
Морфологические основы применения сухожильного трансплантата в реконструктивной хирургии

В.У. ГАЛИМОВА, В.Г. ГАФАРОВ, Ю.С. ХАСАНОВА, И.Р. ИШМУРАТОВА, А.Р. МУХАМЕТОВ, Н.Н. АСЛЯМОВ

ФГУ «Всероссийский Центр глазной и пластической хирургии Росздрава»
МУ «Стоматологическая поликлиника №2»

Уфа, Россия

РЕФЕРАТ. С использованием экспериментальных методов доказано, что аллогенные сухожильные биоматериалы Аллоплант могут использоваться при выполнении реконструктивных операций на мышцах. Авторы рекомендуют данный биоматериал для применения в практике челюстно-лицевой и пластической хирургии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сухожильные биоматериалы Аллоплант, реконструкция скелетных мышц

ВВЕДЕНИЕ

В настоящей статье приводятся результаты двух серий экспериментов по трансплантации сухожильного биоматериала в мышечное ложе.

В первой серии производилась пересадка аллогенного сухожилия в форме нити. Во второй серии кроме трансплантации структурированного биоматериала производилась инъекция в тканевое ложе диспергированной формы аллогенного сухожилия, подвергнутого обработке и стерилизации по технологии Аллоплант.

МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПРИ ТРАНСПЛАНТАЦИИ АЛЛОГЕННЫХ СУХОЖИЛЬНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ

Данный раздел работы выполнялся на половозрелых крысах породы «Вистар». В первой серии опытов лабораторным животным производилась аллотрансплантация сухожильного биоматериала в форме нити в толщу камбаловидной мышцы. Во второй серии опытов также пересаживался сухожильный биоматериал, ложе биоматериала об-

кальвалось диспергированным биоматериалом «Стимулятор регенерации». В качестве трансплантата использовали биоматериал, приготовленный по технологии Аллоплант (патент РФ № 2043078, МПК А 61 В 17/56, опубл. 10.09.1995) на основе аллогенного сухожилия лабораторных крыс. При этом сухожильная нить с помощью иглы проводилась через мышечное брюшко камбаловидной мышцы и фиксировалась узловыми швами в месте вкола иглы (к брюшку мышцы) и к пяточному сухожилию крысы. Для основной и контрольной групп аллогенные биоматериалы готовились в тканевом банке ФГУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (г. Уфа) в соответствии с требованиями ТУ 42-2-537-2002 (диспергированный биоматериал «Стимулятор регенерации») и ТУ 9431-001-27701282-2002 (биоматериал для фиксирующей пластики).

Аллоплантат «Стимулятор регенерации» в количестве 50 мг разводился в 5-10 мл физиологического раствора и вводился перифокально в область дефекта в две точки по 0,02-0,04 мл. Диспергированный биоматериал — продукт тонкого измельчения различных соединительнотканых образований после предварительной физико-химической обработки и лиофилизации. Дисперсность измельченных частиц биоматериала составляет 45-120 мкм. Исследования показали сохранение тинкториальных свойств типичных для зрелых коллагеновых волокон, также сохранение нативной структуры коллагеновых волокон и фибрилл.

Биоматериал для фиксирующей пластики в форме нити (тонкий USP – 2-8, EP – 5-10, диаметр 0,5-1,0 мм) использовался в первой и второй опытных сериях в качестве структурированного сухожильного трансплантата.

Выбор данных биоматериалов связан с тем, что существенную роль в поддержании механических и биологических свойств соединительнотканых структур играет содержащийся в них комплекс гликозаминогликанов. Благодаря своим свойствам они стимулируют репаративную регенерацию соединительной ткани, регулируют процесс роста и дифференцировки клеток, а также фибриллогенез волокнистых структур (Серов В.В., Шехтер А.Б., 1981).

Так, суммарное количество протеогликанов и гликозаминогликанов в диспергированном биоматериале «Стимулятор регенерации» составляет 3,46%. В составе протеогликанов преобладают гепарансульфат и хондроитинсульфат (0,59% и 0,44%

соответственно). Электрофоретический анализ водных экстрактов диспергированного биоматериала показал, что в период от 24 до 72 часов более 70 % общего количества экстрагируемых гликозаминогликанов составляет гепарансульфат. Установлено, что оптимальной для инъекции концентрацией диспергированного биоматериала, при которой образуется стабильная суспензия с хорошими реологическими свойствами, является 40 мг /мл (Хасанов Р.А., 1999).

Динамику структурных изменений изучали на 3, 7, 14, 30 и 90-е сутки эксперимента. Всего для проведения эксперимента использовано 86 лабораторных крыс. Гистологические срезы сухожилий аллотрансплантата и мышечного ложа, полученные в разные сроки эксперимента, окрашивались по Ван-Гизону, гематоксилином и эозином, по Маллори, проводилась поляризационная микроскопия. Для морфометрии использовались программа Biovision Professional 3.0 (West Medica).

Исследование проводилось с помощью поляризационного микроскопа Мин.-8. Микрофотографирование препаратов производилось с использованием микрофотонасадки МФН 10 при увеличении объектива 60 и 20 и гомаль 3.

Проводилась также световая микроскопия с использованием микроскопа Micros (MC-50) с цифровой фотонасадкой Nikon. Полученные фотоснимки передавались с Flash-карты фотоаппарата в ПК для дальнейшей обработки. С помощью предварительно откалиброванной на объектив 40* программы Biovision производилось измерение толщины пучков коллагеновых волокон и длин осей ядер фибробластов. Полученные результаты автоматически переводились в программу Microsoft Office Excel 2003 для устранения производственных погрешностей, далее в программу Statistica 5.5 (StatSoft) для построения графиков.

Морфологические процессы при пересадке аллогенного сухожильного трансплантата в форме нити

В ранние сроки (на 3-7 сутки) структура трансплантата сохранена на всем его протяжении. Обнаруживается реакция тканевого ложа на аллотрансплантат. В краевых зонах выявляется полиморфноклеточная инфильтрация, что свидетельствует о высоком уровне обменных процессов в области трансплантации и выраженной регенерационной способности тканевого ложа биоматериала. Основную часть инфильтрата составляют недифференцированные

соединительнотканые клетки, макрофаги, реже встречаются нейтрофилы. Данная полиморфноклеточная инвазия происходит вдоль пучков волокон трансплантата и распространяется от периферии к центру. При этом в тканевом ложе аллотрансплантата выделяются три зоны: реактивная, краевая и контактная. Между тканевым ложем и аллотрансплантатом происходит плотная адгезия.

В краевой зоне плотность клеточного инфильтрата незначительная, в его составе также доминируют недифференцированные соединительнотканые клетки. Продолжением краевой зоны является контактная зона. Данная зона представлена линией адгезии и не содержит детрита.

Из контактной зоны клетки внедряются в трансплантат между пучками волокон. Недифференцированные соединительнотканые клетки мигрируют по внеклеточному матриксу эндо- и перимизия в направлении трансплантата (рис. 1).

На 14-е сутки, в периферической зоне трансплантата происходит замещение его структур тканями реципиента.

Зона замещения по периметру трансплантата расширяется. В тканевом ложе признаки воспаления заметно стихают. В краевой зоне тканевого ложа снижается выраженность клеточной инфильтрации. Уменьшение воспаления тканевого ложа в данный срок объясняется слабой антигенностью трансплантата. По-видимому, воспалительные процессы в тканевом ложе и, в частности, присутствие клеток, характерных для воспалительного инфильтрата, в данном эксперименте обусловлены операционной травмой. На 14-е сутки эксперимента приходится пик инфильтрации тканей недифференцированными соединительноткаными клетками, их количество равно $21,8 \pm 0,37$ [1,18].

На 30-е сутки определяются признаки фиксации мышечных волокон тканевого ложа к трансплантату. На месте трансплантата обнаруживаются новообразованные коллагеновые волокна. Воспалительные процессы на данном этапе завершаются, о чём свидетельствует снижение числа макрофагов в области имплантации.

Оценивая в описываемые сроки общую динамику морфологических процессов, следует выделить два основных показателя:

- морфологические явления в аллосухожильном трансплантате.
- структурные изменения в тканевом ложе скелетной мышцы.

В трансплантате происходят характерные процессы заместительной регенерации. При этом пучки волокон трансплантата поэтапно замещаются новообразованными волокнами регенерата.

Со стороны тканевого ложа происходит пролиферация мезенхимальных клеток эндо- и перимизия в направлении пучков волокон трансплантата. При этом происходит своеобразное моделирование всех соединительно-тканых структур, характерных для мышцы как органа. Другими словами, происходит органотипическая перестройка тканевого ложа в области аллотрансплантата с образованием

Рис. 1. Экспериментальная аллотрансплантация структурированного сухожильного биоматериала. 3-е сутки. 1 - недифференцированные соединительнотканые клетки, 2 - мышечные волокна. Поляризационная микроскопия. Об. 60, гом. 3

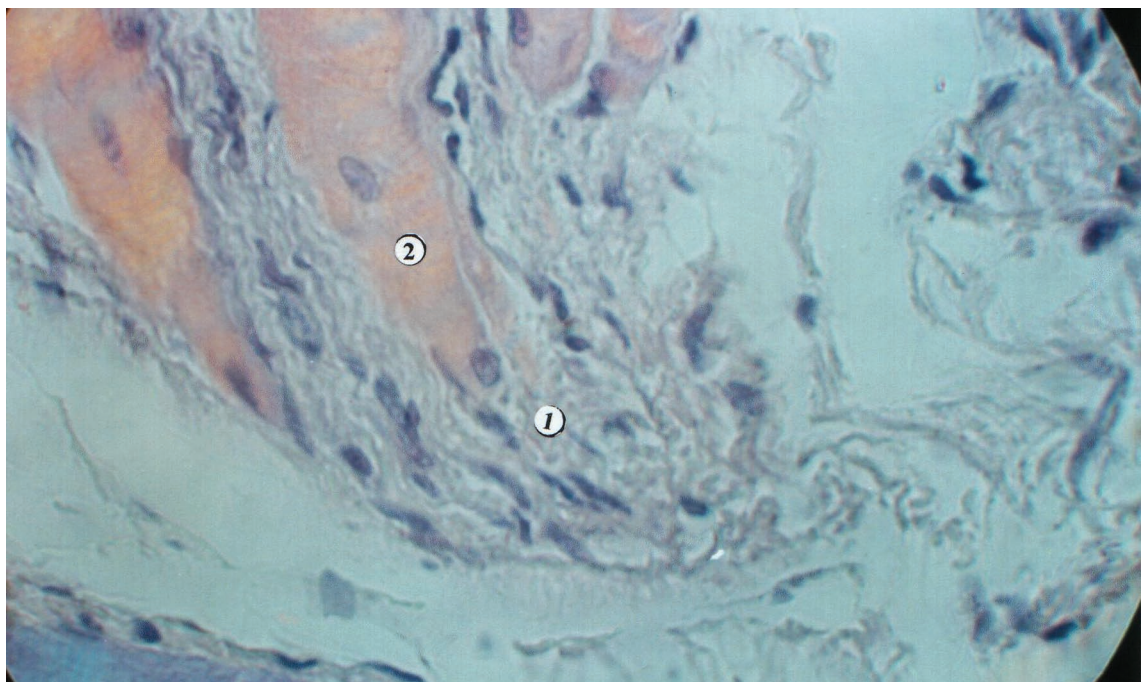
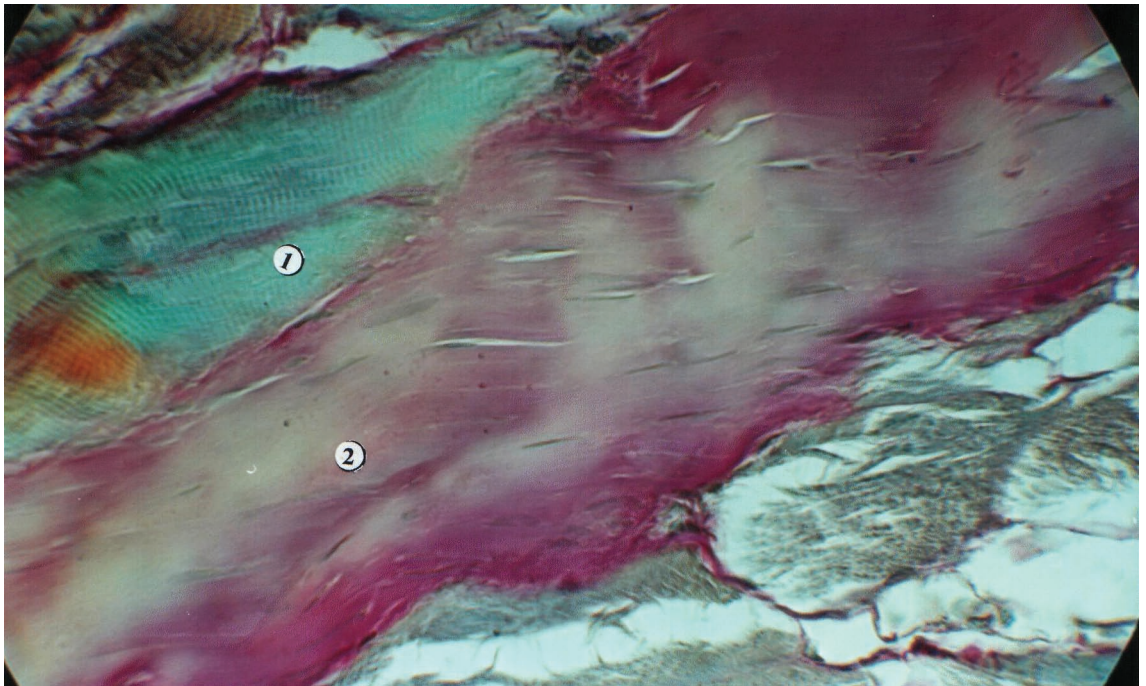


Рис. 1. Экспериментальная аллотрансплантация структурированного сухожильного биоматериала. 3-е сутки. 1 - недифференцированные соединительнотканые клетки, 2 - мышечные волокна. Поляризационная микроскопия. Об. 60, гом. 3

Рис. 2. Экспериментальная аллотрансплантация структурированного сухожильного биоматериала. 90-е сутки. Миофибриллы подрастают к регенерату. 1- мышечные волокна, 2- сухожильный регенерат. Поляризационная микроскопия. Об. 40, гом. 3



дополнительной точки опоры мышечного брюшка на биоматериале.

Комбинируя метод поляризационной микроскопии и окраски гистологического среза гематоксилином и эозином, удастся выявить процессы миграции недифференцированных соединительнотканых клеток из эндомизия к трансплантату аллогенного сухожилия.

На 60-е сутки завершаются процессы замещения трансплантата: по его окружности по межпучковым пространствам и между отдельными волокнами в направлении центра происходит миграция фибробластов и фиброкластов. Сохранившиеся волокна играют ведущую роль в ориентации новообразованных фибрилл и в обеспечении биомеханических параметров замещающегося трансплантата. В процессах регенерации, вероятно, принимают участие и миосателлиты, мигрирующие в данную область трансплантации по структурам эндомизия. Продолжается ремоделирование мышечных волокон и фиксация их к трансплантату.

На 90-е сутки трансплантат полностью замещён тканями реципиента (рис. 2). В финале репаративных процессов происходит интеграция мышечных волокон тканевого ложа и сформированного регенерата. При этом регенерат представлен плотной оформленной волокнистой соединительной тканью по структуре — тканью сухожилия. В структуре преобладают пучки коллагеновых волокон I и II порядков. Между пучками коллагеновых волокон располагаются теноциты — результат дифферен-

цировки мигрировавших в область трансплантации мезенхимальных клеток.

В области формирования регенерата происходит постепенное снижение количества недифференцированных соединительнотканых клеток до $6,5 \pm 0,3$ [0,96] на 60-е сутки и до $3,2 \pm 0,25$ [0,78] на 90-е сутки.

Аллотрансплантация структурированного биоматериала в мышечное ложе с одновременным локальным введением диспергированного биоматериала

В ранние сроки (3-7 сутки) наблюдается полиморфноклеточная инфильтрация структурированного биоматериала. В эти же сроки обнаруживается набухание и гомогенизация коллагеновых волокон трансплантата, свидетельствующие о начинающейся деградации введённых частиц, биоматериала.

В дальнейшем деградация коллагеновых волокон трансплантата и фагоцитоз лизированных фрагментов макрофагами приобретают более интенсивный характер. Наибольшая концентрация макрофагов наблюдалась в зоне контакта частиц диспергированного биоматериала с окружающими тканями. Примечательно, что макрофаги, фагоцитировавшие продукты распада коллагеновых волокон трансплантата, обнаруживались также в окружающих тканях, что свидетельствует об их миграции. Постепенно по межпучковым пространствам и между отдельными волокнами в направлении центра мигрируют макрофаги, фибробласты и

фиброкласты. Количество камбиальных соединительнотканых клеток составляет $20,5 \pm 0,34$ [1,08].

На 14-е сутки выявляются волокна коллагена окрашиваемые в красный цвет по Ван-Гизону. Сохранившиеся волокна трансплантата играют ведущую роль в ориентации новообразованных фибрилл и в обеспечении биомеханических параметров замещающегося трансплантата.

Выявляется также миграция миосателлитоцитов вдоль мышечных волокон тканевого ложа трансплантата.

На 60-е сутки происходит полная резорбция частиц диспергированного биоматериала, и они уже гистологически не обнаруживаются. Большая часть резорбированного биоматериала замещалась новообразованной плотной соединительной тканью, по структуре мало отличающейся от окружающей. Также происходит активное формирование дополнительной опоры для мышечного брюшка трансплантата с фиксацией мышечных волокон к биоматериалу через структуры эндо- и перимизия. В данной серии процессы замещения трансплантата и ремоделирования мышцы протекают быстрее.

На 90-е сутки приходится финал репаративных процессов. Заканчивается формирование регенерата в виде плотной оформленной волокнистой соединительной ткани. Вокруг трансплантата формируется структура подобная перистой мышце с эндо- и перимизием. Заместительная регенерация в области аллотрансплантации завершается формированием органотипического регенерата сухожилия.

Таким образом, в данной статье описаны процессы заместительной регенерации при пересадке структурированного и диспергированного сухожильного биоматериала в мышечное ложе. Имеющийся в нашем распоряжении материал позволяет предположить, что источником репаративной регенерации сухожилий, структур эндо- и перимизия являются недифференцированные соединительнотканые клетки. По-видимому, количество последних является важным фактором определяющим динамику репаративной регенерации. В финале эксперимента происходит естественное снижение числа мезенхимальных клеток, пришедших в область трансплантации биоматериала для дальнейшей дифференцировки. На этапах заместительной регенерации происходит изменение формы самой клетки и формы её ядра. При диф-

ференцировке соединительнотканной клетки она уплощается, удлиняется и ядро клетки.

Наиболее активно процессы заместительной регенерации происходят при трансплантации диспергированной формы биоматериала. Основная часть камбиальных клеток тканевого ложа биоматериала активно мигрирует в зону введения диспергированного биоматериала и дифференцируется в клетки фибробластического дифферона, образуя структуры эндо- и перимизия.

Соединительнотканые клетки синтезируют волокнистые компоненты внеклеточного матрикса, которые образуют единый соединительнотканый комплекс со структурированным трансплантатом. Это приводит к формированию дополнительной фиксирующей и опорной структуры мышцы. Имплантированный ленточный трансплантат можно фиксировать на любой костной или иной соединительнотканной опоре

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, итогом регенеративных процессов в обеих сериях экспериментов является формирование органотипических структур мышцы вокруг аллотрансплантатов. При этом сухожильный трансплантат становится дополнительной опорой для мышечных пучков.

Комбинированное применение структурированного трансплантата сухожилия совместно с инъекционной формой является наиболее оптимальным сочетанием при ремоделировании скелетных мышц.

Проведенные экспериментальные исследования позволили разработать новые пластические операции в кранио-фациальной области. В частности, Э.А. Салихов (2005) обосновал технику реконструкции лобной мышцы с целью фиксации к ней хряща верхнего века при птозе. Используемый для данной операции трансплантат сухожилия позволяет сформировать опору на мышечном брюшке в виде дополнительной головки.

Возможности полной реконструкции скелетных мышц с формированием её дополнительной головки и новой точки фиксации, например, на нижней челюсти, может быть использовано при выполнении пластических операций в практике челюстно-лицевой хирургии.