

ВОССТАНОВЛЕНИЕ СТРУКТУРЫ СУХОЖИЛИЙ С ПРИМЕНЕНИЕМ БИОМАТЕРИАЛОВ АЛЛОПЛАНТ

Э.Р. Мулдашев, Р.Т. Нигматуллин, В.Г. Гафаров, Н.Н. Аслямов, Д.А. Щербаков, А.Р. Мухаметов

*Федеральное государственное учреждение
Всероссийский Центр глазной и пластической хирургии,
г. Уфа*

Реферат. В работе представлены данные по экспериментальному исследованию динамики репаративных процессов в пяточном сухожилии в двух сериях: аллотрансплантация биоматериала Аллоплант для пластики сухожилий в область повреждения сухожилия (первая серия эксперимента), локальное обкалывание диспергированным биоматериалом Аллоплант «Стимулятор регенерации» (вторая серия эксперимента). В первой серии эксперимента трансплантат характеризуется относительно меньшей реакцией тканевого ложа, включая состояние органного сосудистого русла в ранние сроки эксперимента, он служит каркасом для новообразованных волокон и выполняет моделирующую роль для формирующегося регенерата. В результате изначально достигается одноосная направленность новообразованных коллагеновых волокон и компактное расположение пучков волокон. Во второй серии эксперимента происходит стимуляция репаративных процессов с относительно быстрой сменой фаз воспалительной реакции. Входящие в состав биоматериала Аллоплант гликозаминогликаны, являясь адекватным матриксом для миграции клеток, обеспечивают раннюю пролиферацию клеточных структур и синтез волокнистых компонентов. Первоначально волокна не имеют преимущественной ориентации, и только пройдя этап ремоделирования, приближаются к структуре сухожилия. В тканевом ложе трансплантата происходит значительное увеличение суммарной площади просвета капилляров на 3-7 сутки и последующее снижение этого показателя.

Ключевые слова: сухожилия, стимуляция регенерации, диспергированный биоматериал Аллоплант, повреждение сухожилий, структурированный биоматериал, коллагеновые волокна, дифференцировка фибробластов.

Эффективное лечение повреждений сухожилий и полноценная реабилитация пациентов является актуальной проблемой современной травматологии и ортопедии (Казарезов М.В. с соавт., 2004). Наиболее часто встречаются заживления вторичным натяжением, и как следствие нестабильность в суставе, приводящее к развитию деформирующего артроза особенно на нижних конечностях. Не редко при вынужденной иммобилизации наблюдается остеопороз, контрактуры и т.д. Применение шовного материала нередко сопровождается развитием лигатурных свищей. В частности разработка методов биостимуляции репаративных процессов в структурах мягкого остова – важное направление в травматологии (Лаврищева Г.И., Оноприенко Г.А., 1996).

Цель исследования: изучить влияние различных видов биоматериала Аллоплант на процессы репаративной регенерации сухожилий в эксперименте и обосновать возможность их применения в клинической практике при повреждении сухожилий.

Задачи исследования:

1. Экспериментально исследовать реакции тканевого ложа при имплантации двух видов аллогенных биоматериалов Аллоплант: аллогенного сухожильного трансплантата (нить, лента) и диспергированной формы биоматериала Аллоплант «Стимулятора регенерации» производства Центра глазной и пластической хирургии.

2. Изучить структурные особенности регенерата, формирующегося при пересадке указанных видов трансплантатов.

3. Выработать рекомендации по возможности применения аллогенного сухожильного трансплантата (нити, ленты) и диспергированного биоматериала Аллоплант, а также комбинированного применения обеих форм биоматериала при лечении травм сухожилий.

Материал и методы. В эксперименте на крысах породы Вистар изуче-

ны изменения в трансплантате и сосудистая реакция в тканевом ложе в 2-х сериях. В первой серии эксперимента применялся аллогенный сухожильный биоматериал Аллоплант для пластики сухожилий, во второй серии эксперимента – аллогенный диспергированный биоматериал Аллоплант «Стимулятор регенерации» .

Динамику структурных изменений изучали на 1, 3, 7, 14, 30, 60, 90 и 120 сутки эксперимента. Животных выводили из опыта путём передозировки эфира. Для гистологических исследований производился забор трансплантата с окружающими тканями с последующей фиксацией в 10% растворе нейтрального формалина. Серийные гистологические срезы окрашивались гематоксилином и эозином, а также по методу Ван-Гизона и Малори.

На гистологических препаратах проводили подсчёт коэффициента дифференциации фибробластов, определение степени ориентации и толщины волокон коллагена, подсчёт суммарной площади просвета капилляров (СППК) на единицу площади (27,8 тыс. мкм²) в ложе биоматериала, измерение коэффициента анизотропии.

Результаты и обсуждение. Эксперимент по аллотрансплантации сухожильной нити в область травмы сухожилия показал, что данный биоматериал подвергается поэтапной перестройке и замещению в соответствии с закономерностями заместительной регенерации при аллотрансплантации тканей.

Фиброархитектоника аллогенных сухожильных нитей характеризуется плотной упаковкой пучков коллагеновых волокон, ориентированных строго в одном направлении. Это хорошо видно в сравнении со склерой, фасциями, твердой мозговой оболочкой и другими волокнистыми образованиями, представленными плотной неоформленной соединительной тканью, где пучки ориентированы в разных направлениях.

Первая серия эксперимента. В ранние сроки эксперимента структура трансплантата сохранена на всем его протяжении (Рисунки 1,2). Уже в ран-

ние сроки обнаруживается реакция тканевого ложа на аллотрансплантат. В краевых зонах он инфильтрирован сегментоядерными лейкоцитами, макрофагами и фибробластами, что свидетельствует о высокой степени обменных процессов в месте трансплантации и выраженной регенерационной способности ткани сухожилия. Данная полиморфноклеточная инфильтрация направлена вдоль пучков волокон трансплантата и распространяется от периферии к центру. В тканевом ложе аллотрансплантата выделяются три зоны: реактивная, краевая и контактная. Между тканевым ложем и аллотрансплантатом произошла плотная адгезия.

Затем (на 14-30 сутки) признаки воспаления в тканевом ложе заметно уменьшились. Область трансплантации нити инфильтрирована полностью. Идёт образование пучков коллагеновых волокон (*Рисунок 3*). Постепенно нарастают процессы замещения трансплантата: по его окружности по межпучковым пространствам и между отдельными волокнами в направлении центра продвигаются макрофаги, фибробласты и фиброкласты (*Рисунок 3*). В периферической зоне относительно крупные артериолы и венулы ориентированы по ходу формирующихся пучков. Кровеносные сосуды регенерата дифференцированы на отдельные звенья и напоминают сосуды сухожилий. Фибробласты контактной зоны активно синтезируют коллагеновые волокна и с периферии поэтапно замещают аллотрансплантат. За ними тянутся новообразованные капилляры, напоминая капиллярные петли по периферии бессосудистых зон.

На 90 сутки трансплантат замещён тканями реципиента. Сформировавшийся регенерат представляет собой плотную оформленную соединительную ткань незначительными отклонениями от нормальной ткани сухожилия. По площади регенерат соответствует нанесённому ранее дефекту и имеет присущую сухожилию толщину и ориентацию пучков коллагеновых волокон (*Рисунок 4*).

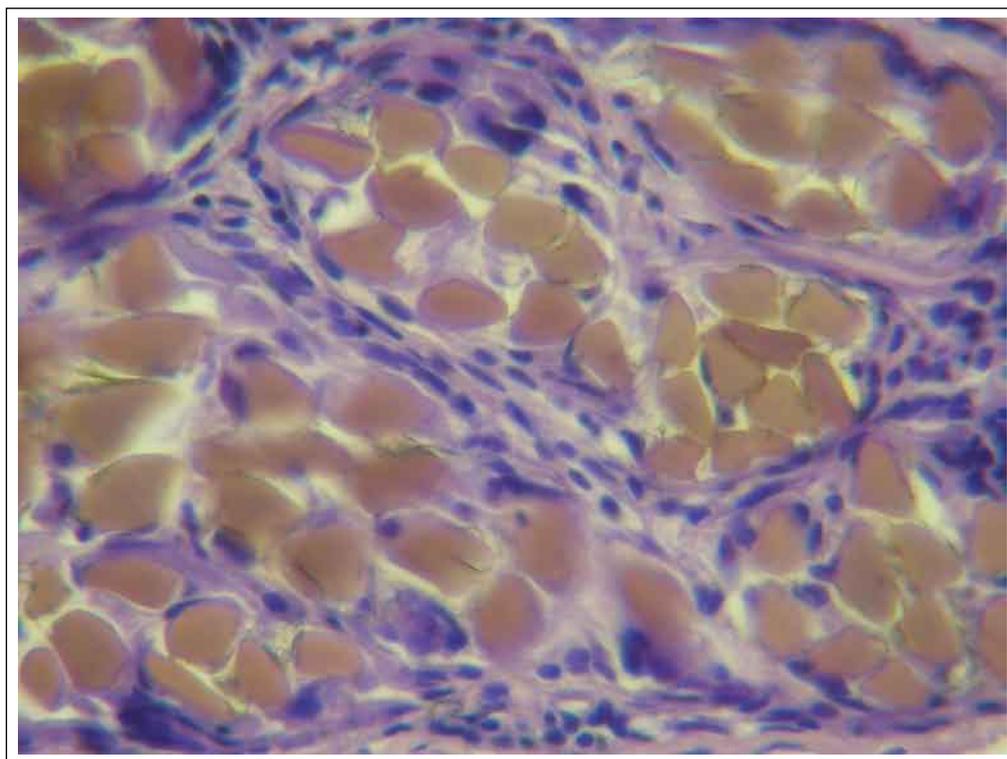


Рис. 1. Экспериментальная травма пяточного сухожилия. Аллосухожильный трансплантат в тканевом ложе. 3 сутки. Структура трансплантата сохранена. Полиморфноклеточная инфильтрация. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 40, окуляр 10*.*

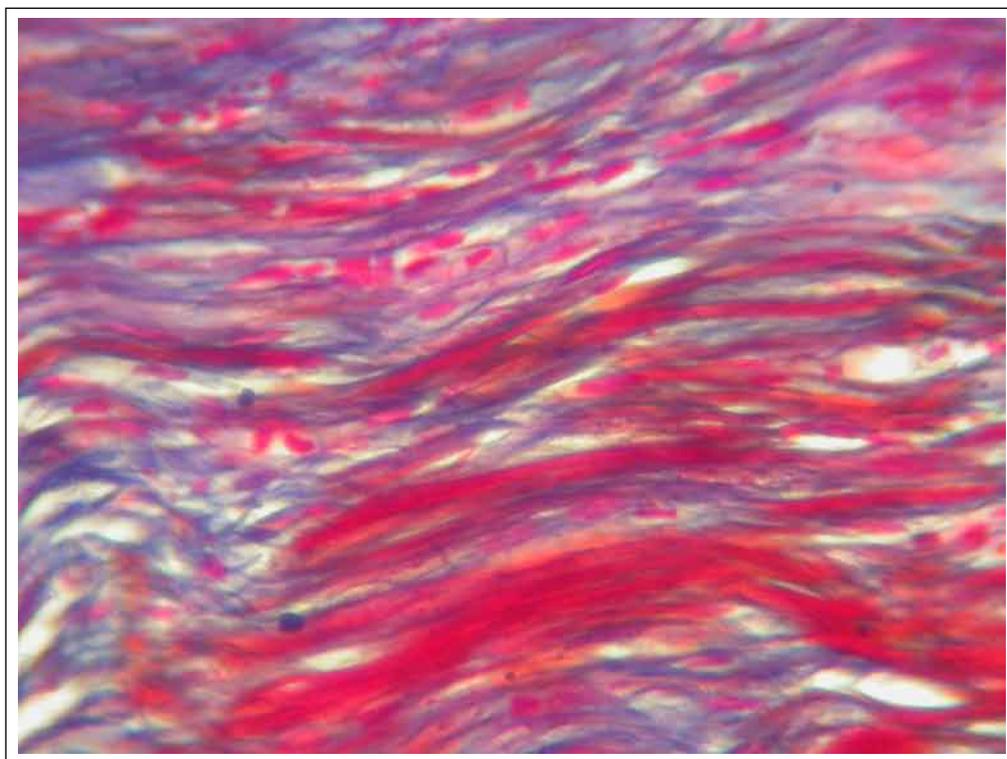


Рис. 2. Экспериментальная травма пяточного сухожилия. Тканевое ложе аллотрансплантата. 7 сутки. Однонаправленная ориентация новообразованных коллагеновых волокон в контактной зоне. Окраска по Маллори. Об.60. Гом.3.

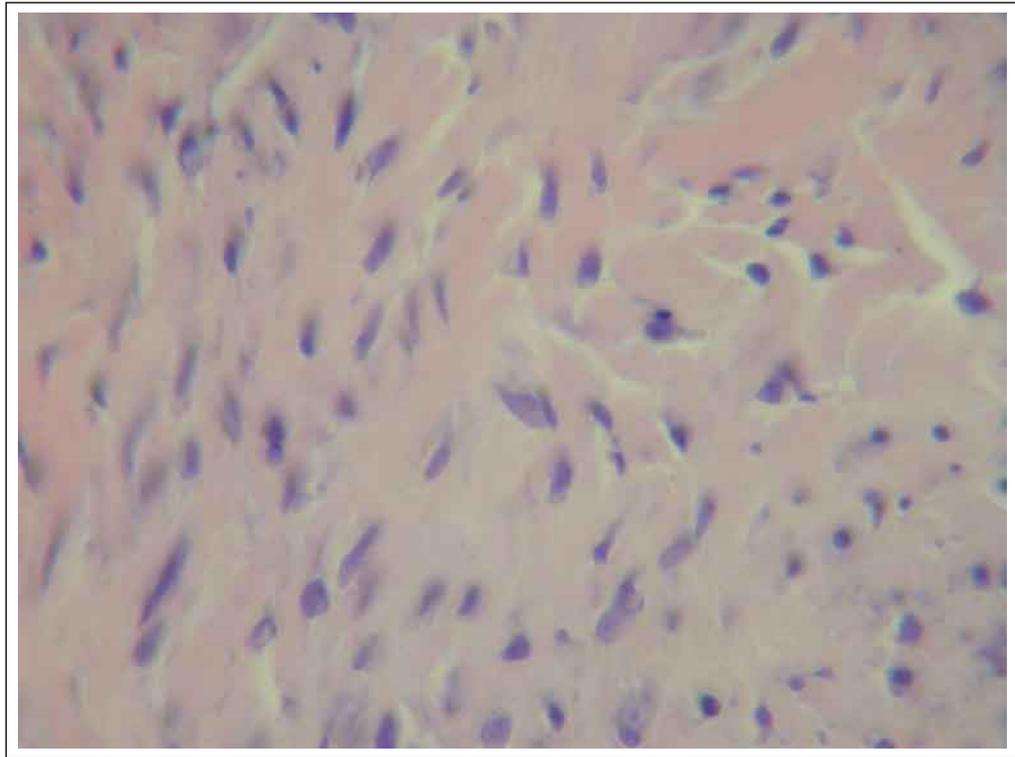


Рис. 3. Экспериментальная травма пяточного сухожилия. Тканевое ложе трансплантата. 30 сутки. Новообразованные ориентированные волокна в трансплантате, без признаков инфильтрации макрофагами. Окраска гематоксилином и эозином. Об.60. Гом.3.

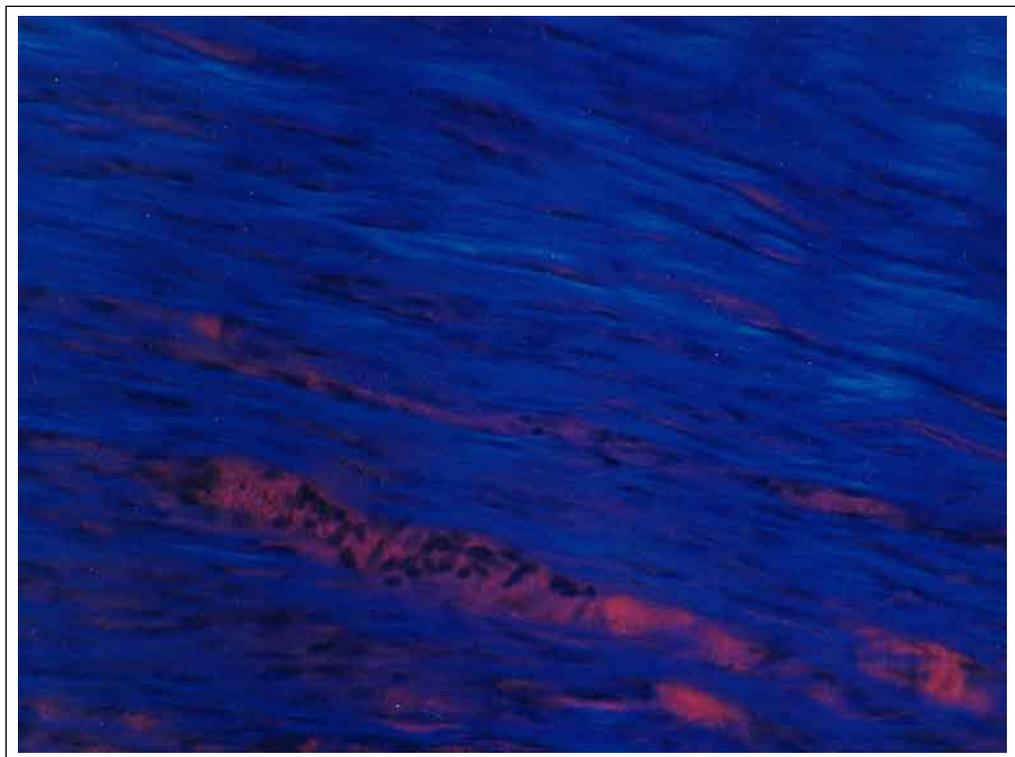


Рис. 4. Аллотрансплантат в тканевом ложе. 90 сутки. Зрелые волокна в зоне бывшего трансплантата. Окраска гематоксилином и эозином. Поляризационная микроскопия. Гом.- 3.

Вторая серия эксперимента. В ранние сроки эксперимента (3 суток) наблюдалась полиморфноклеточная инфильтрация диспергированного сухожильного биоматериала, представленная сегментоядерными лейкоцитами, макрофагами и в меньшем количестве лимфоцитами и фибробластами, наиболее выраженная в области введения. Обнаруживались набухание и гомогенизация коллагеновых волокон диспергированного сухожильного биоматериала, свидетельствующие о начинающейся деградации введённых частиц (*Рисунок 5*).

В дальнейшем (14-21 сутки) происходит формирование коллагеновых пучков, окрашивающихся в красный цвет по Ван-Гизону (*Рисунок 6*).

Полиморфноклеточная инфильтрация на месте введения диспергированного сухожильного биоматериала менее выражена в сравнение с ранними сроками. Их присутствие вызвано наличием гликозаминогликанов в составе диспергированного биоматериала Аллоплант, которые захватываются макрофагами, перерабатываются и активируют синтезирующую функцию фибробластов. Об этом говорит большое количество новообразованных, вновь синтезированных волокон коллагена.

В последующие сроки (30 сутки) происходит полная резорбция частиц диспергированного сухожильного биоматериала, и они уже гистологически не обнаруживаются. Большая часть резорбированного диспергированного сухожильного биоматериала замещена новообразованной плотной соединительной тканью, по структуре мало отличающейся от окружающей. Происходит дальнейшая дифференцировка фибробластов, о чём можно судить по форме их ядер (*Рисунок 7*). Ярко выраженная инфильтрация макрофагами места введения диспергированного сухожильного биоматериала не наблюдается, так как их функция (резорбция диспергированного сухожильного биоматериала) к данному сроку завершается. Также не обнаруживаются и форменные элементы крови.

На 90 сутки трансплантат замещен тканями реципиента. На месте травмы сформировался структурно адекватный регенерат, представляющий собой

плотную оформленную волокнистую ткань с большим, чем в сухожилии количеством клеточных элементов и сосудов. Об этом свидетельствует ряд признаков. При световой и микроскопии выявляются пучки коллагеновых волокон I и II порядков, ориентированные параллельно продольной оси сухожилия. Также обнаруживаются дифференцированные фибробласты, расположенные между этими пучками, имеющие базофильные продольно вытянутые ядра (признак их высокой степени дифференцировки). Также имеются и дефинитивные формы фибробластов – фиброциты или теноциты, расположенные также периферически. Это клетки, выполнившие свою функцию – синтез коллагена; они являются стареющими формами клеток данного дифферона (Рисунок 8).

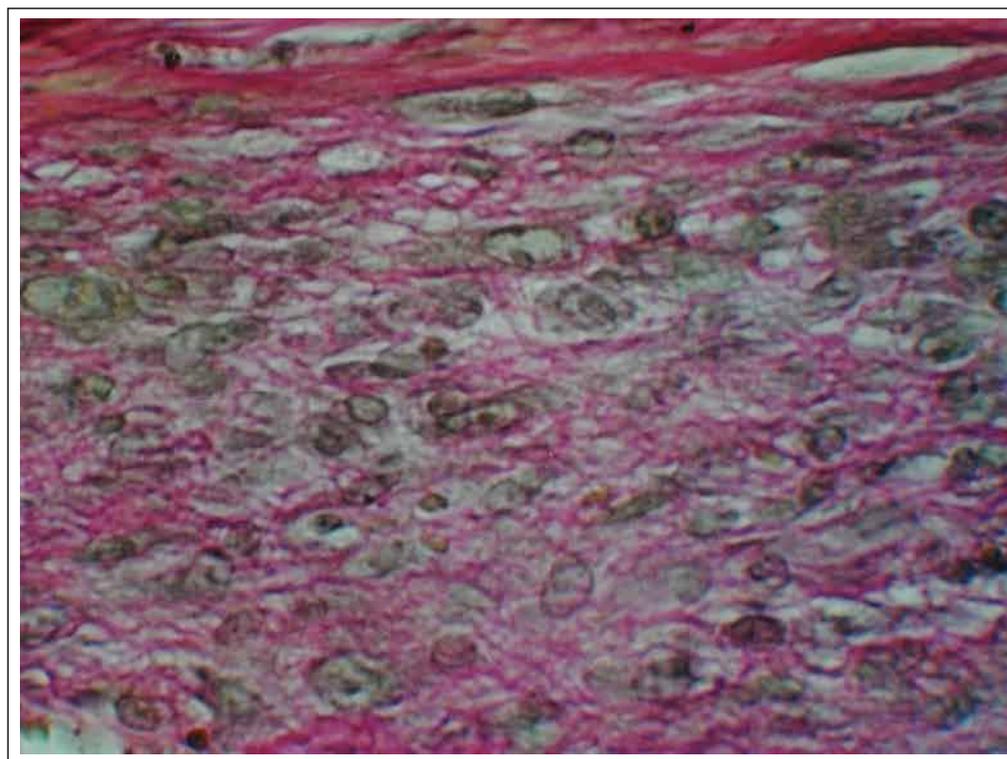


Рис. 5. Экспериментальная травма пяточного сухожилия с инъекцией диспергированного сухожильного биоматериала Аллоплант. 3 сутки. Полиморфноклеточная инфильтрация. Окраска по Ван-Гизону. Об. 60, Гом. – 3.*

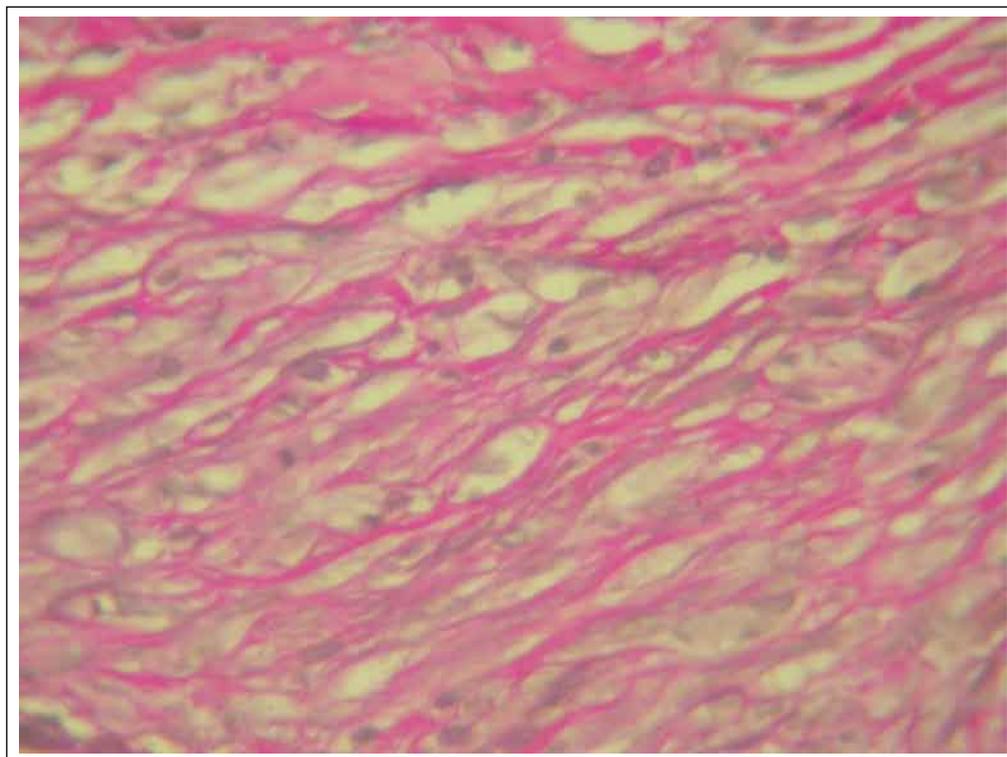


Рис. 6. Экспериментальная травма пяточного сухожилия с инъекцией диспергированного сухожильного биоматериала Аллоплант. 14 сутки. Полиморфноклеточная инфильтрация. Новообразованные коллагеновые волокна, окрашенные в красный цвет. Окраска по Ван - Гизону. Об. 60, Гом. – 3.*

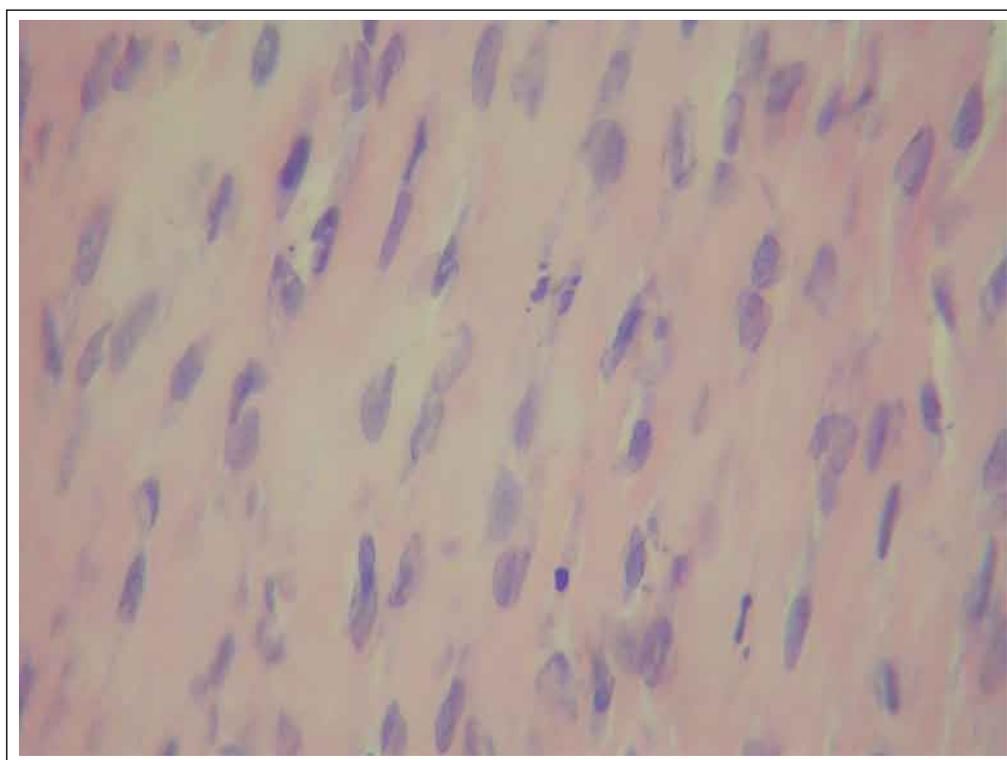


Рис. 7. Экспериментальная травма пяточного сухожилия с инъекцией диспергированного сухожильного биоматериала Аллоплант. 30 сутки. Дифференцированные фибробласты с уплощёнными в продольном направлении ядрами. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 40, окуляр 20*.*

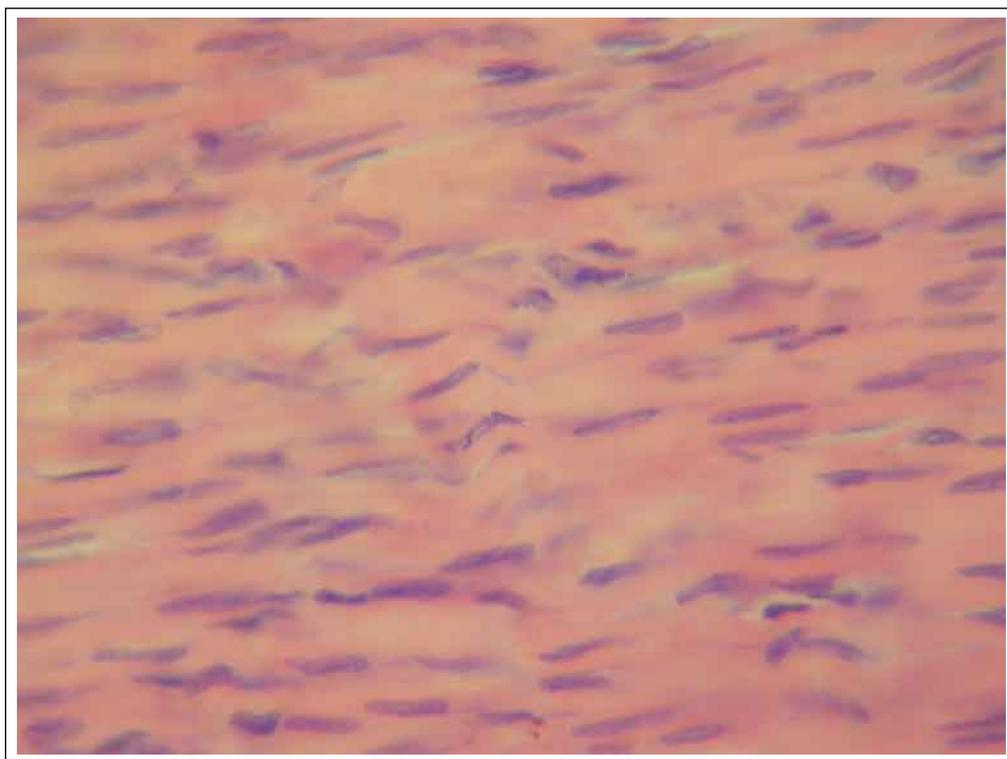


Рис. 8. Экспериментальная травма пяточного сухожилия с инъекцией диспергированного сухожильного биоматериала. 90 сутки. Пучки коллагеновых волокон I и II порядков, дифференцированные фибробласты с вытянутыми ядрами. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 40, окуляр 20*.*

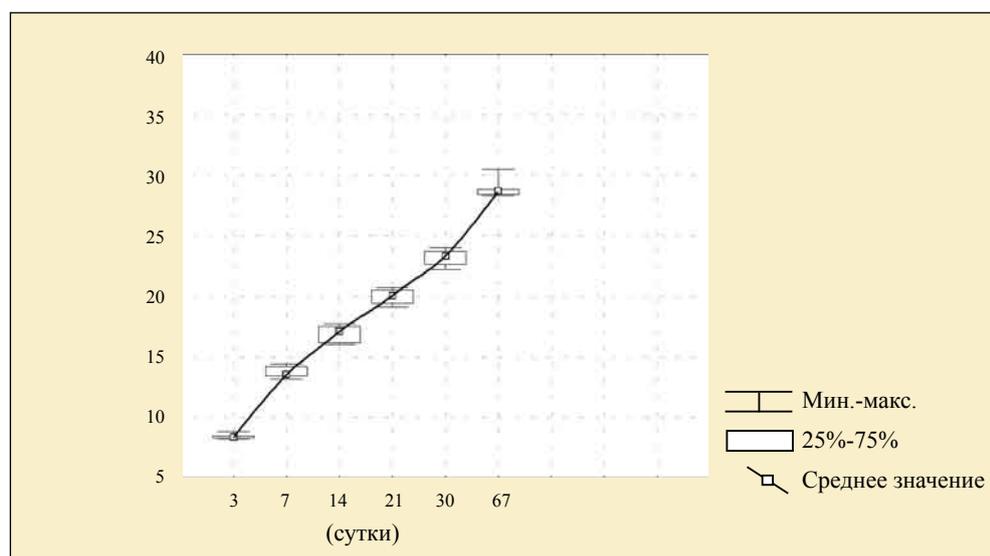
На месте трансплантации во второй серии эксперимента происходит формирование регенерата, при этом увеличивается толщина пучков волокон коллагена в регенерате с $8,4 \pm 0,2$ (0,2) мкм на 3 сутки до $20,0 \pm 0,6$ (1,1) и достигает наибольшего значения – $29,1 \pm 0,7$ (0,4) мкм на 67 сутки.

В первой серии эксперимента динамика увеличения толщины пучков волокон коллагена отличается от таковой в опыте. На 3 сутки этот показатель составляет $7,3 \pm 0,2$ (0,2) мкм, затем на 30 сутки он составляет $16,6 \pm 0,5$ (0,3), и лишь на 90 сутки достигает значения близкого к норме – $28,8 \pm 0,7$ (0,4) мкм. На рисунке 9 (а,б) представлена динамика изменения толщины коллагеновых волокон в формирующемся регенерате в основной и первой серии эксперимента.

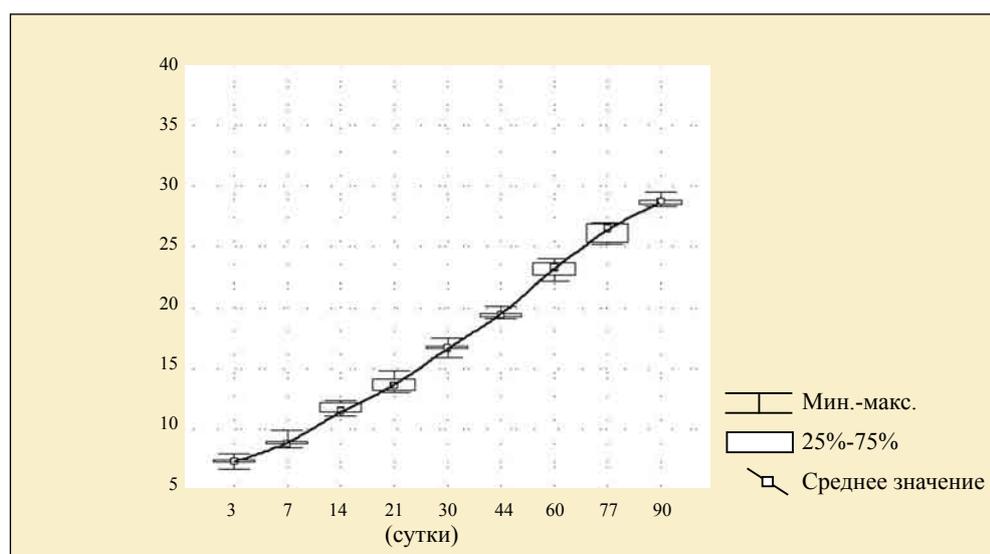
Разработанный нами метод определения коэффициента дифференцировки фибробластов показал следующие результаты. Во второй серии эксперимента в трансплантате на 7 сутки коэффициент был равен $0,75 \pm 0,03$ (0,05)

и достигает минимума на 90 сутки $0,26 \pm 0,03$ (0,05), тогда как в норме этот показатель равен $0,23 \pm 0,03$ (0,06).

В первой серии эксперимента коэффициент дифференцировки на 3 сутки равен $0,821 \pm 0,03$ (0,06), далее он изменяется до $0,6 \pm 0,03$ (0,05) к 30 суткам, а на 90 сутки имеет значение $0,32 \pm 0,03$ (0,05). Следовательно, в данной серии эксперимента в те же сроки фибробласты менее зрелые, чем в опыте. На *рисунке 10 (а,б)* показана динамика изменения величины коэффициента дифференцировки фибробластов в формирующемся регенерате первой и второй серии эксперимента.



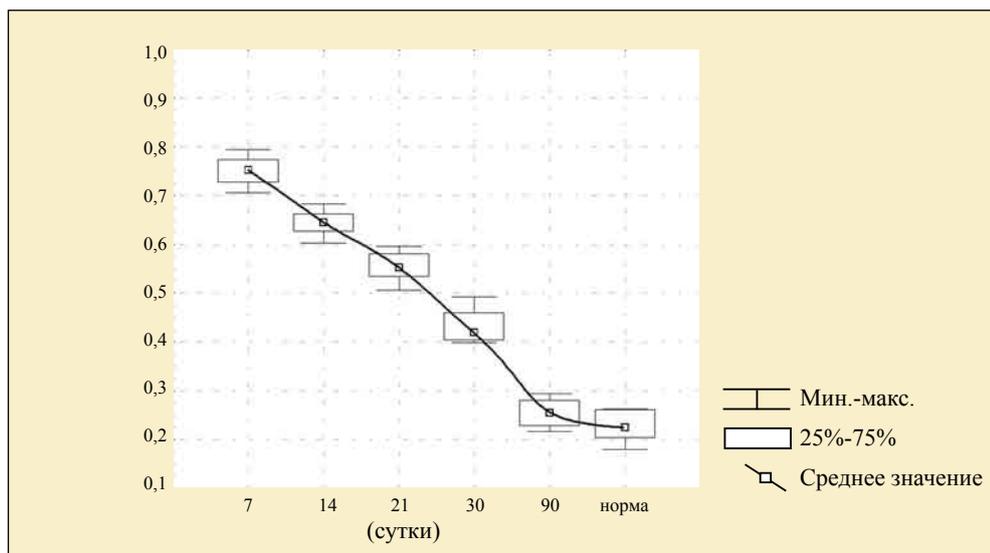
9а



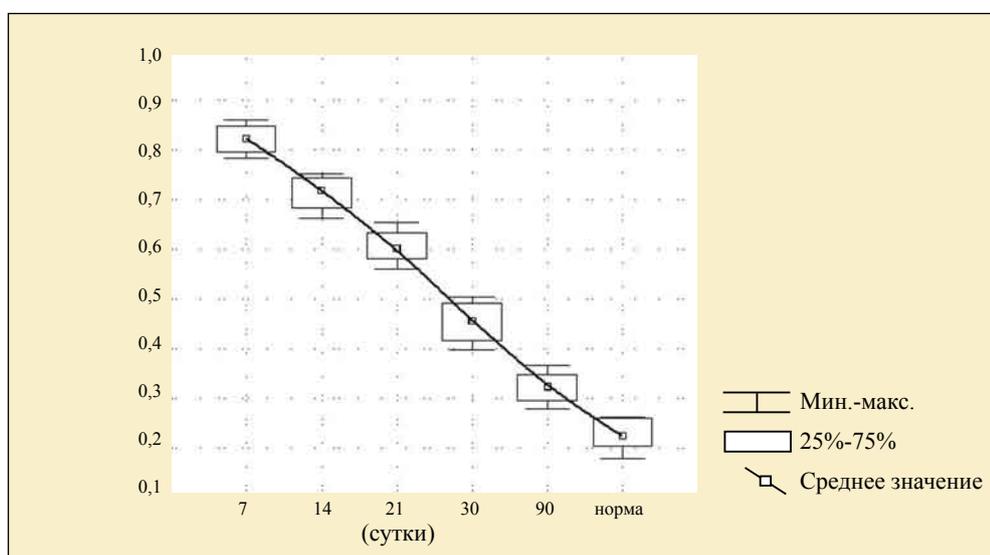
9б

Рис. 9. Динамика изменения толщины пучков коллагеновых волокон в формирующемся регенерате.

9а - первая серия эксперимента; 9б - вторая серия эксперимента.



10a



10б

Рис. 10. Динамика изменения величины коэффициента дифференцировки фибробластов в формирующемся регенерате.

10а - первая серия эксперимента; 10б - вторая серия эксперимента.

Выводы. 1. Пересадка аллогенного сухожильного биоматериала и ДБМА – «стимулятора регенерации» способствует эффективному восстановлению структуры сухожилия.

2. При трансплантации данных видов биоматериала достигается прочность регенерата необходимая для выполнения функции сухожилия.

3. Отсутствие рубцевания в зонах трансплантации обоих видов биоматериала, восстановление скользящих структур позволили рекомендовать данные трансплантаты для применения в клинической практике при травмах сухожилий.

ЛИТЕРАТУРА

1.Лаврищева Г.И., Оноприенко Г.А. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей. – М.: Медицина, 1996. – с. 49- 57, 176-181.

2.Казарезов М.В., Королева А.М., Головнев В.А., Акрамов Э.Х., Габитов В.Х. Восстановительная хирургия повреждений опорно-двигательного аппарата. – М.: Новосибирск, НГМА, 2004. – с. 56-63.