
Z Katedry i Zakładu Technologii Chemicznej Środków Leczniczych
Wydziału Farmaceutycznego Akademii Medycznej w Lublinie
p. o. Kierownik: dr farm. Kazimierz Zagórski

Kazimierz ZAGÓRSKI

**Uwagi techniczne dotyczące oszczędzającego sposobu przeprowadzania
liofilizacji tkanki rogówkowej**

**Технические замечания относительно экономного способа
проведения лиофилизации роговичной ткани**

**Observations on the Technique of a Sparing Method of Freeze-drying
of Corneal Tissue**

Możliwość szybkiego otrzymania materiału do przeszczepienia rogówki posiada niekiedy istotne znaczenie dla wykonania warstwowej keratoplastyki ze wskazań leczniczych. Zagadnienie to nabiera coraz to bardziej zasadniczego znaczenia tam, gdzie keratoplastyka powinna być wykonana szybko i gdy brak czasu na zbyt długie poszukiwania materiału, jak np. tam, gdzie zaistnieje konieczność wykonania keratoplastyki tektoniczno-rekonstrukcyjnej.

W tym celu zostały ostatnio przeprowadzone przez nas badania doświadczalne nad możliwością uzyskania materiału do keratoplastyki drogą liofilizacji (K r w a w i c z, S z w a r c, Z a g ó r s k i 1960). W wyniku tych badań można było stwierdzić, że przeszczep zamrożony w izopentanie ochłodzonym do -79°C nie doznawał uszkodzeń, które byłyby widoczne w preparatach mikroskopowych i które po przeszczepieniu miałyby ujemny wpływ na zachowanie przejrzystości przeszczepu. W badaniach tych wykazano również, że wysuszenie zamrożonego przeszczepu rogówki, które przebiegało przez okres kilku dni w niskiej ciepłocie przy bardzo małej różnicy temperatur między tkanką a wymrażalnikiem nie wpływało uszkadzająco na nabłonek i zrąb przeszczepu.

W ten sposób uzyskany przeszczep zastosowany w przebiegu doświadczalnej keratoplastyki warstwowej śródrogówkowej według sposobu podanego przez K r w a w i c z a (1960) dawał pomyślne wyniki w tym znaczeniu, że przeszczep wga-jał się bez powikłań i utrzymywał pełną przejrzystość. Ważny wydaje się również moment, że przeszczep liofilizowany nie był, jak to do tej pory czyniono, nawadniany przed operacją w odpowiednich płynach, lecz wszczepiany był śródrogówkowo na sucho, a rehydracja liofilizowanego przeszczepu odbywała się wewnątrz tkanki rogówki gospodarza. Również pierwsze próby kliniczne z zastosowaniem przeszczepu liofilizowanego z rogówek pobranych ze zwłok dały wyniki pomyślne (K r w a w i c z 1961).

Dotychczasowe, najważniejsze dane piśmiennictwa mieliśmy możliwość omówić poprzednio (K r w a w i c z, S z w a r c, Z a g ó r s k i). Ostatnio obok liofilizacji zaczyna być omawiana możliwość odwadniania rogówek przy zastosowaniu adsorbentów np. żelu krzemionkowego i przygotowywania w ten sposób przeszczepów (P a y r a u 1960).

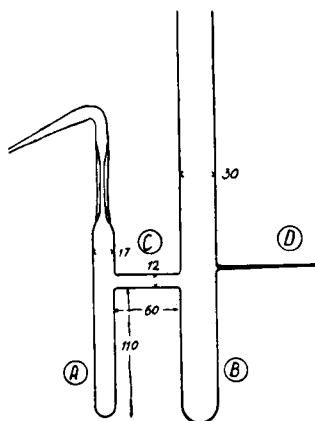
Wszystkie znane dotychczas metody zarówno liofilizacji, jak i odwadniania rogówek prowadzą jednak do uzyskania materiału, który wykazuje cechy dewitalizacji. Wydaje się, że korzystniejsze byłoby otrzymywanie przeszczepów, które po rehydracji wykazywałyby wszystkie cechy żywej tkanki. W wyniku przeprowadzonych badań histochemicznych (S z w a r c 1960) istnieją pewne podstawy do przyjęcia, że przeszczep liofilizowany przez nas i wszczepiony królikom, po auto-rehydracji nie różni się od przeszczepu żywego i nie wykazuje cech dewitalizacji. Badania te wymagają jednak dalszego potwierdzenia. W niniejszej pracy chcielibyśmy przedstawić niektóre techniczne szczegóły procesu liofilizacji przeszczepów rogówkowych uwzględniając ponadto własną modyfikację aparatury i postępowania.

METODA I MATERIAŁ

Sposób liofilizacji przeszczepów rogówkowych

Aparat do suszenia płatów rogówkowych (ryc. 1) wykonano ze szkła obojętnego a następnie wypróbowano na szczelność. Część B oraz łącznik C owinięto drutem oporowym o oporze 100 omów spełniającym rolę grzejnika. Kapilara włosowata D służyła do zapowietrzania aparatu po skończonej liofilizacji.

Świeżo pobrane przeszczepy rogówkowe zamrażano przez zanurzenie w pentanie ochłodzonym z zewnątrz mieszaniną suchego lodu i metanolu do temp. -79°C , a następnie umieszczano w trzech ochłodzonych,



Ryc. 1. Aparat do suszenia przeszczepów rogówkowych; A — wymrażalnik, B — pojemnik na probówki z przeszczepami, D — kapilara do zapowietrzania aparatu. Apparatus for drying corneal grafts; A — refrigerating chamber, B — container for keeping test-tubes with corneal grafts, D — capillary tube letting air into the apparatus.

cienkościennych probówkach. Probówki te, umieszczone w specjalnym uchwycie (K r w a w i c z, S z w a r c, Z a g ó r s k i) wstawiano do części B aparatu ochłodzonej uprzednio suchym lodem, po czym otwór aparatu zatapiano szybko palnikiem tlenowym. Metalowa osłonka wspomnianego uchwytu należycie chroniła zamrożone tkanki przed promieniowaniem cieplnym rozgrzanego szkła. Tak przygotowany aparat łączono węzłem gumowym poprzez wymrażalnik chłodzony mieszaniną stałego CO₂ i metanolu z zespołem pomp próżniowych. Opróżnianie aparatu z powietrza prowadzono aż do uzyskania ciśnienia 1×10^{-2} mm Hg, po czym przy tym ciśnieniu nie wyłączano jeszcze pomp próżniowych przez 15 minut celem usunięcia resztek pentanu z tkanki. Opróżniony z powietrza aparat odcinano następnie od pomp przez odtopienie palnikiem tlenowym specjalnego grubościennego przewężenia części A.

Zatopiony szczelnie aparat umieszczano w zamrażarce w kąpeli metanolowej chłodzonej węzownicą do ok. -40°C (termostat alkoholowy), a końce drutu oporowego łączono poprzez miliamperomierz i opornik ze źródłem niskiego napięcia. W naszych doświadczeniach suszono w każdym aparacie równocześnie 3 płyty rogówkowe. Stosując prąd grzejny o natężeniu w granicach 5—10 mA uzyskiwaliśmy całkowite wysuszenie tkanek w przeciągu 4—8 dni w zależności od natężenia prądu. Sprawdzianem prawidłowego przebiegu procesu suszenia jest narastanie na dnie części A kryształków lodu. Po skończonym suszeniu aparat zapowietrzano przez złamanie końca kapilary. Zapowietrzony aparat otwierano przez odcięcie górnej części naczynia B, a suche rogówki zatapiano natychmiast w ampułkach pod normalnym ciśnieniem.

Podczas wszystkich czynności do momentu wstawienia aparatu do zamrażarki chłodzono suchym lodem część B zawierającą zamrożone rogówki. Po skończonym suszeniu do chwili wyjęcia suchych rogówek z aparatu chłodzono podobnie część A. W ten sposób przeprowadziliśmy liofilizację 30 przeszczepów warstwowych o średnicy 5 mm rogówek pobranych z oczu królików.

WYNIKI BADAŃ

W wyniku przeprowadzonych badań mogliśmy stwierdzić, że liofilizacja płatów rogówkowych wykonana w opisany przez nas sposób oszczędzający tkankę, to znaczy przez bardzo szybkie zamrożenie w pentanie, powolne wysuszenie przy małej różnicy temperatur i ostrożne zapowietrzenie, nie uszkadzała w widoczny sposób przeszczepów.

Suche rogówki miały strukturę gąbczastą, barwę białawą, kształt regularny, na obwodzie były lekko wygięte. Po przeszczepieniu rehydrowały w krótkim czasie i szybko wgajały się zachowując pełną przejrzystość.

Każda nieszczelność aparatu w przebiegu procesu liofilizacyjnego prowadziła do uszkodzenia tkanki, które manifestowało się tym, że po przeszczepieniu rehydracja rogówki przebiegała w sposób opóźniony i niecałkowity, lub też płat zupełnie się nie nawadniał, a ponadto występowały trudności we wgajaniu się płata, który z reguły pozostawał nieprzejrzysty.

OMÓWIENIE WYNIKÓW

W omówieniu wyników chcielibyśmy podkreślić, że proces liofilizacji stwarza naszym zdaniem największe możliwości uszkodzenia delikatnej tkanki rogówki podczas zamrażania, suszenia jej oraz zapowietrzenia aparatury próżniowej. Na ogół można stwierdzić, że najlepsze wyniki przy zamrażaniu uzyskuje się przez bardzo szybkie obniżenie temperatury tkanki w każdym razie poniżej punktu zamarzania eutektycznych roztworów występujących w komórkach. Jak wiadomo, używano to przez zanurzenie tkanki w ciekłym azocie, mieszaninie metanolu i stałego CO₂, w ciekłym propanie ochłodzonym do -196°C (H e n a f f, R e y 1957), oraz innych oziębionych węglowodorach.

W naszym postępowaniu w liofilizacji tkanki rogówkowej przyjęliśmy, jako najbardziej oszczędzający, sposób zamrażania jej przez szybkie, bezpośrednie zanurzenie w pentanie ochłodzonym do -79°C . Zanurzenie tkanki w ciekłym azocie bowiem nie zapewnia dostatecznie szybkiego jej ochłodzenia z powodu występowania zjawiska L e i d e n f r o s t a (L e o p o l d 1955). Zjawisko to polega na tworzeniu się izolującej warstewki pary wokół zanurzonego ciała w wypadkach, gdy temperatura tego ciała jest znacznie wyższa od temperatury wrzenia cieczy. Przy zamrażaniu tkanek w ciekłym azocie zjawisko to występuje szczególnie wyraźnie, a skutkiem tego proces zamrażania nie przebiega z dostateczną szybkością.

Również niższe alkohole nie wydają się być odpowiednim środowiskiem do zamrażania tkanek rogówkowych, gdyż mieszają się z płynami tkankowymi, dając roztwory o silnie obniżonych punktach zamarzania, a ponadto denaturują białko.

Z uwagi na to, że pentan nie wykazuje zjawiska L e i d e n f r o s t a, gdyż posiada temperaturę wrzenia wyższą od temperatury tkanki w momencie jej zanurzenia, a również nie rozpuszcza się zupełnie w wodzie i nie denaturuje białka, wydaje się, że węglowódor ten dostatecznie ochłodzony stanowi w przyjętych przez nas warunkach doświadczeń środowisko zupełnie biochemicznie obojętne. W celu uniknięcia mechanicznego uszkodzenia płata podczas zamrażania, zanurzano go w pentanie przy użyciu specjalnego, opisanego poprzednio uchwytu.

Proces suszenia zamrożonej tkanki różni się zasadniczo od przebiegu suszenia zamrożonego roztworu. Przy suszeniu zamrożonych roztworów istnieje, przynajmniej początkowo, warstewka lodu stykająca się z ewakuowaną przestrzenią aparatury próżniowej i szybkość parowania tego lodu zależy w danym aparacie tylko od różnicy temperatur istniejącej pomiędzy suszonym roztworem a wymrażalnikiem. Również cząsteczki lodu położone głębiej sublimują szybko, gdyż wysuszona porowata warstwa zewnętrzna nie stanowi większej przeszkody dla przepływającej pary. Jest to tzw. pierwsza faza suszenia. W okresie tym usuwa się ok. 90% zawartości wody z zamrożonego roztworu. Pozostałą zawartość wilgoci stanowią cząsteczki wody silniej związane z białkami i innymi koloidami i usunięcie ich wymaga bardziej intensywnych warunków suszenia.

Przy suszeniu zamrożonych tkanek pierwsza faza suszenia w ogóle nie występuje i całkowita zawartość wody musi być usuwana drogą dyfuzji poprzez strukturę tkanki. Fakt ten utrudnia, a nawet uniemożliwia teoretyczne opracowanie tego procesu, gdyż nie znane są współczynniki dyfuzji cząstek H_2O dla różnych zespołów komórkowych. Szybkość dyfuzji można wprawdzie zwiększyć przez zwiększenie różnicy temperatur pomiędzy suszoną tkanką a wymrażalnikiem, prowadzi to jednak do zwiększenia różnicy ciśnień pomiędzy wnętrzem komórki a przestrzenią pozakomórkową, co z kolei może spowodować mechaniczne uszkodzenie tkanki. Gdy uzmysłowimy sobie fakt, że dla odparowania jednego grama lodu przy ciśnieniu 1×10^{-2} mm Hg należy odprowadzić 95000 litrów pary i to przez nieuszkodzoną strukturę tkanki stanie się jasnym, że proces suszenia winien być przeprowadzony możliwie powoli, w sposób oszczędzający tkankę. Decydujący wpływ na szybkość suszenia posiada różnica temperatur pomiędzy suszonym przez czepem a powierzchnią wymrażalnika oraz stopień rozrzedzenia gazu na drodze przepływu pary wodnej. Utrzymanie stałości tych parametrów na odpowiednim poziomie podczas całego przebiegu liofilizacji napotyka w praktyce laboratoryjnej na duże trudności. W dotychczas opublikowanych rozwiązaniach tego zagadnienia stosuje się dwie oddzielne kąpiele dla wymrażalnika i pojemnika z tkanką, przy czym stałość temperatur uzyskuje się bądź to sposobem termostatycznym, bądź też przez zastosowanie cieczy o odpowiednio dobranych punktach wrzenia. Obydwa te sposoby nie zapewniają jednak w warunkach laboratoryjnych na dłuższy przeciąg czasu wystarczająco stałej różnicy temperatur.

Zastosowany przez nas sposób suszenia pozwalał na dowolne regulowanie szybkości przebiegu tego procesu przy czym proces ten przebiegał w ustalonych warunkach samorzutnie, bez potrzeby stosowania ciągłej pracy pomp próżniowych. W naszym rozwiązaniu zrezygnowaliśmy

z kłopotliwego utrzymywania na stałym poziomie oddzielnie temperatur tkanki i wymrażalnika, a zwróciliśmy uwagę na niezmiennosc różnicy temperatur. Osiągnęliśmy to przez umieszczenie zarówno wymrażalnika, jak i pojemnika z tkanką we wspólnej kąpieli chłodzącej, przy czym tkankę ogrzewano dodatkowo za pomocą regularnego grzejnika elektrycznego. Ponieważ ilość ciepła dostarczanego do suszenia tkanki jest proporcjonalna do natężenia prądu płynącego przez grzejnik, zapewniliśmy w ten sposób stałość różnicy temperatur, niezależną w pewnych granicach od ewentualnych wahań temperatury wspólnej kąpieli. Przez zmniejszenie natężenia prądu grzejnego proces suszenia mógł być zatem dowolnie przedłużany. Stałość ciśnienia uzyskano przez pracę w szczelnej aparaturze szklanej, zatopionej po jej ewakuowaniu.

Trzecim z kolei momentem, w którym może nastąpić uszkodzenie wysuszonej już tkanki jest proces zapowietrzania aparatury po skończonej liofilizacji. Wysuszony płat przedstawia sobą kruchy twór, złożony z komórek, w których po usunięciu lodu panuje ciśnienie rzędu setnych części mm Hg. Nagłe wtargnięcie do zbiornika cząstek gazowych, poruszających się z wielką prędkością może spowodować mechaniczne uszkodzenie tkanki, gdyż wyrównanie ciśnienia w nie uszkodzonych komórkach może odbywać się tylko drogą dyfuzji, a więc stosunkowo powoli. W naszym rozwiązaniu zapowietrzenie aparatu odbywało się w ciągu kilkunastu sekund przez specjalną kapilarę.

W oparciu o uzyskane do tej pory pomyślne wyniki prowadzone są dalsze badania nad udoskonaleniem technologii procesu liofilizacji przeszczepów rogówkowych.

WNIOSKI

W wyniku przeprowadzonych badań mogliśmy zauważyć, że:

1. Dla oszczędzającego przeprowadzania liofilizacji przeszczepów rogówkowych istotne znaczenie posiadają szybkie zamrożenie tkanki, powolne jej wysuszenie, oraz ostrożne zapowietrzenie.

2. Chociaż opracowane do tej pory techniczne szczegóły postępowania wskazują na to, iż przy pomocy tak przeprowadzonej liofilizacji użyskujemy przeszczepy, które łatwo rehydrują w tkance rogówkowej i nie wykazują cech dewitalizacji, to jednak konieczne są dalsze badania nad udoskonaleniem technologicznym tego procesu.

PIŚMIENNICTWO

1. Henaff F., Rey L. R. C. R.: Sur une technique de préparation de greffons de cornée lyophilisés C. R. Acad. Sci., 245, 582—583, 1957.
2. Krwawicz T.: Intracorneal Lamellar Keratoplasty. Brit. J. of Ophthalm. 14, 629—633, 1960.

3. Krwawicz T., Szwarc B. Zagórski K.: Badania doświadczalne nad zastosowaniem liofilizowanego przeszczepu w warstwowej keratoplastyce śród-rogówkowej. *Klin. Ocz.* 30, 351—360, 1960.
4. Leopold K. F.: *Refrigerating Engrn.* 63, 49—92, 1955.
5. Payrau P.: Hornhautkonservierung und Heteroplastik. *Klin. Mbl. f. Aug.* 137, 49—55, 1960.

РЕЗЮМЕ

Авторами в настоящей работе изложены технические меры, а также обоснование экономного способа лиофилизации роговичных трансплантатов.

Изложенный способ лиофилизации соответствует трем основным условиям, необходимым для получения неизменных, по возможности, трансплантов: 1) быстрое замораживание ткани, 2) медленное ее высушивание и наконец, 3) осторожное наполнение воздухом.

В качестве наиболее надходящего вещества для замораживания был использован охлажденный изопентан. Этот углеводород не вызывает явления Лейденфроста, не денатурирует белка и не снижает точки замерзания тканевых жидкостей.

Медленное высушивание было получено путем прибавления небольших, регулированных количеств тепла в ткань, помещенную вместе с замораживающим средством в общей охлаждающей ванне. Этот способ обеспечивает удержание любой разницы температур между тканью и замораживающим средством в течение длительного промежутка времени.

После окончания лиофилизации наполняли воздухом аппаратуру через особый капилляр.

Роговичные трансплантаты, лиофилизированные вышеуказанным методом регидрировали после трансплантации в очень короткое время и удерживали полную прозрачность.

SUMMARY

The author describes the technical details of a sparing method of freeze-drying of corneal grafts.

The method fulfills the 3 basic conditions which make it possible to obtain grafts with a minimum of denaturation:

1. quick freezing of the tissue,
2. its slow drying,
3. cautious exposition to air.

Chilled isopentane was selected as the most suitable medium for

refrigerating the corneal tissue. This hydrocarbon is free from Leidenfrost's phenomenon, does not denature proteins and does not lower the freezing point of tissue liquids.

Slow drying was obtained by supplying small, controlled quantities of heat to the tissue placed with the refrigerating chamber in the refrigerating bath. This procedure makes it possible to maintain any difference of temperature between the tissue and the chamber for a long time. When the process of lyophilization was finished, air was let into the apparatus through a special capillary tube.

Corneal grafts freeze-dried by this method rehydrated in a very short time after transplantation and maintained full clarity.