparat soprovozhdeniya tsitostatischeckoy terapii bolnykh zlokachestvennymi novoobrazovaniyami. *Ekspirim.onkol.* 2000;22:94.
12. Jerne N, Nordin A. Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science.* 1963;140(3565):405.
 13. Immunologicheskie metody / pod red. G. Frimelya; per. s nem. AP Tarasova; M.: Meditsina, 1987;472.
 14. Levenson VT. Sposob statisticheskoj obrabotki rezultatov titrovaniya antitel. *Trudy Moskovskogo NII epidemiologii.* M., 1969;12:72-74.
 15. Gyulling EV, Sambur MB. O vosproizvedenii i otsenke reaktsiy giperchuvstvitelnosti zamedlennogo tipa *in vivo.* *Fiziologicheskiy zhurnal.* 1981;2:237-240.
 16. Melnikov OF, Zayats TA. Sravnenie radioizotopnogo i spektrofotometricheskogo metodov opredeleniya tsitotoksichnosti kletok. *Lab. Diagnostika.* 1999;1:43-45.
 17. Gubler EV. Vychislitelnye metody analiza i raspoznavaniya patologicheskikh protsessov. L.: Meditsina, 1978;296.
 18. Berezhnaya NM, Chekhun VF. Immunologiya zlokachestvennogo rosta. K.: Nauk. Dumka, 2005;791.

Some improvement opportunities of regenerative processes of rabbit cornea after experimental alkaline burns

*I. E. Herasymyuk, T. I. Romaniuk

Department of Anatomy, I. Ya. Gorbachevskiy State Medical University of Ternopol, Ukraine

*Corresponding author: herasymyuk@ukr.net. Manuscript received March 06, 2014; accepted April 03, 2014

Abstract

Background: Nowadays peptide bioregulators, stimulating repair processes, accelerating the substitution of necrotizing tissue with fibrous tissue and facilitating active access of young low-differentiated cellular elements between the corneal plates, represent a promising way of treating damaged cornea including its chemical burns. A well-known fact is that biological tissues exhibit a similar activity not only due to alive cells but also homogenates and extracts from them.

Material and methods: The experiments have been performed on 24 rabbits. Each animal has been subject to a corneal burn with alkali (10% NaOH). Time of exposition for alkali was 10 seconds. To a half of the animals corneal burn correction was done with the help of cryophilic pig skin extract. Beginning with the first day of the experiment the extract of cryophilic pig skin was applied into the conjunctiva sac 1 drop after every 2 hours, during three days. Other 12 rabbits didn't benefit from the extract correction.

Results: The results obtained proved that using cryophilic pig skin extract allowed to improve significantly regeneration processes in cornea tissues after alkali burn. Epithelialization of a damaged area is fulfilled faster and better. It is demonstrated by the increase in the number of epithelial cells and their earlier differentiation as well as the increase of regulation of connective-tissue fibers leading to a more effective improvement of the optical features of the damaged area.

Conclusions: It is assumed that this correction method enables the surface epithelium to regenerate due to division and migration of cornea basement epithelial cells as well as transformation and centre-oriented movement of limbus cambial (stem) cells that has already been mentioned in previous publications.

Key words: cornea, burns, alkaline, regeneration.

О некоторых возможностях улучшения регенеративных процессов роговицы глаза кроликов при её ожогах щёлочью в эксперименте

Введение

Проблема лечения ожогов глаз, которые являются тяжелым видом повреждений органа зрения, была и продолжает оставаться острой и актуальной. Что касается последствий травм глаза, то они составляют наиболее распространенную причину инвалидизации при глазной патологии [1]. Перспективным в их лечении, на сегодняшний день становится применение пептидных биорегуляторов [2]. А также аллогенных цитокинов, которые стимулируют репаративные процессы в роговице глаза, способствуя активации фибробластов, разрастанию рубцовой ткани, вращанию сосудов в роговицу, ускоряют процесс замещения некротизированной ткани роговицы фиброзной тканью, а также способствуют активному вторжению клеточных элементов между роговичными пластинами [3, 4]. Вместе с тем, общеизвестным уже является тот факт, что биологические ткани проявляют

свою активность не только за счет живых клеток, но и за счет гомогенатов и экстрактов из них. Поэтому за последние годы во многих странах происходит бурное развитие биотехнологий, направленных на получение биологически активных соединений, в частности, создание препаратов на основе фетального сырья, а также ксеноорганов: селезенки, печени, надпочечников и т. д. [5]. Это связано с увеличением интереса к многообразию и возможностям биологически активных веществ, которые можно получить из такого материала.

Одним из направлений в клеточной терапии травм роговицы может быть использование экстрактов криолиофилизованной кожи, содержащих биологически активные вещества [6]. Эти вещества могут проявлять регуляторное влияние, как на эпителиальную, так и на соединительную ткани, они также необходимы для ре-

гуляции процессов заживления и эффективной терапии патологических процессов [7, 8, 9].

Цель работы. Установить влияние экстракта криолиофилизованной свиной кожи на регенераторные процессы в роговице кроликов после ее ожогов щелочью.

Материал и методы

Эксперименты проведены на 24 кроликах, которым наносили ожоги роговицы щелочью – 10% NaOH. Перед процедурой изготавливались диски диаметром 8 мм из хлопчатобумажной ткани, обладающей гигроскопическими свойствами и способностью равномерно распределять влагу по всей поверхности. Тканевые диски пропитывали раствором щелочи и равномерно распределяли по поверхности роговицы без захвата зоны лимба. Экспозиция щелочи на роговицу составляла 10 секунд, в результате чего она приобретала вид матового стекла (рис. 1). После этого через 5 минут конъюнктивальный мешок промывали дистиллированной водой.

У 12 кроликов осуществляли коррекцию ожогов с применением экстракта криолиофилизованной свиной кожи, который в течение первого дня эксперимента вводили по 1 капле в конъюнктивальный мешок через каждые 2 часа, а в течение следующих дней – 3 раза в день. Еще 12 кроликов наблюдали без проведения коррекции.

Криолиофилизованные ксенодермоимплантаты свиные, как временные заменители кожи, используются при лечении ожоговых, скальпированных ран и трофических язв. Приказом Министерства Здравоохранения Украины № 9967/2003 они внесены в Государственный реестр медицинских изделий и разрешены к использованию в лечебных учреждениях Украины.

Экстракты получали путем инкубации фрагментов криолиофилизованной свиной кожи в физиологическом растворе (при pH 7.4) в соотношении 1:10 при температуре 20-23С° течение 60 минут. Материал для морфологического исследования забирали через 14 и 28 дней от начала эксперимента. Гистологические срезы толщиной 5-7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином, по Вейгерту и по Ван Гизону.

Все эксперименты проводились с соблюдением “Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных”.

Результаты и их обсуждение

Через 1 час с момента нанесения ожога макроскопически наблюдалось помутнение роговицы в пределах ее контакта с ожоговым агентом. Развивался отек с утолщением всех оболочек глаза. Заметно усиливалась инъекция кровеносных сосудов склеры и особенно конъюнктивы. На гистологических срезах склера и роговица выглядели набухшими и местами разволокненными, их толщина увеличивалась на 9-12%. При этом отек и утолщение роговицы были более характерными не столько для зоны непосредственного ожога, сколько для той ее части, которая была расположена вокруг поражения. Перед-

ний эпителий роговицы десквамировался, собственное вещество в ее передних слоях гомогенизировалось, а в заднем эпителии наблюдались умеренные дистрофические изменения, сопровождавшиеся кариолизисом. Толщина сосудистой оболочки возрастала в два раза за счет выраженного полнокроя, на 1/3 увеличивалась толщина радужки. В ряде мест возникал субретинальный отек с частичным отслоением сетчатки. Для 24-часового срока наблюдения характерным было некоторое восстановление структур глаза. Его макрометрические параметры частично возвращались к исходному уровню. Немного восстанавливалось состояние кровеносного русла, хотя толщина сосудистой оболочки продолжала еще значительно превышать контрольный уровень. Оставалась матовой обожженная часть роговицы. Практически неизменной по сравнению с 1-часовым сроком была ее гистологическая структура.

На 14 сутки экспериментального исследования, макроскопически, у животных без корректирующего влияния, площадь видимого дефекта уменьшалась почти на 30%, однако роговица оставалась мутной и непрозрачной. При гистологическом исследовании на значительной площади центральной части эпителий отсутствовал. Лишь в пограничной зоне эпителиальные клетки незначительно напоздали с периферии роговой оболочки к ее центру. Строма роговицы была отечная, рыхлая, инфильтрированная полиморфно-ядерными лейкоцитами и единичными макрофагами. В верхней трети стромы определялись отдельные фибробласты. Неупорядоченные волокна соединительной ткани разнонаправленно переплетались между собой. Во многих местах проявлялись признаки неангиогенеза в виде различной формы синусоидальных капилляров, заполненных скоплениями эритроцитов (рис. 2).

В отличие от этого у животных, которым применялась коррекция с использованием экстрактов криолиофилизованной свиной кожи, на 14 сутки эксперимента наблюдалась выраженная активация регенераторных процессов. Эпителиальные клетки напоздали с периферии роговой оболочки к ее центру. Эпителий недифференцированный, располагался в 1-2 ряда. При приближении к лимбу, количество рядов увеличивалось, а дифференциация возрастала. Более четкой становилась передняя пограничная пластинка. Упорядоченными выглядели волокна соединительной ткани собственного вещества роговицы (рис. 3, 4).

Дальнейшее наблюдение в 28-дневный срок позволило установить прогрессирование регенераторных процессов в обеих группах животных. Однако следует отметить, что у животных с коррекцией экстрактом криолиофилизованной свиной кожи эти процессы происходили значительно интенсивнее, чем у животных без использования корректирующего воздействия. Таким образом, если у животных без коррекции, пролиферация эпителия была сконцентрирована преимущественно в пограничной зоне роговицы между ее обожженной и не



Рис. 1. Матовое помутнение роговицы после 10-секундного ожога щелочью.

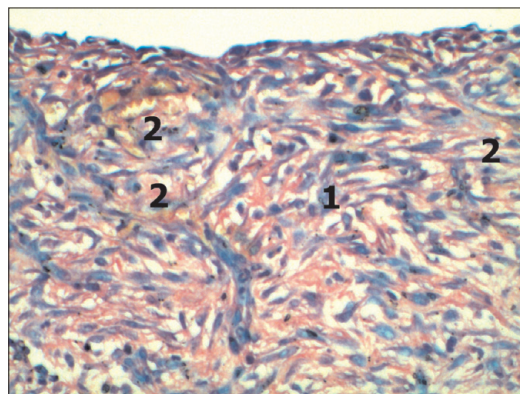


Рис. 2. Гистологический срез роговицы глаза кролика через 14 дней после нанесения ожога щелочью. Окраска по Ван Гизон. x 240.

Примечание: 1 – разнонаправленные и переплетенные между собой волокна соединительной ткани, фибробласты и отдельные макрофаги; 2 – очаги неоваскуляризации.

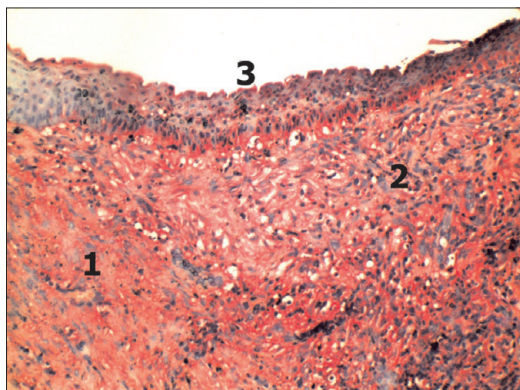


Рис. 3. Гистологический срез роговицы глаза кролика через 14 дней после нанесения ожога щелочью с коррекцией регенераторных процессов экстрактом криолифилизованной кожи свиньи. Окраска гематоксилином и эозином. x 180.

Примечание: 1 – собственное вещество роговицы с упорядоченным направлением соединительнотканых волокон в необожженной части; 2 – разнонаправленные соединительнотканые волокна обожженной части роговицы; 3 – наполнение эпителия с периферии к центру роговицы.

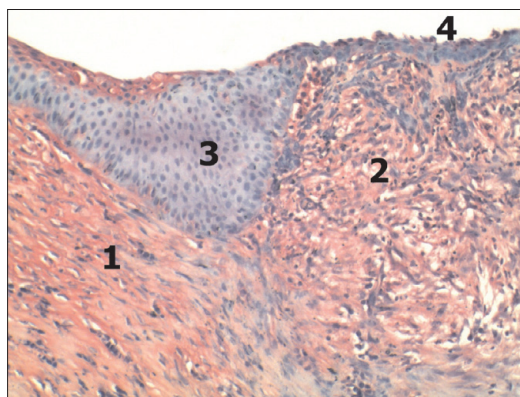


Рис. 5. Гистологический срез роговицы глаза кролика через 28 дней после нанесения ожога щелочью. Окраска по Ван Гизон. x 180.

Примечание: 1 – собственное вещество роговицы в периферической неповрежденной части; 2 – хаотическое переплетение соединительнотканых волокон в обожженной части роговицы; 3 – пролиферация эпителия в пограничной с ожогом зоне; 4 – тонкий слой недифференцированного эпителия в зоне ожогового дефекта.

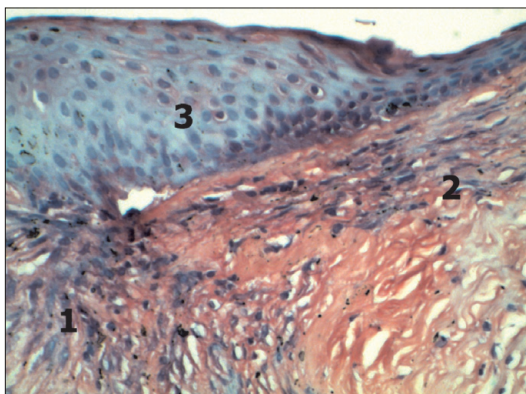


Рис. 4. Гистологический срез роговицы глаза кролика через 14 дней после нанесения ожога щелочью с коррекцией регенераторных процессов экстрактом криолифилизованной кожи свиньи. Окраска гематоксилином и эозином. x 180.

Примечание: 1 – собственное вещество роговицы с упорядоченным направлением соединительнотканых волокон в необожженной части; 2 – упорядоченность соединительнотканых волокон в обожженной части роговицы; 3 – наполнение эпителия с периферии по направлению к центру роговицы.

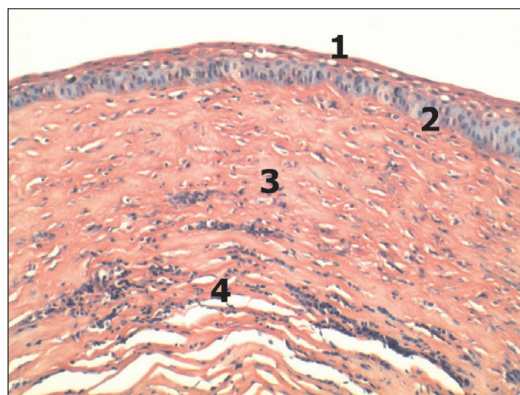


Рис. 6. Гистологический срез роговицы глаза кролика через 28 дней после нанесения ожога щелочью с коррекцией регенераторных процессов экстрактом криолифилизованной кожи свиньи. Окраска гематоксилином и эозином. x 180.

Примечание: 1 – слой плоского эпителия; 2 – цилиндрический эпителий на передней пограничной пластинке; 3 – собственное вещество роговицы; 4 – очаги полиморфноклеточной инфильтрации и умеренный отек с разволокнением глубоких слоев собственного вещества роговицы.

обожженной частями, а на обожженной части эпителизация имела очаговый характер (рис. 5), то у животных с применением экстракта криолиофилизованной свиной кожи эпителизации подлежала уже практически вся площадь ожога (рис. 6). Причем, у некорригированных животных эпителий в зоне поражения был преимущественно недифференцированным, с многочисленными зонами отслоения и располагался не более чем в 1-2 ряда, будучи мало упорядоченным. В то время как у животных с коррекцией он был уже многослойным, ближе к периферии, эпителиальный слой становился более упорядоченным, клетки приобретали цилиндрическую форму, а ядра становились более плоскими. Отек и инфильтрация стромы роговицы на данный период наблюдения у корректируемых животных значительно уменьшались, упорядочивалось направление расположения ее волокон. В верхних слоях сосредотачивалось лишь незначительное количество полиморфно-ядерных лейкоцитов. В результате этого, прозрачность роговицы возрастала, оставаясь, однако, еще умеренно завуалированной. В то же время, на микропрепаратах роговицы животных без коррекции строма была еще утолщенной, ее волокна хаотично переплетались, сохранялись скопления полиморфноядерных лейкоцитов. Степень помутнения при этом снижался незначительно, напоминая бельмо.

В результате проведенного исследования установили, что использование экстракта криолиофилизованной свиной кожи позволяет в значительной степени улучшить регенераторные процессы в тканях роговицы после ее ожогов щелочами. Очевидно, что при применении данного метода коррекция восстановления поверхностного эпителия происходит за счет деления и миграции базальных эпителиоцитов роговой оболочки, а также трансформации и центробежного движения камбиальных (стволовых) клеток лимба, что также подчеркивается и в других исследованиях, проведенных в этом направлении [10].

Выводы

Интраконтрактивальное применение экстракта криолиофилизованной свиной кожи позволяет значительно улучшить и ускорить регенераторные процессы в

тканях роговицы после ее ожогов щелочами, что может быть эффективным и при использовании в клинической офтальмологической практике.

References

1. Yakymenko SA, Buznik AI, Kostenko PA, et al. Lechenie bakterialnykh infektsiy 0,5% rastvorom levofloksatsina pri ozhogakh glaz i ikh posledstviyakh (sravnenie *in vitro* i *in vivo*) [Treatment of bacterial infections after eye burns and their consequences with 0.5% solution of levofloxacin (comparing *in vitro* and *in vivo*)]. *Oftalmol. zhurn. [Ophthalmol. journal]*. 2008;6:27-31.
2. Lee YC, Wang IJ, Hu FR, et al. Immunohistochemical study of subepithelial haze after phototherapeutic iridectomy. *J. Refract. Surg.* 2001;17(3):334-341.
3. Brodovsky Stephen C, McCarty Catherine A, Snibson Grant, et al. Management of alkali burns: An 11-year retrospective review. *Ophthalmology*. 2000;107(10):1829-1835.
4. Wagoner MD. Chemical injuries of the eye: current concepts in pathophysiology and therapy. *Surv. Ophthalmol.* 1997;41(4):275-312.
5. Sandomirsky BP, Galchenko SYe, Galchenko KS, et al. Antioxidative properties of lactoferrin from bovine colostrum before and after its lyophilization. *Cryo Letters*. 2003;24(5):275-280.
6. Shkodovskaya NYu, Galchenko SE, Mamontova AV, et al., Vliyanie ekstrakta kozhi novorozhdennykh porosyat na zazhivlenie ozhogovykh ran [Effect of the extract of the skin of newborn piglets on the healing of burn wounds]. *Probl. kriobiologii [Probl. of cryobiology]*. 2004;4:46-50.
7. Galchenko SE, Dyubko TS, Patsenker LD, et al. Spektrofluorimetricheskoe issledovanie ekstraktov kriokonservirovannykh fragmentov organov sviney. I. Sobstvennaya fluorestsentsiya [Spectrofluorimetric study of cryophilic pig organs extracts. I. Proper fluorescence]. *Eksperyment. i klinich. medytyna [Experiment. and clinical. medicine]*. 2006;1:48-52.
8. Galchenko SE, Dyubko TS, Sandomirskiy BP, et al. Spektrofluorimetricheskoe issledovanie ekstraktov kriokonservirovannykh fragmentov organov sviney. II. Analiz s pomoshchyu fluorestsennogo zonda K-35 [Spectrofluorimetric study of cryophilic pig organs extracts. II. Analysis using the fluorescent probe K-35]. *Eksperyment. i klinich. medytyna [Experiment. and clinical. medicine]*. 2006;3:57-61.
9. Yermakova N, Shinder A, Synchykova O, et al. Effect of extracts of animal origin on regeneration of skin and oral mucous. *Ukr. biokhim. zhurnal (spetsialnyi vipusk) [Eng. Biochem. Journal (Special Edition)]*. 2009;81(4):276.
10. Suhinin MV, Gololobov VG, Gayvoronskiy IV. Istochniki i skorost regeneratsii perednego epiteliya rogovitsy pri razlichnykh travmaticheskikh povrezhdeniyakh sosudistogo rusla perilimbalnoy zony glaza [Sources and regeneration rate of the surface epithelium of cornea in various traumatic injuries of the vascular stream of the eye]. *Materialy konf. uchenykh-morfologov Sankt-Petersburga "Sovremennyye problemy morfologii" [Proceedings of conference with scientists and pathologists of St. Petersburg "Modern problems of morphology"]*. SPb.: Elbi-SPb, 2009;132-134.