

9. Saifullina M.G., Kuftina M.A., Marundik A.V. Vtorichnaya posttraumaticeskaya glaukoma (Topical issues of ophthalmology). Aktual'nye voprosy oftal'mologii (Topical issues of ophthalmology). Kiev. 1970;(1):31-35 (in Russ.).
10. Travmy glaza (Eye injuries) / R.A. Gundorova [et al.]. Moscow. 1986. 253 p. (in Russ.).
11. Shangina O.R. Morfologicheskie osnovy radiatsionnoi ustoychivosti soedinitel'notkannykh transplantatov (Morphological bases of radiation resistance of connective tissue grafts): avtoref. dis. ... d-ra biol. nauk. – Saransk. 2007. 34 p. (in Russ.).
12. Curtin B.J., Whitmore W.G. Long-term results of sclera reinforcement surgery. Am. J. Ophthalmol. 1987;103(4):544-548 (in Engl.). doi: 10.1016/s0002-9394(14)74278-3.

УДК 616.-089.843
© Коллектив авторов, 2021

Л.А. Мусина¹, О.Р. Шангина^{1,2}, Р.З. Кадыров¹, Р.А. Хасанов¹
**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ АЛЬТЕРНАТИВНЫХ ТКАНЕЙ
ДЛЯ ИЗГОТОВЛЕНИЯ ДИСПЕРГИРОВАННЫХ АЛЛОТРАНСПЛАНТАТОВ,
ИСПОЛЬЗУЕМЫХ В ОФТАЛЬМОХИРУРГИИ**

¹ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии»

Минздрава России, г. Уфа

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Уфа

Цель – морфологическое изучение альтернативной кадаверной ткани широкой фасции бедра в процессе изготовления диспергированных аллотрансплантатов для офтальмохирургии.

Материал и методы. Стандартными гистологическими методами исследовали нативные кадаверные ткани широкой фасции бедра (Fascia lata), консервированные в 70% этаноле, и диспергированную форму (по 10 образцов). Измеряли толщину пучков коллагеновых волокон и просветы между ними в цельных образцах и гистохимически выявляли гликозаминогликаны (реакция Хейла).

Результаты и обсуждение. Установлено, что технологическая обработка не оказывает выраженного разрушающего действия на структуру и гликозаминогликаны в аллотрансплантатах широкой фасции бедра, что имеет важное значение непосредственно как для качества диспергированных биоматериалов, так и для регенераторных процессов при их использовании в офтальмохирургии. Окончательная морфологическая оценка по определению регенеративного потенциала диспергированных аллотрансплантатов из кадаверной ткани широкой фасции бедра может быть дана после проведения эксперимента на животных, поэтому полученные результаты позволяют рекомендовать продолжение научных исследований альтернативных кадаверных тканей.

Ключевые слова: кадаверные ткани, структура, диспергированные аллотрансплантаты, гликозаминогликаны

L.A. Musina, O.R. Shangina, R.Z. Kadyrov, R.A. Khasanov
**THE MORPHOLOGICAL INVESTIGATION OF THE ALTERNATIVE TISSUES
FOR THE MANUFACTURE OF DISPERSED ALLOTRANSPLANTS
USED IN OPHTHALMOSURGERY**

Aim is a morphological study of the alternative cadaver tissue of thigh fascia lata during the manufacturing process of dispersed allotransplants for ophthalmosurgery.

Material and methods. We have studied the native cadaver tissues of the thigh fascia lata conserved in 70% ethanol and dispersed form (10 samples each) by standard histological methods. We measured bundle thickness of the collagen fibres and lumen between them in the integral samples; glycosaminoglycans were histochemically detected (Hale's reaction).

Results and discussion. It is established that the technological treatment doesn't have a pronounced effect on the structure and glycosaminoglycans in the allotransplants of the thigh fascia lata which is important both for the quality of dispersed biomaterials and regenerative processes when they are used in ophthalmosurgery. The final morphological assessment to determine the regenerative potential of the dispersed allotransplants from the cadaver tissue of thigh fascial lata will be given after carrying out the experiment on animals. The obtained results allow to recommend further research of the alternative cadaver tissues.

Key words: cadaver tissue, structure, dispersed allotransplants, glycosaminoglycans

С годами увеличивается потребность отечественных офтальмологических клиник в аллотрансплантатах диспергированной формы, изготовленных из соединительнотканых образований. Они широко применяются для перилимбального введения при патологии роговицы глаза (дистрофии, язвы, кератоконус) [1,4,6,7]. В то же время забор определенных кадаверных тканей (в их числе твердая мозговая оболочка) для изготовления аллотрансплантатов строго ограничен [2]. Поэтому становится актуальным поиск альтернативных видов соединительной ткани, из которых мож-

но изготавливать диспергированный биоматериал, для чего учеными были предложены кадаверные ткани широкой фасции бедра (Fascia lata) и перикарда (Pericardium) [8,10,11].

Цель исследования – морфологическое изучение альтернативной кадаверной ткани широкой фасции бедра в процессе изготовления диспергированных аллотрансплантатов для офтальмохирургии.

Материал и методы

Материалами исследования были: нативные кадаверные ткани широкой фасции бедра (Fascia lata) (10 образцов); консервиро-

ванные в 70% этаноле цельные аллотрансплантаты, изготовленные из этих тканей (10 образцов); диспергированные аллотрансплантаты, изготовленные из консервированных аллотрансплантатов (10 образцов). Кадаверные ткани были обработаны по технологии, разработанной в ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Уфа), которая заключается в многоступенчатой физико-химической обработке биологических тканей.

Диспергированные аллотрансплантаты подготовлены во время технологических стадий производства (высушивание-лиофилизация, измельчение, фракционирование с применением высокотехнологичного оборудования). Нативные кадаверные ткани широкой фасции бедра фиксировали в 10% растворе забуференном (до pH 7,0) формалине по Лилли. После обезживания в батарее восходящих спиртов, фиксированные нативные ткани и консервированные в 70% этаноле аллотрансплантаты заливали в парафин по стандартной методике. Из диспергированных аллотрансплантатов изготавливали мазки. Парафиновые срезы и мазки окрашивали гематоксилином и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизону и проводили гистохимическую реакцию на выявление гликозаминогликанов (ГАГ) по методу Хейла. Измерение толщины пучков коллагеновых волокон и просветов между ними на гистологических препаратах проводили с использованием светового микроскопа Axiomager Z1 при общем увеличении X200 и программы анализа изображений Axiovision (Carl Zeiss, Германия).

Математико-статистическая обработка результатов осуществлялась при помощи программы SPSS версии 21 (IBM SPSS Statistics, USA). Сравнение данных проводили с помощью параметрического критерия Стьюдента. При гистохимическом исследовании использовалась полуколичественная оценка полученных результатов (принцип Астальди, основанный на выявлении различной степени интенсивности специфической окраски после постановки гистохимической реакции). Парафиновые срезы готовили на ротационном микротоме LEICA RM 2145 (LEICA, Germany). Микроскопирование и фотографирование всех окрашенных препаратов производили на микроскопе марки LEICA DMD 108 (LEICA, Germany).

Результаты и обсуждение

Гистологические исследования нативной кадаверной ткани широкой фасции бедра показали, что ткань представляет собой сухо-

жильную пластину волокнистой соединительной ткани, состоящую из плотно упакованных коллагеновых волокон, которые окрашиваются пикрофуксином по методу Ван-Гизон в ярко красно-оранжевые тона (рис. 1А). Между коллагеновыми волокнами видны удлиненные ядра фибробластических клеток (рис. 1Б).

Фасции трудно растяжимы вследствие того, что пучки коллагеновых волокон располагаются в определенном порядке в несколько слоев друг над другом. Между слоями есть прослойки рыхлой соединительной ткани. В каждом отдельном слое волнообразно изогнутые пучки коллагеновых волокон лежат параллельно друг к другу и ориентированы в одном направлении, которое не совпадает с направлением в соседних слоях. Такая структура обеспечивает хорошие прочностные свойства фасции. Отдельные солитарные пучки тонких коллагеновых волокон переходят от одного слоя в другой, связывая их между собой. Кроме коллагеновых волокон, в ткани фасции есть и тонкие эластические волокна, которые определяются лишь при специфическом окрашивании ткани.

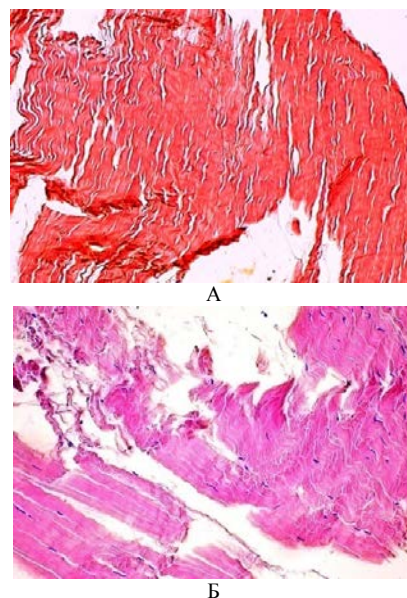


Рис. 1. Структура нативной кадаверной широкой фасции бедра человека: А – окраска пикрофуксином по Ван-Гизону, увел. $\times 100$; Б – окраска гематоксилином и эозином, увел. $\times 200$

После технологической обработки гистологическая структура широкой фасции бедра меняется незначительно: коллагеновый каркас сохраняется, при этом немного увеличиваются промежутки между пучками коллагеновых волокон (рис. 1Б). Тинкториальные свойства ткани сохраняются полностью, коллагеновые волокна окрашиваются в ярко-красный цвет пикрофуксином (рис. 2А). Клеточные элементы после обработки подвергаются полному разрушению, способствуя тем

самым снижению иммуногенности трансплантата (рис. 2Б).

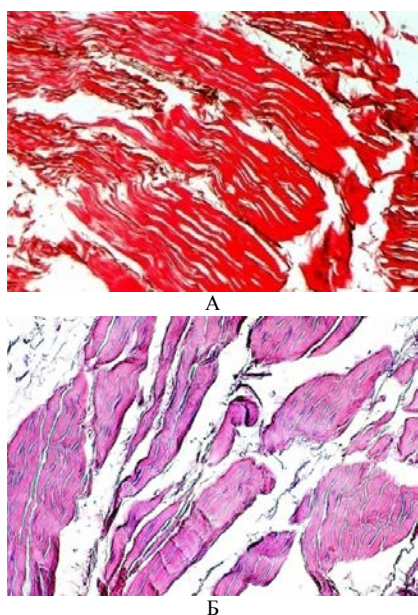


Рис. 2. Структура консервированных цельных аллотрансплантатов широкой фасции бедра человека: А – окраска пикрофуксином по Ван-Гизону, увел. $\times 100$; Б – окраска гематоксилином и эозином, увел. $\times 200$

Консервация трансплантатов в 70% этаноле позволяет максимально сохранить микроструктуру их волокнистого остова. В пределах каждого пучка коллагеновые волокна по-прежнему ориентированы в одном направлении, а в разных слоях фасции волокнистые пучки ориентированы под углом друг к другу. Между слоями плотно уложенных коллагеновых волокон прослойки рыхлой соединительной ткани сохраняются. Но при этом морфометрические исследования выявили достоверное уменьшение толщины пучков коллагеновых волокон в консервированном аллотрансплантате широкой фасции бедра в сравнении с нативной тканью и достоверное увеличение межпучковых пространств (табл. 1-2). Этот факт мы объясняем тем, что после технологической обработки широкой фасции бедра происходит слабо выраженное разволокнение пучков коллагеновых волокон, что не является отрицательным моментом для качества конечного продукта (диспергированного аллотрансплантата) [12].

Таблица 1

Сравнение показателей (переменных) толщины пучков коллагеновых волокон в нативной ткани широкой фасции бедра и в целом консервированном аллотрансплантате широкой фасции бедра

Образцы	Среднее $\pm$ Стд. отклонение	Стд. ошибка среднего	Минимум	Максимум
Нативная ткань широкой фасции бедра	116,44 $\pm$ 14,22	2,6	89,73	147,72
Консервированные аллотрансплантаты широкой фасции бедра	63,49 $\pm$ 14,12*	2,58	36,64	89,68

* Статистически значимые различия при $p < 0,001$.

Таблица 2

Сравнение показателей (переменных) ширины межпучковых пространств в нативной ткани широкой фасции бедра и в целом консервированном аллотрансплантате широкой фасции бедра

Образцы	Среднее $\pm$ Стд. отклонение	Стд. ошибка среднего	Минимум	Максимум
Нативная ткань широкой фасции бедра	10,01 $\pm$ 3,56	0,65	3,94	21,73
Консервированные аллотрансплантаты широкой фасции бедра	42,96 $\pm$ 10,44*	1,9	19,78	63,03

* Статистически значимые различия при $p < 0,001$.

Гистохимическая реакция по Хейлу на выявление гликозаминогликанов (ГАГ) в нативной кадаверной ткани широкой фасции бедра показала, что плотные волокнистые пучки окрашиваются в основном в синие и голубые тона, свидетельствующие о значительном содержании ГАГ в составе основного вещества (рис. 3А). Мы оценили этот факт как положительная реакция (++). В отдельных участках, где пучки коллагеновых волокон были довольно широкими, преобладало интенсивное окрашивание эозином, хотя ГАГ определялись в местах разволокнения и в рыхлых прослойках между пучками. Такие участки мы оценивали как слабopоложительная реакция (+). В консервированных цельных аллотрансплантатах, изготовленных из ткани широкой фасции бедра человека, содержание ГАГ после технологической обработки ткани

расценивались как положительная реакция (++) (рис. 3Б). Лишь изредка встречались небольшие участки со слабopоложительной реакцией (+), в которых широкие пучки толстых коллагеновых волокон местами окрашивались эозином, а более тонкие коллагеновые волокна между ними окрашивались в синий цвет.

В измельченных препаратах аллотрансплантатов широкой фасции бедра (диспергированная форма) при окраске по Ван-Гизону фрагменты коллагеновых волокон так же, как в цельных образцах нативной ткани и консервированных аллотрансплантатах, окрашивались пикрофуксином в ярко-красные тона, что свидетельствовало о сохранности микроструктуры волокон (рис. 4А). Частицы аллотрансплантатов, окрашенные в синий цвет, давали положительную реакцию (++) Хейла на высокое содержание в них гликозаминогликанов (рис. 4Б).

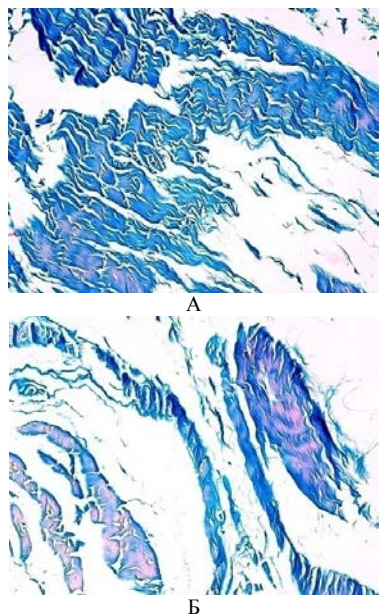


Рис. 3. Положительная реакция (++) на ГАГ (сине-голубые цвета): А – в нативной кадаверной ткани широкой фасции бедра, увел. $\times 200$; Б – в консервированном целом аллотрансплантате широкой фасции бедра, увел. $\times 200$

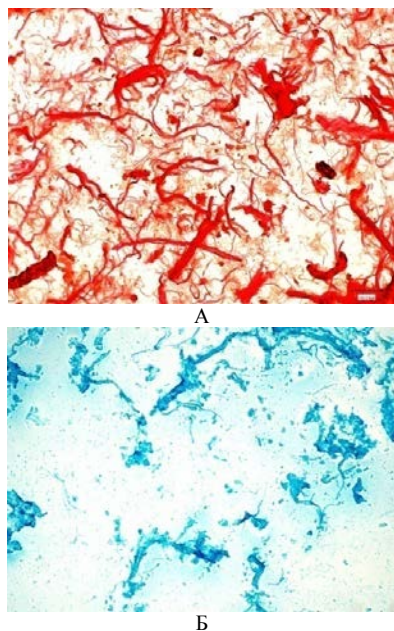


Рис. 4. Структура диспергированного биоматериала, изготовленного из консервированного целого аллотрансплантата широкой фасции бедра: А – окраска по Ван-Гизону, увел. $\times 200$; Б – положительная реакция Хейла на содержание ГАГ, увел. $\times 200$

Полученные нами данные свидетельствуют о том, что диспергированные аллотрансплантаты широкой фасции бедра, про-

шедшие ряд технологических стадий производства (физико-химическая обработка, консервирование в 70% этаноле, лиофильное высушивание, измельчение, фракционирование), не претерпевали денатурации и сохраняли основные свойства, присущие нативным, цельным консервированным образцам, способным к регенерации. Сохранность регенеративного потенциала соединительнотканых аллотрансплантатов в дальнейшем можно определить с использованием лабораторных животных [4,7].

Известно, что главной задачей при изготовлении соединительнотканых аллотрансплантатов является удаление иммунногенных клеточных элементов, а также максимальное сохранение коллагеновых волокон и гликозаминогликанов, входящих в состав как коллагеновых пучков, так и основного вещества соединительной ткани, играющих большую роль в регенерации тканей при пересадке [3,5]. Предварительные исследования показали, что качество диспергированных аллотрансплантатов после технологической обработки ткани широкой фасции бедра соответствует требованиям, предъявляемым к готовым образцам соединительнотканых аллотрансплантатов [12].

Выводы

1. Технологическая обработка не оказывает выраженного разрушающего действия на структуру и гликозаминогликаны в аллотрансплантатах широкой фасции бедра (*Fascia lata*), что имеет важное значение непосредственно как для качества диспергированных биоматериалов, так и для регенераторных процессов при их использовании в офтальмохирургии.

2. Окончательная морфологическая оценка по определению регенеративного потенциала диспергированных аллотрансплантатов из кадаверной ткани широкой фасции бедра может быть дана после проведения эксперимента на животных, поэтому полученные результаты позволяют рекомендовать продолжение научных исследований альтернативных кадаверных тканей.

Сведения об авторах статьи:

Мусина Ляля Ахияровна – д.б.н., ведущий научный сотрудник отдела морфологии ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. Р. Зорге, 67/1. E-mail: morphoplant@mail.ru.

Шангина Ольга Ратмировна – д.б.н., профессор, ведущий научный сотрудник, зав. лабораторией консервации тканей, зам. генерального директора ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России, профессор кафедры анатомии человека ФГБОУ ВО БГМУ Минздрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. Р. Зорге, 67/1. E-mail: aloolga@mail.ru.

Кадыров Радик Завилович – д.м.н., генеральный директор ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. Р. Зорге, 67/1. E-mail: radkad@yandex.ru.

Хасанов Руслан Алмазович – к.ф.н., ведущий научный сотрудник лаборатории консервации тканей ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. Р. Зорге, 67/1. E-mail: khrusall@mail.ru.

ЛИТЕРАТУРА

1. Галимова, В.У. Результаты лечения больных кератоконусом диспергированным в различной степени биоматериалом «Аллоплант» / В.У. Галимова, Р.Ф. Шакиров, Е.М. Гареев // Офтальмологические ведомости. – 2013. – Т. 7, №1. – С.26-28.
2. Проблемы организации донорства, трансплантации и банкирования тканей в Российской Федерации / К.А. Воробьев [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22, № 3. – С. 21-22.
3. Мулдашев, Э.Р. Теоретические и прикладные аспекты создания аллотрансплантатов серии «Аллоплант» для пластической хирургии лица: автореф. дис. ... д-ра. мед. наук. – Санкт-Петербург, 1994. – 40 с.
4. Восстановление структуры роговицы после перилимбального введения аллогенного биоматериала / Л.А. Мусина [и др.] // Морфология. – 2019. – Т. 155, № 2. – С. 207.
5. Муслимов, С.А. Морфологические аспекты регенеративной хирургии / С.А. Муслимов. – Уфа: Башкортостан, 2000. – 168 с.
6. Шакиров, Р.Ф. Изменение толщины роговицы при кератоконусе до и после перилимбального введения диспергированного биоматериала «Аллоплант» / Р.Ф. Шакиров // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2012. – № 12. – С. 229-230.
7. Шакиров, Р.Ф. Экспериментально-морфологическое обоснование перилимбального введения диспергированного биоматериала Аллоплант (ДБМА) при дистрофических поражениях роговицы / Р.Ф. Шакиров, Р.З. Кадыров, Р.Ф. Галияхметов // III Российский общенациональный офтальмологический форум: сборник трудов научно-практической конференции с международным участием. – М., 2010. – С. 445-448.
8. Шангина, О.Р. Разработка новых форм модифицированных диспергированных биоматериалов для нужд регенеративной медицины / О.Р. Шангина, Р.А. Хасанов // Материалы научно-практической конференции «Современные технологии в хирургии головы и шеи». – М.: Мир науки, 2019. – С.48-49.
9. Шангина, О.Р. Принципиальные основы технологии изготовления аллогенных биоматериалов / О.Р. Шангина, Р.А. Хасанов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22, № 3. – С. 165.
10. В поисках альтернативных биоматериалов для регенеративной медицины / О.Р. Шангина [и др.] // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22, № 3. – С. 164.
11. Морфологическое обоснование применения перикарда для изготовления аллотрансплантатов / О.Р. Шангина [и др.] // Морфология. – 2020. – Т. 157, № 2-3. – С. 241-242.
12. Shangina, O.R. Basic criteria of the connective tissue evaluation when manufacturing powder-like allografts / O.R. Shangina, R.A. Khasanov, L.A. Musina // 27th International Symposium on Morphological Sciences. Annals of Anatomy. – 2020. – Vol. 230, № S1. – P. 83.

REFERENCES

1. Galimova V.U., Shakirov R.F., Gareev E.M. Rezul'taty lecheniya bol'nykh keratokonusom dispergirovannym v razlichnoi stepeni biomaterialom «Alloplant» (Results of treatment of patients with keratoconus dispersed to varying degrees with biomaterial «Alloplant») // Oftal'mologicheskie vedomosti. 2013;(1):26-28 (in Russ.).
2. Vorob'ev K.A. [et al.]. Problemy organizatsii donorstva, transplantatsii i bankirovaniya tkanei v Rossiiskoi Federatsii (Problems of organization of donation, transplantation and tissue banking in the Russian Federation) // Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov. 2020;22(3):21-22 (in Russ.).
3. Muldashev E.R. Teoreticheskie i prikladnye aspekty sozdaniya allotransplantatov serii «Alloplant» dlya plasticheskoi khirurgii litsa (Theoretical and applied aspects of creating allografts of the «Alloplant» series for facial plastic surgery): avtoref. dis. ... d-ra. med. nauk. Saint Petersburg. 1994. 40 p. (in Russ.).
4. Musina L.A. [et al.]. Vosstanovlenie struktury rogovitsy posle perilimbal'nogo vvedeniya allogennogo biomateriala (Restoration of the corneal structure after perilimbal injection of allogeneic biomaterial). Morfologiya. 2019;155(2):207 (in Russ.).
5. Muslimov S.A. Morfologicheskie aspekty regenerativnoi khirurgii (Morphological aspects of regenerative surgery). Ufa. Bashkortostan. 2000. 168 p. (in Russ.).
6. Shakirov R.F. Izmenenie tolshchiny rogovitsy pri keratokonuse do i posle perilimbal'nogo vvedeniya dispergirovannogo biomateriala «Alloplant» (Changes in the thickness of the cornea in keratoconus before and after perilimbal administration of dispersed biomaterial «Alloplant»). Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta. 2012;(12):229-230 (in Russ.).
7. Shakirov R.F., Kadyrov R.Z., Galiyakhmetov R.F. Eksperimental'no-morfologicheskoe obosnovanie perilimbal'nogo vvedeniya dispergirovannogo biomateriala Alloplant (DBMA) pri distroficheskikh porazheniyakh rogovitsy (Experimental and morphological substantiation of perilimbal administration of dispersed Alloplant biomaterial (DBMA) in dystrophic corneal lesions). III Rossiiskii obshchenatsional'nyi oftal'mologicheskii forum: sbornik trudov nauchno-prakticheskoi konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem. Moscow. 2010. P. 445-448 (in Russ.).
8. Shangina O.R., Khasanov R.A. Razrabotka novykh form modifitsirovannykh dispergirovannykh biomaterialov dlya nuzhd regenerativnoi meditsiny (Development of new forms of modified dispersed biomaterials for the needs of regenerative medicine). Materialy nauchno-prakticheskoi konferentsii «Sovremennye tekhnologii v khirurgii golovy i shei». Moscow. Mir nauki. 2019. P. 48-49 (in Russ.).
9. Shangina O.R., Khasanov R.A. Printsipial'nye osnovy tekhnologii izgotovleniya allogennykh biomaterialov (Basic principles of manufacturing technology of allogeneic biomaterials). Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov. 2020;22(3):165 (in Russ.).
10. Shangina O.R. [et al.]. V poiskakh al'ternativnykh biomaterialov dlya regenerativnoi meditsiny (In search of alternative biomaterials for regenerative medicine). Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov. 2020;22(3):164 (in Russ.).
11. Shangina O.R. [et al.]. Morfologicheskoe obosnovanie primeneniya perikarda dlya izgotovleniya allotransplantatov (Morphological justification of the use of the pericardium for the manufacture of allografts). Morfologiya. 2020;157(2-3):241-242 (in Russ.).
12. Shangina O.R., Khasanov R.A., Musina L.A. Basic criteria of the connective tissue evaluation when manufacturing powder-like allografts. 27th International Symposium on Morphological Sciences. Annals of Anatomy. 2020; 230(S1):83 (in Engl.).