

О.Р. Шангина^{1,2}, Р.А. Хасанов¹, Л.А. Булгакова¹, Р.Д. Гайнутдинова¹
**МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ И БИОМЕХАНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА СТРУКТУРЫ
РАЗЛИЧНЫХ ТИПОВ СОЕДИНИТЕЛЬНОЙ ТКАНИ
ПРИ ИЗГОТОВЛЕНИИ ТРАНСПЛАНТАТОВ**

¹ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии»

Минздрава России, г. Уфа

²ФГБОУ ВО «Башкирский государственный медицинский университет»

Минздрава России, г. Уфа

Цель исследования: оценка состояния волокнистого остова основного вещества и биомеханических свойств различных типов соединительной ткани.

Материал и методы. Исследовали образцы различных типов соединительной ткани человека: сухожилия различной локализации, дерму опорных участков стопы (сетчатый слой), висцеральные оболочки органов, реберный хрящ, подкожно-жировую клетчатку. Были использованы методы световой, поляризационно-оптической, электронно-сканирующей микроскопии, морфометрия, гистохимический анализ. Физико-механические свойства образцов оценивали на растяжение и сжатие.

Результаты и обсуждение. Проведена оценка состояния волокнистого остова основного вещества и физико-механических свойств исследуемых образцов. Результатом микроскопических исследований стали макро- и микрофотографии с различным увеличением. В результате морфометрических исследований были получены средние значения толщины пучков коллагеновых волокон и размеров межпучковых пространств. В итоге проведенных физико-механических испытаний образцов были получены данные об упругопрочностных свойствах ткани, а именно предел прочности, относительное удлинение, модуль Юнга. Проведенный гистохимический анализ показал степень содержания гликозаминогликанов в основном веществе.

Выводы. Определен комплекс универсальных методов для оценки структурных и физико-механических свойств различных соединительных тканей при изготовлении аллотрансплантатов.

Ключевые слова: соединительная ткань, фиброархитектоника, коллагеновые волокна, основное вещество, гликозаминогликаны, морфометрия, поляризационно-оптический анализ.

O.R. Shangina, R.A. Khasanov, L.A. Bulgakova, R.D. Gainutdinova
**MORPHOLOGICAL AND BIOMECHANICAL ASSESSMENT
OF VARIOUS TYPES OF CONNECTIVE TISSUE STRUCTURE
IN THE MANUFACTURE OF TRANSPLANTS**

Purpose: evaluation of the fibrous framework condition, basic substance and biomechanical properties of various types of connective tissue.

Material and methods. There were studied the specimens of various types of connective tissue: tendons of various localization, derma of the supporting foot areas (reticular layer), visceral membranes, costal cartilage, subcutaneous fat. We used the following methods: those of polarizing-optical, electron-scanning microscopy as well as morphometry, histochemical analysis. The physico-mechanic properties of the specimens were evaluated for tension and compression.

Results and discussion. There was carried out the assessment of the fibrous framework condition, basic substance and physico-mechanical properties of the specimens under study. Macro- and microphotographs with different magnification were the results of the microscopic studies. As a result of the morphometric studies there were obtained the thickness mean values of the collagen fibre bundles and size of the interbundle spaces. As a result of the carried out physico-mechanical tests of the specimens we obtained data on elastic-strength properties of different tissues, namely tensile strength, relative elongation, Young modulus. The carried out histochemical analysis showed the glycosaminoglycan content degree in the basic substance.

Conclusions. A set of the universal methods is defined for the assessment of the structural and physico-mechanical properties of different connective tissues when manufacturing allotransplants.

Key words: connective tissue, fibroarchitectonics, collagen fibers, basic substance, glycosaminoglycans, morphometry, polarizing-optical analysis.

Важной задачей восстановительной хирургии является воссоздание целостности нарушенных функций органов и тканей [1,4,5,11]. Для решения этой задачи разрабатываются и внедряются в клиническую практику различные виды соединительнотканых трансплантатов (СТТ), позволяющие создавать в реципиентном ложе регенерат, по своим морфологическим и физико-механическим характеристикам соответствующий окружающим дефект тканям [3,6,8,9,12].

Цель исследования – подбор определенного комплекса методов для оценки морфофункционального состояния соединительной ткани в процессе изготовления аллотрансплантатов.

Материал и методы

Были исследованы образцы следующих анатомических структур: сухожилия подвздошно-реберной мышцы (СМ), дермы опорных участков стопы (ДП) (сетчатый слой), фиброзной капсулы почки (ФКП), реберного хряща (РХ), подкожно-жировой клетчатки (ПЖК). Основу предлагаемой методологии составили следующие методы изучения структуры биологических тканей – световая микроскопия, сканирующая электронная микроскопия, поляризационно-оптический анализ.

Количественные показатели (толщина пучков коллагеновых волокон и величина межпучковых пространств) определяли морфометрическим методом. Для определения

основного вещества соединительной ткани был использован гистохимический метод выявления гликозаминогликанов по Хейлу. Физико-механический потенциал образцов оценивали на растяжение и сжатие. Оценку фиброархитектоники соединительнотканых аллотрансплантатов проводили при помощи поляризационной микроскопии неокрашенных гистологических срезов толщиной 10 мкм.

Исследование и фотографирование образцов проводили с использованием поляризационного микроскопа МИН-8 и цифровой фотонасадки Nikon Coolpix 4500 при скрещенных фильтрах. Для гистологических исследований срезы окрашивали гематоксилином и эозином, орсеином по Вейгерту и по Ван-Гизону. Для определения основного вещества соединительной ткани был использован гистохимический метод выявления гликозаминогликанов (ГАГ) по Хейлу. Микроскопические исследования проводили на световых микроскопах JENVAL и AXIO IMAGER-ZI (C. Zeiss, Германия).

Для ультраструктурного исследования СТТ использовали метод сканирующей электронной микроскопии. Микрофотографирование проводили на сканирующем электронном микроскопе JSM-840 (Jeol, Япония) при увеличениях 100-3000. Количественные показатели (толщину пучков коллагеновых волокон и величина межпучковых пространств) определяли морфометрическим методом. Для этого использовали микроскоп AXIO IMAGER – Z1 (C. Zeiss, Германия) с аппаратно-программным комплексом Axiovision. Исследование физико-механических свойств аллотрансплантатов проводили на универсальной машине для испытания прочностных свойств материалов модели 1185 INSTRON (Англия).

Результаты и обсуждение

При микроскопическом исследовании структура сухожилия подвздошно-реберной мышцы представлена плотно упакованными пучками коллагеновых волокон (КВ), имеющих преимущественно однонаправленную ориентацию (рис. 1).

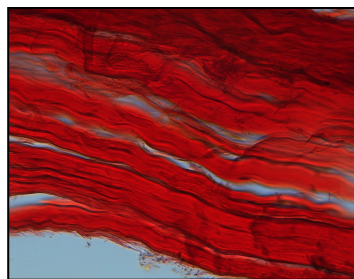


Рис. 1. Структурная организация сухожилия. Световая микроскопия. Окраска по Ван-Гизону. Ув. $\times 200$

Исследование в поляризационном свете демонстрирует выраженный эффект двойного лучепреломления, что свидетельствует о высокой оптической активности пучков коллагеновых волокон, характерной для плотной оформленной соединительной ткани. На сканограммах прослеживаются тонкие солитарные волокна, образующие связочную систему сухожилия. Плотная упаковка и однонаправленность пучков КВ параллельно длинной оси сухожилия определяют высокие механические свойства, что является основным показателем для данного вида ткани, поэтому нами был сделан акцент на морфометрию и биомеханическое исследование.

Среднее значение толщины пучков КВ составило $47,49 \pm 10,37$ мкм, величины межпучковых пространств – $19,17 \pm 3,57$ мкм. Физико-механические свойства образцов сухожилия определялись при продольном растяжении. В результате испытаний были получены следующие показатели: предел прочности равен $104,5 \pm 3,3$ МПа, относительное удлинение – $0,15 \pm 0,002$. Модуль Юнга составил $1110,0 \pm 36,0$ МПа. Гистохимическое исследование показало слабopоложительную реакцию (+), что свидетельствует о незначительном содержании ГАГ в основном веществе исследуемых образцов сухожилия (рис. 2).

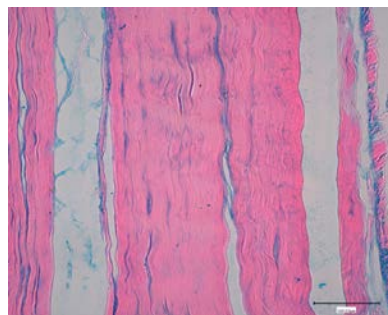


Рис. 2. Слабopоложительная реакция на содержание ГАГ в ткани сухожилия. Гистохимическая реакция по Хейлу с окраской эозином. Ув. $\times 200$

Фиброархитектонику дермы опорных участков стопы можно охарактеризовать как коллагено-волоконистый каркас, образованный извилистыми, способными к растяжению волокнами. Пучки КВ, переплетенные во всех направлениях, имеют сложную пространственную ориентацию, что подтверждает световая микроскопия препаратов, окрашенных по Ван-Гизону. Поляризационно-микроскопическое исследование демонстрирует высокий уровень оптической активности коллагеновых волокон. Сканирующая электронная микроскопия показала разнонаправленный характер пучков КВ, связанных между собой системой тонких волокон и фибрилл (рис. 3).



Рис. 3. Ультраструктура дермы опорных участков стопы. Сканирующая электронная микроскопия. Ув. $\times 2500$

В связи с тем, что структура ДП имеет неориентированный тип коллагенового остова, присущего плотной неоформленной соединительной ткани, в котором волокнистые элементы расположены без определенной геометрической закономерности, проведение полноценного морфометрического анализа не представляется возможным. Гистохимическое исследование ДП по Хейлу свидетельствует о значительном содержании ГАГ в составе основного вещества расположенного между пучками КВ (рис. 4).

Характерной особенностью ДП является способность к ремоделированию коллагеновых и эластиновых волокон в направлении их удлинения и соответственно, возвращения им исходной спиральности, утраченной при растяжении. Этим объясняются высокие упругопрочностные свойства ДП, что подтверждается результатами физико-механических исследований: относительное удлинение образцов ДП составило $0,6 \pm 0,06$, значение предела прочности – $12,9 \pm 0,7$ МПа. Параметр модуля Юнга составил $23,5 \pm 1,2$ МПа.

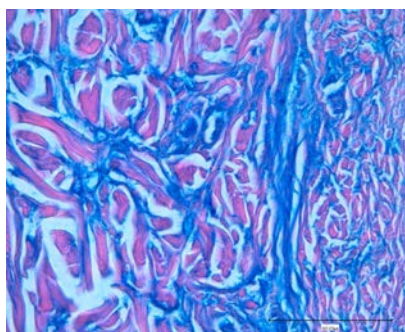


Рис. 4. Положительная реакция Хейла на содержание ГАГ в основном веществе дермы опорных участков стопы. Гистохимическая реакция по Хейлу с докраской эозином. Ув. $\times 400$

Изучение фиброархитектоники фиброзной капсулы почки, которая относится к плотной неоформленной соединительной ткани, показало, что в структуре ткани определяются два слоя КВ: внутренний – рыхлый и наружный – более плотный. На препаратах, окрашенных по Ван Гизону, внутренний слой

представлен множеством тонких, разнонаправленных, переплетенных КВ между собой (диаметр 1-3 мкм) и их пучками, имеющими рыхлую организацию (рис. 5).

Данные сканирующей электронной микроскопии свидетельствуют о том, что наружный слой представляет собой извилистую и компактную тонковолокнистую сеть, образованную как отдельными плотно лежащими КВ, так и их пучками. Данные гистохимического анализа наглядно демонстрируют высокое содержание ГАГ в основном веществе ткани. При проведении поляризационной микроскопии образцов ФКП КВ показали высокую оптическую активность. Из-за трехмерной организации пучков КВ данной ткани морфометрический анализ не показателен. Физико-механическое исследование проводить в данном случае также нецелесообразно, так как трансплантаты, изготовленные из ФКП, как правило, не несут биомеханической нагрузки.

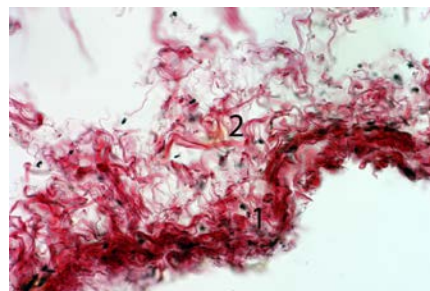


Рис. 5. Структура фиброзной капсулы почки: 1 – наружный слой; 2 – внутренний слой. Окраска по Ван-Гизону. Ув. $\times 100$

Для реберного хряща, который относится к скелетной ткани, характерна структура, представленная территориальным и межтерриториальным межклеточным матриксом из переплетенных КВ и фибрилл, образующих лакуны, что отчетливо прослеживается на сканограммах (рис. 6).



Рис. 6. Архитектоника реберного хряща. Сканирующая электронная микроскопия. Ув. $\times 500$

Наружные волокна стенок лакун переходят непосредственно в волокнистый каркас межтерриториального матрикса, в котором КВ ориентированы в направлении вектора

действия сил основных нагрузок. Пространство между коллагеновыми структурами заполнено основным веществом. Поляризационная микроскопия демонстрирует высокую оптическую активность КВ хряща (рис. 7).



Рис. 7. Архитектоника реберного хряща. Поляризационная микроскопия. Объектив 20. Гомаль 3

Показательными методами исследования реберного хряща (РХ) являются поляризационная и сканирующая электронная микроскопии. Применение гистологических красителей в данном случае нецелесообразно, так как высокое содержание ГАГ в основном веществе РХ не позволяет рассмотреть в препаратах волокнистую структуру коллагенового остова. Морфометрические исследования РХ не проводились в связи с особенностью его структуры. Важным для РХ являются его упруго-прочностные свойства. Проведенные физико-механические исследования на сжатие показали, что предел прочности РХ составил $10,8 \pm 0,8$ МПа, относительное укорочение – $0,26 \pm 0,08$.

Исследование фиброархитектоники подкожно-жировой клетчатки при помощи световой микроскопии показало ярко выраженную ячеистость структуры данной ткани. Крупные, различной формы жировые дольки диаметром от 30 до 70 мкм окружены коллагеново-эластическими оболочками. Между жировыми ячейками расположены соединительнотканые пластины и коллагеновые тяжи (рис. 8).

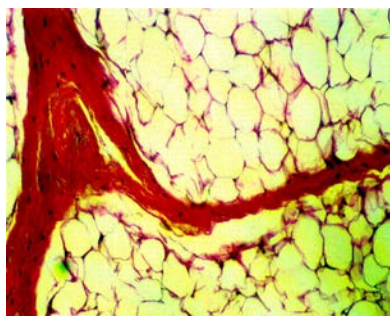


Рис. 8. Структура подкожно жировой клетчатки. Окраска по Ван-Гизону. Ув. $\times 60$

Данные поляризационной микроскопии свидетельствуют о высокой оптической ак-

тивности КВ оболочек жировых ячеек и коллагеновой стромы. На сканограммах наблюдаются плотно расположенные и слабоизвилистые пучки КВ тяжелой стромы. Морфометрическая оценка волокнистых структур стромы ПЖК показала, что плотность КВ межпучковых пространств составила $19,3 \pm 2,22\%$. Ячеистая структура ПЖК придает ей объем, а упругость и эластичность обеспечивает развитая сеть эластиновых волокон. Наличие сети эластиновых волокон подтверждают результаты световой микроскопии окраски орсеином по Вейгерту (рис. 9).

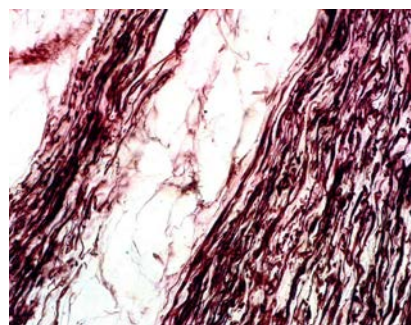


Рис. 9. Сеть эластических волокон подкожно-жировой клетчатки. Окраска орсеином. Ув. $\times 400$

Данные биомеханических испытаний подкожно-жировой клетчатки (ПЖК) показывают, что при сжатии относительное ее укорочение в среднем составило $1,21 \pm 0,01$.

Выводы

По нашему мнению, методы исследования структуры КВ при помощи световой микроскопии препаратов, окрашенных по Ван-Гизону, и поляризационной микроскопии неокрашенных срезов являются для всех видов соединительной ткани универсальными, за исключением исследования РХ [10]. Кроме того, для плотной оформленной волокнистой соединительной ткани (на примере сухожилия), также информативными методиками являются морфометрия и биомеханика [6].

В процессе изготовления соединительнотканых трансплантатов (СТТ) необходимо сохранить целостность пучков КВ и избежать увеличения межпучковых пространств, так как в противном случае произойдет разволокнение ткани и, как следствие, снижение ее биомеханических свойств. Сохранность КВ и их прочностных свойств является необходимым условием для СТТ, применяемых при укрепляющих операциях. Для СТТ, изготовленных из плотной неоформленной волокнистой соединительной ткани (дерма опорных участков стопы), основными показателями являются сохранность фиброархитектоники пучков КВ и содержание ГАГ, а также упруго-годеформативных свойств.

Поэтому при изготовлении СТТ из дермы, кроме универсальных методов, необходимо проведение гистохимического анализа и физико-механических испытаний [8]. Для соединительнотканых трансплантатов, изготовленных из фиброзной капсулы почки, важным фактором является степень сохранности волокнистого остова и основного вещества ткани. В связи с этим, кроме результатов световой и поляризационной микроскопии, важными являются данные гистохимического анализа [9]. Соединительнотканые трансплантаты, изготовленные из РХ, применяются в операциях, где трансплантат несет физико-механическую нагрузку, поэтому упруго прочностные свойства в данном случае являются приоритетными [7,8]. Кроме этого, необходимо проведение анали-

за состояния ГАГ и традиционных методов исследования КВ [2].

Трансплантаты, изготовленные из ПЖК, используются при заполнении объемных дефектов различных тканей. В связи с этим при изготовлении СТТ из соединительной ткани со специальными свойствами необходимо сохранить объем, упругость и эластичность, характерные для данной ткани. Наглядными методами исследования ПЖК являются биомеханика, окраска орсеином по Вейгерту, а также классические методы изучения структуры КВ.

Предложенные методы и методики могут быть рекомендованы для комплексной оценки структурных и физико-механических свойств биологических тканей при изготовлении СТТ и дальнейшего их применения в хирургической практике.

Сведения об авторах статьи:

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.

Хасанов Руслан Алмазович – ведущий научный сотрудник лаборатории консервации тканей, кандидат фармацевтических наук ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. Рихарда Зорге, 67/1. Тел. 8(347)286-00-27. E-mail: khrusall@mail.ru.

Булгакова Людмила Александровна – научный сотрудник лаборатории консервации тканей, кандидат биологических наук ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. Рихарда Зорге, 67/1. Тел.: 8(347)286-00-27. E-mail: mila.bulg@list.ru.

Гайнутдинова Раушания Дамировна – научный сотрудник лаборатории консервации тканей, кандидат биологических наук ФГБУ «Всероссийский центр глазной и пластической хирургии» Минздрава России. Адрес: 450075, г. Уфа, ул. Рихарда Зорге, 67/1. Тел.: 8(347)286-00-27. E-mail: rushanagai@mail.ru.

ЛИТЕРАТУРА

- Максимович, М.М. Заготовка аллотрансплантатов для клиник / М.М. Максимович, Н.В. Отцекая, С.В. Тараненко // Материалы V Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (17–18 мая 2012 г., Уфа). – Уфа, 2012. – С. 39.
- Идентификация гликозаминогликанов в соединительной ткани при имплантации различных биоматериалов. / Л.А. Мусина [и др.] // Морфологические ведомости. – 2006. – № 1-2 (приложение № 1). – С. 194-196.
- Морфологическая оценка структурно-модифицированного сухожильного трансплантата для офтальмохирургии / Л.А. Мусина [и др.] // Морфология. – 2010. – Т. 137, №4. – С. 136-137.
- Мусин, У.К. Реваскуляризация хориоидеи биоматериалом «Аллоплант» при лечении гемофтальма / У.К. Мусин, Р.З. Нурхакимов // Материалы V Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (17–18 мая 2012 г., Уфа). – Уфа, 2012. – С. 83-84.
- Нигматуллин, Р.Т. Очерки трансплантации тканей / Р.Т. Нигматуллин. – Уфа: Ксерокс СТМ, 2003. – 160 с.
- Нигматуллин, Р.Т. Биомеханические свойства эластинового биоматериала при деформации на сжатие / Р.Т. Нигматуллин, Р.З. Кутушев, Ю.С. Первушин // Морфология. – 2020. – Т. 157, №2-3. – С. 153-154.
- Сравнительный анализ пластических свойств аллотрансплантатов гиалинового хряща / О.Р. Шангина [и др.] // Морфология. – 2019. – Т. 155, № 2. – С. 323.
- Шангина, О.Р. Упругодеформативные свойства комбинированных аллотрансплантатов для восстановления стенок орбиты / О.Р. Шангина, Л.А. Мусина // Вестник Оренбургского государственного университета. – 2015. – №12. – С. 300-302.
- Шангина, О.Р. Морфологическая оценка соединительнотканых аллотрансплантатов для урологических операций / О.Р. Шангина, Л.А. Мусина // Морфология. – 2014. – Т. 145, №3. – С. 218.
- Шангина, О.Р. Поляризационно-оптический анализ как метод оценки сохранности волокнистого остова аллотрансплантатов / О.Р. Шангина, Л.А. Булгакова // Морфология. – 2018. – Т. 153, №3. – С. 313.
- Шангина, О.Р. Принципиальные основы технологии изготовления аллогенных биоматериалов / О.Р. Шангина, Р.А. Хасанов // Вестник трансплантологии и искусственных органов. – 2020. – Т. 22, №5. – С. 165.
- Щербаков, Д.А. Восстановление переднелатеральной стенки верхнечелюстного синуса аллогенными биоматериалами / Д.А. Щербаков, А.И. Лебедева, А.И. Каримова // Гены и Клетки. – 2014. – Т. 9, №2. – С. 104-109.

REFERENCES

- Maksimovich M.M., Otetskaya N.V., Taranenko S.V. Zagotovka allotransplantatov dlya kliniki (Preparation of allografts for clinics). Materials of the V All-Russian symposium with international participation «Aktual'nye voprosy tkanevoi i kletочноi transplantologii» («Topical issues of tissue and cell transplantology»), Ufa. 2012:39 (in Russ.).
- Musina L.A. [et al.]. Identifikatsiya glikozaminoglikanov v soedinitel'noi tkani pri implantatsii razlichnykh biomaterialov (Identification of glycosaminoglycans in connective tissue during implantation of various biomaterials). Morfologicheskie ведомosti (Morphological newsletter). 2006;(1-2, app. № 1):194-196 (in Russ.).

3. Musina L.A. [et al.]. Morfologicheskaya otsenka strukturno-modifitsirovannogo sukhozhil'nogo transplantata dlya oftal'mokhirurgii (Morphological evaluation of a structurally modified tendon graft for ophthalmic surgery). *Morfologiya (Morphology)*. 2010;137(4):136-137 (in Russ.).
4. Musin U.K., Nurkhakimov R.Z. Revaskulyarizatsiya khorioidei biomaterialom «Alloplant» pri lechenii gemoftal'ma (Revascularization of the choroid with the «Alloplant» biomaterial in the treatment of hemophthalmos). Materials of the V All-Russian symposium with international participation «Aktual'nye voprosy tkanevoi i kletchnoi transplantologii» («Topical issues of tissue and cell transplantology»), Ufa. 2012:83-84 (in Russ.).
5. Nigmatullin R.T. Ocherki transplantatsii tkanei (Essays on tissue transplantation). Ufa, Kseroks STM. 2003:160 (in Russ.).
6. Nigmatullin R.T., Kutushev R.Z., Pervushin Yu.S. Biomechanical properties of elastin biomaterial under compression deformation. *Morfologiya (Morphology)*. 2020;157(2-3):153-154 (in Russ.).
7. Shangina O.R. [et al.]. A comparative analysis of the plastic properties of hyaline cartilage allografts. *Morfologiya (Morphology)*. 2019;155(2):323 (in Russ.).
8. Shangina O.R., Musina L.A. Elastic-deformative properties of combined allografts for the restoration of the orbital walls. *Vestnik Orenburgskogo gosudarstvennogo universiteta (Bulletin of the Orenburg State University)*. 2015;(12):300-302 (in Russ.).
9. Shangina O.R., Musina L.A. Morphological evaluation of connective tissue allotransplants for urological operations. *Morfologiya (Morphology)*. 2014;145(3):218 (in Russ.).
10. Shangina O.R., Bulgakova L.A. Polarization-optical analysis as the evaluation method of the allograft fibrous skeleton preservation. *Morfologiya (Morphology)*. 2018;153(3):313 (in Russ.).
11. Shangina O.R., Khasanov R.A. Printsipial'nye osnovy tekhnologii izgotovleniya allogennykh biomaterialov (Fundamentals of the technology for the manufacture of allogeneic biomaterials). *Vestnik transplantologii i iskusstvennykh organov (Russian journal of transplantation and artificial organs)*. 2020;22(5):165 (in Russ.).
12. Shcherbakov D.A., Lebedeva A.I., Karimova A.I. Replacement of the anterior-lateral wall of the maxillary sinus with allografts. *Geny i Kletki (Genes and Cells)*. 2014;9(2):104-109 (in Russ.).