

## **ЭФФЕКТЫ МИКРОИНЪЕКЦИЙ НАНОДИСПЕРСНОЙ ПЛАЦЕНТЫ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТА**

**В условиях эксперимента на крысах изучены эффекты микроинъекций нанодисперсной плаценты в конъюнктиву глаза в зависимости от вводимой дозы. Показано, что при увеличении дозы вводимой взвеси нанодисперсной плаценты пропорционально повышаются биологические эффекты при взаимодействии с окружающими тканями реципиента. В частности васкуло- и коллагеногенез, являющиеся производными процессов репаративной регенерации. Однако при увеличении дозы вводимой нанодисперсной плаценты до 25 мг в 0,08 мл физиологического раствора ряд биологических эффектов может носить негативный характер, связанный с выраженными экссудативными процессами в зоне введения.**

**Ключевые слова:** репаративная регенерация, нанодисперсная плацента человека, микроинъекция.

### **Актуальность**

Последние исследования [1, 2, 3], посвященные изучению регенерации пересаженного биологического материала, широко применяемого в медицинской практике, в частности в офтальмологии, показали, что при уменьшении дисперсности имплантата (в микрометровом диапазоне) увеличивалась эффективность его взаимодействия с тканями реципиента. Использование нанодисперсных имплантатов из биологических материалов [4, 5], 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, измельченных до наноразмерного уровня на динамику дегенеративно-воспалительных и репаративных процессов в соединительно-тканых структурах глазного яблока в зависимости от вводимой дозы в настоящее время не проводилось.

### **Цель**

Морфологическое изучение эффектов микроинъекций нанодисперсной плаценты в соединительно-тканых структурах глаза в зависимости от введенной дозы в условиях эксперимента.

### **Материалы и методы**

Исследования были выполнены на самцах белых беспородных крыс в возрасте 6 месяцев, массой тела от 200 до 250 грамм. В ходе эксперимента животным произведено инъекционное введение взвеси лиофилизированной механоактивированной нанодисперсной плаценты [6] под конъюнктиву на склеру глаза под общей анестезией. В роли анестезирующего препарата применялся золетил в дозе 0,1 мл внутримышечно. Основа взвеси была представлена порошком нанодисперсной плаценты, который представлял собой отдельные частицы размером от 200 до 500 нм, сформированные зернами размером от 40 до 100 нм. Слабо связанные частицы в свою очередь образовывали неустойчивые агрегаты размером от 2 до 10 мкм [5].

Взвесь во всех случаях разводили в 0,08 мл физиологического раствора. Введение 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 ложноперированных крыс, которым под анестезией вводили под конъюнктиву физиологический раствор. Экспериментальные исследования проведены с соблюдени-

ем «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». Забой производили под общей анестезией с применением 0,15 мл препарата золетил внутримышечно. Изучены группы животных к концу 3, 7, 14 суток, 1 месяца после манипуляций. Фиксацию осуществляли в 10% растворе нейтрального формалина, заливали в парафин. Исследования структуры поверхности гистологических срезов зоны оперативного вмешательства проводились на сканирующей зондовой лаборатории Ntegra (NT-MDT) в полуконтактном режиме на воздухе после предварительной химической очистки от парафина. Для общего морфологического анализа препараты окрашивали гематоксилин-эозином.

### **Результаты и обсуждение**

В ранние сроки после имплантации (на 3-е сутки) в контрольной группе животных местные изменения проявлялись в виде умеренного асептического воспаления. В первой опытной группе лейкоцитарные реакции в окружающей конъюнктиве и субконъюнктивальной основе были более выражены по сравнению с контролем. В зоне введения нанодисперсной плаценты преобладали клетки лимфоцитарного ряда, выявлялись единичные нейтрофильные и эозинофильные гранулоциты. Наблюдалось умеренное расширение микрососудов. Во второй опытной группе у всех исследованных животных проявления воспалительного ответа были более выражены, при этом инфильтрация клеточными элементами носила умеренный характер и проявлялась в преобладании нейтрофильно-клеточных ответов. Существенно увеличивалась толщина конъюнктивы 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. 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.

На 3 сутки после введения у животных 1 опытной группы при атомно-силовой микро-

скопии в прилежащих месту введения нанодисперсной плаценты выявлены признаки умеренного разрыхления пластинок коллагеновых волокон, обусловленных отеком аморфного компартамента межклеточного вещества (рис. 1, цветная вкладка). Коллагеновые волокна сохраняют D-исчерченность и компактное расположение в пределах пластинок. В лонгитудинальном направлении в коллагеновых волокнах сохраняется равномерный диаметр, что указывает на отсутствие в них признаков деструктивных изменений. На микросканограмме кроме описанных коллагеновых пластинок имеется участок с зернами введенной нанодисперсной плаценты, представленными частицами 0,2-0,3 мкм.

При введении 25 мг вышеупомянутого материала выявлены изменения структуры коллагена в виде потери, либо резкого уменьшения проявлений поперечно-полосатой исчерченности (рис. 2, цветная вкладка). Волокна разрыхлены, между ними выявляется резкое увеличение объема аморфного матрикса. Пластинки теряют упорядоченное распределение, отдельные волокна формируют зоны утолщений, по-видимому, на фоне повышенной гидрофильности. Все это указывает на деструктивные процессы в межклеточном веществе склеры, прилежащие к месту введения нанодисперсной плаценты. Наряду с формированием глобул, вводимый материал формирует рыхлый агломерат представленный на рисунке.

К концу 7 суток начинаются процессы ранней реэпителизации раневой зоны, что имело место, как у контрольных, так и во всех группах опытных животных. В контроле в зоне раневого дефекта видны единичные моноклеары. Явления периваскулярного отека незначительны. В первой опытной группе отмечены инфильтративно-экссудативные процессы в виде лимфоцитарно-моноцитарных клеточных ответов, умеренной инфильтрации моноклеарами в участках тканей конъюнктивы и поверхностных слоях склеры в зоне введения взвеси. Выявлено умеренное расширение сосудов микроциркуляторного русла. Помимо этого отмечены пролиферативно-фибробластические ответы в виде клеточных тяжей из фибробластов, разделенных нежными волокнистыми структурами. У животных второй опытной и третьей группы проявления асептических экссудатив-

но-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 введения взвеси, с преобладанием моноцитарно-макрофагических и нейтрофильно-клеточных ответов.

К концу 14-х суток после инъекции у контрольных животных в участках конъюнктивы наблюдались признаки реэпителизации. У животных первой опытной группы зоны посттравматического дефекта также подверглись реэпителизации. В зоне введения взвеси выявлены признаки умеренной инфильтрации мононуклеарами и немногочисленными полиморфноядерными клетками без явлений набухания клеток и отека межклеточного вещества. Дополнительно обнаруживалось значительное число клеток фибробластического ряда с наличием фигур митозов. Отмечено увеличение числа функционирующих кровеносных микрососудов, появление эндотелиально-клеточных тяжей и эндотелиальных почек роста – указывающих на активацию репаративного ангиогенеза в рассматриваемый срок. В поверхностных участках склеры, в зоне введения взвеси наноплаценты формировались обильные сети нежных коллагеновых волокон, указывающих на активный коллагеногенез. У животных второй опытной группы сохранялись проявления локальных асептических экссудативно-пролиферативных реакций. Имелось множество клеток моноцитарно-макрофагического и фибробластического рядов. В поверхностных участках склеры наблюдались признаки отека с увеличением объема аморфного компонента межклеточного вещества и разобщением пластинок коллагеновых волокон. Выявляются отдельные плазмциты и лимфоциты. Нередко обнаруживались фигуры митозов. Отмечались гипетрофированные фибробласты, что косвенно указывало на значительное повышение их функциональной активности, что подтверждалось усилением коллагенообразования, значимо превышающим аналогичные явления в контроле и первой опытной

группе. Имелось много, как функционирующих кровеносных капилляров, так и прорастающих превазоидов и эндотелиальных почек роста. В 3-ей опытной группе также сохранялись признаки местного воспалительного процесса. Изменения в зоне введения нанодисперсной плаценты были аналогичны, выявленным у животных второй опытной группы, но еще более были выражены.

К концу первого месяца в первой опытной группе по сравнению с контролем толщина фиброзной оболочки была 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 указывала на высокую степень их морфологической зрелости. Волокнистая организация межклеточного вещества склеры приобретала упорядоченный характер. Во второй и третьей группе по сравнению с первой процесс коллагенообразования имел более диффузный и выраженный характер.

### Выводы

Таким образом, взвесь нанодисперсной плаценты оказывает выраженное модулирующее действие в зоне ее введения в ранние сроки после оперативного вмешательства. При этом 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 и ангиогенеза. Применение препарата в дозах 15 и, особенно, 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.

14.10.2012

### Список литературы:

1. Муслимов, С.А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии. – Уфа, 2000. – 168 с.
2. Канюков, В.Н. Экспериментально-гистологические основы новых технологий в офтальмохирургии / В.Н. Канюков, А.А. Стадников. – Оренбург, 2009. – 104 с.

3. Морфологическое исследование биоконтейнеров в эксперименте / А.В. Корепанов [и др.] // Морфологические ведомости. – 2005. – №1-2. – С. 91-92.
4. Перспективы использования наноструктурированной плацентарной ткани человека при склеропластических операциях / В. В. Жаров [и др.] // В сборнике тезисов докладов участников Второго Международного форума по нанотехнологиям Rusnanotech-2009. – Москва, 6-8 октября, 2009. – С. 614-616.
5. Сканирующая зондовая микроскопия в изучении регенерации тканей при склеропластических операциях в офтальмологии / В. В. Жаров [и др.]. – Поверхность. Рентгеновские, синхротронные и нейтронные исследования. – 2009. – №10. – С. 1-6.
6. Способ приготовления биофункционального трансплантата в виде наночастиц: пат. РФ №2367448 от 09.01.08.

Сведения об авторах:

**Стрелков Николай Сергеевич**, ректор ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России, доктор медицинских наук, профессор,  
e-mail: rector@igma.udm.ru

**Жаров Виктор Владимирович**, заведующий кафедрой офтальмологии  
ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России,  
доктор медицинских наук, профессор, e-mail: rokb@udm.net

**Васильев Юрий Геннадьевич**, доктор медицинских наук, профессор кафедры гистологии  
ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России  
e-mail: devugen@mail.ru

**Самарцев Владимир Сергеевич**, клинический ординатор кафедры офтальмологии  
ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России  
e-mail: vovicss@mail.ru

426034, Ижевск, ул. Коммунаров, д. 281

**Перевозчиков Петр Арсентьевич**, заочный докторант кафедры офтальмологии  
ГБОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия» Минздравсоцразвития России,  
кандидат медицинских наук, заведующий операционным отделением БУЗ УР «Республиканская  
офтальмологическая клиническая больница МЗ УР»

426009, Ижевск, ул. Ленина, д. 98а, e-mail: perev.petr@yandex.ru

**Карбань Оксана Владиславовна**, доктор физико-математических наук, научный сотрудник,  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Физико-технический институт УрО РАН

426001, Ижевск, ул. Кирова, д. 132, e-mail: ocsa123@yahoo.com

**UDC 617.7: 615.216.84: 615.076.9: 615.38.453.2: 616-003.93: 618.36**

**Strelkov N.S., Zharov V.V., Perevozchikov P.A., Vasiljev U.G., Karban O.V., Samartsev V.S.**  
**MICROINJECTION EFFECTS OF HUMAN NANODISPERSED PLACENTA IN EXPERIMENT**

Effects of nanodispersed placenta microinjection in eye conjunctiva depending on an entered dose are studied in rats experiments. It is demonstrated the proportion rise of biological effects due interaction with recipient surrounding tissues as entered nanodispersed placenta dose increases. In particular vascularization and kollagenogenesis, which is derived from the reparative regeneration process, increase. However a number of biological effects connected with evident exudative processes in a introduction zone are able to be harmful because of increase of entered nanodispersed placenta dose to 25 mg in 0,08 ml physiological solution.

Key words: a reparative regeneration, human nanodispersed placenta, microinjection.

#### Bibliography:

1. Muslimov S.A. Morphological aspects of regenerative surgery. – Ufa, 2000. – 168 p.
2. Kanyukov V.N. Experimental and histological base of new technologies in ophthalmosurgery / V.N.Kanyukov, A.A.Stadnikov. – Orenburg, 2009. – 104 p.
3. Morphological investigation of biocontainers in experiment / A.V. Korepanov et al // Morphological vedomosti.– 2005.– №1-2.– P. 91-92.
4. Usage perspectives of human nanostructured placental tissue at scleroplastic surgeries / V.V.Zharov et al // Book of theses of The second International forum at nanotechnologies Rusnanotech-2009. – Moscow, 6-8 October, 2009. – P. 614-616.
5. Scanning catheter microscopy in tissue regeneration study at scleroplastic surgeries in ophthalmology / V.V.Zharov et al.// Surface. X-ray, sincrotrone and neutron investigation. – 2009. – №10. – P. 1-6.
6. Preparation way of biofunctional graft as nanoflakes: Pat. of Russia №2367448 from 09.01.08