

**Шангина О.Р., Хасанов Р.А., Булгакова Л.А.**  
ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии»  
Министерства здравоохранения России, г. Уфа  
E-mail:aloolga@mail.ru

## **ЗАКОНОМЕРНОСТИ ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУРЫ ЛИОФИЛИЗИРОВАННЫХ СОЕДИНИТЕЛЬНОТКАННЫХ АЛЛОТРАНСПЛАНТАТОВ**

**Проведен анализ структуры волокнистого остова лиофилизированных аллотрансплантатов изготовленных из ахиллового сухожилия, широкой фасции бедра, твердой оболочки головного мозга, гиалинового хряща, дермы опорных участков стопы. Установлена зависимость структурных изменений аллотрансплантатов от степени гидратированности аморфного матрикса и специфичности фиброархитектоники.**

**Ключевые слова:** донорские ткани, соединительнотканые аллотрансплантаты, лиофилизация, фиброархитектоника.

### **Актуальность**

В настоящее время применение донорских тканей для трансплантации получило всеобщее признание, так как они являются ценным пластическим материалом. Успех пересадок аллогенных тканей зависит не только от техники хирурга, но и от особенностей аллотрансплантата, которые определяются выбором ткани, а так же применением соответствующей технологии консервации [2,13,7]. Важно отметить, что видоспецифичность тканей и их свойства, а так же методы консервации, имеют основополагающее значение в процессах трансформации при пересадке [6,1,11]. Установлено, что определяющим фактором структуры формирующейся ткани на месте пересаженного трансплантата является его фиброархитектоника [3].

Каждая ткань в зависимости от своей структуры и биохимического состава нуждается в особом, соответствующем данной ткани, методе консервации [10,5,12]. Одним из широко используемых методов физико-химической обработки донорских тканей является лиофилизация. По мнению В.И. Савельева с соавторами (2004), в процессе лиофилизации ткани приобретают устойчивость к факторам внешней среды и способность сохранять комплекс структурных и биохимических качеств, важных с трансплантационной точки зрения. Однако имеются данные об отрицательном влиянии лиофилизации на пластические свойства биологических тканей [4,8].

### **Цель исследования**

Провести морфологическую оценку фиброархитектоники волокнистого остова соединительнотканых аллотрансплантатов, прошедших процесс лиофилизации.

### **Материалы и методы**

Для исследования были изготовлены лиофилизированные соединительнотканые аллотрансплантаты из ахиллового сухожилия (АС), широкой фасции бедра (ФБ), твердой оболочки головного мозга (ТМО), гиалинового хряща (ГХ), дермы опорных участков стопы (ДП). Контрольной группой явились нативные образцы соответствующих тканей.

Для получения лиофилизированных соединительнотканых трансплантатов исходные донорские ткани замораживали в криогенной камере до  $-45^{\circ}\text{C}$  и высушивали под вакуумом (остаточное давление 10 мТорр) при помощи лиофильной сушилки Dry Winner DW-6 (Heto Holten, Дания).

Для гистологических исследований структуры соединительной ткани образцы фиксировали в 10% нейтральном формалине. Обезвоживание и заливку в парафин проводили по общепринятой методике. Гистологические срезы окрашивали по Ван Гизону и по Маллори.

Оценка фиброархитектоники соединительнотканых аллотрансплантатов проводилась способом количественного поляризационно-оптического анализа. Данный метод основан на способности волокнистых компонентов соединительной ткани к двойному лучепреломлению.

Сравнительный анализ ультраструктуры лиофилизированных и нативных образцов проводили методом сканирующей электронной микроскопии.

Количественные показатели (толщину коллагеновых волокон и ширину межпучковых пространств) определяли морфометрическим методом.

### **Результаты и обсуждение**

Результаты проведенных нами морфологических исследований показали, что лиофилизация оказывает неоднозначное влияние на структуру соединительнотканых аллотрансплантатов.

Особенность фиброархитектоники ахиллового сухожилия в нативном виде определяется плотной упаковкой пучков коллагеновых волокон I порядка (толщиной 3-5 мкм) и II порядка (толщиной 30-50 мкм), ориентированных строго в одном направлении. Волокна формируются из фибрилл, за счет которых образуется складчатость на их поверхности. Коллагеновые волокна постоянно разветвляются, и часть составляющих их фибрилл переходит в состав смежных волокон. Пучки коллагеновых волокон пересекаются тонкими волоконцами, образуя сплетения на их поверхности. Поперечно расположенные волокна образуют связочную систему сухожилий.

Лиофилизация аллотрансплантатов ахиллового сухожилия приводит к дегидратации аморфного матрикса, окружающего коллагеновые волокна. В образцах наблюдаются продольно ориентированные коллагеновые волокна, толщина которых не превышает 20 мкм, межпучковые пространства достигают 40 мкм. При поляризационной микроскопии выявляются типичные сетчатые структуры, с размерами ячеек до 60 мкм. В целом лиофилизированный аллотрансплантат АС приобретает строевые губки, то есть теряет исходную однонаправленную пучковую организацию коллагеновых волокон. Однако структура самих коллагеновых волокон сохраняется, о чем свидетельствует присущая им анизотропия.

Фиброархитектоника контрольного образца широкой фасции бедра представлена тремя хорошо выраженными слоями. Каждый слой состоит из плотно упакованных пучков коллагеновых волокон, толщина которых варьирует от 40 до 100 мкм, пространства между пучками – 10 мкм. Между слоями находятся солитарные пучки, связывающие слои. Пучки коллагеновых волокон внутри слоя параллельны друг другу и ориентированы в одном направлении, но не совпадают с направлениями пучков в соседних слоях.

Данные проведенных исследований лиофилизированных аллотрансплантатов широкой

фасции бедра свидетельствуют о том, что их фиброархитектоника значительно отличается от таковой нативных образцов. После лиофилизации аллотрансплантатов ФБ происходят выраженные структурные преобразования. Пучки коллагеновых волокон расположены отдельными крупными фрагментами с измененными тинкториальными свойствами, что свидетельствует об их частичной деструкции. Величина межпучковых пространств колеблется от 20 до 50 мкм. Солитарные пучки приобретают вид рыхлой сети, участки которой чередуются с небольшими фрагментами плотных пучков коллагеновых волокон.

Нативная твердая оболочка головного мозга представляет собой плотно оформленную соединительную ткань, состоящую из 2-4 слоев пучков коллагеновых волокон, толщина которых варьирует от 20 до 90 мкм. В каждом слое волнообразные пучки коллагеновых волокон проходят параллельно в одном направлении, отличном от направлений в соседних слоях. Отдельные пучки волокон, расстояние между которыми около 10 мкм, переходят из одного слоя в другой, связывая их между собой. Пучки коллагеновых волокон сопровождают эластические волокна, которые образуют рыхлую сеть, состоящую из тонких крупных ячеек.

Исследования лиофилизированных образцов аллотрансплантатов твердой оболочки головного мозга показали, что их фиброархитектоника претерпевает выраженные изменения. Лиофилизированные аллотрансплантаты ТМО приобретают вид рыхлой мелкоячеистой сети (размеры ячеек достигают 30 мкм), что свидетельствует о нарушении волокнистого каркаса. Коллагеновые пучки расщепляются на волокна различной толщины (от 5 до 20 мкм) и приобретают вид тонких волнообразно изогнутых нитей, ориентированных в одном направлении. Очертания слоев, характерные для данной ткани, не просматриваются.

Нативные образцы дермы опорных участков стопы имеют коллагеново-волокнистый каркас, образованный извилистыми, способными к растяжению, волокнами. Часть волокон объединяется в пучки первого и второго порядков (толщина пучков первого порядка – 1 мкм; второго – 8-20 мкм), имеющие небольшую извилистость. Основные волокна связаны между собой слаборазвитой системой тонких связочных волокон.

Пучки коллагеновых волокон, переплетенные во всех направлениях, имеют сложную пространственную архитектуру. В глубоких слоях дермы преимущественное направление пучков более отвесное, пучки волокон перекрещиваются друг с другом под разными углами к плоскости препарата. Несмотря на преобладание волокон, наблюдается значительное количество фибрилл, существующих самостоятельно, т. е. не объединенных в волокна. Расположение волокнистых элементов без определенной геометрической закономерности образует неориентированный тип коллагенового остова.

Гистологические исследования лиофилизированных аллотрансплантатов ДП показали, что их фиброархитектоника сохраняет сложную пространственную организацию. Коллагеновые пучки имеют извилистый ход и связаны между собой редкой сетью связочных волокон. Сохранность структуры лиофилизированных аллотрансплантатов ДП подтверждается, в частности, высокой оптической анизотропией коллагеновых волокон при поляризационной микроскопии.

Структура нативного гиалинового хряща представлена чередующимися участками территориального и межтерриториального матрикса. В территориальном матриксе расположены лакуны (диаметр равен 20 мкм), стенки которых сформированы переплетенными коллагеновыми фибриллами. Наружные волокна стенок лакун переходят непосредственно в волокнистый каркас межтерриториального матрикса, который состоит из густой сети коллагеновых фибрилл, не объединенных в волокна. Фибриллы имеют спиральную форму и толщину от 20 до 150 нм.

Процесс лиофилизации не повлиял на фиброархитектонику волокнистого остова гиалинового хряща. Данные поляризационной микроскопии демонстрируют высокую оптическую активность коллагеновых фибрилл перицеллюлярной капсулы и межтерриториального матрикса. На сканограммах отчетливо видны коллагеновые фибриллы, переплетенные в едином непрерывном волокнистом остове.

### **Заключение**

Проведенный нами анализ фиброархитектоники лиофилизированных соединитель-

нотканых аллотрансплантатов показал, что модификация волокнистого остова с формированием ячеистых структур наблюдается у трансплантатов ахиллова сухожилия, широкой фасции бедра и твердой оболочки головного мозга. В тоже время, структура аллотрансплантатов дермы и хряща после лиофилизации сохраняется. Неоднозначность изменений, происходящих в волокнистом остове аллотрансплантатов, связана, на наш взгляд, со специфичностью их фиброархитектоники. Так, аллотрансплантаты ахиллового сухожилия, широкой фасции бедра и твердой оболочки головного мозга относятся к плотной оформленной соединительной ткани, для которой характерно наличие большого количества плотно упакованных пучков коллагеновых волокон при слабо выраженном аморфном матриксе. Высушивание тканей в процессе лиофилизации приводит к дегидратации аморфного матрикса, окружающего коллагеновые волокна. В результате этого, в зависимости от степени начальной гидратированности аморфного матрикса, происходят те или иные структурные преобразования тканей. Сложная пространственная организация аллотрансплантатов дермы, наличие основного вещества, которое составляет значительную часть ткани и в которое погружены коллагеновые волокна, все это способствует сохранению структуры данной ткани. Способность аллотрансплантатов хряща сохранять в процессе лиофилизации фиброархитектонику определяется, по-видимому, гетерогенностью его структуры. Значительную часть данной ткани составляет внеклеточный аморфный матрикс, обладающий высокой степенью гидратации, кроме того, в хряще преобладает коллаген второго типа, волокна которого не образуют пучков.

Таким образом, результаты наших исследований показали, что характер и выраженность структурных изменений, происходящих в соединительнотканых аллотрансплантатах после лиофилизации, зависят от степени гидратированности аморфного матрикса, а так же от специфичности фиброархитектоники ткани.

7.02.2013

**Список литературы:**

1. Дунаев П.В. Органоспецифическая детерминация и индуктивные свойства генетически родственных тканей в онтогенезе // Российские морфологические ведомости. – 1999. – №1-2. – С. 63.
2. Клен Р. Заготовка и консервирование тканей. – Прага: Государственное изд-во мед. лит-ры, 1962. – 316 с.
3. Коваленко П.П. Пересадка тканей и органов. Ростов н/Д. 1976. – 48 с.
4. Крыстинов Г. Консервирование и трансплантация тканей и органов. – София: Медицина и физкультура, 1975. – Т. II. – 426 с.
5. Мулдашев Э.Р. Теоретические и прикладные аспекты создания аллотрансплантатов серии «Аллоплант» для пластической хирургии лица: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – СПб., 1994. – 40 с.
6. Нигматуллин Р.Т. Морфологические аспекты пересадки соединительнотканых трансплантатов: автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – Новосибирск, 1996. – 40 с.
7. Нигматуллин Р.Т. Очерки трансплантации тканей. – Уфа: Ксерокс СТМ, 2003. – 160 с.
8. Подопригора Р.Н. Методы консервации донорского материала // Новые технологии микрохирургии глаза. – 2004. – №38. – С. 100.
9. Савельев В.И., Калинин А.В. О выборе экспериментальной модели для сравнительной оценки различных методов стерилизации и консервации биологических тканей // Клинические и фундаментальные аспекты клеточных и тканевых биотехнологий: матер. II Всерос. симп. – Самара, 2004. – С. 55.
10. Саутин Е.П. Заготовка, консервация и стерилизация тканей // Клиника, диагностика и лечение заболеваний и повреждений опорно-двигательного аппарата. – М., 1982. – С. 77-79.
11. Шангина О.Р. Морфологические основы радиационной устойчивости соединительнотканых трансплантатов: автореф. дис. ... д-ра биол. наук. – Саранск, 2007. – 34 с.
12. Шангина О.Р., Хасанов Р.А. Биоматериалы «Alloplant®»: Технологии и стандарты // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: Сборник тезисов IV Всерос. симп. – СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2010. – С. 138-139.
13. Komender J., Marczynski W., Tylman D., Malczewska H., Komender A., Sladowski D., Preserved tissue allografts in reconstructive surgery // Cell and Tissue Banking. – 2001. – Vol. 2, №2. – P. 103-112.

Сведения об авторах:

**Шангина Ольга Ратмировна**, зам. ген. директора по производству биоматериалов  
ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России,  
доктор биологических наук, профессор, e-mail: aloolga@mail.ru

**Хасанов Руслан Алмазович**, ведущий научный сотрудник лаборатории консервации тканей ФГБУ  
«Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России; e-mail: khrusall@mail.ru

**Булгакова Людмила Александровна**, научный сотрудник лаборатории консервации тканей  
ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России,  
e-mail: mila.bulg@list.ru

450075, г.Уфа, ул. Р. Зорге 67/1, тел.: (347) 232-88-89; факс: (347) 232-80-58

**UDC 616 – 089.843**

**Shangina O.R., Khasanov R.A., Bulgakova L.A.**

E-mail: aloolga@mail.ru

**REGULARITIES OF THE STRUCTURE CHANGES OF THE FREEZE-DRIED CONNECTIVE ALLOTRANSPLANTATS**

There was performed the analysis of the structure of the fibrous stroma of the freeze-dried allotransplants made from Achilles tendon, broad fascia, dura mater, hyaline cartilage and derma of foot supporting portion. Dependence of the allotransplants structural changes on hydration degree of the amorphous matrix and fibroarchitectonics specificity was established.

Key words: donor tissue, connective tissue allotransplants, lyophilization, fibroarchitectonics.

**Bibliography:**

1. Dunaev P.V. Organ-specific determination and inductive properties of genetically related tissues in ontogenesis // Russian morphological journal. – 1999. – No. 1-2. – P. 63.
2. Klen R. Harvesting and conservation of tissues. – Prague: State publishing of medical literature, 1962. – 316 p.
3. Kovalenko P.P. Transplantation of tissues and organs. Rostov on Don. 1976. – 48 p.
4. Krystinov G. Conservation and transplantation of tissues and organs. – Sofia: Medicine and physical culture, 1975. – V.II. – 426 p.
5. Muldashev E.R. Theoretical and applied aspects of elaboration of «Alloplant» series allotransplants for plastic facial surgery: Thesis of MD dissertation. – Saint-Petersburg, 1994. – 40 p.
6. Nigmatullin R.T. Morphological aspects of connective transplants grafting: Thesis of MD dissertation. – Novosibirsk, 1996. – 40 p.
7. Nigmatullin R.T. Essays on tissue transplantation. – Ufa: Kseroks СТМ, 2003. – 160 p.
8. Podoprigora R.N. Methods of donor tissue conservation // New technologies of eye microsurgery. – 2004. – No.38. – P. 100.
9. Saveliyev V.I. Kalinin A.V. About choosing the experimental model for comparative evaluation of different methods of biological tissues sterilization and conservation // Clinical and fundamental aspects of cellular and tissue biotechnologies: proceedings of the all-russian symposium. – Samara, 2004. – P.55.
10. Sautin E.P. Tissues harvesting, conservation and sterilization // Clinics, diagnostics and treatment of locomotor system injuries. – M., 1982. – P. 77-79.
11. Shangina O.R. Morphological basis of radiation resistance of connective tissue transplants: Thesis of ScD dissertation. – Saransk, 2007. – 34 p.
12. Shangina O.R. Khasanov R.A. Alloplant biomaterials: technologies and standards // Actual problems of tissue and cellular transplantology: Thesis of the IV-th All-Russian Symposium. – Saint-Petersburg: Publishing House «Human being and its health», 2010. – P. 138-139.
13. Komender J., Marczynski W., Tylman D., Malczewska H., Komender A., Sladowski D. Preserved tissue allografts in reconstructive surgery // Cell and Tissue Banking. – 201. – Vol.2, No.2. – P. 103-112.