

**Канюков В.Н., Стадников А.А., Трубина О.М., Подопригора Р.Н.,  
Горбунов А.А., Ломухина Е.А., Казеннов А.Н.**

Оренбургский филиал ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова  
Федерального агентства по оказанию высокотехнологичной медицинской помощи»,  
Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии  
ГОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия Росздрава»,  
Проблемная научно-исследовательская лаборатория «Экспериментально-гистологическое  
изучение биотрансплантатов в офтальмохирургии» Южно-Уральского научного центра РАН

## **МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИМЕНЕНИЯ РАЗЛИЧНЫХ ВИДОВ АЛЛОТРАНСПЛАНТАТОВ ДЛЯ ЦЕЛЕЙ ОФТАЛЬМОХИРУРГИИ**

**Авторами экспериментально-гистологически обосновано применение различных аллотрансплантатов для реконструкции дефектов органа зрения. Оценена жизнеспособность трансплантационных материалов светооптическим, ультраструктурным и иммуноцитохимическим методом. Дан анализ процессов регенерации тканей глаза при заместительной пластике.**

### **Актуальность**

Одним из наиболее востребованных разделов современной офтальмологии является пластическая офтальмохирургия. В ее задачи входит получение оптимального донорского материала, разработка способов его хранения, достижение полноценного структурного и функционального восстановления органа зрения, оптимизация регенераторных потенциалов клеток и тканей глазного яблока и его вспомогательного аппарата.

Применение различных трансплантатов, несомненно, повышает эффективность многих реконструктивных операций. Проблема выбора оптимального, отвечающего всем требованиям офтальмохирургии, трансплантационного материала с учетом гистогенетических особенностей совмещаемых тканей в каждом рассматриваемом случае является обоснованной [2]. При этом аллогенные ткани являются наиболее перспективными из существующего многообразия трансплантируемого материала [2, 4].

На базе Оренбургского филиала ФГУ «МНТК «Микрохирургия глаза» им. акад. С.Н. Федорова Росмедтехнологии» функционирует Проблемная научно-исследовательская лаборатория Южно-Уральского научного центра РАН, предметом деятельности которой является «Экспериментально-гистологическое изучение биотрансплантатов в офтальмохирургии». Сотрудниками данной лаборатории совместно с кафедрой гистологии Оренбургской государственной ме-

дицинской академии и ПНИЛ «Нейроэндокринная регуляция взаимодействий про- и эукариот» ЮУНЦ РАН к настоящему времени накоплен определенный опыт по использованию аллогенных тканей, а также способов их хранения.

**Цель исследования** – экспериментально-гистологически обосновать возможность и целесообразность применения аллотрансплантатов для реконструкции дефектов органа зрения.

### **Материалы и методы**

В 2005 г. профессором Канюковым В.Н. был предложен альтернативный способ консервации донорских тканей и органов в условиях вакуума при гипотермии. Система представляет собой вакуумный насос для откачивания воздуха и контейнера для хранения материала. Максимальное разрежение, которое можно получить при использовании данной системы, 0,5 бар ( $\approx 0,5$  атм.). Известно, что в условиях вакуума устраняется возможность экзогенного попадания микроорганизмов, исключается размножение бактерий, замедляются процессы аутолиза клеток и тканей, происходит торможение перекисного окисления липидов цитологических структур. Для успешной трансплантации способ первичной обработки и средства консервации тканей имеют основополагающее значение. При этом ведущим фактором, определяющим эффективность заместительных гистогенезов в об-

ласти структур ложа органов реципиента является фибриллоархитектоника трансплантата [2, 5, 6]. Биопластическая ценность трансплантатов, используемых для реконструктивных операций, состоит в том, что они должны представлять оптимальный каркас, по которому будет происходить новообразование тканей. Кроме того, они должны обладать слабой иммуногенностью и обеспечить индуцирующее влияние на мобилизацию малодифференцированных (камбиальных) клеток тканей реципиента.

С целью оценки эффективности методики вакуумной консервации трупной роговицы, аорты и твердой оболочки головного мозга было предпринято исследование образцов тканей в течение 3, 7, 10, 14, и 30 суток. Затем в указанные сроки материал дегидратировали в этаноле возрастающей крепости (50° – 100°) и заливали в парафин-целлоидин. Гистологические срезы толщиной 5-6 мкм после депарафинирования окрашивали гематоксилином Майера и эозином, перйодатом К и реактивом ШИФФА (контроль с амилазой), пикрофуксином по Ван Гизон, а также альциановым синим (рН-7,8) по Сидмену. Часть объектов подвергнута ультраструктурному анализу в электронном микроскопе ЭМВ 100 АК.

Были проведены гистологические исследования (включая иммуноцитохимическую идентификацию экспрессии синтеза про- и антиапоптотических белков p53 и bcl-2), касающиеся процессов регенерации тканевых структур глаза, оценки морфофункционального состояния гипоталамо-гипофизарной нейросекреторной системы (ГГНС), развивающихся в ответ на травму, в том числе в условиях замещения интраоперационных дефектов аллотрансплантатами.

В 1-й серии (10 животных – кролики породы Шиншилла) дефект конъюнктивы был сформирован методом простой эксцизии бульбарной ее части до склеры диаметром 6 мм. Дефект слизистой ничем не замещали.

Во 2-й серии (10 животных), при аналогичной (как в 1-й) постановке эксперимента, в конъюнктивальную полость ежедневно вводился окситоцин («ОХУТОЦИНУМ», 5МЕ, фирмы «Gedeon Richter») 3 раза в день.

В 3-й серии (10 животных) дефект конъюнктивы закрывался аллоперикардом кадавера.

В 4-й серии (10 животных) при аналогичной (как в 3-й серии) постановке эксперимента в конъюнктивальную полость ежедневно вводился окситоцин.

В 5-й серии (10 животных) трепаном диаметром 6 мм маркировался участок роговицы и конъюнктивы. Роговицу иссекали до поверхностных слоев стромы, удаляли конъюнктиву и субконъюнктиву. Дефект слизистой закрывали биоматериалом Аллоплант для пластики конъюнктивы.

В 6-й серии (8 животных) производились разрезы конъюнктивы длиной 6-8 мм в 5-6 мм от лимба по меридианам 10, 1, 4, 7 ч. Формировались конъюнктивальные «карманы», в виде тоннелей до заднего полюса глазного яблока. В них имплантировались трансплантаты из аорты и фиксировались швом. Сроки наблюдений во всех группах составили 7, 14, 30 суток.

### **Результаты и обсуждение**

Гистологические исследования роговицы, подверженной экспозиции в вакууме в течение 3 суток не показали существенных структурных изменений ее эпителиальных и соединительнотканых элементов. Передний эпителий, собственное вещество роговицы, передняя и задняя пограничные мембраны, а также эндотелий сохранили дефинитивную структурную организацию. Через 7 суток консервации определены признаки дискомплексации десцеметовой мембраны (оболочки) роговицы, что проявилось в ее разрыхлении и локальной складчатости. Это сочеталось с эрозивными изменениями клеток «заднего» эпителия. Боуменова мембрана при этом была не повреждена на всем протяжении. Через 14 суток указанные явления деструкции десцеметовой оболочки нарастали. К ним добавились процессы некробиоза и лизиса многослойного плоского неороговевающего эпителия, прилежащих к нему участков боуменовой мембраны, а также разрыхления (с признаками лизирования соединительнотканых пластинок собственного вещества роговицы). В своей совокупности эти процессы приводили к уменьшению на 25% толщины роговицы.

Это происходит, главным образом, за счет утраты деструктивно измененных волокнистых и аморфных компонентов. Поэтому оптимальным сроком консервации роговицы были определены 3-и сутки.

Анализ гистопрепаратов показал, что оптимальным режимом консервации для аорты являются 14-е 30-е сутки, для твердой оболочки головного мозга – 7-е 10-е сутки. В эти сроки аорта (ее средняя оболочка) имеет сохранный эластический каркас, без признаков разволокнений, разрыхлений и деструкции. Гладкие мышечные клетки с пикноморфными ядрами и узким ободком цитоплазмы единичны. Аморфный матрикс, расположенный между эластическими мембранами содержит амилазоустойчивые гликопротеины и сульфатированные фракции гликозаминогликанов. В более ранние сроки консервации гисто- и ультраструктура эластического каркаса, а также гистохимический состав аорты аналогичны. Однако между мембранами располагается значительное число гладких миоцитов. Они имеют крупные ядра с деконденсированным хроматином, большой ободок базофильной цитоплазмы, что свидетельствует об их цитофизиологической сохранности, а, следовательно, и о высокой иммуногенности.

Твердая оболочка головного мозга имеет оптимальную гистоструктуру только в сроки 7-10 дней консервации (она состоит из плотной волокнистой соединительной ткани, богатой эластическими волокнами). Основная масса пучков соединительнотканых волокон ориентирована продольно, меньшая часть – косопоперечно. Клеточные элементы (типа фиброцитов) единичны. В аморфном межклеточном веществе идентифицированы гликопротеины и гликозаминогликаны, количество которых визуальным образом значительно снижается через 10 суток консервации. Следует особенно подчеркнуть, что через 14 и особенно 30 суток консервации данных объектов происходят процессы дисконформации волокнистых структур, а углеводные биополимеры не определяются. Это, в свою очередь, приводит к разрыхлению пучков соединительнотканых волокон, их микроповреждениям, разволокнениям с

формированием значительных дефектов стромы.

Гистологический анализ раневых дефектов конъюнктивы глазного яблока показал, что через 7-14 суток развивалась малодифференцированная соединительная ткань, богатая гемокapиллярами и постепенно замещающая раневой дефект. При этом активизировалась нейросекреция нонапептидных гормонов супраоптических и паравентрикулярных ядер гипоталамуса. Эти изменения (на поздних стадиях – 15-30 суток) сочетались с блокированием высвобождения нейросекреторных гранул на уровне аксовазальных контактов нейрогипофиза и срединного возвышения подбурья (рис. 1). В эти же сроки происходила ускоренная дифференцировка соединительной ткани в фиброзную (рубцовую) структуру, ограничивающую образование органотипического регенерата в зоне травматического дефекта конъюнктивы (отсутствие адекватной реорганизации репаративного гистогенеза конъюнктивального эпителия) (рис. 2).

Введение Аллопланта в область раневого дефекта создавало условия для формирования соединительнотканного регенерата, сохраняющего малодифференцированный статус вплоть до 30 суток эксперимента. Последующая гисто- и органотипическая дифференцировка регенерата приводила к замещению дефекта фиброзной тканью, в глубоких уровнях которой сохранялись клетки с признаками апоптоза, что нами трактуется как прогностически неблагоприятный признак. Аналогичные гистологические и иммуноцитохимические изменения поврежденной конъюнктивы мы определили и в случае использования перикардального аллотрансплантата.

Включение окситоцина в комплекс лечебных мероприятий позитивно изменило ход репаративных процессов. Существенным было отграничение развития некробиотических (и некротических) процессов раневой области конъюнктивы, что позитивно сказалось на развитии пролиферативной фазы посттравматического воспаления. Местное применение окситоцина вызывало не только образование на месте дефекта малодифференцированной соединительной ткани, но и близкую к органотипической эпителиза-

цию, что выражалось в лучшей, по сравнению с контролем, адаптации кровного и железистого эпителия к травматическому повреждению (рис. 3).

В серии опытов, когда в зону трансплантированного перикарда вводили окситоцин, мы получили результаты, свидетельствующие о позитивном влиянии данного гипоталамического нонапептида на пролиферативную фазу воспаления, что выразилось в создании адекватных условий для развития и пролонгированного существования грануляционной соединительной ткани по краю трансплантата, обеспечивающей реализацию ткане- и органотипических возможностей эпителиального регенерата. Одновременно установлен факт лимитирования экспрессии синтеза проапоптотического белка p53, деградация ДНК (Tunel-методом).

В своей совокупности полученные результаты свидетельствуют о том, что введение Аллопланта либо аллоимплантация перикарда для пластики конъюнктивы в зону дефекта в определенной степени корригировало и оптимизировало ход репаративных процессов, обеспечивая стабилизацию гистоструктур конъюнктивы и роговицы, приводя к образованию в «конъюнктивальном ложе» соединительнотканного регенерата с обеспечением коррекции механических свойств поврежденной конъюнктивы. Местное же применение окситоцина в зоне раневого дефекта конъюнктивы создавало адекватные условия для реализации адаптивных и компенсаторных возможностей тканевых и клеточных структур. Включение с лечебной целью окситоцина в условиях заместительной пластики раневых дефектов конъюнктивы аллоперикардом оптимизировало фазы воспаления, уменьшало программированную гибель эпителиоцитов, фибробластов, эндотелиоцитов, обеспечивая тем самым формирование органотипического регенерата.

Нами были проведены экспериментально-морфологические исследования применения аорты при пластике склеры. Результаты исследования показали, что в ранние сроки (3-7 сут.) после склеропластики вокруг трансплантатов наблюдалась умеренная воспалительная реакция, сопровождающаяся расши-

рением и полнокровием сосудов, имела место гомогенизация коллагеновых и эластических волокон. Очаги лейкоцитарной инфильтрации по краю трансплантата сохранялись и также включали в себя активизированные фибробласты и гистиоциты, проявляющие признаки пролиферативной активности. В более поздние сроки пролиферативные процессы сохранялись, при этом наблюдались многоядерные макрофаги, участки трансплантата замещались молодой соединительной тканью. Через три месяца отмечалось усиление регенеративных процессов в склере и прилежащих глазных мышцах, замещение разрушенных участков малодифференцированной соединительной тканью. Были получены результаты, свидетельствующие о тканеспецифической трансформации трансплантатов с развитием фибриллоархитектоники, свойственной склере реципиента. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в основе таких процессов лежат закономерности репаративных гистогенезов, которые касаются индуктивных межтканевых корреляций, предопределяющих диапазон изменчивости и реорганизации гистоструктур.

### **Заключение**

В целом, обобщая результаты проведенных к настоящему времени исследований, выполненных офтальмохирургами совместно с гистологами, можно сделать несколько немаловажных обобщений. Прежде всего, экспериментально-гистологический анализ процессов регенерации тканей глаза при использовании различных видов трансплантационных материалов свидетельствует о том, что методы светооптической, ультраструктурной и иммуноцитохимической оценки жизнеспособности, диапазона гистобластических и органотипических свойств тканей глаза являются адекватными и доказательными. Это еще раз подтверждает основные положения учения о репаративных гистогенезах [3].

Данный методический подход позволяет разрабатывать пути и способы оптимизации течения раневого процесса, тканевой заместительной терапии и оценивать их эффективность на основе комплекса показаний, имеющих отношение к доклиническому изу-

чению разрабатываемых способов в соответствии с правилами Добротной лабораторной практики (GLP). Эти правила, как известно, требуют привлечения к научным исследованиям квалифицированных специалистов, разработки логики НИР, стандартизацию операционных процедур.

Немаловажно заметить, что наши исследования осуществляются в русле фундаментальных проблем тканевой биологии, обозначенных в трудах известных гистологов [1, 7]. Именно ими была высказана глубокая мысль о том, что в экспериментальных, либо патологических условиях клетки (ткани) реагируют определенным филогенетически обусловленным образом, а в каждой тканевой реакции на любые воздействия отражаются гене-

тически детерминированные свойства, пройденные клеткой или тканью в ходе индивидуального и эволюционного развития.

Именно данный аспект, проблемы репаративных гистогенезов (малоизвестных широкому кругу офтальмологов) мы и пытались показать в данной статье. Полагаем, что изучение обозначенных вопросов регенерации тканей органа зрения позволяет обнаружить и сопоставить как реализуются физиологические механизмы гистогенезов, по-новому оценить роль этих механизмов в восстановлении поврежденных гистоструктур, приблизиться к оптимизации течения репаративных процессов и обоснованию внедрения эффективных способов лечения больных в офтальмохирургической клинике.

**Список использованной литературы:**

1. Заварзин, А.А. Основы сравнительной гистологии / А.А. Заварзин // Л.: Изд-во ЛГУ, 1986. - 400с.
2. Канюков, В.Н. Аллотрансплантация аорты в пластической хирургии / В.Н. Канюков, А.А. Стадников, О.М. Трубина. - М.: Медицина, 2001. - 128с.
3. Клишов, А.А. Гистогенез и регенерация тканей / А.А. Клишов. - Л.: Медицина, 1984. - 220с.
4. Морфологические принципы аллотрансплантации тканей / Э.Р. Мулдашев, В.У. Галимова, К.А. Захваткина и др. // III Всероссийский пленум проблемной комиссии по трансплантации органов и тканей. - Пермь. - 1987. - С.73-75.
5. Мулдашев, Э.Р. Аллотранспланты для офтальмохирургии / Э.Р. Мулдашев, С.А. Муслимов, А.Ю. Салихов. - Уфа, 1987. - 30 с.
6. Роль биомеханических свойств аллотрансплантатов в репаративной регенерации соединительных структур / Р.Т. Нигматуллин, Э.Р. Мулдашев, С.А. Муслимов, Р.Н. Еникеев и др. // Управление морфогенезом тканей и органов в процессе адаптации. - Иркутск. - 1981. - С.71.
7. Хлопин, Н.Г. Общебиологические и экспериментальные основы гистологии / Н.Г. Хлопин. - Л.: АНСССР, 1946. - 490 с.

Иллюстрации на стр. 193