

На правах рукописи

ГАЛИЯХМЕТОВ Радик Фаязович

**ДИНАМИКА ПОСТОЖОГОВОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ РОГОВИЦЫ
ПРИ ЛОКАЛЬНОМ И РЕФЛЕКСОГЕННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ
АЛЛОГЕННЫМ ДИСПЕРГИРОВАННЫМ
БИОМАТЕРИАЛОМ**

14.03.03 – патологическая физиология

**Автореферат
диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук**

Екатеринбург – 2010

Работа выполнена в Федеральном государственном учреждении «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» и Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Башкирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию».

Научный руководитель: доктор медицинских наук, профессор
Еникеев Дамир Ахметович

Научный консультант: доктор медицинских наук, профессор
Мулдашев Эрнст Рифгатович

Официальные оппоненты: доктор медицинских наук, профессор
Осипенко Артур Васильевич,
доктор медицинских наук, профессор
Кривохижина Людмила Владимировна

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Российский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию».

Защита диссертации состоится «19» октября 2010 года в «10» часов на заседании совета по защите докторских диссертаций Д 208.102.03, созданного при Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Уральская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, 3.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГОУ ВПО УГМА Росздрава по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Ключевская, 17, с авторефератом на сайте www.usma.ru.

Автореферат разослан «07» сентября 2010 г.

Ученый секретарь совета по защите
докторских диссертаций
доктор медицинских наук, профессор

Базарный В.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность. Исследование саногенетических механизмов восстановления функций организма и отдельных органов остается приоритетным направлением современной патофизиологии. К указанному направлению в полной мере относятся и процессы оптимизации репаративной регенерации различных тканей и органов (Крыжановский Г.Н., 2002; Нузов Б.Г., 2005; Ярыгин К.Н., 2007–2008; Пальцев М.А. с соавт., 2009).

Патофизиологические аспекты регенерации органов и тканей при воздействии различных факторов достаточно полно были изучены в работах А.П. Ястребова (1990, 1995, 1999), Л.Н. Маслова (2006), В.В. Базарного с соавт. (2006, 2007, 2008) и других авторов. В ряде работ (Коваленко П.П., 1975; Савельев В.И., 2000; Мулдашев Э.Р., 1994, 2007, 2009; Стадников А.А., 2009) было установлено, что одним из эффективных методов стимуляции регенерации является пересадка аллогенных трансплантатов.

Особенно актуальным это направление стало благодаря современным технологиям, позволяющим модифицировать структуру трансплантатов, получая при этом биоматериалы с различным биохимическим составом, фиброархитектоникой и биомеханическими свойствами (Хасанов Р.А., 1999; Мулдашев Э.Р. с соавт., 2009; Муслимов С.А. с соавт., 2009). В рамках рассматриваемой проблемы чрезвычайно важным представляется то, что эти работы позволили создать общепринятые экспериментальные модели для изучения морфологических, патофизиологических, биофизических и иммунологических аспектов регенерации тканей при трансплантации.

В силу морфофункциональных особенностей (оптические свойства, метаболизм), а также благодаря большой значимости для нужд практической офтальмологии особый интерес представляет исследование процессов регенерации роговицы (Fromer С.Н., Klintworth G.К., 1975; Сомов Е.Е., 2005; Олиневич В.Б., 2009). В исследованиях Р.А. Гундоровой и соавторов (2005, 2007, 2009), а также Е.В. Ченцовой с соавторами (2005) были установлены важные механизмы репаративной регенерации роговицы, в частности то, что клетки, обеспечивающие регенерацию роговицы, локализованы в области лимба.

Наиболее значительным патологическим фактором, выявленным при исследовании репаративной регенерации роговицы, следует считать синдром «недостаточности стволовых лимбальных клеток», который характеризуется васкуляризацией конъюнктивы лимбальной области, нарушением структуры базального эпителия, васкуляризацией и хроническим воспалением роговицы и является серьезным препятствием для приживления трансплантата (Holland M.C., et al., 1957; Puangsricharern V., Tseng S.C.G., 1995; Tseng S.C.G., 1996; Dua H.S. et al., 2000; Grueterlich M. et al., 2002).

Клинические аспекты патологии роговицы исследованы и обобщены рядом зарубежных авторов (Rapano C.J., Heng W.J., 2003; Krachmer J.H., Palay D.A., 2006). В то же время ряд важных морфофункциональных и патологических механизмов восстановления роговицы до сегодняшнего дня исследованы недостаточно полно. К их числу можно отнести недостаточные сведения о самогенетических механизмах, обеспечивающих процессы регенерации роговицы при различных экстремальных воздействиях, в частности при ожогах.

Учитывая вышеизложенное, а также большой опыт применения аллотрансплантатов во Всероссийском центре глазной и пластической хирургии, мы полагаем, что экспериментальное исследование процессов постожоговой регенерации роговицы при локальном и рефлексогенном воздействиях с помощью аллогенных биоматериалов могло бы явиться вкладом в решение указанной проблемы.

Цель исследования. Определить эффективность репаративной регенерации поврежденной ожогом роговицы при локальном и рефлексогенном воздействиях диспергированным аллогенным биоматериалом.

Задачи исследования:

1. Изучить в эксперименте патологические процессы в роговице на модели экспериментального химического ожога.
2. Исследовать патологические механизмы репаративной регенерации собственного вещества и эпителия роговицы при локальном (перилимбальном) введении аллогенного диспергированного биоматериала.

3. Исследовать морфофизиологические механизмы регенерации собственного вещества и эпителия роговицы при рефлексогенном воздействии аллогенным диспергированным биоматериалом.

4. Исследовать динамику морфофункциональных изменений в локальных рефлексогенных зонах дермы и гиподермы при классическом акупунктурном воздействии.

5. Изучить динамику морфофункциональных изменений в локальных рефлексогенных зонах дермы и гиподермы при акупунктурном введении аллогенного диспергированного биоматериала.

Научная новизна работы. Впервые показано, что воздействие диспергированного аллогенного биоматериала на локальные рефлексогенные зоны приводит к выраженным сосудистым реакциям в тканевом ложе и активному ангиогенезу в области введения. При этом максимальная плотность капилляров в области введения биоматериала достигается на 14-е сутки при сохранении адекватного кровоснабжения в отдаленные сроки. Указанные сосудистые процессы реализуются на фоне полиморфной клеточной инфильтрации при ведущей роли макрофагов, что позволяет избежать явлений фиброза. В контрольной серии многократные сеансы акупунктурного воздействия приводят к локальному фиброзу рефлексогенной зоны.

Установлено, что воздействие диспергированного аллогенного биоматериала на локальные рефлексогенные зоны активизирует регенерацию роговицы после экспериментального ожога и приводит к выраженной сосудистой реакции и ангиогенезу в области лимба уже на 3-и сутки. Формирование органотипичного регенерата эпителия и собственного вещества роговицы происходит на 14-е сутки, минуя выраженную стадию помутнения, характерную для контрольной серии.

Новыми являются данные о том, что локальное перилимбальное введение диспергированного аллогенного биоматериала ускоряет процессы репаративной регенерации роговицы после ожоговой травмы, вызывая сосудистую реакцию (вазодилатацию и неоангиогенез) в области лимба на 7-е сутки эксперимента. Формирование первичного эпителиального покрова происходит на 3-и сутки эксперимен-

та, а трансформация его в многослойный плоский эпителий – на 7-е сутки, с последующей дифференцировкой роговичных пластин и ранним восстановлением поляриционно-оптических свойств собственного вещества роговицы (14-е сутки).

Новизна разработанного метода подтверждена патентом № 2238076 (12.05.2003 г.) «Способ лечения и профилактики заболеваний воздействием на биологически активные точки и зоны» и уведомлением о положительном результате формальной экспертизы по заявке № 2009145354/14(064634) от 07.12.2009 г. на патент «Способ лечения начального кератоконуса».

Научно-практическая значимость. Рефлексогенное и локальное перилимбальное введение аллогенного диспергированного биоматериала может быть использовано для стимуляции репаративной регенерации эпителия и соединительнотканых структур роговицы. Показаниями для фармакопунктуры аллогенным диспергированным биоматериалом могут являться поражения стромы и эпителия роговицы различного генеза.

Инъекционная форма аллогенного диспергированного биоматериала, длительно поддерживая локальные сосудистые и клеточные реакции, может использоваться в схеме фармакопунктурной терапии с учетом ее пролонгированного эффекта и последующей полной резорбции биоматериала без явлений фиброза.

Положения, выносимые на защиту:

1. Аллогенный диспергированный биоматериал при введении в локальные рефлексогенные зоны инициирует комплекс микрососудистых и клеточных реакций, которые определяют пролонгированный терапевтический эффект данного вида фармакопунктуры.

2. Патофизиологическим эквивалентом постожогового помутнения роговицы является снижение коэффициента анизотропии коллагеновых волокон стромы и повышение экспрессии трансформирующего фактора роста (TGF β -1).

3. Фармакопунктура с использованием диспергированного аллогенного биоматериала при экспериментальном ожоге оптимизирует процессы регенерации в строме и эпителии роговицы, что проявляется более высокими показателями коэффициента анизотропии коллагеновых волокон, ингибированием экс-

прессии трансформирующего фактора роста (TGF β -1) и увеличением пролиферативной активности эпителиоцитов роговицы.

4. Перилимбальное введение диспергированного аллогенного биоматериала при экспериментальном ожоге роговицы стимулирует регенерацию эпителия и собственного вещества роговицы, активизирует микроциркуляторное русло и, снижая уровень TGF β -1, предотвращает рубцевание в области формирования регенерата.

Реализация результатов работы. Результаты работы внедрены в практику отдела рефлексотерапии ФГУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» и ГОУ ВПО «Оренбургская государственная медицинская академия Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию».

Апробация работы. Результаты диссертационной работы доложены на: III Международном тихоокеанском конгрессе по традиционной медицине (Владивосток, Сеул, 2006), XIV Международной конференции «Циклы природы и общества» (Ставрополь, 2006), конгрессе «Традиционная медицина 2007», посвященном 30-летию со дня открытия Центрального научно-исследовательского института рефлексотерапии (Москва, 2007), научно-практической конференции «Современные методы диагностики и лечения заболеваний роговицы и склеры» (Москва, 2007), семинаре-конференции «Регенеративная офтальмохирургия» на базе Всероссийского центра глазной и пластической хирургии (Уфа, 2007), Всероссийской научно-практической конференции «Клиническая анатомия и экспериментальная хирургия в XXI веке» (Оренбург, 2009), IX съезде офтальмологов России (Москва, 2010).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 13 работ, 5 из которых в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 156 страницах машинописного текста, состоит из введения, пяти глав, заключения, выводов и практических рекомендаций. В работе содержится 37 рисунков, 18 графиков, 3 таблицы. Указатель литературы включает 303 источника (192 отечественных и 111 иностранных).

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Общая характеристика работы. Экспериментальная работа была выполнена на базе Всероссийского центра глазной и пластической хирургии Федерального государственного агентства по здравоохранению и социальному развитию.

Патофизиологические опыты проведены на 49 серых кроликах средним весом 2–2,5 кг. Эксперименты были проведены в соответствии с требованиями приказа №755 МЗ СССР от 12.08.1977 г., Приложения 3 к «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», а также с требованиями приказа № 267 МЗ РФ от 19.06.2003 г.

Поскольку планировалось проведение иммунологических исследований и изучение иммунологического звена патогенеза химического ожога роговицы, выбирались исключительно особи мужского пола, у которых отсутствуют циклические гормональные изменения, характерные для самок.

Химический ожог диаметром 6 мм в центре роговицы вызывали 2,5% раствором едкого натра 30-секундной экспозицией по стандартной методике (Бабушкин А.Э., Хафизов Г.Г., 1996). После нанесения травмы животные были разделены на 3 группы. Контрольную группу (n=7) составили животные, которым после нанесения ожога каких-либо других воздействий больше не проводили. В экспериментальной группе 1 (n=10), после нанесения ожога животным производили субконъюнктивальную перилимбальную инъекцию суспензии 1 мл диспергированного аллогенного биоматериала (ДБА), произведенного тканевым банком Всероссийского центра глазной и пластической хирургии в соответствии с требованиями ТУ 42-2-537-2006. Навеска в одном флаконе составляла 200 мг. Указанное количество разбавляли 5 мл физиологического раствора. В экспериментальной группе 2 (n=10) у животных идентифицировали параорбитальные рефлексогенные зоны, в которые инъецировали по 0,5 мл раствора ДБА.

Для исследования особенностей рефлексогенного воздействия аллогенного диспергированного биоматериала на процессы регенерации роговицы нами

были изучены реактивные изменения в локальных рефлексогенных зонах. У 22 животных был проведен сравнительный анализ клеточных и сосудистых реакций при введении ДБА в рефлексогенные зоны (n=11) и при акупунктурном воздействии (n=11).

Общая характеристика материалов исследования представлена в табл. 1.

Таблица 1

СВОДНЫЕ ДАННЫЕ ПО ОБЪЕМУ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Вид эксперимента	Количество лабораторных животных	Количество препаратов
1. Химический ожог роговицы – контрольная серия	7	73
– первая опытная серия (перилимбальная инъекция биоматериала)	10	108
– вторая опытная серия (введение биоматериала в рефлексогенные зоны)	10	103
2. Исследование локальных рефлексогенных зон кожи после классической акупунктуры	11	124
3. Исследование локальных рефлексогенных зон кожи после инъекционного введения биоматериала	11	120
Всего...	49	528

Всех животных выводили из опыта на 3, 7, 14, 30-е сутки. Для гистологического исследования забирали роговицу с прилегающей частью склеры, а также кожу и субдермальные ткани в области введения ДБА.

Характеристика методов исследования

Гистологические исследования проводили с использованием окраски гематоксилином и эозином, а также по методам Маллори и Ван-Гизона.

Резорбцию биоматериала изучали методом количественной оценки коэффициента анизотропии (КА) коллагеновых структур с помощью поляризационной микроскопии неокрашенных гистологических срезов микроскопом Мин. 8 с цифровой фотонасадкой Nikon Coolpix 4500 при скрещенных фильтрах. Полученная

информация об оптически активных объектах анализировалась с помощью специализированной программы Biovision 3.0. Полученные данные переводились в программу Microsoft Office Excel 2003, где производился расчёт отношения суммарной площади оптически активных объектов к общей площади выбранного участка, а также устранялись погрешности. Затем обработанные данные переводились в программу Statistica 5.5. для построения соответствующих графиков.

С помощью иммуногистохимических исследований выявляли экспрессию двух факторов: трансформирующего фактора роста (TGF β -1), который является индуктором фиброза (Sporn M.B., Roberts A.B., 1990) и ядерного антигена пролиферирующих клеток (PCNA), позволяющего судить о пролиферативной активности клеток (Yew D.T. et al., 2000). Экспрессию TGF β -1 и PCNA определяли непрямой иммунопероксидазным методом на серийных парафиновых срезах толщиной 5 мкм с использованием соответствующих моноклональных антител (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

Митотический индекс, как количество PCNA-положительных клеток на 100 эпителиоцитов, определяли в клетках эпителия роговицы. Оценка результатов производилась с помощью функции «подсчет части» программы Biovision 3.0.

Для изучения динамики реактивных процессов в контроле и после введения ДБА на гистологических препаратах производили подсчет суммарной площади просвета капилляров (СППК) лимбальной области морфометрическим методом с использованием программы Biovision 3.0 Professional и аппаратного комплекса, включающего исследовательский микроскоп МС-50, цифровой фотоаппарат Nikon CP4500 и персональный компьютер.

Показатели кожного импеданса в локальных рефлексогенных зонах определяли у всех исследованных животных (n=49) с помощью высоковольтного импульсного генератора с микропроцессорным управлением «AcuVision-04» (Россия). Прибор производится научно-производственным предприятием «Гравитон» (Москва) по требованиям технических условий ТУ 9444-050-40062169-2003, сертификат соответствия № РОСС RU.ИМ15.В00577, зарегистрирован в Российской Федерации и внесен в реестр медицинских изделий (Регистрационное удостоверение № 29/23010203/5270-03 от 20 мая 2003 года).

Методы статистической обработки

Поскольку в исследованных нами показателях среднее значение и среднее квадратическое отклонение заранее не были известны, анализ соответствия вида распределения признака закону нормального распределения производился методами Лиллиефорса и Шапиро-Уилка в программе Statistica 5.5.

Для сравнения полученных результатов в различных сериях опытов использовался параметрический метод (критерий Стьюдента для независимых групп). Учитывая, что средние значения признаков и средние квадратические отклонения были заранее известны, проверка нулевой статистической гипотезы выполнялась процедурой «различия между двумя средними (нормальное распределение)» ← промодуль «другие критерии значимости» ← модуль «основные статистики и таблицы» ← Statistica 5.5. В случаях $p > 0,05$ различия признавались статистически незначимыми, и принималась нулевая гипотеза об отсутствии различий. Альтернативная гипотеза принималась при $p < 0,05$, когда различия считались статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Процессы репаративной регенерации в роговице

после экспериментального химического ожога

при перилимбальном введении и рефлексогенном воздействии ДБА

Экспериментальный химический ожог в зоне непосредственного контакта с детергентом у всех животных вызывал грубые патологические изменения – деструкцию эпителия, базальной мембраны и поверхностных слоев собственного вещества роговицы. Глубина поражения достигала 50 мкм. По периферии от этой области на расстоянии, составляющем в среднем 200 мкм, также обнаруживались деструктивные процессы, что позволило нам определить эту область как краевую зону повреждения.

Одним из основных проявлений повреждения роговицы является снижение коэффициента анизотропии (КА), падение которого в наших экспериментах достигало 20% от нормы на 3-и сутки ($p < 0,01$).

На границе с краевой зоной повреждения, на расстоянии до 500 мкм также были выявлены изменения в виде пролиферации кератобластов, макрофагов, лейкоцитов. Эту область мы обозначили как зону реактивных изменений.

И, наконец, в периферических участках роговицы на светооптическом уровне изменений не обнаружено. Следует отметить, что обнаруженные нами гистотопографические зоны при ожоговой травме роговицы в целом соответствуют данным других авторов, изучавших экспериментальное повреждение роговицы (Максимов И.Б., 1990). Согласно полученным результатам выраженность и динамика репаративных процессов в указанных зонах существенно зависела от серии экспериментов, обобщенные количественные данные представлены в табл. 2.

Таблица 2

**ПОКАЗАТЕЛИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ РОГОВИЦЫ
ПРИ ЛОКАЛЬНОМ И РЕФЛЕКСОГЕННОМ ВВЕДЕНИИ ДБА**

Серия	Контроль		Локальное введение		Рефлексогенное воздействие	
	3	7	3	7	3	7
Сроки, сутки	3	7	3	7	3	7
В сравнении	с исходным состоянием		с контролем		с контролем	
Показатели экспрессии TGFβ-1, % (M±m) n=27						
Исходное состояние 2,57±1,86	31,15±1,86	40,3±2,06	16,1±2,13	2,27±1,32	26,5±1,45	4,74±1,64
Уровень доверия	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,001	p > 0,05	p < 0,01
Показатели митотического индекса эпителия роговицы, % (M±m) n=27						
Исходное состояние 30,6±3,09	8,8±3,50	25,4±5,30	16,8±4,42	36,4±4,27	12,4±2,95	29,3±5,25
Уровень доверия	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05
Показатели коэффициента анизотропии, % (M±m) n=27						
Исходное состояние 86,5±5,34	16,7± 1,99	38,3± 4,08	46,5±3,78	81,4±2,85	38±3,5	54,9±3,41
Уровень доверия	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,05	p > 0,05	p < 0,05	p < 0,05
Показатели суммарной площади просвета капилляров лимба, мкм² (M±m) n=27						
Исходное состояние 846±161,1	1697± 130	2115± 102,9	2119±161,1	2720±110,2	1764±113,6	2360±104,5
Уровень доверия	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05	p < 0,05

Примечание. M – средняя арифметическая, m – ошибка средней арифметической.

В серии экспериментов с перилимбальным введением диспергированного аллогенного биоматериала были получены следующие результаты. В гистологических препаратах 3–4-слойный эпителий обнаруживался уже на 7-е сутки, что можно объяснить ускорением механизмов восстановления структур переднего эпителия.

При перилимбальном введении ДБА восстановление оптических свойств роговицы происходило также на 7-е сутки после ожога. Так, коэффициент анизотропии на 7-е сутки в нашем экспериментальном исследовании составил 94% ($p < 0,05$) от нормы (табл. 2). Этот факт объясняется тем, что на ранних этапах репарации средние и глубокие слои собственного вещества роговицы в патологический процесс не вовлекаются. Это подтверждается данными литературы (Павлова В.Н. с соавт., 1998) о том, что высокая оптическая активность определяет морфологическую и функциональную зрелость коллагеновых структур.

Показатели коэффициента анизотропии в различные сроки эксперимента в контрольной и экспериментальных группах представлены на рис. 1.

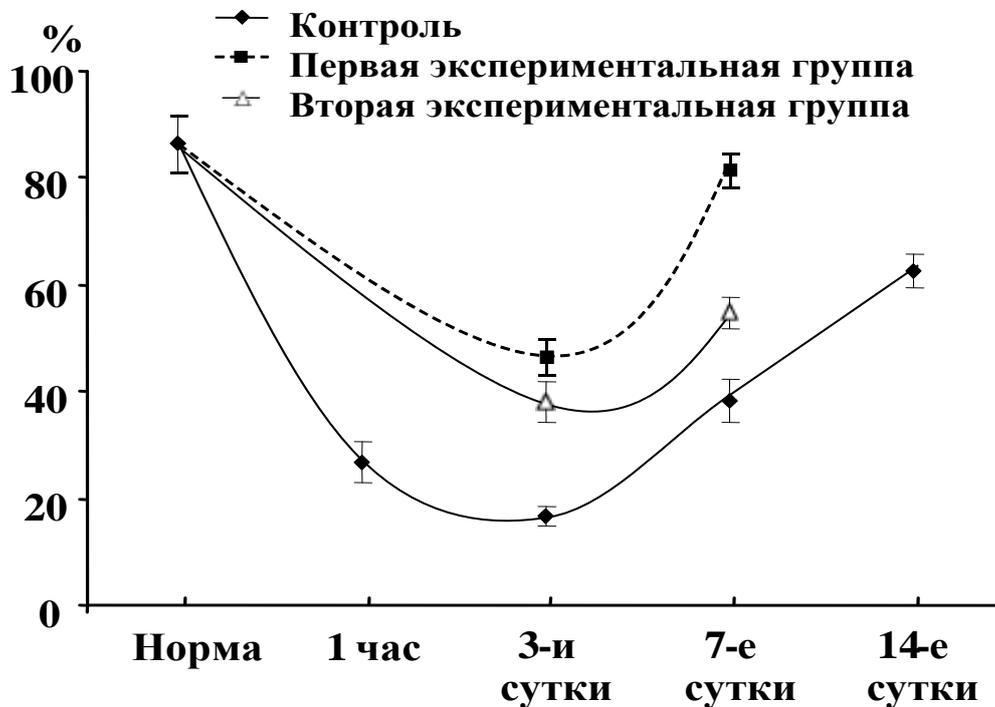


Рис. 1. Коэффициент анизотропии собственного вещества роговицы в норме, после ожоговой травмы, при локальном введении (группа 1) и рефлексогенном воздействии ДБА (группа 2). Ось ординат: показатель,%. Ось абсцисс: сроки эксперимента

В серии экспериментов с перилимбальным введением ДБА были обнаружены следующие изменения митотического индекса. В исходном состоянии этот показатель составил $30,6 \pm 3,1\%$, в контрольной группе животных наблюдалось его максимальное падение до $8,8 \pm 3,52\%$ на 3-и сутки и $25,4 \pm 5,93\%$ на 7-е сутки. Иная динамика митотического индекса обнаружена при перилимбальном введении ДБА (рис. 2). На 3-и сутки после ожога он составил $16,8 \pm 4,42\%$, что вдвое превысило соответствующий показатель в контроле. На 7-е сутки PCNA превысил исходный уровень и достиг $36,4 \pm 4,27\%$ (табл. 2), изменения статистически достоверны.

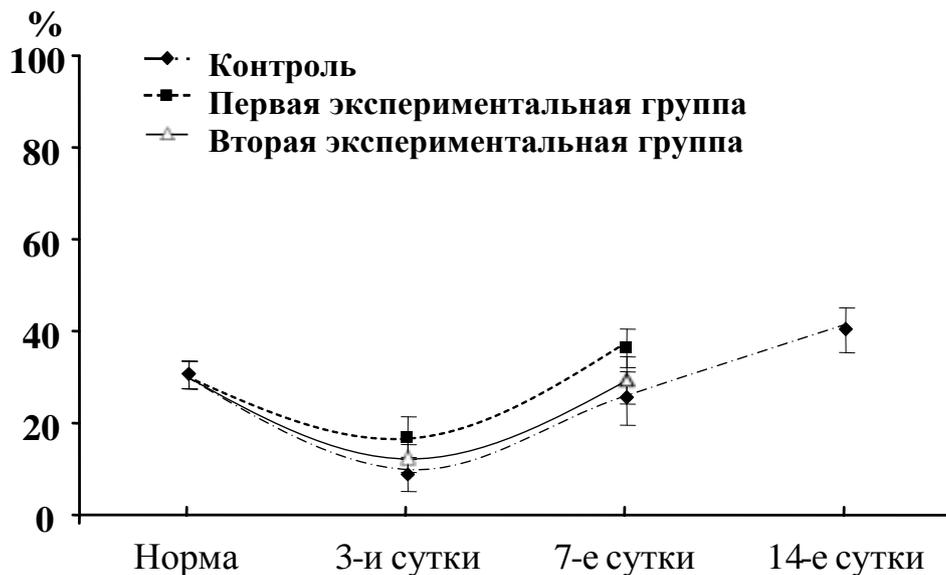


Рис. 2. Динамика изменений митотического индекса эпителия роговицы в норме, после ожоговой травмы, при локальном введении (группа 1) и рефлексогенном воздействии ДБА (группа 2). Ось ординат: показатель, %. Ось абсцисс: сроки эксперимента

Показатель экспрессии TGFβ-1 в исходном состоянии составил $2,27 \pm 1,32\%$. В контрольной серии на 3-и сутки после ожога он увеличился до $31,15 \pm 1,86\%$ и на 7-е сутки — до $40,3 \pm 2,06\%$. При перилимбальном введении ДБА обнаружены совершенно иные показатели: на 3-и и 7-е сутки TGFβ-1 составил $16,1 \pm 2,13\%$ и $2,27 \pm 1,32\%$ соответственно (рис. 3). Необходимо особо отметить, что такое значительное снижение фиброзирующего фактора роста при введении ДБА является весьма благоприятным патофизиологическим признаком, поскольку свидетельствует о регенерации роговицы без образования бельма.

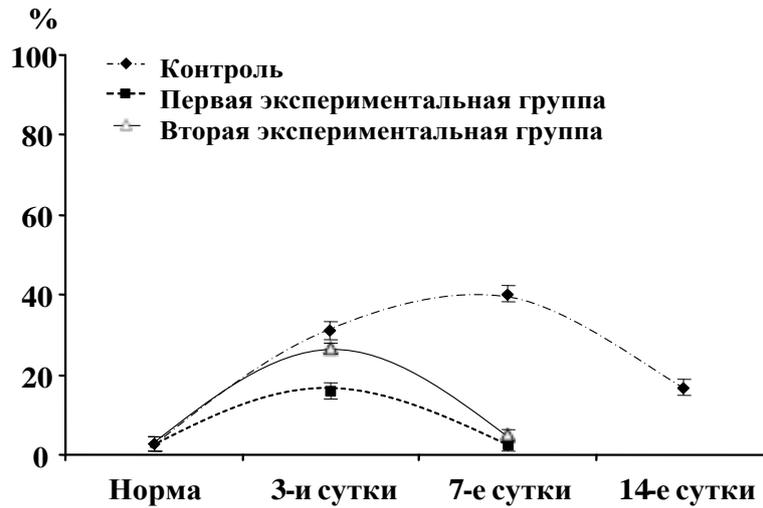


Рис. 3. Относительный показатель содержания TGFβ-1 в собственном веществе роговицы в норме, после ожоговой травмы, при локальном введении (группа 1) и рефлексогенном воздействии (группа 2) ДБА. Ось ординат – показатель (%), ось абсцисс – сроки эксперимента

Исследование суммарной площади просвета капилляров лимба (СППК) показало, что в исходном состоянии он составил 846 ± 161 мкм². После ожога в контрольной серии он увеличился до 1697 ± 130 мкм² на 3-и сутки и $2119 \pm 161,1$ мкм² на 7-е сутки. При локальном перилимбальном введении ДБА аналогичные показатели составили $2119 \pm 161,1$ мкм² и $2720 \pm 110,2$ мкм² соответственно. Результаты представлены на рис. 4.

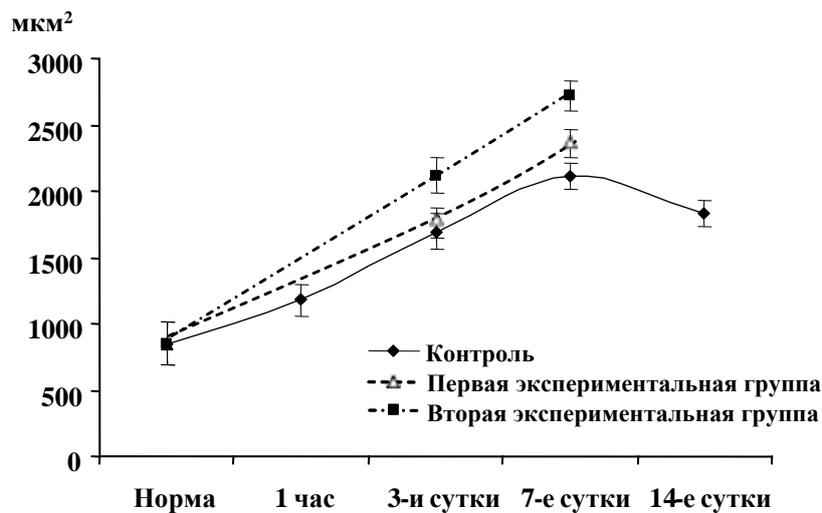


Рис. 4. Суммарная площадь просвета капилляров в области лимба в норме, после ожоговой травмы, при локальном введении (группа 1) и рефлексогенном воздействии (группа 2) ДБА. Ось ординат – СППК, мкм², ось абсцисс – сроки эксперимента

Таким образом, при перилимбальном введении ДБА наблюдалась полиморфно-клеточная инфильтрация и расширение сосудов микроциркуляторного русла.

В экспериментах с введением диспергированного аллогенного биоматериала в рефлексогенные зоны были получены следующие результаты. В целом, патоморфологические изменения в роговице в серии с акупунктурным введением ДБА во всех фазах эксперимента обладали динамикой, сходной с серией экспериментов по перилимбальному введению диспергированного аллогенного биоматериала. Так, при рефлексогенном воздействии ДБА эпителий, характерный для нормальной роговицы, обнаруживался на 14-е сутки эксперимента, но при этом митотический индекс в ядрах клеток переднего эпителия нормализовался уже на 7-е сутки.

В наших экспериментах, как перилимбальное, так и акупунктурное введение ДБА приводило к незначительному увеличению уровня TGF β -1 в собственном веществе роговицы в ранние сроки (рис. 3). При этом TGF β -1 обнаруживался в основном в цитоплазме фибробластов различной степени дифференцировки и клеток моноцитарно-макрофагальной системы. На 7-е сутки независимо от способа введения ДБА происходила нормализация содержания TGF β -1 в ткани роговицы. Мы полагаем, что отмеченные выше изменения реализуются через систему макрофагов, активированных частицами ДБА и влияющих на пролиферативную и синтетическую активность фибробластов. В контрольной серии наблюдалось нарастание TGF β -1, что определяет тенденцию к образованию бельма роговицы (Lee J. et al., 2008). Так, относительный показатель TGF β -1 на 7-е сутки более чем в 15 раз превышал нормальные значения ($p < 0,001$).

Принципиальным является то, что уровень кровоснабжения области лимба во многом определяет исходы регенерации роговицы (Majo F. et al., 2006). В наших экспериментах в контрольной серии наблюдалась выраженная сосудистая реакция в области лимба, проявляющаяся в увеличении СППК уже через час после ожога роговицы. Пик роста выбранного показателя приходился на 7-е сутки, когда суммарная площадь просвета капилляров в 2,5 раза ($p < 0,05$) превышал норму. Высокий уровень СППК обусловлен при этом не только дилата-

цией сосудов краевой петливой сети, но и включением в кровоток неактивных в норме сосудистых терминалей.

По данным Р.А. Гундоровой с соавт. (2005), продукты химической деструкции клеток и коллагена вызывают выраженную вазомоторную реакцию сосудов краевой петливой сети в ранние сроки. Сосудистые изменения в области лимба при акупунктурном введении ДБА выражались в подъеме уровня СППК в 2,5 раза ($p < 0,05$) на 3-и сутки, что на 20% выше ($p > 0,05$), чем в серии с перилимбальным введением ДБА. На 7-е сутки наблюдался пик увеличения СППК до 279% ($p < 0,05$) от нормы на фоне перилимбального введения ДБА (за счет неоангиогенеза) и до 321% от нормы на фоне акупунктурного введения ДБА (рефлекторный механизм действия акупунктуры на сосуды краевой петливой сети).

Обнаруженное в наших экспериментах сходство динамики репаративной регенерации роговицы при перилимбальном введении диспергированного аллогенного биоматериала и воздействие ДБА рефлексогенным путем имеет принципиальное значение, поскольку достижение позитивных результатов по регенерации роговицы путем воздействия на рефлексогенные зоны является более предпочтительным по сравнению с оперативным вмешательством, каковым, по сути, является перилимбальное введение ДБА.

Исследования сетчатого слоя дермы на фоне акупунктурного введения ДБА отражали положительную динамику репаративных процессов. Показатель, отражающий содержание $TGF\beta-1$ в сетчатом слое дермы, в 1,49 раза ($p < 0,05$) превышал нормальные значения на 3-и сутки эксперимента. Начиная с 7-х суток экспрессия $TGF\beta-1$ постепенно снижался и нормализовался на 30-е сутки. Полученные данные согласуются с А.В. Roberts et al. (1990) и J. Halper et al. (2005), которые показали ангиогенное действие нормальных титров $TGF\beta-1$. В контроле на фоне акупунктуры на 14-е сутки наблюдалось увеличение экспрессии $TGF\beta-1$ в сетчатом слое дермы, кратное числу сеансов процедуры. При минимальном числе сеансов акупунктуры выбранный показатель был выше нормы в 1,48 раза ($p < 0,05$), при 4–7 сеансах – в 1,84 раза ($p < 0,05$), а при 8–10 сеансах – в 2,64 раза ($p < 0,01$).

Результаты выполненных исследований соответствуют данным Е.Б. Новикова с соавт. (2004), которые также указывают на формирование локального рубца в коже в области многократно проводимой акупунктуры.

В области акупунктурного введения ДБА в сетчатом слое дермы на 14-е сутки наблюдалось увеличение СППК в 3,4 раза ($p < 0,01$). В то же время результаты контрольной серии позволили выявить зависимость между числом сеансов иглоукалывания и кратностью снижения СППК в сетчатом слое дермы на 14-е сутки эксперимента. Так, при 1–3 сеансах акупунктурного воздействия СППК варьировало в пределах нормы ($p > 0,05$), при 4–7 сеансах – снижалось в 1,4 раза ($p < 0,05$), а при максимальном числе сеансов (8–10) наблюдалось двукратное снижение ($p < 0,05$) выбранного показателя. При этом в опытной серии в отдаленные сроки происходило сохранение высоких значений СППК: 133% ($p < 0,05$) от нормы.

Данный факт свидетельствует о перестройке микроциркуляторного русла и о процессах неоангиогенеза в области введения биоматериала. Полученные нами результаты подтверждают данные В.В. Серова (1995) о важной роли адекватного кровоснабжения тканевого ложа в резорбции биоматериала макрофагами и в регенерации тканей.

В исследованные сроки в опытной серии сохранялась высокая плотность макрофагальной инфильтрации в трансплантате и тканевом ложе, что можно рассматривать как структурный эквивалент высокой биологической активности акупунктурной точки при введении ДБА. Считается доказанным, что клеточная реакция на биоматериал зависит от его химической природы (Лаврищева Г.И., Оноприенко Г.А., 1996). Следует также отметить, что введение ДБА активирует миосателлиты, что согласуется с результатами работы А.А. Стадникова с соавт. (2001), полученными при пересадке других аллотрансплантатов.

Таким образом, сравнительный анализ результатов двух серий экспериментов показал, что как перилимбальное введение ДБА, так и его воздействие на рефлексогенные зоны мобилизуют комплекс сосудистых и клеточных реакций, которые проявляются в полиморфной инфильтрации с участием макрофагов и процессами ангиогенеза с последующей резорбцией волокнистого матрикса биоматериала.

ВЫВОДЫ

1. Экспериментальное моделирование химического ожога роговицы приводит к некрозу тканей в контактной зоне с последующим развитием воспалительных процессов. Нарушение структуры собственного вещества роговицы проявляется достоверным снижением коэффициента анизотропии до 44% от исходного уровня на 7-е сутки. Нормализация переднего эпителия происходит на 14-е сутки эксперимента, а пролиферативная активность эпителиоцитов восстанавливается на 7-е сутки.

2. Локальное перилимбальное введение оптимизирует репаративные процессы, что проявляется нормализацией поляризационно-оптических свойств собственного вещества роговицы в ранние сроки, коэффициент анизотропии статистически значимо возрастает, достигая на 7-е сутки 94% от исходных значений. Восстановление прозрачности роговицы определяют ранняя нормализация экспрессии трансформирующего фактора роста в собственном веществе роговицы и мобилизация микрососудов в области лимба со статистически значимым увеличением суммарной площади просвета капилляров на 7-е сутки эксперимента.

3. Рефлексогенное воздействие диспергированным аллогенным биоматериалом оптимизирует механизмы репаративной регенерации роговицы, о чем свидетельствует нормализация митотического индекса на 7-е сутки эксперимента. В эти же сроки достигает нормы экспрессия трансформирующего фактора роста в собственном веществе роговицы, снижая вероятность развития фиброза в зоне химического ожога. Коэффициент анизотропии коллагеновых волокон на 7-е сутки достигает 63% от нормы, отражая динамику восстановления функционально адекватных структур.

4. Как локальное, так и акупунктурное введение аллогенного диспергированного биоматериала является эффективным методом стимуляции репаративных процессов в соединительной и эпителиальной тканях, что показано на модели регенерации роговицы.

5. Курс классической иглорефлексотерапии (10 сеансов) в эксперименте приводит к выраженным локальным сосудистым и клеточным реакциям в дерме и гиподерме с формированием в области микротравмы грубоволокнистой соединительной ткани, что подтверждается повышением уровня TGF β -1 (в 2,64 раза выше нормы), а также низкой плотностью микроциркуляторного русла (двукратное уменьшение СППК).

6. Рефлексогенное воздействие с ДБА приводит к комплексу сосудистых и клеточных реакций, не сопровождающихся фиброзом в области инъекции. При этом СППК в зоне акупунктуры превышает нормальные значения на уровне сетчатого слоя дермы в 1,33 раза. Уровень TGF β -1, отражающий пролиферацию соединительной ткани, незначительно увеличивается при введении ДБА и к 30-м суткам эксперимента полностью нормализуется. Это подтверждает эффективность предпринятой попытки оптимизации процессов регенерации роговицы выбранным фармакопунктурным методом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для стимуляции репаративной регенерации стромы и эпителия при повреждениях роговицы необходимо локальное перилимбальное введение аллогенного диспергированного биоматериала.

2. Для оптимизации и пролонгирования восстановительных процессов в структурах переднего отрезка глаза необходимо воздействие на локальные рефлексогенные зоны аллогенным диспергированным биоматериалом.

3. С целью достижения пролонгированного эффекта и для профилактики и рассасывания рубцов в области биологически активных зон кожи необходимо фармакопунктурное введение аллогенного диспергированного биоматериала.

4. Новизна разработанного метода подтверждена патентом РФ (№ 2238076 от 12.05.2003 г. «Способ лечения и профилактики заболеваний воздействием на биологически активные точки и зоны» Мулдашев Э.Р. с соавт.).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:

1. Фармакопунктура диспергированным биоматериалом «Аллоплант» / Э.Р. Мулдашев, Р.Т. Нигматуллин, **Р.Ф. Галияхметов**, А.М. Дусалимова, Р.З. Кадыров, Н.И. Валиева // Циклы природы и общества: материалы XIV Международной конференции. – Ставрополь, 2006. – С. 76–77.
2. Применение диспергированного биоматериала «Аллоплант» для акупунктурного введения в клинической практике / Э.Р. Мулдашев, Р.Т. Нигматуллин, **Р.Ф. Галияхметов**, А.М. Дусалимова, Р.З. Кадыров // Материалы Третьего Международного тихоокеанского конгресса по традиционной медицине. – Владивосток; Сеул, 2006. – С. 30–32.
3. Мулдашев, Э.Р. Стимуляция репаративной регенерации роговицы диспергированными биоматериалами / Э.Р. Мулдашев, **Р.Ф. Галияхметов**, Р.З. Кадыров // Современные методы диагностики и лечения заболеваний роговицы и склеры: сборник научных статей. – М., 2007. – С. 96–102.
4. Репаративная регенерация роговицы при акупунктурном и перилимбальном введении биоматериала Аллоплант / Э.Р. Мулдашев, Р.Т. Нигматуллин, **Р.Ф. Галияхметов**, Р.З. Кадыров, А.М. Дусалимова // Сборник научных трудов конгресса, посвященного 30-летию со дня открытия Центрального научно-исследовательского института рефлексотерапии. – М., 2007. – С. 319–320.
5. Морфологические аспекты фармакопунктуры с использованием биоматериалов / Э.Р. Мулдашев, В.У. Галимова, **Р.Ф. Галияхметов**, А.И. Кирилличев, А.Е. Апрельев, Р.Т. Нигматуллин // **Морфологические ведомости**. – 2007. – № 3. – 4. – С. 128–130.
6. Некоторые закономерности биодеградации трансплантатов / Р.Т. Нигматуллин, В.Г. Гафаров, **Р.Ф. Галияхметов**, А.Р. Мухаметов, А.Е. Апрельев, Д.А. Щербаков // **Морфологические ведомости**. – 2007. – № 3–4. – С. 130–132.
7. Роль тканевого напряжения при пересадке аллогенных трансплантатов / Р.Т. Нигматуллин, Р.Г. Гафаров, **Р.Ф. Галияхметов**, Н.Н. Аслямов, А.Р. Мухаметов, И.Р. Ишмуратова, З.Р. Мухаметова // **Вестник Оренбургского государственного университета**. – 2007. – № 78. – С. 147–150.

8. Поляризационно-оптический анализ в исследовании аллогенных тканевых трансплантатов / Р.Т. Нигматуллин, В.Г. Гафаров, **Р.Ф. Галияхметов**, Н.Н. Аслямов, А.Е. Апрельев, З.Р. Мухаметова // **Морфологические ведомости.** – 2008. – № 2. – С. 95.

9. Реактивные изменения в гиподерме при введении биоматериала Аллоплант / Э.Р. Мулдашев, В.У. Галимова, Р.Т. Нигматуллин, А.И. Кирилличев, А.Е. Апрельев, **Р.Ф. Галияхметов** // **Морфологические ведомости.** – 2008. – № 3. – С. 77–78.

10. **Галияхметов, Р.Ф.** Сравнительный анализ физических методов идентификации биологически активных точек / **Р.Ф. Галияхметов**, Л.Ф. Агеева // Человек и лекарство: сборник материалов XVI Российского национального конгресса. – М., 2009. – С. 531.

11. Кадыров, Р.З. Стимуляция репаративной регенерации роговицы перилимбальным и акупунктурным введением биоматериала Аллоплант / Р.З. Кадыров, **Р.Ф. Галияхметов**, Д.А. Щербаков // Экологическая медицина и офтальмология: материалы научно-практической конференции. – М., 2009. – С. 95–97.

12. Клеточные и сосудистые реакции при подкожном введении биоматериала / В.У. Галимова, **Р.Ф. Галияхметов**, Н.И. Валиева, Д.А.Щербаков, Л.Ф. Агеева, А.Е. Апрельев // **Морфологические ведомости.** – 2009. – № 3.– С. 278–279.

13. Кадыров, Р.З. Стимуляция репаративной регенерации роговицы перилимбальным введением биоматериала / Р.З. Кадыров, **Р.Ф. Галияхметов**, А.Б. Нураева // **Морфологические ведомости.** – 2009. – № 3. – С. 256–258.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ДБА – диспергированный биоматериал аллогенный

СППК – суммарная площадь просвета капилляров

КА – коэффициент анизотропии

PCNA – ядерный антиген пролиферирующих клеток

TGFβ-1 – трансформирующий фактор роста

ГАЛИЯХМЕТОВ Радик Фаязович

**ДИНАМИКА ПОСТОЖОГОВОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ РОГОВИЦЫ
ПРИ ЛОКАЛЬНОМ И РЕФЛЕКСОГЕННОМ ВОЗДЕЙСТВИИ
АЛЛОГЕННЫМ ДИСПЕРГИРОВАННЫМ
БИОМАТЕРИАЛОМ**

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Издательская лицензия № 06788 от 01.11.2001 г.
ООО «Издательство «Здравоохранение Башкортостана»
450000, РБ, г. Уфа, а/я 1293; тел.: (347) 250-81-20; тел./факс (347) 250-13-82.

Подписано в печать 13.07.2010 г.
Формат 60×84/16. Гарнитура Times New Roman.
Бумага офсетная. Отпечатано на ризографе.
Усл. печ. л. 2,0. Уч.-изд. л. 2,0.
Тираж 100. Заказ № 542.