

РАЗНЫЕ АСПЕКТЫ

DOI: 10.30906/0869-2092-2018-81-7-34-38

РЕГЕНЕРАТИВНЫЙ ПОТЕНЦИАЛ БИОРЕЗОРБИРУЕМОГО КОЛЛАГЕНОВОГО МАТРИКСА НА МОДЕЛИ ПОЛНОСЛОЙНОГО ДЕФЕКТА КОНЪЮНКТИВЫ ГЛАЗА КРОЛИКА

Т. А. Демура¹, Н. В. Фисенко^{1,2}, В. Р. Мамиконян^{1,2},
Е. А. Коган¹, С. Э. Аветисов^{1, 2}

Исследован регенеративный потенциал биорезорбируемого коллагенового матрикса (гемостатической губки) на модели полнослойного дефекта конъюнктивы глаза кролика. Результаты гистологического исследования и сканирующей электронной микроскопии свидетельствуют о постепенной резорбции волокон имплантированной в зону полнослойного дефекта конъюнктивы гемостатической коллагеновой губки от периферии к центру с замещением грануляционной тканью остаточной полости. В контрольной группе рост грануляционной ткани от интактных краев конъюнктивы обеспечивает закрытие конъюнктивального дефекта. Полнослойный конъюнктивальный дефект полностью замещается полноценной рыхлой соединительнотканной стромой, покрытой многослойным плоским эпителием к 30 сут наблюдения в обеих группах животных. Отмечен высокий регенеративный потенциал биорезорбируемого матрикса — гемостатической коллагеновой губки — при его имплантации в зону полнослойного дефекта конъюнктивы.

Ключевые слова: коллаген; репарация тканей; регенеративный потенциал; сканирующая электронная микроскопия; конъюнктивальный дефект.

ВВЕДЕНИЕ

Известно, что тканевая инженерия является одним из перспективных направлений современной регенеративной медицины. В ее основе лежит культивирование различных типов клеток на полимерных матриксах, приводящее к росту ткани, сходной по строению и функциям с собственной тканью организма. В качестве матриксов используют биологические и синтетические материалы. Они обладают пористой структурой, обеспечивающей направленный рост клеток и сосудов реципиента, высокой биосовместимостью и способностью к постепенной резорбции в тканях [3]. В настоящее время основным биологическим матриксом, используемым в тканевой инженерии является коллаген. Данный материал обладает термической и химической стабильностью, слабыми антигенными свойствами, полностью резорбируется в срок от нескольких недель до года после имплантации в ткани реципиента [1, 4]. В офтальмологии коллагеновые матриксы применяют в качестве роговичных покрытий, дренажей при хи-

рургическом лечении глаукомы, а также как носители некоторых лекарственных препаратов.

В современной хирургии глаукомы широко используют коллагеновый биорезорбируемый дренаж iGen (OculusGen Biomedical Inc. Taipei, Taiwan) и дренаж “Ксенопласт” (ООО “Дубна-Биофарм”). Нами был разработан биорезорбируемый антиглаукомный дренаж – БРАД (патент Российской Федерации на полезную модель RU 179971 от 29.05.18), выполненный из гемостатической губки, в состав которой входит коллаген (98 %), борная кислота (1,25 %), фурацилин (0,75 %) (Р N001656 от 08.08.2008 г.).

В работе В. Р. Мамиконяна и соавт. [2] были изучены процессы биодеградации имплантата коллагена и репарации тканей при транслимбальном микродренировании с использованием БРАД (основная группа) и дренажа iGen (контрольная группа). Был проведен сравнительный морфометрический анализ состояния конъюнктивы и склеры, свидетельствующий о достоверно менее выраженном клеточном ответе на сроках 30, 60, 90 сут после имплантации БРАД. Также выявлено, что слабая хроническая локальная воспалительная реакция тканей и активный ангиогенез способствуют медленному фиброзированию экстрацеллюлярного матрикса (ЭЦМ) конъюнктивы и склеры в поздние сроки после имплантации БРАД. Однако в данной работе не была изучена роль БРАД в репарации конъюнктивальных дефектов, возникающих на фоне про-

¹ ФГОАУ ВО Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова Минздрава РФ (Сеченовский университет), Россия, 119991, Москва, Трубецкая ул., д. 8, стр. 2.

² ФГБНУ “НИИ глазных болезней”, Россия, 119021, Москва, ул. Россолимо, 11А, Б; e-mail: natfisenko@mail.ru, тел: 89031233944.

резывания операционных швов или наличия рубцовых изменений конъюнктивы и приводящих к наружной фильтрации внутриглазной жидкости (ВГЖ) и послеоперационной гипотонии. Вместе с тем проведенные экспериментальные исследования эффективности и безопасности дренажа iGen показывают, что его расположение в субконъюнктивальном пространстве способствует закрытию возможных послеоперационных конъюнктивальных дефектов и препятствует наружной фильтрации ВГЖ [5, 6]. В связи с этим целью данной работы является изучение регенеративного потенциала биорезорбируемого матрикса — гемостатической коллагеновой губки на модели полнослойного дефекта конъюнктивы экспериментального животного.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В исследование были включены 10 половозрелых самцов кроликов породы шиншилла (20 глаз) массой 3,5 – 4 кг. Экспериментальные животные находились в стандартных условиях содержания вивария Первого МГМУ им. И. М. Сеченова. Проведение исследования было разрешено локальным биомедицинским этическим комитетом ФГБНУ “НИИ глазных болезней”. Содержание животных соответствовало правилам надлежащей лабораторной практики, утвержденной приказом № 199н от 01.04.2016 Минздрава России. При проведении экспериментов были приняты меры, исключающие излишние физические страдания или повреждения животных.

Предоперационную подготовку животных осуществляли внутримышечным введением раствора комбинированного препарата Золетил 100 (Virbac Sante Animale, Франция), содержащего в 5 мл 250 мг тилетамин гидрохлорида и 250 мг золазепам гидрохлорида, в объеме 0,6 мл. Дополнительно проводилась инстилляционная анестезия раствором проксиметакаина 0,5 % (Алкаин, Alcon, Бельгия).

У всех животных удаляли участок конъюнктивы диаметром 6 мм в верхне-наружном квадранте глазного яблока. При этом по периметру образованного дефекта производили отслоение конъюнктивы от склеры, формируя кольцевидный карман шириной около 2 мм. В основную группу были включены правые глаза кроликов (10 глаз), на которые в зону дефекта укладывали гемостатическую коллагеновую губку квадратной формы размером 7 × 7 мм, края которой заправляли в сформированный карман. Контролем служили левые глаза кроликов (10 глаз), где зона дефекта конъюнктивы оставалась открытой. В обеих группах края конъюнктивы сопоставлены не были, швы не накладывали.

Животных выводили из эксперимента на 1 – 7 – 15 – 21 – 30 сут, в каждый срок 2 кролика (4 глаза). Гистологическое исследование выполнено на кафедре патологической анатомии им. А. И. Струкова ПМГМУ им. И. М. Сеченова (Сеченовский университет). Глаза кроликов, выведенных из эксперимента на 1 – 7 – 15 –

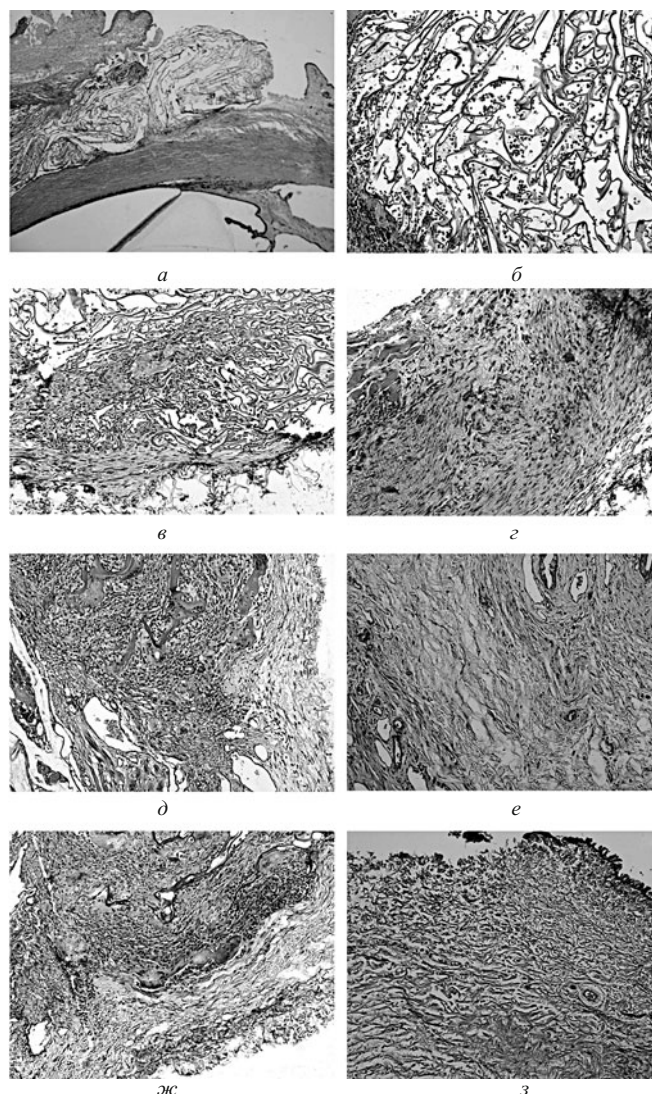


Рис. 1. Морфологическая картина удаленных образцов конъюнктивы и склеры, окраска гематоксилином и эозином.

a — основная группа, 1 сут, ув. × 50; *б* — основная группа, 1 сут, ув. × 200; *в* — основная группа, 7 сут, ув. × 100; *г* — контрольная группа, 7 сут, ув. × 100; *д* — основная группа, 15 сут, ув. × 100; *е* — контрольная группа, 15 сут, ув. × 100; *ж* — основная группа, 30 сут, ув. × 100; *з* — контрольная группа, 30 сут, ув. × 100.

34 сут, фиксировали в 10 % нейтральном формалине с фосфатным буфером, обрабатывали в аппарате гистологической проводки тканей фирмы “Pool Scientific Instruments” (Швейцария) и заливали в парафин. Суммарное время фиксации, проводки и заливки материала, как правило, не превышало 48 ч. Затем готовили серийные парафиновые срезы (не менее 12 серийных срезов) толщиной 4 – 5 микрон. Срезы фиксировали на предметные полилизинные стекла (Mainzel Glaser, Polylysine, Германия) и инкубировали в термостате при 37 °С в течение 12 ч. Далее срезы депарафинировали и обезживали в батарее из 3 ксилолов, 2 абсолютных спиртов, 2 95 % спиртов, 80 и 70 % спирта и дистилли-

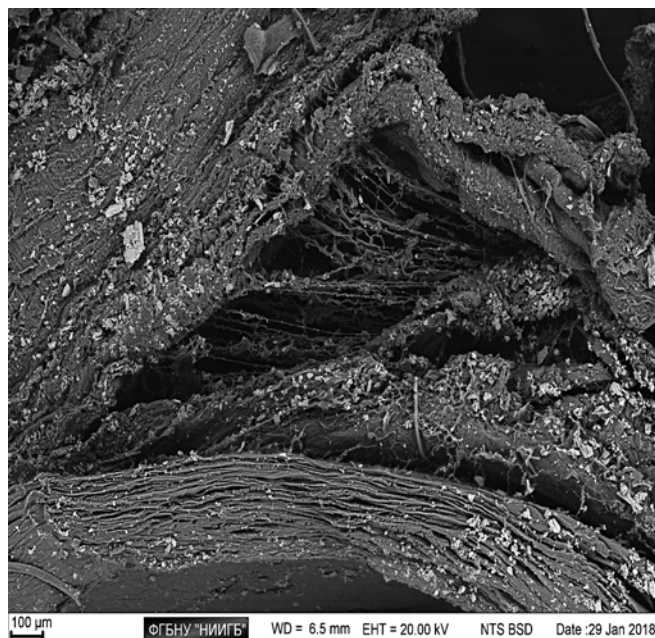


Рис. 2. Электронограмма поверхности поперечного среза фиброзных оболочек глаза кролика и биорезорбируемого коллагенового матрикса в области полнослойного дефекта конъюнктивы.

рованной воды. Препараты окрашивали гематоксилином и эозином.

Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ) была выполнена в лаборатории фундаментальных исследований в офтальмологии ФГБНУ “НИИ глазных болезней” (И. А. Новиков). Глаза кроликов, выведенных из эксперимента на 21 сут, подготавливали для сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) методом желатиновых блоков. После 2 сут экспозиции в 2,5 % растворе глутарового альдегида для выявления спаянных и обособленных участков в структуре соединительной ткани была выполнена заливка цельных изолированных глаз в желатин. Мета-раствор для заливки готовили разведением пищевого желатина 43 г/л в горячей (90 °С) деионизированной воде, после доведения до кипения и естественного охлаждения. Полимеризацию осуществляли при температуре 5 °С в цилиндрическом пластиковом контейнере, позволяющем полностью погрузить цельный изолированный глаз в мета-раствор. После полимеризации желатина (2 ч), полученные блоки извлекали из контейнера и вручную раскраивали лезвием для микротомы. Прозрачность желатина позволила осуществлять полный визуальный контроль при раскройке образца и осуществить разрез в плоскости, проходящей через апекс роговицы, задний полюс глаза и метку на поверхности конъюнктивы. Раскройку выполнили без потери герметичности глазного яблока, что стало возможным с учетом эластичности желатинового блока и его способности смыкаться за погружающимся в него лезвием. После фрагментации препарат проводился по упрощенной классической схеме подготовки к СЭМ,

включающей: последовательную экспозицию в спиртах (20, 60, 80 и 100 %), высушивание в надкритической CO₂ и напыление сплавом Au-Pd. Перед напылением фрагменты ориентировали поверхностью интереса вверх и укрепляли на предметном стекле посредством адгезивной ленты. Поверхность поперечного среза фиброзных оболочек глаза с имплантированным биорезорбируемым матриксом визуализировали сканирующим электронным микроскопом Zeiss EVO LS10 (Zeiss, Германия), сконфигурированным для работы в режиме высокого вакуума. Получение изображений осуществляли с использованием детектора вторичных электронов при ускоряющем напряжении 20 кВ, токе на образце 320 пА.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Гистологическое исследование

На 1 сут после оперативного вмешательства в основной группе животных визуализирован сохраненный биорезорбируемый матрикс на основе коллагена, полностью закрывающий зону полнослойного дефекта конъюнктивы (рис. 1, а). Отмечена локальная воспалительная реакция, сопровождающаяся умеренной лейкоцитарной, лимфоцитарной, макрофагальной и моноцитарной инфильтрацией наружных слоев дренажа и прилежащих к нему краев конъюнктивы. В прилежащей ткани определяются отек стромы с полнокровием конъюнктивальных сосудов и реактивные изменения плоского эпителия конъюнктивы в виде гидropической дистрофии клеток, пролиферации базального слоя, а также появления акантоза базальной мембраны (рис. 1, б).

В основной группе на сроке 7 сут после операции волокна наружных слоев матрикса частично резорбируются с постепенным замещением их грануляционной тканью в области краев конъюнктивального дефекта. По сравнению с 1 сут после имплантации, на 7 сут отмечается более выраженная воспалительная реакция с инфильтрацией гемостатической коллагеновой губки лимфоцитами, макрофагами и частично лейкоцитами. Грануляционная ткань, формирующаяся вокруг губки, представлена макрофагами, лейкоцитами, лимфоцитами, моноцитами, фибробластами и новообразованными сосудами, окруженными рыхлой стромой (рис. 1, в). В контрольной группе к 7 сут после вмешательства в области дефекта выявлено более интенсивное формирование грануляционной ткани, растущей от краев конъюнктивального дефекта к его центру. Грануляционная ткань содержит лимфо-гистиоцитарный инфильтрат, лейкоциты и фибробласты, и новообразованные сосуды (рис. 1, г). У животных обеих групп в прилежащей к дефекту конъюнктиве определяется гидropическая дистрофия эпителиальных клеток, пролиферация клеток базального и парабазального слоя плоского эпителия, а также появление

акантоза его базальной мембраны. Отмечена эпителизация краев конъюнктивального дефекта.

На 15 сут после операции в основной группе отмечается выраженный лизис волокон коллагенового матрикса, сопровождающийся локальной гигантоклеточной реакцией, ангиогенезом и моноцитарной инфильтрацией дренажа. Грануляционная ткань окружает матрикс и практически полностью закрывает полнослойный дефект конъюнктивы. На периферии начинается процесс ремоделирования грануляционной ткани с формированием соединительнотканых прослоек, типичных для рыхлой соединительной ткани слизистой конъюнктивы. Плоский эпителий прилежащей конъюнктивы определяется с признаками пролиферации в базальном и парабазальном слое, а также гидропической дистрофии отдельных клеток. Эпителизация обнаружена почти по всей поверхности дефекта (рис. 1, *д*).

В контрольной группе на данном сроке полнослойный дефект конъюнктивы значительно уменьшен в размерах и заполнен грануляционной тканью с признаками зрелости — с увеличением количества фибробластов и волокнистых структур стромы, свидетельствующим о слабо выраженном фиброзировании стромы. В центральной части грануляционной ткани сохраняется активный ангиогенез, а на ее периферии обнаруживается ремоделирование в конъюнктивальную ткань с формированием рыхлых структур ЭЦМ, которые покрыты многослойным плоским эпителием конъюнктивы с признаками гидропической дистрофии в отдельных клетках (рис. 1, *е*).

Через 30 сут после формирования полнослойного дефекта конъюнктивы у основной группы животных отмечен выраженный лизис волокон гемостатической коллагеновой губки, сопровождающийся гигантоклеточной реакцией и ангиогенезом. Воспалительный инфильтрат представлен небольшим количеством моноцитов и макрофагов. Полнослойный дефект заполнен новообразованной рыхлой соединительной тканью с признаками зрелости, т.е. с умеренным фиброзированием ЭЦМ, однако, отмечены отдельные немногочисленные очаги, представленные грануляционной тканью. Вокруг единичных волокон биорезорбируемого матрикса и в прилежащей конъюнктиве наблюдаются новообразованные полнокровные сосуды. Поверхность конъюнктивального дефекта полностью покрыта многослойным плоским эпителием (рис. 1, *ж*). В контрольной группе на данном сроке после операции конъюнктивальный дефект не определяется, он полностью замещен конъюнктивой, покрытой многослойным плоским эпителием (рис. 1, *з*).

Сканирующая электронная микроскопия

Пропитка желатином позволила выявить степень изоляции биорезорбируемого матрикса (гемостатической коллагеновой губки) на 21 сут после имплантации относительно окружающих тканей, на уровне ультрафильтрации и диффузии жидкостей. На элек-

тронограмме поверхности среза, помимо структур, соответствующих склере и конъюнктиве, топографически выделяется трапециевидная полость, частично представленная разобщенными волокнами коллагена, идентичными по структурным мотивам исходному веществу матрикса. Нижней границей данной полости является склера, верхней границей — более рыхлая ткань, пронизанная многочисленными капиллярами. Со всех 4 сторон, в пределах плоскости среза, остаточная полость биорезорбируемого матрикса на основе коллагена окружена плотной оболочкой с признаками ультраструктуры новообразованной соединительной ткани — частично упорядоченными волокнами и жгутами (рис. 2).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, результаты гистологического исследования и СЭМ свидетельствуют о постепенной резорбции волокон гемостатической коллагеновой губки в основной группе экспериментальных животных. Данный процесс происходит в направлении от периферии к центру с постепенным замещением полости грануляционной тканью. Через 15 сут после формирования конъюнктивального дефекта происходит закрытие многослойным плоским эпителием его поверхности. К 30 сут наблюдения по данным гистологического исследования отмечается ремоделирование грануляционной ткани с образованием рыхлой соединительной ткани, аналогичной по своему строению субэпителиальному слою конъюнктивы. Полнослойный дефект полностью замещается полноценной рыхлой соединительнотканной стромой конъюнктивы, покрытой многослойным плоским эпителием к 30 сут наблюдения в обеих группах животных, при этом в основной группе в строме новообразованной конъюнктивы сохраняются единичные волокна коллагенового матрикса. Отмечен высокий регенеративный потенциал биорезорбируемого матрикса — гемостатической коллагеновой губки — при его имплантации в зону полнослойного дефекта конъюнктивы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Л. П. Истранов, Л. В. Истранова, И. А. Сыченников, *Фармация*, **5**, 76 – 79 (1984).
2. В. Р. Мамиконян, Н. В. Фисенко, Т. А. Демура и др., *Эксперим. и клин. фармакол.*, **81**(4), 21 – 26 (2018); <https://doi.org/10.30906/0869-2092-2018-81-4-21-26>.
3. A. Atala, *J. Pediatric Surg.*, **47**(1), 17 – 28 (2012); <https://doi.org/10.1016/j.jpedsurg.2011.10.013>.
4. K. Henriksen, M. Karsdal, Type I Collagen, in: *Biochemistry of collagens, laminins and elastin. Structure, function and biomarkers*, M. Karsdal (ed.), Elsevier Inc. (2016), pp. 1 – 11.
5. W. C. Hsu, M. H. Spilker, I. V. Yannas, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, **41**(9), 2404 – 2411 (2000).
6. W. C. Hsu, R. Ritch, T. Krupin, H. S. Chen, *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, **246**, 709 – 717 (2008).

REGENERATIVE POTENTIAL OF BIODEGRADABLE COLLAGEN MATRIX FOR HEALING FULL-THICKNESS DEFECT OF CONJUNCTIVA IN RABBITS

T. A. Demura¹, N. V. Fisenko^{1,2*}, V. R. Mamikonyan¹, E. A. Kogan¹, and S. E. Avetisov^{1,2}

¹ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University, ul. Trubetskaya 8/2, Moscow, 119991 Russia

² Research Institute of Eye Diseases, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Rossolimo 11A/B, Moscow, 119021 Russia

* e-mail: natfisenko@mail.ru

The regenerative potential of biodegradable collagen matrix (hemostatic sponge) for healing full-thickness rabbit conjunctival injury was studied. Results of histological investigation and scanning electron microscopy showed evidence of the progressive degradation of collagen matrix followed by granulation tissue formation from periphery to the center of the conjunctival wound. The ungrafted conjunctival defect was substituted with granulation tissue from the intact edges of wound to the center. Both matrix-grafted and ungrafted full-thickness conjunctival defects were covered completely with loose stroma and stratified squamous epithelium within 30 days. Thus, high regenerative potential of biodegradable collagen matrix (hemostatic sponge) implanted into the zone of injury for healing full-thickness defect of rabbit conjunctiva was established.

Keywords: collagen; tissue repair; wound healing; regenerative potential; scanning electron microscopy; conjunctival wound.