

DOI: 10.15825/1995-1191-2020-1-157-164

# ФОРМИРОВАНИЕ ОПОРНО-ДВИГАТЕЛЬНОЙ КУЛЬТИ ГЛАЗНОГО ЯБЛОКА С ПОМОЩЬЮ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ ИЗ НИКЕЛИДА ТИТАНА И АУТОЛОГИЧНЫХ МОНОНУКЛЕАРНЫХ ЛЕЙКОЦИТОВ КРОВИ

Е.А. Горбунова, О.И. Кривошеина, Л.Р. Мустафина

ФГБОУ ВО «Сибирский государственный медицинский университет» Минздрава России, Томск, Российская Федерация

**Цель:** в эксперименте *in vivo* изучить морфологические особенности формирования опорно-двигательной культы глазного яблока с помощью тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов крови. **Материалы и методы.** Выполнена серия экспериментов на 54 половозрелых крысах породы Wistar весом 200–250 г, которые в зависимости от вида оперативного вмешательства были разделены на 3 группы: 1-я группа ( $n = 18$ ) – животным после эвисцероэнуклеации формировали опорно-двигательную культю глазного яблока путем имплантации в склеральный мешок тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов крови; 2-я группа ( $n = 18$ ) – опорно-двигательную культю глаза формировали путем имплантации никелида титана в склеральный мешок; 3-я группа ( $n = 18$ ) – опорно-двигательную культю формировали с помощью имплантата из биоматериала «Аллоплант». **Результаты.** Установлено, что у животных 1-й группы на 7-е сутки после операции удельный объем соединительной ткани был в 7,9 раза ( $p_U = 0,048$ ) выше, чем у животных 2-й группы и в 15,8 раза ( $p_U = 0,039$ ) выше, чем у животных 3-й группы. На 14-е сутки после операции объем соединительной ткани в опорно-двигательной культе глазного яблока у крыс 1-й группы достигал наибольшего значения по сравнению с таковым у крыс остальных групп. Численная плотность новообразованных сосудов в опорно-двигательной культе глазного яблока у крыс 1-й группы, начиная с 14-х суток после операции и до завершения эксперимента (21-е сутки), статистически значимо превышала таковую у животных остальных групп. При этом на 21-е сутки у крыс 1-й группы данный показатель в 4,0 раза ( $p_U = 0,001$ ) был выше, чем у животных 2-й группы, и в 9,8 раза ( $p_U = 0,0003$ ) выше, чем у животных 3-й группы. **Заключение.** Имплантация тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов крови в склеральный мешок после эвисцероэнуклеации в эксперименте *in vivo* сопровождается ускоренным созреванием соединительной ткани и интенсивной васкуляризацией в опорно-двигательной культе глазного яблока, что обеспечивает прочную фиксацию имплантата и снижает риск его отторжения.

**Ключевые слова:** моноклеарные лейкоциты крови, опорно-двигательная культя глазного яблока, тканеинженерная конструкция, никелид титан, клеточные технологии.

## FORMATION OF EYEBALL ORBITAL STUMP USING TITANIUM NICKELIDE TISSUE-ENGINEERED CONSTRUCT AND AUTOLOGOUS BLOOD MONONUCLEAR LEUKOCYTES

E.A. Gorbunova, O.I. Krivosheina, L.R. Mustafina

Siberian State Medical University, Tomsk, Russian Federation

**Objective:** to study the morphological features of formation of the eyeball orbital stump using a titanium nickelide tissue-engineered construct and a suspension of autologous blood mononuclear leukocytes *in vivo*. **Materials and methods.** Experiments were performed on 54 sexually mature Wistar rats weighing 200–250 g. The animals

**Для корреспонденции:** Горбунова Евгения Александровна. Адрес: 634028, Томск, Московский тракт, 89-105. Тел. (905) 992-08-22. E-mail: ea.gorbunova@yandex.ru

**For correspondence:** Gorbunova Evgeniya Aleksandrovna. Address: 89-105, Moscow highway, Tomsk, 634028, Russian Federation. Tel. (905) 992-08-22. E-mail: ea.gorbunova@yandex.ru

were divided into 3 groups, depending on type of surgical intervention: group 1 ( $n = 18$ ) consisted of animals in which eyeball orbital stump was formed after evisceroenucleation through implantation of a titanium nickelide tissue-engineered construct and a suspension of autologous blood mononuclear leukocytes in the scleral sac; group 2 ( $n = 18$ ) – the eyeball orbital stump was formed through implantation of titanium nickelide tissue-engineered construct in the scleral sac; group 3 ( $n = 18$ ) – orbital stump was formed using an Alloplant implant. **Results.** It was established that in group 1 rats, on day 7 following surgery, the specific volume of connective tissue was 7.9 times ( $p_U = 0.048$ ) higher than in group 2 rats and 15.8 times ( $p_U = 0.039$ ) higher than in group 3 rats. On day 14 after surgery, the volume of connective tissue in the eyeball orbital stump of group 1 rats reached the highest value compared to that in the other groups. The numerical density of newly formed vessels in the eyeball orbital stump of group 1 rats, starting from day 14 after surgery up to the end of experiment (day 21), was statistically significantly higher than that in the other groups. Moreover, on day 21, this indicator was 4.0 times ( $p_U = 0.001$ ) higher in group 1 rats than in group 2 rats and 9.8 times ( $p_U = 0.0003$ ) higher than in group 3 rats. **Conclusion.** Implantation of titanium nickelide tissue-engineered construct and a suspension of autologous blood mononuclear leukocytes into the scleral sac after evisceroenucleation in an *in vivo* experiment leads to accelerated maturation of the connective tissue and intensive vascularization in the eyeball orbital stump. This ensures strong fixation of the implant and reduces risk of rejection.

**Keywords:** blood mononuclear leukocytes, eyeball orbital stump, tissue-engineered construct, titanium nickelide, cell technology.

## ВВЕДЕНИЕ

Благодаря достижениям современной офтальмологии лечение многих тяжелых заболеваний органа зрения становится все более эффективным, однако в ряде случаев, несмотря на проводимые лечебные мероприятия, не удается сохранить глазное яблоко как орган [1, 2]. Необходимо отметить, что около 75% энуклеаций выполняется без формирования опорно-двигательной культи и имплантации орбитального вкладыша [2, 3]. Это, в свою очередь, приводит к развитию анофтальмического синдрома. Клиническая картина данного осложнения характеризуется западением орбиты-пальпебральной борозды, деформацией век, птозом и неполным смыканием глазной щели [1, 4]. Лечение анофтальмического синдрома представляет собой трудоемкий и многоэтапный процесс, направленный на восстановление объема конъюнктивальной полости и других анатомических структур, а также восполнение дефицита объема тканей орбиты с помощью имплантата из инертного, биосовместимого материала [1, 3, 5]. К настоящему времени существует целый ряд материалов, предлагаемых в качестве орбитального имплантата. Некоторые из них – такие как хрящ, гидроксиапатит, углеродные композиты – достаточно широко применяются в орбитальной хирургии, другие же, например, тантал, керамика, инъекционный гидрогель, монокристаллический силикон, имеют ограниченное применение как из-за высокой стоимости, так и большого числа осложнений [1, 3, 5].

На современном этапе возрос интерес офтальмохирургов к пористым материалам, структура которых обеспечивает достаточно быстрое врастание окружающих тканей, способствуя тем самым прочной фиксации имплантата в орбите. Однако и при использовании пористых материалов, особенно в отдален-

ные сроки, возможно развитие таких осложнений, как обнажение имплантата, его инфицирование и отторжение. Возможное решение проблемы – использование клеточных технологий при орбитальной имплантации [6–12].

**Цель исследования:** в эксперименте *in vivo* изучить морфологические особенности формирования опорно-двигательной культи глазного яблока с помощью тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов крови.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Эксперимент выполнен на 54 половозрелых крысах-самцах породы Wistar (54 глаза) весом 200–250 г, полученных из вивария ФГБОУ ВО «СибГМУ» Минздрава России. Перед экспериментом всех животных выдерживали на протяжении недельного карантинного срока в условиях вивария на обычном пищевом режиме. Протокол проведения экспериментальных исследований утвержден локальным этическим комитетом ГОУ ВПО «СибГМУ» Росздрава от 29.11.2010 г., регистрационный номер № 1715.

В зависимости от планируемого вида оперативного вмешательства крысы были разделены на 3 группы: 1-я группа ( $n = 18$ ) – животным после эвисцероэнуклеации (удаление роговицы и содержимого глазного яблока) одного из глаз формировали опорно-двигательную культю глазного яблока путем имплантации в склеральный мешок тканеинженерной конструкции из никелида титанового имплантата и суспензии аутологичных моноклеарных лейкоцитов крови; 2-я группа ( $n = 18$ ) – крысам после эвисцероэнуклеации формировали опорно-двигательную культю путем помещения в склеральный мешок имплантата из никелида титана; 3-я группа ( $n = 18$ ) – после эвисцероэнуклеации крысам формировали

опорно-двигательную культю глазного яблока с помощью имплантата из биоматериала «Аллоплант».

Имплантат из никелида титана изготавливается из нити пористого никелида титана марки ТН-10 толщиной 100 мкм (сертификат соответствия № РОСС RU ЛЯ79НО93 37 от 15.04.2011 г.) [13] и имеет округлую форму диаметром 4–5 мм. Имплантат производится на базе НИИ медицинских материалов (руководитель – д. т. н., профессор В.Э. Гюнтер).

Имплантат из биоматериала «Аллоплант» (производства ФГУ «ВЦГиПХ», г. Уфа) изготавливается из подкожно-жировой клетчатки подошвы человека и имеет округлую форму диаметром 5 мм.

Мононуклеарные лейкоциты из крови экспериментального животного выделяли непосредственно перед операцией методом фракционирования на разделяющем растворе фиколл-верографин (плотность 1,067–1,077 г/мл). Чистота клеток составляла 96–98%, окрашенных (погибших) клеток было 1,5–2%, что не превышало допустимое (не более 3%) количество.

В условиях операционной под эфирным наркозом всем животным трех групп (54 крысы) выполняли эвисцерознуклеацию одного из глаз с последующим помещением в склеральный мешок глазного яблока соответствующего имплантата. Животным 1-й группы (18 крыс) в структуру имплантата из никелида титана вводили 0,1 мл свежевыделенной суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов крови (клеточная плотность 200 тыс. клеток/мл). В послеоперационном периоде всем животным трех групп в конъюнктивальную полость оперированного глаза закапывали раствор Тобрамицина 6 раз в день.

Общая продолжительность эксперимента составила 21 сутки. В ходе эксперимента на 1, 3, 7, 14, 21-е сутки после операции проводили наружный осмотр, биомикроскопию оперированных глаз с оценкой состояния конъюнктивы век и опорно-двигательной культя глазного яблока, краев операционной раны и швов, а также наличия и характера отделяемого в конъюнктивальной полости.

На 7, 14, 21-е сутки после операции из эксперимента выводили по 6 крыс из каждой группы с удалением опорно-двигательной культя оперированного глазного яблока, фиксацией полученного материала и окраской гематоксилин-эозином, по методу Ван-Гизона для световой микроскопии под 200-, 300- и 400-кратным увеличением. Забой экспериментальных животных на всех этапах эксперимента осуществляли с соблюдением правил и норм Европейского общества (86/609ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

## Обработка данных

В ходе морфометрии срезов с использованием программы ImageJ 1.50i производили подсчет

моно- и полинуклеарных лейкоцитов, плазмоцитов, определяли объем стромы и численную плотность новообразованных сосудов в процентах. Статистический анализ результатов проводили с использованием статистического пакета IBM SPSS Statistics 20. Нормальность распределения показателей проверяли при помощи закона Колмогорова–Смирнова. Анализ переменных, имеющих нормальное распределение, осуществляли с помощью t-критерия Стьюдента. Результаты представлены в виде  $M \pm m$ , где  $M$  – среднее арифметическое значение,  $m$  – стандартная ошибка среднего. При несоответствии распределения данных нормальному закону распределения использовали непараметрический критерий – тест Манна–Уитни ( $p_U$ ). Статистически значимыми различия считали при уровне значимости  $p < 0,05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Через 1 сутки после операции у животных всех трех групп (54 крысы) в ходе наружного осмотра отмечались умеренный отек и гиперемия конъюнктивы век и опорно-двигательной культя оперированного глазного яблока, которые постепенно уменьшались к 3–4-м суткам. Сформированная культя глазного яблока у всех экспериментальных крыс (100%) имела округлую форму и была умеренно подвижна. По данным биомикроскопии, края операционной раны в области швов были адаптированы, в конъюнктивальной полости оперированных глаз у крыс обнаруживалось незначительное количество отделяемого слизистого характера. На протяжении всего эксперимента (21 сут) у животных трех групп не выявлено ни одного случая обнажения или отторжения имплантата, помещенного в склеральный мешок оперированного глазного яблока.

Согласно результатам световой микроскопии, у животных 1-й группы (6 крыс) на 7-е сутки после эвисцерознуклеации и имплантации в склеральный мешок глаза тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов крови в полости опорно-двигательной культя глазного яблока обнаруживались обширные скопления мононуклеарных лейкоцитов ( $6259,0 \pm 1646,0$  клетки в  $1 \text{ мм}^2$  среза) (рис. 1), небольшое количество плазмоцитов ( $443,6 \pm 200,5$  клетки в  $1 \text{ мм}^2$  среза) и единичные полиморфно-ядерные лейкоциты – ПМЛ ( $344,9 \pm 165,1$  клетки в  $1 \text{ мм}^2$  среза). Вокруг имплантата из никелида титана выявлялись множественные очаговые скопления незрелых фибробластов. Тонкие коллагеновые волокна были умеренно отечны, располагались рыхло. Между волокнами обнаруживались новообразованные сосуды (табл., рис. 1).

У животных 2-й группы (6 крыс) на 7-е сутки после эвисцерознуклеации и имплантации в склеральный мешок имплантата из никелида титана в

полости опорно-двигательной культы глазного яблока обнаруживались диффузная, равномерная лимфо-лейкоцитарная инфильтрация ( $1916,6 \pm 495,3$  клет-

ки в  $1 \text{ мм}^2$  среза) и небольшое количество незрелых фибробластов, а также выявлялись отечные, рыхло расположенные вокруг имплантата коллагеновые

Таблица

**Количественное соотношение стромы и новообразованных сосудов в  $1 \text{ мм}^2$  среза опорно-двигательной культы глазного яблока у животных в зависимости от вида имплантата,  $M \pm m, p_U$**

**The quantitative ratio of new vessels and stroma in  $1 \text{ mm}^2$  slice of the orbital stump in animals depending on the type of the implant,  $M \pm m, p_U$**

Сроки эксперимента	Объем стромы, % (n = 10)			Численная плотность сосудов, % (n = 10)		
	1-я группа	2-я группа	3-я группа	1-я группа	2-я группа	3-я группа
7-е сутки	$0,158 \pm 0,1$	$0,02 \pm 0,01$	$0,01 \pm 0,005$	$0,04 \pm 0,027$	$0,02 \pm 0,014$	$0,01 \pm 0,006$
14-е сутки	$95,0 \pm 2,1$ $p_1 = 0,0002$ ; $p_2 = 0,0001$	$0,3 \pm 0,14$	$0,2 \pm 0,11$	$5,0 \pm 2,1$ $p_1 = 0,04$ ; $p_2 = 0,03$	$0,04 \pm 0,03$	$0,02 \pm 0,01$
21-е сутки	$79,1 \pm 3,4$ $p_2 = 0,0005$	$94,7 \pm 1,9$	$5,3 \pm 1,9$	$21,6 \pm 3,1$ $p_1 = 0,001$ ; $p_2 = 0,0003$	$5,3 \pm 1,9$	$2,2 \pm 1,2$

*Примечание.*  $p_1$  – уровень значимости различий по сравнению с данными 2-й группы;  $p_2$  – уровень значимости различий по сравнению с данными 3-й группы;  $M$  – выборочное среднее значение;  $m$  – ошибка среднего.

*Note.*  $p_1$  – the level of significance of differences compared with the data of the 2nd group;  $p_2$  – the level of significance of differences compared with the data of the 3rd group;  $M$  – the sample mean;  $m$  – the average error.

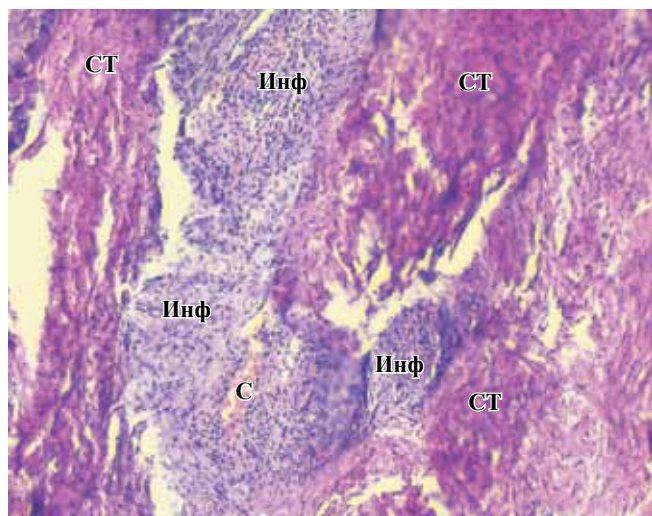


Рис. 1. Разрастание рыхлой волокнистой соединительной ткани, очаговая мононуклеарная инфильтрация и новообразованные сосуды в опорно-двигательной культе глазного яблока крысы 1-й группы на 7-е сутки после эвисцеронуклеации с имплантацией тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологичных мононуклеарных лейкоцитов. СТ – соединительная ткань, Инф – клеточная инфильтрация, С – сосуды. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 400$

Fig. 1. Growth of loose fibrous connective tissue, focal mononuclear infiltration and newly formed vessels in the orbital stump of the 1<sup>st</sup> group of animals on the 7<sup>th</sup> day after evisceronucleation with implantation of a tissue-engineering construction from titanium nickelide and suspension of autologous blood mononuclear cells. СТ – connective tissue, Инф – cell infiltration, С – vessels. Stained with hematoxylin and eosin.  $\times 400$

волокна. Среди волокон выявлялись единичные новообразованные сосуды (табл., рис. 2).

У животных 3-й группы (6 крыс) на 7-е сутки после эвисцеронуклеации и имплантации в склеральный мешок имплантата из биоматериала «Аллоплант» полость опорно-двигательной культы глазного яблока была заполнена жировой тканью, между дольками которой обнаруживались единичные мононуклеарные лейкоциты ( $111,5 \pm 41,8$  клетки в  $1 \text{ мм}^2$  среза), небольшое количество ПМЛ ( $9,6 \pm 4,8$  клетки в  $1 \text{ мм}^2$  среза), тонкие коллагеновые волокна (рис. 3) и единичные новообразованные сосуды (табл.).

На 14-е сутки после операции у животных 1-й группы (6 крыс) в полости опорно-двигательной культы глазного яблока отмечалось обширное разрастание волокнистой соединительной ткани. Коллагеновые волокна располагались более упорядоченно, чем на 7-е сутки. Между волокнами выявлялись скопления мононуклеарных лейкоцитов ( $9093,8 \pm 891,0$  клетки в  $1 \text{ мм}^2$  среза). Вокруг имплантата из никелида титана обнаруживались новообразованные сосуды (табл.), большинство из которых начинало дифференцироваться в артериолы и венулы.

У животных 2-й группы (6 крыс) на 14-е сутки после операции в полости опорно-двигательной культы глазного яблока наблюдалось разрастание рыхлой волокнистой соединительной ткани со значительным отеком и умеренно выраженной лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрацией ( $4744,0 \pm 928,0$  клетки



в  $1 \text{ мм}^2$  среза). Между коллагеновыми волокнами обнаруживались тонкостенные капилляры, появлялись отдельные артериолы и венулы (табл.).

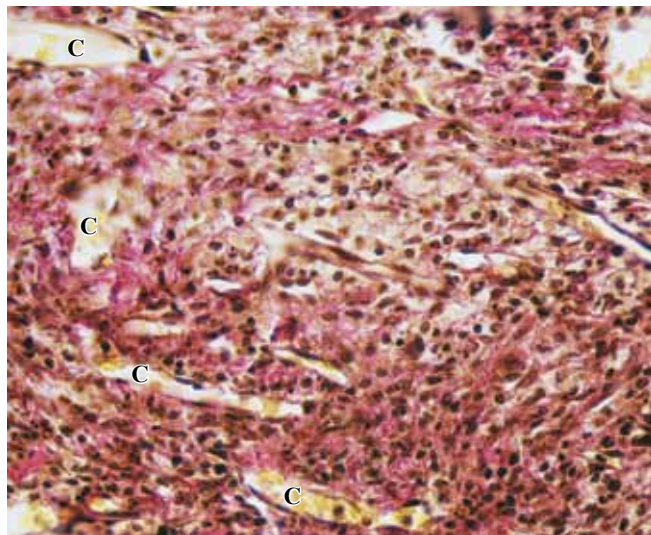


Рис. 2. Диффузная лимфо-лейкоцитарная инфильтрация и единичные новообразованные сосуды в опорно-двигательной культе глазного яблока крысы 2-й группы на 7-е сутки после эвисцероэнуклеации с имплантацией никелида титана. С – сосуды. Окраска гематоксилином и пикрофуксином по методу Ван-Гизона.  $\times 300$

Fig. 2. Diffuse lymphocytic leukocyte infiltration and single newly formed vessels in the orbital stump of the 2<sup>nd</sup> group of animals on the 7<sup>th</sup> day after evisceration with implantation of titanium nickelide. C – vessels. Stained with hematoxylin and pikrofuksin by the method of Van-Giezon.  $\times 300$

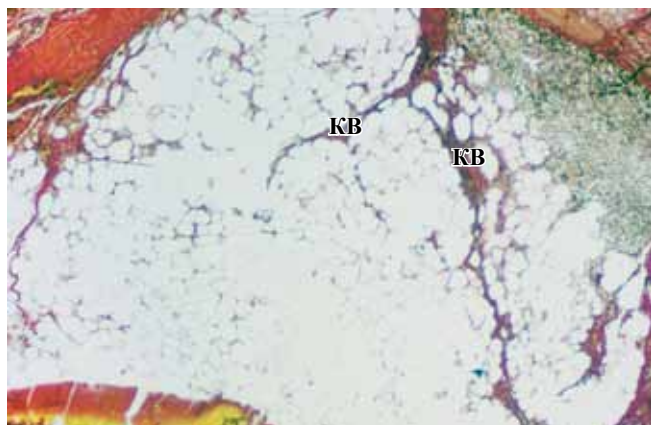


Рис. 3. Тонкие единичные коллагеновые волокна между дольками жировой ткани в опорно-двигательной культе глазного яблока крысы 3-й группы на 7-е сутки после эвисцероэнуклеации с имплантацией биоматериала «Аллоплант». KB – коллагеновые волокна. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 200$

Fig. 3. Thin, single collagen fibers between the segments of adipose tissue in the orbital stump of the 3<sup>rd</sup> group of animals on the 7<sup>th</sup> day after evisceration with implantation of biomaterial «Alloplant». KB – collagen fibers. Stained with hematoxylin and eosin.  $\times 200$

У животных 3-й группы (6 крыс) на 14-е сутки после операции в полости опорно-двигательной культы глазного яблока между жировыми дольками имплантата из биоматериала «Аллоплант» отмечались незначительная лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация ( $103,6 \pm 49,4$  клетки в  $1 \text{ мм}^2$  среза) и разрастание тонких коллагеновых волокон. Вокруг имплантата обнаруживались единичные новообразованные сосуды (табл.).

На 21-е сутки после операции у животных 1-й группы (6 крыс) в полости опорно-двигательной культы глазного яблока обнаруживалась зрелая соединительная ткань. Толстые пучки коллагеновых волокон располагались компактно и упорядоченно (рис. 4). Вокруг имплантата из никелида титана выявлялись мелкоочаговые скопления мононуклеарных лейкоцитов ( $4386,3 \pm 498,1$  клетки в  $1 \text{ мм}^2$  среза) и большое число новообразованных сосудов (табл.).

У животных 2-й группы (6 крыс) на 21-е сутки после операции в полости опорно-двигательной культы глазного яблока обнаруживалась рыхлая соединительная ткань с тонкими коллагеновыми волокнами, неупорядоченно расположенными вокруг имплантата из никелида титана. Между пучками коллагеновых волокон выявлялись диффузная мононуклеарная инфильтрация ( $2020,6 \pm 562,8$  клетки в  $1 \text{ мм}^2$  среза) и небольшое число новообразованных сосудов (табл., рис. 5).

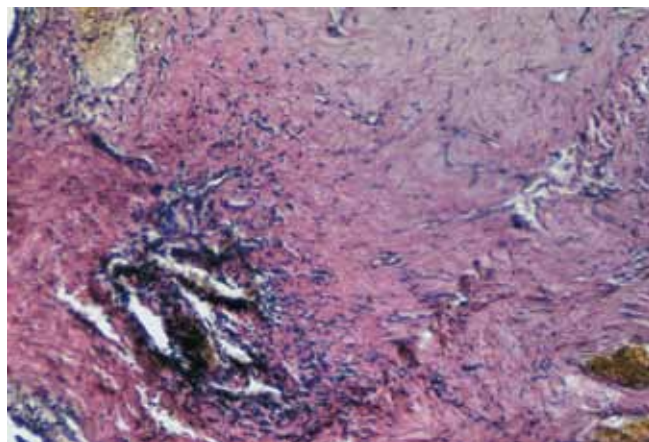


Рис. 4. Упорядоченно расположенные пучки коллагеновых волокон в опорно-двигательной культе глазного яблока крысы 1-й группы на 21-е сутки после эвисцероэнуклеации с имплантацией тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологических мононуклеарных лейкоцитов. Окраска гематоксилином и пикрофуксином по методу Ван-Гизона.  $\times 300$

Fig. 4. Orderly arranged bundles of collagen fibers in the orbital stump of the 1<sup>st</sup> group of animals on the 21<sup>st</sup> day after evisceration with implantation of a tissue-engineering construction from titanium nickelide and suspension of autologous blood mononuclear cells. Stained with hematoxylin and pikrofuksin by the method of Van-Giezon.  $\times 300$

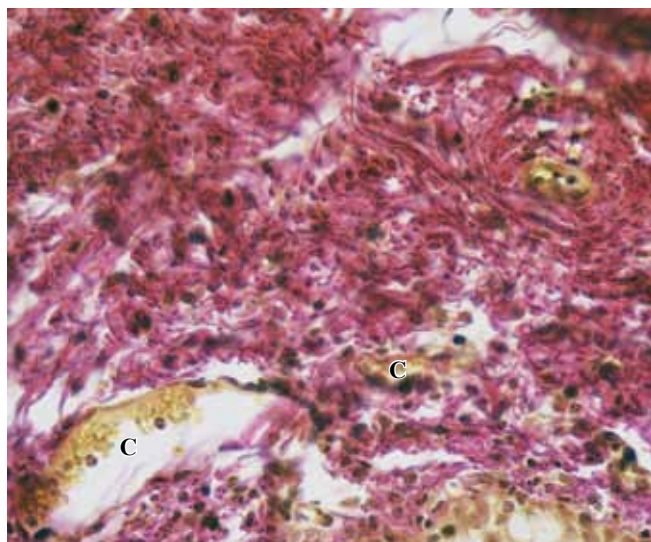


Рис. 5. Рыхло расположенные пучки коллагеновых волокон и умеренно полнокровные сосуды в опорно-двигательной культе глазного яблока крысы 2-й группы на 21-е сутки после эвисцероэнуклеации с имплантацией никелида титана. С – сосуды. Окраска гематоксилином и пикрофуксином по методу Ван-Гизона.  $\times 400$

Fig. 5. Loosely arranged bundles of collagen fibers and moderately full-blooded vessels in the orbital stump of the 2<sup>nd</sup> group of animals on the 21<sup>st</sup> day after evisceration with implantation of titanium nickelide. С – vessels. Stained with hematoxylin and pikrofuksin by the method of Van-Giezon.  $\times 400$

У животных 3-й группы (6 крыс) на 21-е сутки после операции в полости опорно-двигательной культы глазного яблока обнаруживалась жировая ткань, между дольками отмечались незначительная мононуклеарная инфильтрация ( $106,1 \pm 43,5$  клетки в  $1 \text{ мм}^2$  среза) и рыхлая соединительная ткань (рис. 6). Вокруг имплантата из биоматериала «Аллоплант» выявлялись единичные умеренно полнокровные сосуды (табл.).

По данным морфометрии, в клеточном составе опорно-двигательной культы глазного яблока у крыс всех трех групп на протяжении всего эксперимента (21 сут) преобладала популяция мононуклеарных лейкоцитов. При этом у животных 1-й группы с имплантатом из тканеинженерной конструкции численность клеток данной популяции в ходе эксперимента статистически значимо превышала таковую у животных остальных групп. Так, на 7-е сутки после операции число мононуклеарных лейкоцитов в культе глазного яблока у крыс 1-й группы в 3,3 раза ( $p_U = 0,034$ ) превышало данный показатель у животных 2-й группы с имплантатом из никелида титана и в 56,1 раза ( $p_U = 0,0002$ ) – у животных 3-й группы с имплантатом из биоматериала «Аллоплант». На 14-е сутки численность клеток данной популяции в культе глазного яблока у крыс 1-й группы превышала

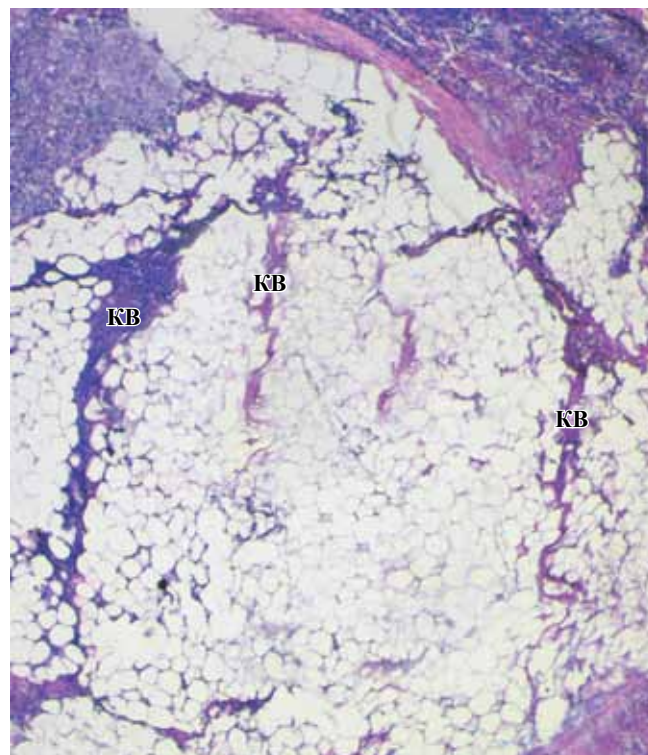


Рис. 6. Рыхлые коллагеновые волокна между дольками жировой ткани в опорно-двигательной культе глазного яблока крысы 3-й группы на 21-е сутки после эвисцероэнуклеации с имплантацией биоматериала «Аллоплант». КВ – коллагеновые волокна. Окраска гематоксилином и эозином.  $\times 200$

Fig. 6. Loose collagen fibers between the segments of adipose tissue in the orbital stump of the 3<sup>rd</sup> group of animals on the 21<sup>st</sup> day after evisceration with implantation of biomaterial «Alloplant». КВ – collagen fibers. Stained with hematoxylin and eosin.  $\times 200$

таковую у крыс 2-й группы в 1,9 раза ( $p_U = 0,01$ ), у крыс 3-й группы – в 87,7 раза ( $p_U = 0,0001$ ), на 21-е сутки – в 2,2 раза ( $p_U = 0,02$ ) и 41,3 раза ( $p_U = 0,0002$ ) соответственно. Выявленная закономерность объясняется как непосредственным введением суспензии аутологических мононуклеарных лейкоцитов крови в тканеинженерную конструкцию при формировании опорно-двигательной культы глазного яблока у крыс 1-й группы, так и дополнительной миграцией клеток данной популяции вследствие индуцирующего влияния экзогенно введенных мононуклеаров.

Удельный объем соединительной ткани в опорно-двигательной культе глазного яблока у животных 1-й группы с имплантатом из тканеинженерной конструкции, начиная с 7-х суток после операции и на протяжении всего эксперимента, также статистически значимо превышал таковой у животных остальных групп. Так, на 7-е сутки после оперативного вмешательства у крыс 1-й группы данный показатель был в 7,9 раза ( $p_U = 0,048$ ) выше, чем у животных 2-й группы с имплантатом из никелида ти-



тана и в 15,8 раза ( $p_U = 0,039$ ) выше, чем у животных 3-й группы с имплантатом из биоматериала «Аллоплант» (табл.). На 14-е сутки после операции объем соединительной ткани в опорно-двигательной культе глазного яблока у животных 1-й группы достигал наибольшего значения по сравнению с таковым у животных других групп.

На 21-е сутки после операции у животных 1-й группы в ходе морфометрии выявлено уменьшение объема стромы опорно-двигательной культи глазного яблока в 1,2 раза ( $p_U = 0,0019$ ) по сравнению с показателем на 14-е сутки (табл.), что обусловлено созреванием соединительной ткани в культе глазного яблока. У животных же 2-й группы объем стромы опорно-двигательной культи глаза на 21-е сутки, напротив, достигал наибольшего значения как по сравнению с исходными данными, так и по сравнению с таковыми у крыс остальных групп (табл.). Однако в соединительной ткани культи у всех животных 2-й группы (6 крыс) при световой микроскопии обнаруживались признаки незрелости. У животных 3-й группы, хотя объем стромы опорно-двигательной культи глаза на 21-е сутки после операции и превысил таковой на 14-е сутки в 26,5 раза, тем не менее его уровень имел наименьшее значение по сравнению с показателями у крыс остальных групп (табл.).

Численная плотность новообразованных сосудов в опорно-двигательной культе глазного яблока у животных 1-й группы, начиная с 14-х суток после операции и до завершения эксперимента (21-е сутки), статистически значимо превышала таковую у крыс остальных групп (табл.). При этом на 21-е сутки у крыс 1-й группы данный показатель в 4,0 раза ( $p_U = 0,001$ ) был выше, чем у животных 2-й группы и в 9,8 раза ( $p_U = 0,0003$ ) – у животных 3-й группы (табл.).

## ОБСУЖДЕНИЕ

Как известно, мононуклеарные лейкоциты крови благодаря синтезу и секреции большого числа цитокинов (интерлейкины – ИЛ-1 $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИЛ-10, фактор некроза опухоли, фактор роста эндотелия сосудов) стимулируют миграцию мононуклеаров, ПМЛ и фибробластов, ускоряют пролиферацию фибробластов и эндотелиоцитов, воздействуют на систему комплемента и продукцию коллагена [14–16]. Вероятно, благодаря функциональной кооперации мононуклеарных лейкоцитов, экзогенно вводимых в структуру имплантата из никелида титана, помещенного в опорно-двигательную культю глазного яблока крысы, и дополнительно мигрирующих под их влиянием клеток, обеспечивающих развитие воспалительно-репаративной реакции, происходит быстрая смена клеточных фаз и ускоряется переход воспаления в фазу репарации [7, 15]. При этом наблюдается быстрое – в течение 21 суток – созревание

соединительной ткани в опорно-двигательной культе глазного яблока крыс и ускоренный, начиная с 14-х суток, неоваскулогенез.

Необходимо отметить, что использование никелида титана в качестве основы имплантата благодаря пористой структуре материала существенно облегчает прорастание имплантата фиброваскулярной тканью. Это, в свою очередь, обеспечивает его прочное удержание в полости культи глаза экспериментального животного и значительно снижает риск обнажения и отторжения имплантата [15, 16]. В ходе проведенного эксперимента *in vivo* при использовании имплантата из никелида титана (36 крыс, 36 глаз) в послеоперационном периоде не выявлено ни одного осложнения (инфицирование, отторжение имплантата). Согласно же литературным данным [1, 2, 4], риск развития послеоперационных осложнений при применении орбитальных имплантатов из различных синтетических материалов составляет от 4 до 38%.

Кроме того, имплантат, изготовленный из никелида титана, благодаря упруго-эластичным свойствам материала обеспечивает стабильную форму опорно-двигательной культи глазного яблока животного.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Имплантация тканеинженерной конструкции из никелида титана и суспензии аутологических мононуклеарных лейкоцитов крови в склеральный мешок крыс после эвисцерознуклеации в эксперименте *in vivo* сопровождается ускоренным созреванием соединительной ткани и интенсивной васкуляризацией в опорно-двигательной культе глазного яблока, что обеспечивает прочную фиксацию имплантата и снижает риск его отторжения. Полученные результаты являются перспективными для клинических исследований.

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*The authors declare no conflict of interest.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ / REFERENCES

1. Schmitzer S, Simionescu C, Alexandrescu C, Burcea M. The Anophthalmic Socket – Reconstruction Options. *Journal of Medicine and Life*. 2014; 7 (Spec Iss 4): 23–29.
2. Бараш АН, Шаршакова ТМ, Малиновский ГФ. Медико-социальные проблемы при анофтальмическом синдроме. *Проблемы здоровья и экологии*. 2015; 44 (2): 4–7. Barash AN, Sharshakova TM, Malinovskij GF. Mediko-social'nye problemy pri anoftal'micheskom syndrome. *Problemy zdorov'ja i jekologii*. 2015; 44 (2): 4–7.
3. Лузянина ВВ. Особенности офтальмопластики для глазного протезирования. *Тихоокеанский медицинский журнал*. 2016; 3 (65): 32–36. Luz'janina VV. Osobennosti oftal'moplastiki dlja glaznogo protezirovaniya.

- Tihookeanskij medicinskij zhurnal*. 2016; 3 (65): 32–36. doi: 10.17238/PmJ1609-1175.2016.3.32–36.
4. Bohman E, Roed Rassmusen ML, Kopp ED. Pain and discomfort in the anophthalmic socket. *Curr Opin Ophthalmol*. 2014; 25 (5): 455–460. doi: 10.1097/ICU.0000000000000069.
  5. Иволгина ИВ. Особенности применения различных имплантатов при формировании опорно-двигательной культы после энуклеации. *Вестник ТГУ*. 2015; 20 (3): 577–579. Ivolgina IV. Osobennosti primeneniya razlichnyh implantatov pri formirovani oporno-dvigatel'noj kul'ti posle jenukleacii. *Vestnik TGU*. 2015; 20 (3): 577–579.
  6. Мезен НИ. Стволовые клетки: учеб.-метод. пособие. Минск: БГМУ, 2014: 62. Mezen NI. Stvolovye kletki: ucheb.-metod. posobie. Minsk: BGMU, 2014: 62.
  7. Гилевич ИВ, Поляков ИС, Порханов ВА, Чехонин ВП. Морфологический анализ биологической совместимости аутологических костных мононуклеарных клеток с синтетическим каркасом на основе полиэтилентерефталата. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 163 (3): 388–392. Gilevich IV, Polyakov IS, Porkhanov VA, Chekhonin VP. Morphological Analysis of Biocompatibility of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cells with Synthetic Polyethylene Terephthalate Scaffold. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*. 2017; 163 (3): 400–404. [In Russ, English abstract]. doi: 10.1007/s10517-017-3813-z.
  8. Лычиков АН, Осипов ББ, Скуратов АГ, Призенцов АА. Стволовые клетки в регенеративной медицине: достижения и перспективы. *Проблемы здоровья и экологии*. 2015; 45 (3): 4–9. Lyzikov AN, Osipov BB, Skuratov AG, Prizencov AA. Stvolovye kletki v regenerativnoj medicine: dostizheniya i perspektivy. *Problemy zdorov'ja i jekologii*. 2015; 45 (3): 4–9.
  9. Рябов СИ, Звягинцева МА, Осидак ЕО, Смирнов ВА. Коллагеновый имплантат и мононуклеарные клетки пуповинной крови позволяют восстановить движение задних конечностей после удаления участка спинного мозга. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 2017; 164 (9): 377–380. Rjabov SI, Zvjaginceva MA, Osidak EO, Smirnov VA. Kollagenovyy implantat i mononuklearnye kletki pupovinnoj krovi pozvoljajut vosstanovit' dvizhenie zadnih konechnostej posle udalenija uchastka spinного mozga. *Bjulleten' jeksperimental'noj biologii i mediciny*. 2017; 164 (9): 377–380.
  10. Суббот АМ, Каспарова ЕА. Обзор подходов к клеточной терапии в офтальмологии. *Вестник офтальмологии*. 2015; 5: 74–81. Subbot AM, Kasparova EA. Obzor podhodov k kletочноj terapii v oftal'mologii. *Vestnik oftal'mologii*. 2015; 5: 74–81.
  11. Bedian L, Rodriguez AMV, Vargas GH, Parra-Saldivar R, Iqbal HM. Bio-based materials with novel characteristics for tissue engineering applications – a review. *Int J Biol Macromol*. 2017; 98: 837–846. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.02.048.
  12. Li MD, Atkins H, Bubela T. The global landscape of stem cell clinical trials. *Regen Med*. 2014 Jan; 9 (1): 27–39. doi: 10.2217/rme.13.80.
  13. Гюнтер ВЭ, Ходоренко ВН, Чекалкин ТЛ, Олесова ГЦ, Дамбаев ПГ, Сысолятин НГ и др. Медицинские материалы с памятью формы. Томск: МИЦ, 2011: 534. Gjunter VJe, Hodorenko VN, Chekalkin TL, Olesova GC, Dambaev PG, Sysoljatin NG i dr. Medicinskie materialy s pamjat'ju formy. Tomsk: MIC, 2011: 534.
  14. Еричев ВП, Петров СЮ, Суббот АМ, Волжанин АВ, Германова ВН, Карлова ЕВ. Роль цитокинов в патогенезе глазных болезней. *Национальный журнал «Глаукома»*. 2017; 16 (1): 87–101. Erichev VP, Petrov SY, Subbot AM, Volzhanin AV, Germanova VN, Karlova EV. Role of cytokines in the pathogenesis of eye diseases. *National Journal «Glaucoma»*. 2017; 16 (1): 87–101. [In Russ, English abstract].
  15. Хлусов ИА, Нечаев КА, Дворниченко МВ, Хлусова МЮ, Рязанцева НВ, Савельева ОВ и др. Молекулярные механизмы реакции стромальных стволовых клеток и мононуклеарных лейкоцитов крови на кратковременный контакт с искусственными материалами. *Вестник науки Сибири*. 2012; 1: 321–327. Hlусov IA, Nechaev KA, Dvornichenko MV, Hlусova MJu, Rjazanceva NV, Savel'eva OV i dr. Molekuljarnye mehanizmy reakcii stromal'nyh stvolovyh kletok i mononuklearnyh lejkocitov krovi na kratkovremennyj kontakt s iskusstvennymi materialami. *Vestnik nauki Sibiri*. 2012; 1: 321–327.
  16. Атькова ЕЛ, Рейн ДА, Ярцев ВД, Суббот АМ. Влияние цитокина TGF-бета и других факторов на процесс регенерации. *Вестник офтальмологии*. 2017; 4: 89–96. At'kova EL, Rejn DA, Jarcev VD, Subbot AM. Vlijanie citokina TGF-beta i drugih faktorov na process regeneracii. *Vestnik oftal'mologii*. 2017; 4: 89–96.

Статья поступила в редакцию 1.11.2018 г.  
The article was submitted to the journal on 1.11.2018