

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

EXPERIMENTAL STUDIES

<https://doi.org/10.33266/2070-1004-2024-2-60-64>
УДК 615.477.24:616.288.7

Оригинальная статья
© ФМБЦ им.А.И.Бурназяна

ПРИМЕНЕНИЕ РОССИЙСКИХ ЭНДОПРОТЕЗОВ ДЛЯ УСТРАНЕНИЯ ДЕФЕКТОВ УШНОЙ РАКОВИНЫ: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЙ АНАЛИЗ

Н.А.Дайхес¹, Н.Е.Мантурова², Д.Н.Назарян¹, А.А.Хачатрян¹, Ю.Д.Хесуани³, Х.М.Диаб¹, А.С.Мачалов¹,
Г.Г.Аракелян¹

¹ ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр оториноларингологии» ФМБА России,
Москва, Россия

² АО «Институт пластической хирургии и косметологии», Москва, Россия

³ ООО «3D Bioprinting Solutions», Москва, Россия

Резюме. Цель исследования – улучшить качество жизни пациентов с врожденной атрезией или ампутацией наружного уха.
Материалы и методы исследования

В эксперименте в качестве живой биологической модели были использованы две близкородственные особи минипигов (домашние карликовые свиньи) породы *Sus scrofa*.

Два минипига были подвергнуты хирургическому вмешательству в операционной в условиях стерильности и с использованием стандартного хирургического инструментария.

Хирургическая фаза эксперимента состояла из трех этапов. Все оперативные этапы проводились под многокомпонентной тотальной внутривенной (в/в) анестезией в присутствии анестезиолога.

Операции выполняли две бригады хирургов по 2 хирурга в каждой. В течение 120 сут были выполнены следующие этапы:

- забор ушного хряща у особей для выделения и культивирования хондроцитов;
- имплантация и префабрикация бионженерных эндопротезов в мышечные футляры теменной области;
- забор трансплантатов для гистологического анализа.

Все три хирургических этапа на обоих минипигах были идентичными и выполнялись синхронно.

Результаты исследования и их анализ. По результатам исследования можно сделать следующие выводы:

- отечественный эндопротез показал свою эффективность и безопасность на биологической модели;
- необходимо дальнейшее изучение апробированной методики на большем количестве биологических моделей;
- учитывая чистоту Beta-тестирования, разработанный материал необходимо апробировать в клинических исследованиях;
- использование хондроцитов и технологий клеточной инженерии позволяет создать безопасные и эффективные эндопротезы для устранения врожденной атрезии ушной раковины.

Ключевые слова: дефекты ушной раковины, минипиги, пациенты с ампутацией наружного уха, пациенты с врожденной атрезией наружного уха, российские эндопротезы, технологии клеточной инженерии, хондроциты

Конфликт интересов. Авторы статьи подтверждают отсутствие конфликта интересов

Для цитирования: Дайхес Н.А., Мантурова Н.Е., Назарян Д.Н., Хачатрян А.А., Хесуани Ю.Д., Диаб Х.М., Мачалов А.С., Аракелян Г.Г. Применение российских эндопротезов для устранения дефектов ушной раковины: экспериментальный анализ // Медицина катастроф. 2024. №2. С. 60-64. <https://doi.org/10.33266/2070-1004-2024-2-60-64>

<https://doi.org/10.33266/2070-1004-2024-2-60-64>
UDC 615.477.24:616.288.7

Original article

© Burnasyan FMBC FMBA

THE USE OF RUSSIAN ENDOPROSTHESES TO ELIMINATE DEFECTS OF THE AURICLE: EXPERIMENTAL ANALYSIS

N.A.Daykhes¹, N.E.Manturova², D.N.Nazaryan¹, A.A.Khachatryan¹, Yu.D.Khesuani³, Kh.M.Diab¹,
A.S.Machalov¹, G.G.Arakelyan¹

¹ National Medical Research Center of Otorhinolaryngology FMBA of Russia, Moscow, Russian Federation

² JSC Institute of Plastic Surgery and Cosmetology, Moscow, Russian Federation

³ LLC "3D Bioprinting Solutions", Moscow, Russian Federation

Summary. The purpose of the study is to improve the quality of life of patients with congenital atresia or amputation of the external ear.
Materials and research methods. In the experiment, two closely related individuals of minipig (domestic dwarf pigs) of the *Sus scrofa* breed were used as a living biological model.

Two minipigs were surgically treated in the operating room under sterile conditions using standard surgical instruments.

The surgical phase of the experiment consisted of three stages. All surgical stages were performed under multicomponent total intravenous (IV) anesthesia in the presence of an anesthesiologist.

The operations were performed by two surgical teams of 2 surgeons each. The following steps were completed within 120 days:

- collection of ear cartilage from individuals for isolation and cultivation of chondrocytes;
- implantation and prefabrication of bioengineered endoprostheses into the muscle sheaths of the parietal region;
- collection of grafts for histological analysis.

All three surgical steps on both minipigs were identical and were performed synchronously.

Research results and their analysis. Based on the results of the study, the following conclusions can be drawn:

- the domestic endoprosthesis has shown its effectiveness and safety on a biological model;
- further study of the proven methodology on a larger number of biological models is necessary;
- taking into account the purity of Beta testing, the developed material must be tested in clinical studies;
- the use of chondrocytes and cell engineering technologies makes it possible to create safe and effective endoprostheses to eliminate congenital atresia of the auricle.

Key words: auricle defects, cell engineering technologies, chondrocytes, minipigs, patients with amputation of the external ear, patients with congenital atresia of the external ear, Russian endoprostheses

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest

For citation: Daykhes N.A., Manturova N.E., Nazaryan D.N., Khachatryan A.A., Khesuani Yu.D., Diab Kh.M., Machalov A.S., Arakelyan G.G. The Use of Russian Endoprostheses to Eliminate Defects of the Auricle: Experimental Analysis. *Meditina Katastrof* = Disaster Medicine. 2024;2:60-64 (In Russ.). [https://doi.org/10.33266/2070-1004-2-60-64](https://doi.org/10.33266/2070-1004-2024-2-60-64)

Контактная информация:

Дайхес Николай Аркадьевич – член-корр. РАН, докт. мед. наук, профессор; директор ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр оториноларингологии» ФМБА России

Адрес: Россия, 123182, Москва, Волоколамское шоссе д. 30, к. 2

Тел.: +7 (499) 968-69-12

E-mail: otolarfmba@mail.ru

Contact information:

Nikolay A. Daikhes – Corresponding member RAS, Dr. Sc. (Med.), Professor; Director of National Medical Research Center of Otorhinolaryngology FMBA of Russia

Address: 30, Volokolamskoe road, Moscow, 123182, Russia

Phone: +7 (499) 968-69-12

E-mail: otolarfmba@mail.ru

Введение

Врожденная атрезия наружного уха – это редкое врожденное заболевание, проявляющееся отсутствием наружного слухового прохода или его частичным закрытием. Согласно результатам исследования, проведенного в США, частота встречаемости этого заболевания составляет примерно одно заболевание на 10 тыс. родившихся [1]. Кроме того, было выявлено, что врожденная атрезия наружного уха более распространена среди мужчин, чем среди женщин [2].

Врожденная атрезия наружного уха может привести к серьезным проблемам со слухом и речью. Современный подход к лечению врожденной атрезии наружного уха состоит в применении искусственных эндопротезов. Будучи весьма успешными в достижении эстетико-функционального результата современные эндопротезы в то же время не лишены недостатков, порой ограничивающих их применение. К последним, например, относятся их высокая стоимость и риск инфицирования при прорезывании протезов [3].

В настоящей статье представлены результаты эксперимента, в котором был использован выращенный с помощью технологий клеточной инженерии отечественный эндопротез, предназначенный для устранения врожденной атрезии наружного уха. Наличие контрольных трансплантатов дало возможность объективно исследовать все компоненты технологии создания эндопротеза – коллагеновый каркас и хондроциты.

Цель исследования – улучшить качество жизни пациентов с врожденной атрезией или ампутацией наружного уха.

Суть эксперимента заключалась в разработке на основе современных достижений биоинженерии отечественного материала, обладающего всеми преимуществами современных эндопротезов и минимизирующего количество интра- и послеоперационных осложнений и побочных проявлений.

Материалы и методы исследования

В эксперименте в качестве живой биологической модели были использованы две близкородственные особи минипигов* породы *Sus salvanius* с кодовыми номерами 955 и 957. Использование минипигов в экспериментальных исследованиях имеет несколько преимуществ. Во-первых, они имеют анатомические и физиологические характеристики, близкие к человеческим, что делает их более подходящими для моделирования заболеваний человека и испытания новых методов его лечения. Во-вторых, минипиги меньше по размеру, чем обычные свиньи, что упрощает их содержание. Кроме того, минипиги были выбраны в связи с наличием у нас опыта проведения экспериментов на данных животных. Средняя масса минипигов составляла 37,5 кг. Минипигов содержали на базе научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (ФМБА России) в свободных от стресса условиях и в соответствии с едиными этическими нормами Базельской декларации. Минипигам был предоставлен свободный доступ к еде и питью.

Два минипига с кодовыми номерами 955 и 957 были подвергнуты хирургическому вмешательству в операционной в условиях стерильности и с использованием стандартного хирургического инструментария. Опираясь на наш опыт устранения врожденной атрезии наружного уха на базе ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр оториноларингологии» ФМБА России (НМИЦО ФМБА России) и опыт зарубежных коллег, все три оперативных вмешательства были тщательно смоделированы с точки зрения выполнения оптимального хирургического доступа и формирования мышечных футляров для трансплантатов.

* Минипиги – домашние карликовые свиньи

Хирургическая фаза эксперимента состояла из трех этапов. Все оперативные этапы проводились под многокомпонентной тотальной внутривенной (в/в) анестезией в отсутствии анестезиолога.

Операции выполняли синхронно две бригады хирургов по 2 хирурга в каждой. Минипиги были анестезированы путем выполнения внутривенной индукции 1%-ным пропофолом (3–5 мг/кг) и внутривенной анестезии с использованием следующих препаратов: золазепам/тилетамин (золетил) – 4 мг/кг и ксилазин – 1 мг/кг. В течение 120 сут были выполнены следующие этапы:

- забор ушного хряща у особей для выделения и культивирования хондроцитов;
- имплантация и префабрикация бионженерных эндо-протезов в мышечные футляры теменной области;
- забор трансплантатов для гистологического анализа.

Все три хирургических этапа на обоих минипигах были идентичными и выполнялись синхронно.

1-й этап – забор ушного хряща – выполнен 03.11.2022 г.

При положении минипигов на животе в условиях тотальной в/в анестезии по предварительной разметке был выполнен разрез по нижнему краю наружного уха и отслоен кожный лоскут. Фрагменты хрящевой ткани 1,5×1,5 см были забраны и отправлены в бионженерную лабораторию для выделения и дальнейшей культивации хондроцитов. Раны ушиты без натяжения узловыми швами Викрил 4.0 (рис. 1).

2-й этап – имплантация хрящевых трансплантатов в теменную область живой биологической модели – выполнен через 30 сут – 08.12.2022 г.

Через 30 сут после культивации клеток для каждой особи были подготовлены три трансплантата с разной комбинацией и структурой – бионженерное ухо и 2 контрольных препарата, представленные коллагеновым каркасом без клеток и коллагеновым каркасом с клетками.

Через U-образный разрез был обеспечен коронарный доступ к височным и лобной мышцам, выделены обе поверхности височных фасций и лобная мышца. Из фасций и мышц сформированы футляры, в которые были имплантированы подготовленные трансплантаты. При этом правой височной фасцией было обернуто бионженерное ухо; левой височной фасцией – коллагеновый каркас с клетками; лобной мышцей – коллагеновый каркас без клеток. Чтобы предотвратить физическое и биохимическое взаимодействие компартментов друг с другом, все 3 компартмента были герметично ушиты (рис. 2).

3-й этап – забор префабрикованных трансплантатов для гистологического исследования – выполнен 03.03.2023 г.

Через 120 сут после имплантации по предыдущему разрезу был выполнен аналогичный доступ к префабрикованным бионженерным трансплантатам. Все три трансплантата каждой особи были забраны для гистологического исследования в одном блоке с мышечным футляром (рис. 3).



Рис. 1. Забор ушного хряща: а – особь 955; б – особь 957 – 03.11.2022 г.

Fig. 1. Collection of ear cartilage: a – individual No. 955; b – individual No. 957 – 11/03/2022



Рис. 2. Формирование футляров из поверхностных височных мышц и лобной мышцы:

а – особь 955: А – биоинженерное ухо; Б – коллагеновый каркас с клетками; В – коллагеновый каркас без клеток
б – особь 957: А – биоинженерное ухо; Б – коллагеновый каркас с клетками; В – коллагеновый каркас без клеток – 08.12.2022 г.

Fig. 2. Formation of sheaths from the superficial temporal muscles and frontalis muscles:

a – individual No. 955: A – bioengineered ear; B – collagen frame with cells
b – individual No. 957: A – bioengineered ear; B – collagen frame with cells – 12/08/2022

Описание этапов эксперимента

Для профилактики вторичных бактериальных осложнений в послеоперационном периоде экспериментальные особи получали антибактериальную терапию препаратом интерспектина (1 мл на 10 кг внутримышечно – в/м – 1 р./сут) в течение 14 сут. На 120-е сутки после операции был проведен забор материала для гистологического исследования, при котором использовалась в/в седация препаратами золетил-100 (1,5 мг/кг) и ксила (0,15 мл/кг). Дизайн исследования представлен в табл. 1.

Результаты исследования и их анализ

Результаты гистологических исследований – 03.03.2023 г.

Во время третьего этапа эксперимента после обеспечения хирургического доступа была дана макроскопическая оценка всех трех трансплантатов у минипигов. У обеих особей наблюдалась полная интеграция трансплантатов с их мышечными и фасциальными футлярами без признаков инфицирования или некроза тканей (рис. 4).

Сравнительный гистологический анализ префабрикованных бионженерных трансплантатов

Полноразмерная ушная раковина изготовлена методом 3D-печати из термопластичного уретана (ТПУ) с ребрами жесткости из полилактида с добавлением гидрогеля на основе коллагена 1-го типа

При окрашивании бионженерного уха обеих особей гематоксилин-эозином наблюдается практически идентичная гистологическая картина. В обоих препаратах просматривается умеренно плотный утолщенный участок мышечной ткани с обильной фиброподжеллюрной соединительной тканью с кровенаполненными сосудами различного диаметра (рис. 5а). Воспалительный инфильтрат – не выявлен. К мышечной ткани мультифокально плотно прилегает (сращенность) плотная эозинофильная бесклеточная ткань (предположительно – коллаген). Центральная часть имеет лабиринтообразное строение из мышечных переплетенных



Рис. 3. Префабрикованное бионженерное ухо в футляре из поверхностной височной фасции: а – особь 955; б – особь 957 – 03.03.2023 г.

Fig. 3. Prefabricated bioengineered ear in a case made of superficial temporal fascia: a – individual No. 955; b – individual No. 957 – 03/03/2023

Таблица 1 / Table No. 1
Дизайн экспериментального исследования двух особей
Two-individual experimental design

Кол-во исследуемых образцов/ Number of samples studied	Кол-во забранных/ имплантированных биоптатов/ трансплантатов / Number of biopsies/grafts taken/implanted	Дизайн эксперимента / Experimental design
1-й этап / Stage 1		
2	2	Забор двух ушных хрящей размером 1,5x1,5 см / Harvesting two ear cartilages
2-й этап – через 30 сут / Stage 2 – after 30 days		
6	6	Имплантация 6 трансплантатов: 2 биоинженерных уха 2 цилиндра (коллаген + хондроциты) 2 цилиндра (каркас полилактид) Implantation of 6 grafts: 2 bioengineered ears 2 cylinders (collagen + chondrocytes) 2 cylinders (polylactide frame)
3-й этап – через 120 сут / Stage 3 – after 120 days		
6	6	Забор 6 биоптатов: 2 биоинженерных уха – футляр из поверхностной височной фасции 2 цилиндра (коллаген + хондроциты) – футляр из поверхностной височной фасции 2 цилиндра (каркас полилактид) – футляр из лобной мышцы / Taking 6 biopsies: 2 bioengineered ears – case made from superficial temporal fascia 2 cylinders (collagen + chondrocytes) – case from the superficial temporal fascia 2 cylinders (polylactide frame) – case from the frontal muscle /
Всего / Total: 14	Всего / Total: 14	

волокон, среди которых просматриваются обширные поля эозинофильной волокнистой ткани.

Необходимо отметить, что в обоих препаратах присутствует выраженная васкуляризация с усилением по периферии центральной части, что косвенно подтверждает интеграцию трансплантатов с их мышечными и фасциальными футлярами. В центральной части просматриваются множественные плотные лимфоплазмоцитарные инфильтраты с преобладанием плазмоцитов. Нейтрофильного воспаления, в том числе реакции отторжения – не выявлено.

Схожая гистологическая картина наблюдается и при окрашивании по Маллори, где большая часть препаратов насыщенно синего цвета, что – согласно методике окраски – соответствует коллагеновым волокнам (рис. 5б). При этом на определенных участках коллаген плотно прилегает к мышечным волокнам – окрашивание в коричневый цвет.

При иммуногистохимическом (ИГХ) анализе у обоих препаратов выявлена слабая экспрессия на маркеры неонгиогенеза – VEGF и CD31 (рис. 6).

Цилиндрический образец Цилиндр 1, полученный из ТПУ и полилактида с добавлением гидрогеля на основе коллагена 1-го типа с включением аутологичных хондроцитов

Препараторы преимущественно состоят из рыхлой волокнистой ткани с пустотами по типу лабиринта (рис. 7). Местами встречаются узкие поля фиброза и мелкие округлые поля бесклеточной эозинофильной массы.

Волокнистая ткань умеренно васкуляризована, множество крупных щелевидных кровенаполненных сосудов. Также были выявлены мультифокальные воспалительные лимфоплазмоцитарные инфильтраты с образованием лимфоидных фолликулов, состоящих преимущественно из мелких

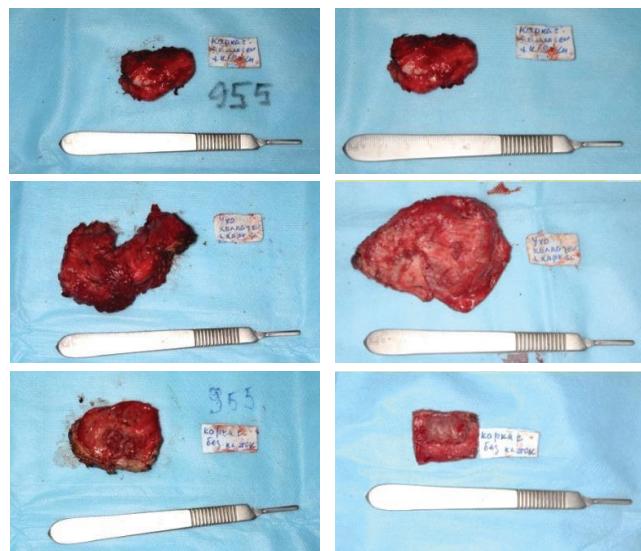


Рис. 4. Префабрицированные биоинженерные трансплантаты:
а – особь 955: А – биоинженерное ухо; Б – коллагеновый каркас с клетками;
Б – особь 957: А – биоинженерное ухо; Б – коллагеновый каркас с клетками; В – коллагеновый каркас без клеток с клетками; В – коллагеновый каркас без клеток – 03.03.2023 г.

Fig. 4. Prefabricated bioengineered transplants:
a – individual No. 955: A – bioengineered ear; B – collagen frame with cells;
B – individual No. 957: A – bioengineered ear; B – collagen frame with cells;
C – collagen frame without cells – 03/03/2023

лимфоцитов. Среди мышц прослеживается узкая прослойка зрелой хрящевой ткани.

При окрашивании по Маллори не более 75% обоих препаратов было окрашено в насыщенно синий цвет. По интенсивности окрашивания, наиболее выраженное содержание коллагена – по периферии, тогда как в центре просматривается голубой, красный и синий цвет, что говорит о присутствии коллагеновых волокон между мышечными пучками, на периферии препарата, вне области имплантата.

Иммуногистохимический анализ на экспрессию маркеров VEGF и CD31 выявил выраженную экспрессию в эндотелиях сосудов (рис. 8).

Цилиндрический образец Цилиндр 2, полученный из ТПУ и полилактида

При окраске препаратов гематоксилин-эозином преобладают участки тканей, полностью состоящие из умеренно плотной волокнистой ткани и имеющие пустоты по принципу лабиринта (рис. 9). В средней части этих тканей по периферии просматривается фиброзная ткань, скучная васкуляризация. Вокруг сосудов просматриваются плотные лимфоплазмоцитарные миофиты. В центральной части сосредоточены множественные плотные смешанные инфильтраты с преобладанием плазмоцитов, с единичными лимфоцитами, в меньшей степени – с нейтрофилами и различным количеством сидерофагов. При окрашивании по Маллори большая часть обоих препаратов – синего цвета разной интенсивности в зависимости от поля зрения, что

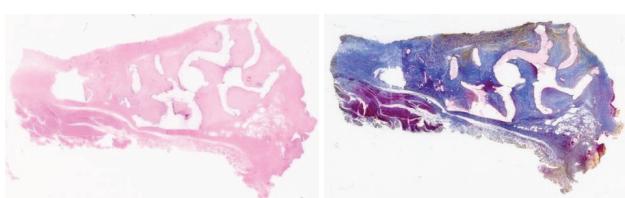


Рис. 5. Препаратор биоинженерного уха: а – окраска по H&E; б – окраска по Маллори
Fig. 5. Preparation of a bioengineered ear: a – H&E staining; b – Mallory staining

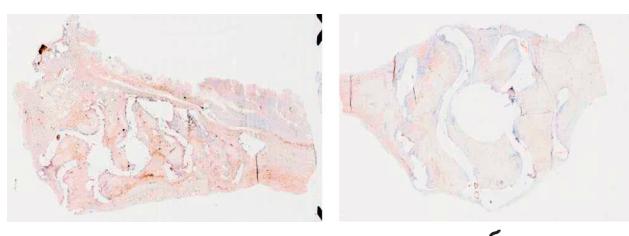


Рис. 6. Иммуногистохимический анализ биоинженерного уха: а – VEGF; б – CD31
Fig. 6. Immunohistochemical analysis of the bioengineered ear: а – VEGF; б – CD31

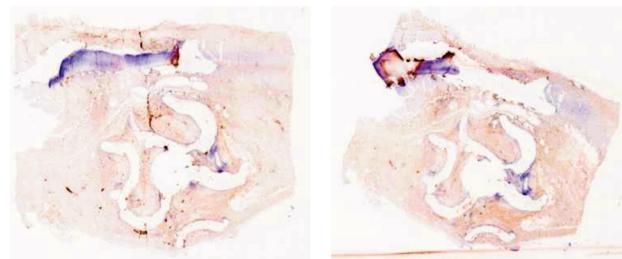


Рис. 8. Иммуногистохимический анализ препарата коллаген + клетки: а – VEGF; б – CD31
Fig. 8. Immunohistochemical analysis of the collagen + cells preparation: а – VEGF; б – CD31



Рис. 7. Цилиндр 1: а – окраска по H&E; б – окраска по Маллори
Fig. 7. Cylinder 1: а – H&E staining; б – Mallory staining

свидетельствует о высоком преобладании коллагеновых волокон. Маркеры неоангиогенеза (VEGF и CD31) при ИГХ-анализе выражены слабо (см. рис. 9).

В табл. 2 представлена сравнительная гистологическая характеристика образцов.

Выводы

1. Отечественный эндопротез показал свою эффективность и безопасность на биологической модели.



Рис. 9. Препарат Цилиндр 2: а – окраска по H&E; б – окраска по Маллори; в – ИГХ анализ CD31
Fig. 9. Preparation Cylinder 2: а – H&E staining; б – Mallory staining; в – IHC analysis of CD31

2. Необходимо дальнейшее изучение апробированной методики на большем количестве биологических моделей.

3. Учитывая чистоту Beta-тестирования, разработанный материал необходимо апробировать в клинических исследованиях.

Таким образом, использование хондроцитов и технологий клеточной инженерии позволяет создать безопасные и эффективные эндопротезы для устранения врожденной атрезии ушной раковины.

Таблица 2 / Table No. 2

Сравнительная гистологическая характеристика образцов Comparative histological characteristics of samples

Показатель Indicator	Особь / Individual 955			Особь / Individual 957		
	полноразмерная ушная раковина / full-size auricle	цилиндр 1 – коллаген + хондроциты / cylinder 1 – collagen + chondrocytes	цилиндр 2 – полиплактид / cylinder 2 – polylactide	полноразмерная ушная раковина / full-size auricle	цилиндр 1 – коллаген + хондроциты / cylinder 1 – collagen + chondrocytes	цилиндр 2 – полиплактид / cylinder 2 – polylactide
Васкуляризация / Vascularization	++-	++-	+-	++-	++-	+-
Интеграция адгезия / Integration and adhesion	+++	+-	+-	+++	+-	+-
Маркеры ангиогенеза VEGF и CD31 / Angiogenesis markers VEGF and CD31	+-	+++	+-	+-	+++	+-
Признаки воспаления и отторжения / Signs of inflammation and rejection	---	+-	+-	---	----	+-

Примечания: +++ – параметр выражен сильно, ++ – параметр выражен умеренно, +- – параметр выражен слабо, --- параметр не выражен
Notes: +++ – parameter is strongly expressed, ++ – parameter is moderately expressed, +- – parameter is weakly expressed, --- parameter is not expressed

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ / REFERENCES

1. Kelley PE, Scholes MA. Microtia and Congenital Aural Atresia. *Otolaryngol Clin North Am.* 2007 Feb;40(1):61-80. vi. doi: 10.1016/j.otc.2006.10.003. PMID: 17346561.
2. Luquetti DV, Heike CL, Hing AV, Cunningham ML, Cox TC. Microtia: Epidemiology and Genetics. *Am J Med Genet A.* 2012

Jan;158A(1):124-39. doi: 10.1002/ajmg.a.34352. Epub 2011 Nov 21. PMID: 22106030; PMCID: PMC3482263.

3. Wang M, Xiao Z, Huang M, Xie J, Liu G. Clinical Effect Evaluation and Complication Analysis of Different Auricle Reconstruction of Congenital Microtia. *Am J Transl Res.* 2021 Dec 15;13(12):13878-13885. PMID: 35035728; PMCID: PMC8748167.

Материал поступил в редакцию 01.02.24; статья принята после рецензирования 04.05.24; статья принята к публикации 19.06.24
The material was received 01.02.24; the article after peer review procedure 04.05.24; the Editorial Board accepted the article for publication 19.06.24