

УДК 612.841.1: 616-003.93: 618.36: 615.453.2

РЕПАРАТИВНАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ ПЕРЕДНЕЙ СТЕНКИ ГЛАЗА В ОТВЕТ НА ИМПЛАНТАЦИЮ НАНОДИСПЕРСНОЙ ПЛАЦЕНТЫ

Перевозчиков П.А.

ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России,
Ижевск, e-mail: rector@igma.udm.ru

В эксперименте на самцах белых крыс трехмесячного возраста с массой тела 220–300 г. изучена репаративная регенерация соединительнотканых структур передней стенки глаза животного методом иммуногистохимического анализа с определением экспрессии Ki-67 при имплантации биологического контейнера с нанодисперсной плацентой, крупноизмельченной плацентой, а также у ложнооперированных животных (разрез конъюнктивы без имплантации биологического контейнера). Проллиферативные процессы в виде образования рыхлой соединительнотканной капсулы в зоне операции с формированием в ней множеством новообразованных сосудов, активизация фибробластов были в значительной степени выражены при имплантации биоконтейнера с нанодисперсной плацентой. Отмечено усиление процессов пролиферации с активизацией фибробластов и формированием гемокапилляров в наружных и средних слоях склеры, прилежащей зоне имплантации биоконтейнера, только в группе животных с имплантацией биоконтейнера с нанодисперсной плацентой. Таким образом, нанодисперсная плацента за счет приобретения ею вследствие механоактивации новых физических свойств, таких как повышенная проницаемость и гидрофильность, значительно усиливает процессы пролиферации в соединительнотканых структурах передней стенки глаза реципиента.

Ключевые слова: механоактивация, репаративная регенерация, нанодисперсная плацента, иммуногистохимия

REPARATIVE REGENERATION OF THE EYE'S ANTERIOR WALL IN RESPONSE TO IMPLANTATION OF THE NANODISPERSED PLACENTA

Perevozchikov P.A.

Izhevsk State Medical Academy, Izhevsk, e-mail: rector@igma.udm.ru

In the experiment on male white rats of three-months age with the body weight of 220–300 g reparative regeneration of the connective-tissue structures of the anterior wall of the animals eye was studied by an immunohistochemical analysis with determination of Ki-67 expression when implanting the biological container with a nanodispersed placenta and the biological container with a coarse-ground placenta. The control group included animals with conjunctiva section without the implantation of the biocontainer. Proliferative processes such as the formation of a loose connective-tissue capsule in an operation zone with multiple angiogenesis and the fibroblast activation were considerably marked after the implantation of the biocontainer with a nanodispersed placenta. Strengthening of proliferation processes with fibroblast activation and the generation of haemocapillaries in external and middle layers of the sclera adjacent to the biocontainer implantation zone was noted only in group of animals implanted with the biocontainer with a nanodispersed placenta. Thus, due to mehanooactivation the nanodispersed placenta acquires new physical properties such as increased permeability and hydrophily and as a result the placenta substantially strengthens proliferation processes in the connective-tissue structures of the anterior wall of the recipient eye.

Keywords: mechanoactivation, reparative regeneration, nanodispersed placenta, immunohistochemistry

Изучение процессов репаративной регенерации до сих пор остается актуальным в биологии и медицине [2, 5]. Особенно это важно для биологических тканей, в которых регенерация очень низка или практически отсутствует, в частности, в офтальмологии – в ходе манипуляции для укрепления наружной стенки глаза при ее дистрофических процессах [3, 9, 10].

В предварительных исследованиях эффективности применения различных аллоплантов и имплантатов выявлено их значительное модулирующее влияние на поврежденные ткани [7]. Использование измельченных в порошок биологических материалов в виде крупнодисперсной взвеси уменьшает травматичность методики за счет минимизации разрезов слизистой оболочки, однако репаративная регенерация возникает также только на поверхности склеры в зоне ее введения [5, 6].

Известно, что измельчение до наноразмерной структуры вещества без изме-

нения его химического состава изменяет в сторону увеличения его физические свойства: проникающую способность, гидрофильность и т.д. [4]. Однако изучение влияния имплантации биологических материалов, измельченных до наноразмерного уровня, на динамику репаративных процессов в соединительнотканых структурах передней стенки глаза в настоящее время не проводилось.

Цель исследования – изучить закономерности репаративной регенерации соединительнотканых структур передней стенки глаза в ответ на имплантацию нанодисперсной плаценты.

Материалы и методы исследования

Экспериментальные исследования выполнены на самцах белых крыс трехмесячного возраста с массой тела 220–300 г. В первой группе животным (опыт) под слизистую на склере глаза под местной анестезией имплантировали биологический контейнер (БК) размерами $3,0 \pm 0,5 \times 1,0 \pm 0,2$ мм. Биоконтейнер представлял собой отрезок сосуда амниотической оболоч-

ки человека и был наполнен $0,05 \pm 0,01$ г порошком нанодисперсной плаценты, полученной методом механоактивации [1]. Порошок состоял [8] из отдельных частиц размером от 200 до 500 нм, сформированных зернами размером от 40 до 100 нм. Частицы в свою очередь образовывали слабосвязанные агломераты размером от 2 до 10 мкм. Во второй опытной группе животным под слизистую на склере глаза под местной анестезией имплантировали биологический контейнер, заполненный порошком из крупноизмельченной плаценты с размерами частиц более 45 мкм, в аналогичной дозе. Третья группа животных (контроль) состояла из ложнооперированных крыс, которым под анестезией проводили разрез, аналогичный таковому в ходе имплантации.

Экспериментальные исследования проведены с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Забой производили под тиопенталовым наркозом путем декапитации. Изучены группы животных к концу 3, 7, 30 и 60 суток после манипуляций (по 5 животных в каждой группе). Фиксацию осуществляли в 10% растворе нейтрального формалина, заливали в парафин. Исследование структуры порошка измельченной плаценты человека и поверхности гистологических срезов зоны оперативного вмешательства проводились на сканирующей зондовой лаборатории Ntegra (NT-MDT) в прерывисто-контактной методике на воздухе после предварительной химической очистки от парафина. Аналогичным образом изучена структурная организация коллагеновых волокон в участках предварительно проведенных манипуляций. Для общего морфологического анализа препараты окрашивали гематоксилин-эозином. Изучение пролиферативной активности соединительнотканного окружения трансплантируемого материала выявляли иммуногистохимически с определением экспрессии Ki-67 ПАП методом.

Результаты исследования и их обсуждение

В ходе проведенных экспериментальных исследований выявлено, что постимплантационный период у животных протекал без видимых осложнений: отсутствовали признаки отторжения и вторичной инфекции.

В ранние сроки (3–7-е сутки) после имплантации БК во всех рассмотренных случаях имплантат сохранялся в обеих опытных группах. Отмечалась умеренная воспалительная инфильтрация как оболочки БК, представленной стенкой сосуда, так и окружающей конъюнктивы и субконъюнктивальной основы. Это проявлялось в лимфоцитарно-моноцитарных клеточных ответах, умеренной инфильтрации мононуклеарами тканей прилежащей склеры и конъюнктивы, появлении отдельных лейкоцитов в стенке и в содержимом БК. В контроле же проявления клеточных реакций были значительно менее выражены. Прилежащий участок склеры реципиента в первой опытной группе характеризовался разрыхлением стромы, между коллагеновыми волокнами которой видны нейтрофилы

и лимфоциты, а также мелкие полихромно окрашенные пылевидные частицы, аналогичные наблюдаемым при исследовании гистологического среза БК. При этом отмечено сохранение наноразмерной структуры измельченной плаценты 40–100 нм. Разволокнение поверхностных слоев склеры во второй опытной группе было незначительное, их инфильтрация под БК не отмечалась. В контроле склера была интактна.

Иммуногистохимическое исследование с определением экспрессии Ki-67 ПАП методом показало выраженную пролиферативную активность клеток соединительнотканной основы слизистой оболочки глаза вокруг БК (рис. 1, 2) в первой контрольной группе, умеренно выраженную пролиферативную активность в зоне имплантации БК с крупноизмельченной плацентой (рис. 3) и низкую пролиферативную активность в зоне разреза слизистой и подслизистой оболочек в опытной группе (рис. 4).

Через 30 суток после проведенной манипуляции как у контрольных, так и опытных животных зона внешней поверхности раневого повреждения подвергалась полной реэпителизации. В контроле на месте хирургического вмешательства сформировался рубец в виде ограниченного участка плотной волокнистой соединительной ткани с сетевидно распределенными коллагеновыми волокнами. Лейкоцитарно-клеточные реакции в зоне и непосредственно вокруг повреждения у контрольных животных отсутствовали. У животных опытных групп в зоне имплантации наблюдались остатки стенки БК в виде небольших скоплений участков эластических и коллагеновых волокон с наличием лимфоцитарно-клеточного ответа в них. У животных обеих опытных групп в непосредственном окружении БК наблюдались значительные клеточные скопления, включающие лимфоциты, пролиферирующие и зрелые клетки фибробластического ряда, эпителиоидные клетки.

При этом фибробласты формировали тонкую соединительную капсулу вокруг БК с множеством гемокапилляров и наличием эпителиоидных клеток, однако в первой опытной группе при имплантации БК с нанодисперсной плацентой процессы клеточных реакций, а также формирование новых капилляров было более выражено. Кроме того, отмечалась пролиферативная активность клеток фибробластического ряда в прилежащей к БК склере реципиента, в ее поверхностных и средних слоях, а также формирование в них гемокапилляров, что практически отсутствовало во второй группе животных с имплантацией БК с крупноизмельченной плацентой.

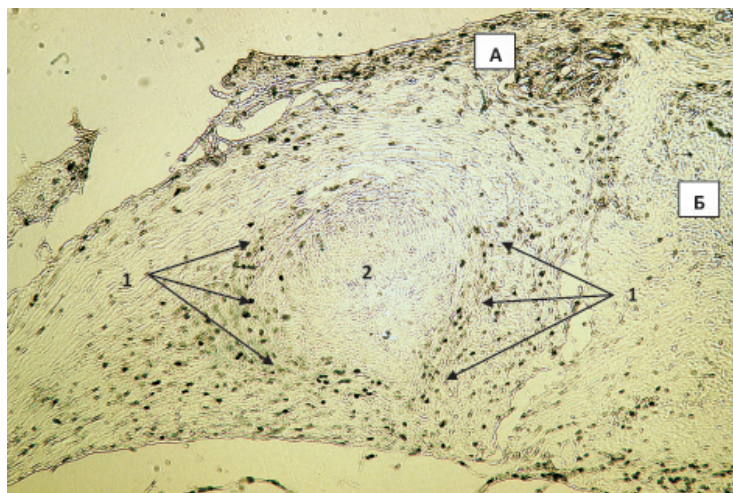


Рис. 1. Обзорное изображение экспрессии Ki-67 в зоне имплантации биоконтейнера в 1-й опытной группе на 7-е сутки после вмешательства. Вторые антитела, меченные пероксидазой. Ув. x50:
1 – участок соединительной ткани с признаками высокой пролиферативной активности,
2 – остатки биоконтейнера; А – слизистая оболочка; Б – подслизистая оболочка

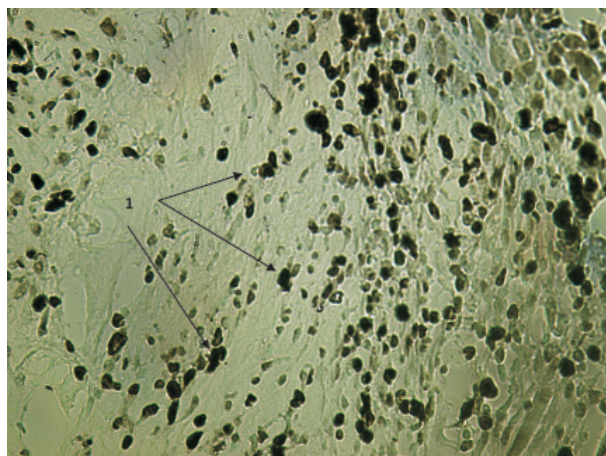


Рис. 2. Экспрессия Ki-67 в зоне, непосредственно прилегающей к имплантируемому биоконтейнеру в 1-й опытной группе на 7-е сутки после вмешательства. Вторые антитела, меченные пероксидазой. Ув. x200: 1 – пролиферативно активные клетки

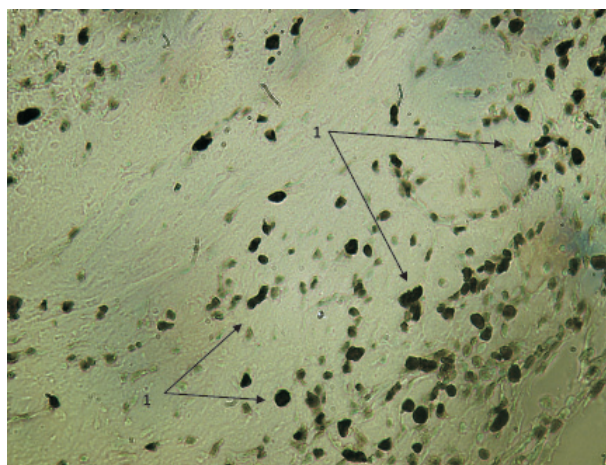


Рис. 3. Экспрессия Ki-67 в зоне, непосредственно прилегающей к имплантируемому биоконтейнеру во 2-й опытной группе на 7-е сутки после вмешательства. Вторые антитела, меченные пероксидазой. Ув. x200: 1 – пролиферативно активные клетки

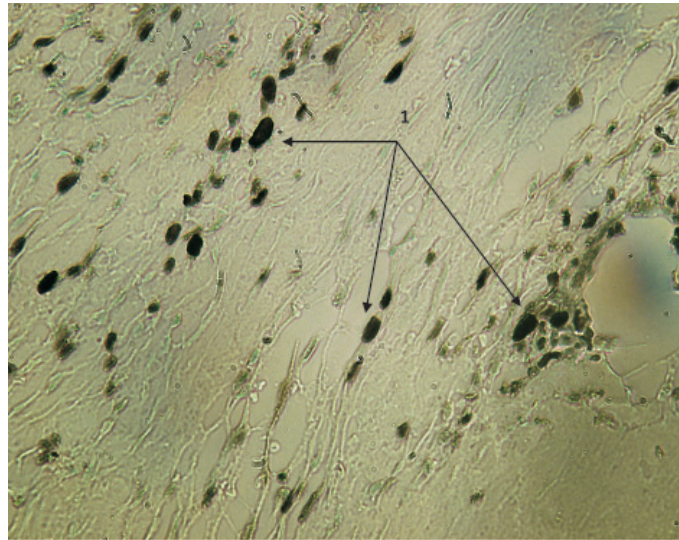


Рис. 4. Экспрессия Ki-67 в зоне механической травмы в контрольной группе на 7-ые сутки после вмешательства. Вторые антитела, меченные пероксидазой. Ув. x200:
1 – пролиферативно активные клетки

Через 60 суток в области разреза у контрольных животных участок хирургического вмешательства выявлялся в виде ограниченной зоны рубцовой ткани конъюнктивы. В обеих опытных группах БК практически полностью рассасывался. Вокруг донорских структур в первой опытной группе образовалась капсула, внутренние слои которой состояли из эпителиоидных клеток и крупных макрофагов. Наружные слои капсулы состояли из вновь образованной рыхлой соединительной ткани с множеством вновь сформированных сосудов, активных фибробластов. Новообразованная соединительная ткань по плотности приближалась к отдаленной от зоны имплантации. Макромолекулярная организация вновь образованных коллагеновых волокон указывала на достаточную степень их морфологической зрелости. Волокнистая организация межклеточного вещества склеры приобретала упорядоченный характер. При имплантации БК с крупноизмельченной плацентой данные процессы проявлялись в значительно меньшей степени. Толщина склеры во второй опытной группе была на 23 %, а в контроле на 31 % меньше по отношению к первой опытной группе.

Заключение

Таким образом, нанодисперсная плацента, по всей видимости, за счет приобретения ею новых физических свойств вследствие механоактивации, таких как повышенная проницаемость и гидрофильность, значительно усиливает процессы пролиферации в соединительнотканых структурах ре-

ципиента в зоне ее введения. Кроме того, повышаются репаративные свойства склеральной ткани при ее изначально низкой пролиферативной активности.

Список литературы

1. Биологический контейнер для реваскуляризации соединительной ткани: пат. № 2369361 РФ / Жаров В.В. [и др.]; заявитель и патентообладатель ГУЗ «Республиканская офтальмологическая клиническая больница МЗ УР», Жаров В.В., Перевозчиков П.А., Лялин А.Н.; заявка № 2008113277/14 зарегистр. 04.04.2008 // Изобретения. Полезные модели. – 2009.
2. Каниюков В.Н. Экспериментально-гистологические основы новых технологий в офтальмохирургии / В.Н. Каниюков, А.А. Стадников. – Оренбург: ОАО «ИПК «Южный Урал», 2009. – 104 с.
3. Лапочкин В.И. Приобретенная близорукость: классификация, диагностика, тактика лечения // «Ижевские родники – 2008»: Рос. науч.-практ. конф. офтальмологов с международ. участием. – Ижевск, 2008. – С. 112–120.
4. Механоактивированный лекарственный препарат кальция глюконат: рентгеноструктурные, микроскопические и рентгеноэлектронные исследования / Г.Н. Коньгин [и др.] // Химия в интересах устойчивого развития. – 2005. – Т. 13, № 3. – С. 249–252.
5. Муслимов С.А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии. – Уфа: Башкортостан, 2000. – 168 с.
6. Перевозчиков П.А. Морфологические особенности репаративной регенерации при имплантации нанодисперсного биологического материала плацентарного происхождения / П.А. Перевозчиков, Ю.Г. Васильев, О.В. Карбань // Морфологические ведомости. – 2011. – № 4. – С. 37–42.
7. Перевозчиков, П.А. Стимуляция коллагеногенеза в склеральной ткани в эксперименте / П.А. Перевозчиков, Ю.Г. Васильев, О.В. Карбань // Астраханский медицинский журнал. – 2013. – № 1. – С. 187–190.
8. Сканирующая зондовая микроскопия в изучении регенерации тканей при склеропластических операциях в офтальмологии / В.В. Жаров [и др.] // Поверхность. Рентгеновские, синхотронные и нейтронные исследования. – 2009. – № 10. – С. 1–6.

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

10. Sellheyer K. Development of the human sclera: a morphological study / K. Sellheyer, M. Spitznas // Graefe's Archive Clin Exp Ophthalmol. – 1988. – Vol. 226. – P. 89–100.

References

1. Zharov V.V., Perevozchikov P.A., Lyalin A.N. The biological container for a revascularization of connective tissue (The Russian Federation patent no. 2369361. The applicant and patent holder – Republican Ophthalmological Clinical Hospital; the application no. 2008113277/14 was registered 04.04.2008).

2. Kanukov V.N., Stadnikov A.A. Experimental and histological bases of new technologies in ophthalmosurgery. Orenburg: Yuzhniy Ural; 2009. 104 p.

3. Lapochkin V.I. Acquired myopia: classification, diagnosis, treatment regimen. In: Collection of scientific articles of the Russian scientific and practical conference of ophthalmologists with the international participation «The Izhevsk springs – 2008». Izhevsk, 2008, pp. 112–120.

4. Konygin G.N. et al. The mechanoactivated medicine of calcium gluconate: X-ray diffraction, microscopic and X-ray electronic researches. Chemistry in interests of a sustainable development, 2005, Vol. 13, no. 3, pp. 249–252.

5. Muslimov S.A. Morphological aspects of regenerative surgery. Ufa: Bashkortostan; 2000. 168 p.

6. Perevozchikov P.A., Vasiliev U.G., Karban O.V. Morphological features of reparative regeneration after implantation

of the biological material nanodispersed placental origin. Morphological newsletter, 2011, no. 4, pp. 37–42.

7. Perevozchikov P.A., Vasiliev U.G., Karban O.V. Stimulation of a collagenogenesis in scleral tissue in an experiment. Astrakhan Medical Journal, 2013, no. 1, pp. 187–190.

8. Zharov V.V. et al. Atomic Force Microscopy in Studying Regeneration of Tissues in Sclera Plasty in Ophthalmology / Journal of surface investigation. X-ray, synchrotron and neutron techniques, 2009, Vol. 3, no. 5, pp. 804–808.

9. Somov E.E. Scleroplastica. Petersburg: Peterburg Pidiatric Medical Institute; 1995. 144 p.

10. Sellheyer K., Spitznas M. Development of the human sclera: a morphological study / Graefe's Archive Clin Exp Ophthalmol, 1988, no. 226, pp. 89–100.

Рецензенты:

Васильев Ю.Г., д.м.н., профессор кафедры гистологии, эмбриологии и цитологии, ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздрава России, г. Ижевск;

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

Работа поступила в редакцию 18.02.2014.