

© Коллектив авторов, 2017
УДК 616-003.9:616.25-002.3-036.12-08:599.323.4

Х.Б.М. Мухаммедов¹, Н.Н. Шевлюк², А.А. Третьяков¹, С.Б. Фадеев³

АНАЛИЗ ОСОБЕННОСТЕЙ ГИСТОГЕНЕЗА СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ БИОДЕГРАДИРУЕМОГО МАТЕРИАЛА В УСЛОВИЯХ ВЛИЯНИЯ ОКСИТОЦИНА (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО-ГИСТОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)

¹ Кафедра хирургии (зав. — проф. А.А. Третьяков), ² кафедра гистологии, цитологии, эмбриологии (зав. — проф. А.А. Стадников), ³ кафедра госпитальной хирургии (зав. — проф. В.С. Тарасенко), ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ

Изучены особенности репаративного гистогенеза при ликвидации ригидной остаточной полости на модели хронической эмпиемы плевры (32 крысы) с использованием только биodeградируемого композитного гидроксоapatитколлагенового* материала «ЛитАр» и в комбинации с антибиотиком и окситоцином. Участок, подвергнутый пломбировке композитным материалом, исследовали с использованием гистологических и иммуногистологических методов через 3, 7, 14, 30 сут. «ЛитАр» в комбинации с антибиотиком и окситоцином к 14-м суткам эксперимента на месте полости стимулировал васкулогенез, пролиферацию и цитодифференцировку клеточных элементов фибробластического дифферона, синтез компонентов межклеточного вещества, что приводило к формированию рыхлой неоформленной соединительной ткани. Введение окситоцина приводило к пролонгированию малодифференцированного состояния соединительной ткани в области имплантированного композита.

Ключевые слова: соединительная ткань, регенерация, окситоцин, гидроксоapatитколлагеновый композит

Оптимизация репаративных процессов при ликвидации стойких остаточных полостей в организме с помощью различных пломбировочных материалов продолжает оставаться актуальной [1, 8–10]. Одним из таких материалов является гидроксоapatитколлагеновый биodeградируемый композит «ЛитАр» (СердоЛит, Россия) [2–4]. В последние годы резко возрос интерес исследователей к роли и значимости гипоталамических нонапептидов, в частности окситоцина, в обеспечении тканевого и клеточного гомеостаза, в оптимизации репаративного гистогенеза. На основании многочисленных комплексных исследований был сделан вывод, что окситоцин может рассматриваться как регулятор процессов пролиферации, роста и цитодифференцировки клеток и тканей различного генеза [5–7, 10].

Цель данной работы — изучить особенности гистогенеза соединительной ткани при использовании биodeградируемого материала в условиях влияния окситоцина.

Материал и методы. У 32 белых крыс-самцов линии Вистар массой 180–250 г моделировали ограниченную хро-

ническую эмпиему плевры, на формирование которой требовалось 38 сут. Вначале была создана модель асептической ограниченной полости в правой половине грудной клетки путем имплантации в нее латексного шарика диаметром 9 мм. В полость через 20 сут пункционно вводили 0,5 мл взвеси 1-суточной культуры *Klebsiella pneumoniae* 10⁵ КОЕ (штамм ГИСК № 278 из музейной коллекции Института клеточного и внутриклеточного симбиоза УрО РАН). Затем этим животным в течение 10 сут проводили местное лечение эмпиемы традиционным способом — пункциями инфицированной полости, промыванием её 1% раствором диоксида и введением внутримышечно антибиотика цефазолина в дозе 10 мг/кг 2 раза в сутки. К началу 6-й недели в правой половине плевральной полости у исследованных животных завершилось формирование остаточной полости диаметром 9–10 мм.

У животных 1-й группы (16 крыс) полость заполняли композитным материалом «ЛитАр» объёмом 0,25 см³, никакого другого лечения не проводили. Во 2-й группе животных (16 крыс) полость заполняли композитным материалом, пропитанным раствором окситоцина в дозе 1 МЕ. Затем животным 2-й группы в течение 10 сут внутримышечно вводили антибиотик цефазолин 2 раза в сутки по 20 мг/кг плюс экзогенно к месту пластики окситоцин (по 1 МЕ ежедневно). Контролем для животных 2-й группы служили животные 1-й группы. Все операции проводили под эфирным наркозом при соблюдении правил асептики и антисептики. Животных 1-й

* От редакции. В мировой и отечественной литературе используется термин «гидроксоapatитколлагеновый».

Сведения об авторах:

Мухаммедов Хан Богдат Мереддурдыевич (e-mail: mb4rever@ya.ru), *Третьяков Анатолий Андреевич* (e-mail: Anatoly-tretyakov@mail.ru), кафедра хирургии, *Шевлюк Николай Николаевич* (e-mail: k_histology@orgma.ru), кафедра гистологии, цитологии, эмбриологии, *Фадеев Сергей Борисович* (e-mail: sergfsb@mail.ru), кафедра госпитальной хирургии, ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6

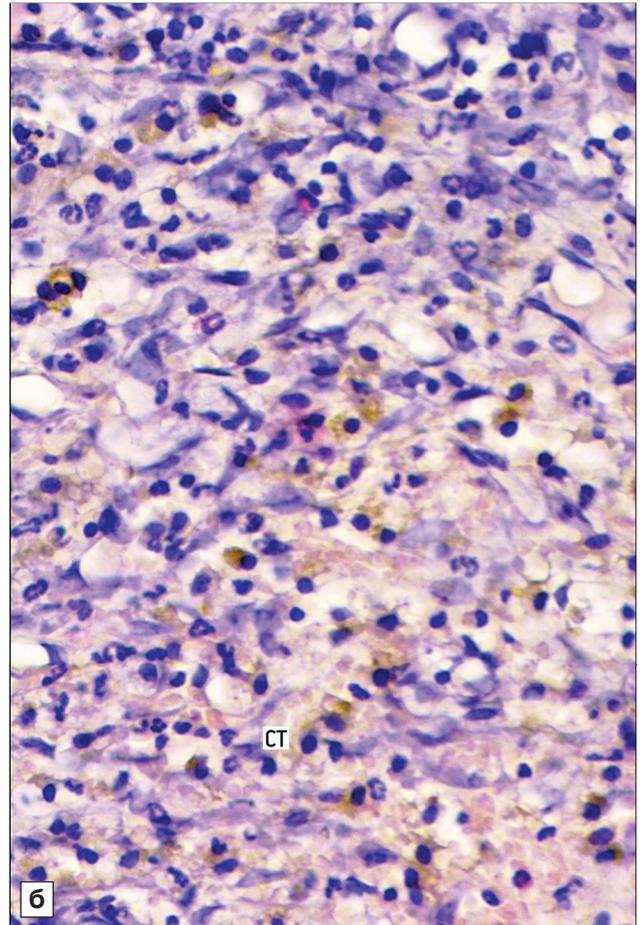
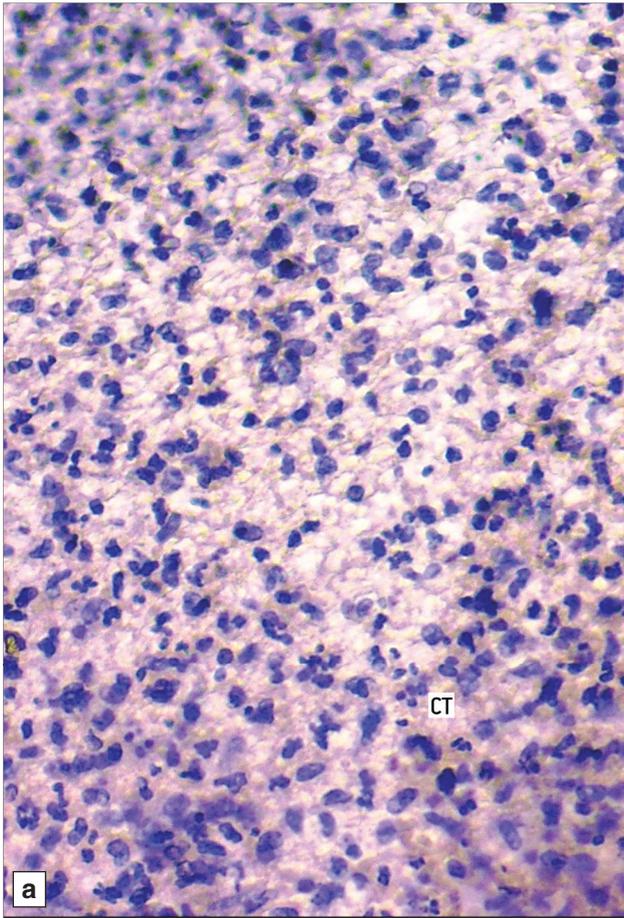
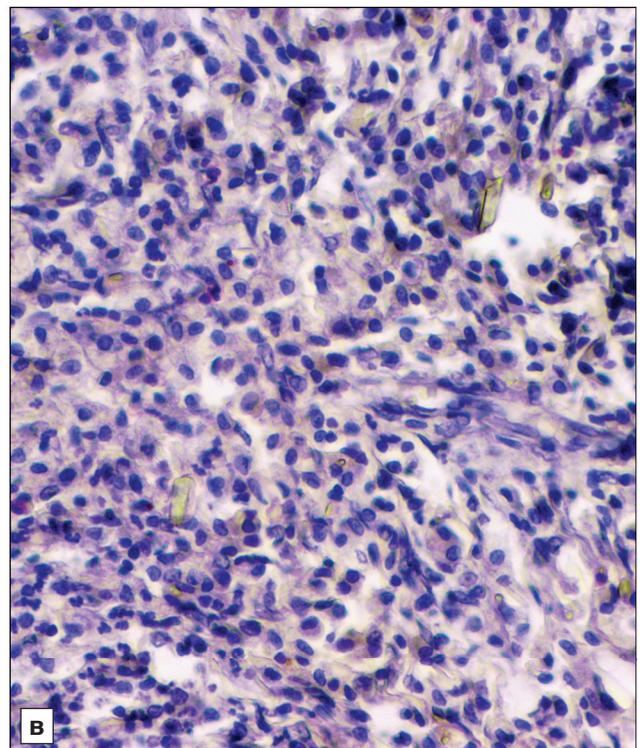


Рис. 1. Фрагмент полости ограниченной хронической эмпиемы плевры у крыс, заполненной композитным материалом на стадии 3 сут (а), 7 сут (б) и 14 сут (в) эксперимента.

а — центральный участок; между коллагеновыми волокнами большое количество лейкоцитов; б — новообразованные капилляры в соединительной ткани (СТ); в — остатки биокомпозита с умеренной лейкоцитарной инфильтрацией и новообразованной соединительной тканью. Окраска гематоксилином Майера — эозином. Об. 40, ок. 10



и 2-й групп выводили из опыта путем передозировки эфира на 3-, 7-, 14-е и 30-е сутки с момента имплантации композитного материала. Содержание и выведение животных из эксперимента соответствовало требованиям, содержащимся в «Правилах проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденным приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г., а также положениям «Европейской конвенции по защите позвоночных, используемых для экспериментальных и иных научных целей» (1986 г.). Проведение исследований разрешено локальным этическим комитетом ГБОУ ВПО ОрГМА МЗ России от 01.10.2014 г. Полученный материал исследовали с использованием обзорных гистологических методов (гематоксилин Майера — эозин, по Ван-Гизону). Иммуноцитологически в срезах определяли маркер пролиферации белок Ki-67 (серийные гистологические срезы инкубировали с соответствующими моноклональными антителами фирмы ДАКО, Дания).

Результаты исследования. Уже на 3-и сутки со стороны капсулы, ограничивающей полость, заполненную композитным материалом,

у животных обеих групп отмечают преимущественно малодифференцированные фибробласты и активная миграция клеточных элементов крови (гранулоциты и лимфоциты) (рис. 1),

а к 7-м суткам эксперимента в пространстве, заполненном композитным материалом, в результате пролиферации клеток фибробластического дифферона наблюдается большое количество малодифференцированных фибробластов с одновременным возрастанием среди них клеток с экспрессией маркера пролиферации белка Ki-67.

В результате последующей дифференцировки и синтетической деятельности фибробластов увеличивается количество коллагеновых волокон и основного вещества. У животных 1-й и 2-й группы во вновь образованной соединительной ткани отмечается новообразование кровеносных капилляров (см. рис. 1, б). При этом процесс ангиогенеза у животных 2-й группы протекает более интенсивно, что выражается в большей численности

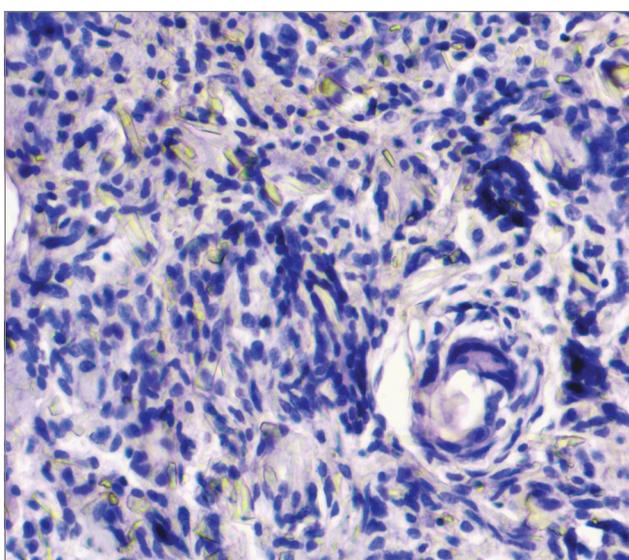


Рис. 2. Соединительная ткань, сформированная на месте ликвидированной остаточной полости при хронической эмпиеме плевры у крыс на 30-е сутки эксперимента. Окраска гематоксилином Майера — эозином. Об. 40, ок. 10

новообразованных сосудов. Процессы активного ангиогенеза, а также степень экспрессии Ki-67 наиболее выражены у этих животных от 7-х до 14-х суток. При применении окситоцина отмечено пролонгированное формирование малодифференцированной соединительной ткани в области имплантированного композита (до 14-х суток). У животных 1-й группы имплантируемые структуры быстрее подвергаются лизису макрофагами, чем у животных 2-й группы. При этом вся полость заполняется фибробластами, гемокапиллярами. В результате активного синтеза компонентов межклеточного вещества, к 14-м суткам эксперимента на месте полости оказывается сформированной рыхлая соединительная ткань. Численность Ki-67-позитивных клеток (фибробласты, эндотелиоциты) у животных 2-й группы возрастает на 7-е сутки в 2,5 раза, а к 14-м суткам — в 6 раз от начальных значений. Во вновь сформированной рыхлой соединительной ткани у животных 2-й группы наблюдается незначительная лейкоцитарная инфильтрация (таблица, см. рис. 1, в), при этом среди лейкоцитов преобладают лимфоциты. У животных 1-й группы выраженность лейкоцитарной инфильтрации продолжает оставаться высокой (см. таблицу). К концу 1-го месяца происходит полная биодеградация композитного материала «ЛитАр» в обеих группах. На месте остаточной полости сформирована рыхлая соединительная ткань (рис. 2), при этом у животных 2-й группы новообразованная соединительная ткань более рыхлая и ее объем меньше, чем животных 1-й группы.

Обсуждение полученных данных. Результаты наших исследований показали, что наноразмерный гидроксиапатитколлагеновый биополимерный композит в комбинации с окситоцином и антибиотиком способствует активации

Количество клеточных элементов соединительной ткани среза 4900 мкм² в разные сроки ликвидации остаточной полости при хронической эмпиеме плевры у крыс контрольной группы и у животных (2-я группа) при пломбировке остаточной полости композитом, пропитанным окситоцином

Группа животных	Исследованные клеточные элементы	Сроки эксперимента, сутки			
		3-и	7-е	14-е	30-е
1-я (контрольная)	Лимфоциты	31,4±2,3	16,6±1,1*	23,6±2,3*	15,8±1,4*
	Макрофаги	1,6±1,1	4,6±1,1*	3,6±1,1	1,6±0,9*
	Фибробласты	6,7±1,0	15,6±1,8*	11,6±1,9*	3,4±1,5*
	Фиброциты	1,4±0,9	7,8±1,3*	13,8±1,3*	15,8±1,4
2-я группа	Лимфоциты	13,4±1,8	8,4±1,14*	11,6±1,8*	7,2±2,1*
	Макрофаги	1,2±0,8	4,4±1,1*	3,1±1,5	1,6±1,1
	Фибробласты	4,8±0,8	15,8±1,4*	12,6±1,5*	5,1±1,6*
	Фиброциты	1,8±0,8	8,2±1,6*	14,4±1,6*	16±1,9

* Различия по сравнению с показателями в предыдущий срок эксперимента значимы при P<0,05.

пролиферации и цитодифференцировки клеток фибробластического дифферона, в результате которой в композитном материале выявляется большое количество дифференцированных фибробластов. Наши данные о том, что использование антибиотика с окситоцином в условиях инфицированной остаточной полости лимитирует развитие гнойно-некротических процессов, ограничивает зоны некроза от жизнеспособных тканей, стимулирует пролиферацию малодифференцированной ткани как в самой полости, так и в пограничных с ней зонах, приводит к замещению полости рыхлой соединительной тканью с меньшей лейкоцитарной инфильтрацией, согласуются с результатами, полученными другими исследователями [2–4]. Следует особо подчеркнуть роль окситоцина, который способствует пролиферации малодифференцированных клеточных элементов соединительной ткани. Он обладает «антибиотикоподобным» свойством, запуская определенные защитные вне- и внутриклеточные механизмы, которые приводят, с одной стороны, к «антимикробному» эффекту, а с другой — стимулируют репаративные процессы в месте его приложения [5–7, 11]. Иммуноцитохимические исследования показали, что применение окситоцина в условиях пломбировки композитом ригидной полости при хронической эмпиеме плевры приводит к существенным изменениям экспрессии синтеза белка Ki-67 у фибробластов, продукция которого инициирует и изменяет фазу пролиферации в ходе формирования соединительной ткани на месте полости. Прежде всего, отмечается пролонгированное и раннее формирование малодифференцированной соединительной ткани в области имплантированного композита, а к 7-м суткам еще и интенсивный васкулогенез. В дальнейшем на месте композитного материала формируется хорошо васкуляризованная соединительная ткань.

ЛИТЕРАТУРА

1. Василец В.Н., Казбанов И.В., Ефимов А.Е., Севастьянов В.И. Разработка новых методов формирования имплантационных материалов с использованием технологий электроспиннинга и биопринтирования // Вестн. трансплантол. и искусственных органов. 2009. Т. 11, № 2. С. 47–53.
2. Волков Ю.О. Экспериментально-морфологическое обоснование применения окситоцина для оптимизации репаративных гистогенезов при костной аутопластике дефектов нижней челюсти (экспериментально-гистологическое исследование): Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Оренбург, 2014.
3. Волова Л.Т. Биологическая система оценки качества биоимплантатов с помощью клеточных технологий // Успехи соврем. естествознания. 2008. № 5. С. 25–28.
4. Гавриленко В.Г., Есипов В.К., Сивожелезов К.Г. Морфологическая характеристика раневого процесса у больных с диабетическими гнойно-некротическими поражения-

ми стоп при воздействии окситоцином // Морфология. 2003. Т. 124, вып. 5. С. 24–28.

5. Краснов А.Ф. Использование материала «ЛитАр» в замещении постостеомиелитных дефектов длинных костей // Вестн. травматол. и ортопед. им. Н.И. Пирогова. 2004. № 4. С. 75–79.
6. Стадников А.А., Бухарин О.В. Морфологические основы влияния гипоталамической нейросекреции на структурно-функциональный гомеостаз, про- и зукариот // Морфология. 2013. Т. 144, вып. 5. С. 16–20.
7. Третьяков А.А., Стадников А.А., Хижняк И.И. Результаты применения композита «ЛитАр» для ликвидации остаточных полостей печени в эксперименте // Анн. хир. гепатол. 2013. Т. 18, № 4. С. 61–65.
8. Третьяков А.А., Хижняк И.И., Неверов А.Н. Применение «ЛитАр» для закрытия остаточных полостей печени в эксперименте // Морфология. 2014. Т. 145, № 3. С. 196–197.
9. Цеймах Е.А., Левин А.В., Зимонин П.Е., Самуйленков А.М. Эмпиемы плевры. Частота возникновения, пункционная терапия, закрытое дренирование плевральной полости. Часть I // Туберкулез и болезни легких. 2009. № 8. С. 3–9.
10. Elabd C., Cousin W., Upadhyayula P. et al. Oxytocin is an age-specific circulating hormone that is necessary for muscle maintenance and regeneration // Nature communications. 2014. № 5. P. 4082.
11. Rahman N.M., Davies R.J. Effusion from infections: parapneumonic effusion and empyema, second ed. // Textbook of Pleural Diseases, Hodder Arnold. 2008. P. 341–366.

Поступила в редакцию 14.04.2017

Получена после доработки 16.06.2017

ANALYSIS OF THE PECULIARITIES OF CONNECTIVE TISSUE HISTOGENESIS WITH THE USE OF BIODEGRADABLE MATERIAL UNDER THE INFLUENCE OF OXYTOCIN (AN EXPERIMENTAL-HISTOLOGICAL STUDY)

Kh.B.M. Mukhammedov¹, N.N. Shevlyuk², A.A. Tretyakov¹, S.B. Fadeyev³

The peculiarities of reparative histogenesis during the elimination of a rigid residual cavity were studied in the model of chronic pleural empyema (32 rats) using the «LitAr» composite biodegradable hydroxyapatite-collagen material only or in combination with an antibiotic and oxytocin. The site filled with composite material was examined using histological immunohistological methods at Days 3, 7, 14 and 30. LitAr composite in combination with an antibiotic and oxytocin stimulated vasculogenesis, proliferation and cytodifferentiation of the cellular elements of the fibroblastic cell line, the synthesis of components of the extracellular matrix, which led to the formation of a loose irregular connective tissue by Day 14 day of the experiment in the place of the cavity. The administration of oxytocin led to prolongation of the undifferentiated state of connective tissue in a region of the implanted.

Key words: *connective tissue, regeneration, oxytocin, hydroxyapatite-collagen composite*

¹ Department of Surgery; ² Department of Histology, Cytology, Embryology; ³ Department of Hospital Surgery, Orenburg State Medical University