УДК 617.7: 611.841.1: 616-003.93: 611-013.85: 615.453.2: 569. 323.4: 576.3.03

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОЯВЛЕНИЯ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ НАНОДИСПЕРСНОЙ ПЛАЦЕНТЫ С СОЕДИНИТЕЛЬНО-ТКАННЫМИ СТРУКТУРАМИ ГЛАЗА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ВВЕДЕННОЙ ДОЗЫ

[1]Перевозчиков П.А., [1]Васильев Ю.Г., [2]Карбань О.В., [1]Самарцев В.С.

[1]ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, Ижевск, e-mail: rector@igma.udm.ru;

[2]ФГБУН «Физико-технический институт» УрО РАН, Ижевск, e-mail: fti@fti.udm.ru

Проведен анализ особенностей морфологических изменений в соединительно-тканных структурах глаза крысы в эксперименте в зависимости от дозы вводимой нанодисперсной плаценты. Показано, что при введении порошка нанодисперсной плаценты в дозе 5 мг сухого вещества в зоне оперативного вмешательства наблюдается значительное усиление пролиферативных и регенераторных процессов в соединительной ткани глаза крысы с усилением коллагенообразования и ангиогенеза. Это подтверждалось наличием большого количества функционирующих кровеносных капилляров, прорастающих превазоидов, а также эндотелиальных почек роста и значительным повышением функциональной активности фибробластов. Увеличение дозы препарата (до 15–25 мг) чрезмерно усиливает проявления репаративных и асептических воспалительных процессов, что может носить даже негативный характер.

Ключевые слова: репаративная регенерация, ангиогенез, коллагеногенез, нанодисперсная плацента

THE DOSE-RESPONSE MORPHOLOGICAL MANIFESTATIONS OF THE NANODISPERSED PLACENTAE AND EYE CONNECTIVE TISSUE STRUCTURE INTERACTION

[1]Perevozchikov P.A., [1]Vasiliev U.G., [2]Karban O.V., [1]Samartsev V.S.

[1]Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, e-mail: rector@igma.udm.ru;

[2]Physical-Technical Institute Ural Branch of RAS, Izhevsk, e-mail: fti@fti.udm.ru

Analysis carried out has shown the features of morphological changes in rat eye connective tissue during the experiment depending on a entered nanodispersed placentae dose. It is shown that introduction of nanodispersed placentae powder in a dose of 5 mg of solid in surgery zone can cause significant amplification of proliferatire and regeneration processes in rat eye connective tissue and kollagenogenesis and angiogenesis increase. A great number of functioning blood capillaries, extending prevazoids and endothelial growth gemmas existence and also useful increase of functional fibroblast activity reflected it. The preparation dose increase (till 15–25 mg) excessively strengthens manifestations of reparative and aseptic inflammatory processes that can have even negative character.

Keywords: reparative regeneration, angiogenesis, kollagenogenesis, nanodispersed placentae

Выяснение закономерностей развития воспалительных и репаративных процессов в тканях в ответ на повреждение, а также модуляция регенерации являются важной проблемой, не потерявшей своей актуальности и в настоящее время. Особую значимость имеет понимание регенераторных процессов в соединительной ткани, в частности в соединительно-тканных структурах органа зрения, в ответ на альтерацию. В настоящее время с целью активации репаративных процессов в офтальмологии используются различные биологические материалы, применяемые в виде макроскопических имплантатов, которые в процессе своего рассасывания образуют депо биологически активных веществ, ускоряющих восстановление тканей реципиента и стимулирующих процессы ангиогенеза [1–3, 5]. Последние исследования, посвященные изучению регенерации пересаженного биологического материала, показали, что при уменьшении дисперсности имплантата (в микрометровом диапазоне) увеличивалась эффективность его взаимодействия с тканями реципиента. Использование нанодисперсных имплантатов из биологических материалов, способных глубоко проникать, вызывая репарацию и ангиогенез в прилежащих тканях реципиента, тем самым восстанавливать их трофику и функцию, может значительно расширить возможности медицины в комплексном лечении глазных заболеваний и особенно таких, которые до сих пор трудно или совсем не поддаются лечению. Однако изучение влияния имплантации биологических материалов животного происхождения, измельченных до наноразмерного уровня, на динамику дегенеративно-воспалительных и репаративных процессов в соединительно-тканных структурах глазного яблока в зависимости от вводимой дозы в настоящее время не проводилось.

Цель исследования – изучение особенностей морфологических проявлений взаимодействия нанодисперсных частиц биологического материала плацентарного происхождения с соединительно-тканными структурами фиброзной оболочки глазного

яблока реципиента в зависимости от введенной дозы.

Материал и методы исследования

Исследования выполнены на самцах белых беспородных крыс в возрасте 6 месяцев, массой тела от 200 до 250 г. В ходе эксперимента животным произведено введение взвеси лиофилизированной механоактивированной нанодисперсной плаценты [4] под конъюнктиву на склеру глаза под общей анестезией. В роли анестезирующего препарата применялся – Золетил 0,1 мл внутримышечно. В качестве имплантата использовали порошок нанодисперсной плаценты, который представлял собой отдельные частицы размером от 200 до 500 нм, сформированными зернами размером от 40 до 100 нм. Слабосвязанные частицы в свою очередь образовывали неустойчивые агломераты размером от 2 до 10 мкм.

Взвесь во всех случаях разводили в 0,08 мл физиологического раствора. Ведение взвеси производилось в верхне-наружном квадранте глазного яблока под конъюнктиву с помощью иглы диаметром 0,4 мм. В первой группе (опыт) применяли взвесь из расчета 5 мг сухого вещества. Во второй опытной группе произведено введение взвеси нанодисперсной плаценты из расчета 15 мг сухого вещества. В третьей опытной группе произведено введение взвеси нанодисперсной плаценты из расчета 25 мг сухого вещества. Четвертая группа животных (контроль) состояла из ложнооперированных крыс, которым под анестезией вводили под конъюнктиву физиологический раствор. Оперативное пособие завершалась инстилляцией 0,25 % левомицетина с целью профилактики гнойно-септического воспаления. Экспериментальные исследования проведены с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Забой проводили под наркозом – внутримышечное введение 0,15 мл препарата Золетил. Изучены группы животных к концу 3, 7, 14 суток, 1 месяца после манипуляций. Фиксацию осуществляли в 10 %-м растворе нейтрального формалина, заливали в парафин. Для общего морфологического анализа препараты окрашивали гематоксилин-эозином.

Результаты исследования и их обсуждение

В ранние сроки после имплантации (на 3-е сутки) в контрольной группе животных местные изменения проявлялись в виде умеренного асептического воспаления. Клетки лимфоидного и моноцитарно-макрофагического ряда располагались одиночно или в виде небольших групп непосредственно в зоне раневого дефекта и в пределах 150–300 мкм от него. Вблизи раны кровеносные капилляры были умеренно расширены.

В первой опытной группе к концу 3 суток в окружающей конъюнктиве и субконъюнктивальной основе лейкоцитарные реакции были более выражены по сравнению с контролем. Среди клеточных популяций, инфильтрирующих зону воспаления, преобладали клетки лимфоцитарного ряда, но выявлялись и нейтрофильные гранулоциты. Обнаруживались также единичные эозинофильные гранулоциты. Поверхностные участки склеры в первой опытной группе, как и в контроле, подверглись механической травме, и отличались от глубоких слоев нарушением структурной целостности коллагеново-волокнистых пластинок, разрыхлением пространств между коллагеновыми волокнами, между которыми были видны немногочисленные нейтрофилы и лимфоциты. Наблюдалось умеренное расширение микрососудов.

Во второй опытной группе у всех исследованных животных проявления воспалительного ответа были более выражены. Существенно увеличивалась толщина конъюнктивы в зоне прилегающей к раневому дефекту, в первую очередь за счет признаков экссудации. Возникали проявления умеренного отека межклеточного вещества с конъюнктивы и поверхностных участков склеры, с разволокнением коллагеновых пластинок последней. Расширение микрососудов не сопровождалось морфологическими признаками стаза. Инфильтрация клеточными элементами носила умеренный характер и проявлялась в преобладании нейтрофильно-клеточных ответов. Клетки нейтрофильного ряда располагались небольшими группами, особенно в участках скоплений мелкозернистого гомогенного материала размерами до 1–2 мкм, рассматриваемых нами как агломераты механоактивированного нанодисперсного порошка плаценты.

В третьей опытной группе морфологические изменения были близки к животным, которым было введено 15 мг взвеси, но изменения были более выражены, в первую очередь в виде лейкоцитарных клеточных реакций, также носивших очаговый характер.

К концу 7 суток после манипуляции начинаются процессы ранней реэпителизации раневой зоны, что имело место, как в контрольной, так и во всех группах опытных животных. В контроле в зоне раневого дефекта видны единичные мононуклеары. Явления периваскулярного отека незначительны. Распределение и структура сосудов микроциркуляторного русла на светооптическом уровне близка к таковой к удаленным участкам конъюнктивы и склеры. Зона повреждения заметна в виде умеренной деструкции в месте непосредственного оперативного воздействия.

В первой опытной группе к концу 7-х суток усиливаются инфильтративно-эксудативные процессы в участках тканей конъюнктивы и поверхностных слоях склеры в зоне введения препарата. Это проявляется в лимфоцитарно-моноцитарных клеточных ответах, умеренной инфильтрации

мононуклеарами тканей прилежащей склеры и конъюнктивы. Выявлено умеренное расширение сосудов микроциркуляторного русла. Наряду с лейкоцитарно-клеточными реакциями, наблюдаются пролиферативно-фибробластические ответы. Фибробласты формируют обильные клеточные тяжи, разделенные нежными волокнистыми структурами.

У животных второй опытной и третьей группы проявления асептических экссудативно-клеточных реакций более выражены, при этом близки по характеру ответов к таковым у опытных животных первой группы. Это проявляется в значительном числе клеток лейкоцитарного ряда в зоне раневого дефекта и места введения, с преобладанием моноцитарно-макрофагических и нейтрофильно-клеточных ответов.

К концу 14-х суток после оперативного вмешательства у контрольных животных в участках конъюнктивы, соответствующих оперативной травме, наблюдаются признаки реэпителизации по всей площади раневой поверхности. Зоны конъюнктивы и поверхностных слоев склеры, подвергшиеся механическому повреждению в ходе оперативного вмешательства, обнаруживаются лишь по повышенному содержанию молодых клеток фибробластического и моноцитарно-макрофагического ряда, скоплению нежных, беспорядочно лежащих коллагеновых волокон, указывающих на проявления начинающегося коллагеногенеза в области повреждения. При этом участки разрушенных коллагеновых пластинок поверхностных слоев склеры сохраняют дефекты распределения коллагеновых волокон.

У животных первой опытной группы отмечаются значительные различия в морфологических ответах по отношению к контролю соответствующего срока наблюдения. Зоны посттравматического дефекта также подверглись реэпителизации. В участках, непосредственно подвергшихся вмешательству, особенно в глубоких зонах (куда вводилась взвесь), выявлены признаки умеренной инфильтрации мононуклеарами и немногочисленными полиморфноядерными клетками, при этом не выявляются признаки набухания клеток и существенного отека межклеточного вещества. Наряду с указанными клеточными популяциями, обнаруживаются значительное число клеток фибробластического ряда. Нередко выявляются фигуры митозов. Это типично также и для зон в непосредственном окружении от места оперативного вмешательства, постепенно снижаясь по проявлениям по мере удаления. Существенно и то, что участки введения механоактивированного нанодисперсного материала плаценты отличаются значительной активацией ангиогенеза, что проявляется в увеличении числа функционирующих кровеносных микрососудов, появлении эндотелиально-клеточных тяжей и эндотелиальных почек роста – указывающих на активацию репаративного ангиогенеза в рассматриваемый срок. В зонах поверхностных участков склеры, подвергшихся повреждению, и раневого дефекта соединительно-тканой пластинки конъюнктивы формируются обильные сети нежных коллагеновых волокон, указывающих на активный коллагеногенез.

У животных второй опытной группы к концу 14-х суток местные реакции сохраняют весьма выраженный характер. Сохраняются проявления локальных асептических экссудативно-пролиферативных реакций. Поверхность раневого дефекта, так же реэпителизована, как и в предыдущих группах. Но в зоне как непосредственной травматизации, так и в прилежащих областях имеется множество клеток моноцитарно-макрофагического и фибробластического рядов. В склеральном содержимом наблюдаются признаки отека с увеличением объема аморфного компонента межклеточного вещества и разобщением пластинок коллагеновых волокон. Значительно возрастает толщина конъюнктивы. Содержание полиморфоядерных клеток невелико и составляет не более 8–15 % от общей популяции клеток. Моноциты и макрофаги имеют типичное строение. Выявляются отдельные плазмоциты и лимфоциты. Нередко обнаруживаются фигуры митозов. Особенностью фибробластов являются признаки их значительной гипертрофии (клетки достигают 25–30 мкм), хорошо развит ядрышковый аппарат, клетки нередко формируют скопления. Все это косвенно указывает на значительное повышение их функциональной активности, что подтверждается усилением коллагенообразования, особенно по периферии зоны воспаления, значимо превышающим аналогичные явления в контроле и первой опытной группе. Наряду с выраженной активацией пролиферативной активности, наблюдается значительное число клеток со сморщенными ядрами и проявлениями кариопикноза и кариорексиса. По периферии зоны инфильтрации резко возрастает число сосудов микроциркуляторного русла. Имеется много, как функционирующих кровеносных капилляров, так и прорастающих превазоидов и эндотелиальных почек роста.

В 3-й опытной группе также сохранятся признаки местного воспалительного процесса. Реэпителизация раны аналогична наблюдаемые проявлениям в контроле. Изме-

нения в зоне повреждения и имплантации механоактивированного нанодисперсного материала плаценты аналогичны выявленным у животных второй опытной группы, но еще более выражены.

К концу первого месяца в первой опытной группе по сравнению с контролем толщина фиброзной оболочки увеличена за счет новообразованных коллагеновых волокон с множеством вновь сформированных сосудов, активных фибробластов. Новообразованная соединительная ткань по плотности приближалась к отдаленной от зоны имплантации. Макромолекулярная организация вновь образованных коллагеновых волокон указывает на высокую степень их морфологической зрелости. Волокнистая организация межклеточного вещества склеры приобретает упорядоченный характер. Во второй и третьей группе по сравнению с первой процесс коллагенообразования имел более диффузный и выраженный характер.

Заключение

Таким образом, введение взвеси механоактивированной нанодисперсной плаценты оказывает выраженное модулирующее действие в зоне и вокруг раневого дефекта в ранние сроки после оперативного вмешательства. В ранние сроки морфологические изменения носят преимущественно очаговый характер, в последующем приобретая диффузный. В дозах 5 мг эти влияния проявляются в значительном усилении пролиферативных и регенераторных процессов в соединительной ткани с усилением коллагенообразования. Заметно повышение репаративного ангиогенеза. Применение препарата в дозах 15 и 25 мг чрезмерно усиливает проявления репаративных и асептических воспалительных процессов, что может даже носить негативный характер. Все это предполагает необходимость строгого контроля за вводимой дозой применяемого препарата.

Список литературы

1. Галимова В.У. Динамика зрительных функций у больных с пигментной дегенерацией сетчатки после хирургического лечения биоматериалом «Аллоплант» // Вестник офтальмологии. – 2001. – № 3. – С. 20–23.

2. Канюков В.Н. Экспериментально-гистологические основы новых технологий в офтальмохирургии / В.Н. Канюков, А.А. Стадников. – Оренбург: ОАО «ИПК «Южный Урал», 2009. – 104 с.

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

4. Патент РФ № 2008101216/15, 09.01.2008. / Жаров В.В., Лялин А.Н., Коныгин Г.Н., Перевозчиков П.А., Точилова Е.Р. Способ приготовления биофункционального трансплантата в виде наночастиц // Патент России № 2367448. 2009 Бюл. № 26.

5. Сомов Е.Е. Склеропластика. – СПб.: Петербургский педиатрический мед. ин-т, 1995. – 144 с.

References

1. Galimova V.U. Dynamics of patients visual functions with retina pigmentary degeneration after surgical treatment by the biomaterial «Alloplant» // Messenger of ophthalmology, 2001, no. 3, pp. 20–23.

2. Kanukov V.N., Stadnikov A.A. An experimental and histologic bases of new technologies in an ophthalmosurgery, Orenburg, 2009, pp. 104.

3. Muslimov S.A. Morphological aspects of regenerative surgery, Ufa, 2000, pp. 168.

4. Russian Federation Patent № 2008101216/15, 09.01.2008. Zharov V.V., Lyalin A.N., Konigin G.N., Perevozchikov P.A., Tochilova E.R. A biofunctional nanoparticles transplant preparation method // Russian Federation Patent № 2367448.2009 Bull. no, 26.

5. Somov E.E. Scleroplastica // Petersburg, 1995, pp. 144.

Рецензенты:

Селякин С.П., д.м.н., профессор кафедры анатомии человека ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г. Ижевск;

Шумихина Г.В., д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, г. Ижевск.

Работа поступила в редакцию 26.11.2012.