

Регенераторные процессы в модулях микроциркуляторного кровеносного русла скелетных мышц после травмы и свободной пластики измельченной мышечной тканью в эксперименте

(Экспериментально-морфологическое исследование)

С.Н. ЧЕМИДРОНОВ, П.А. ГЕЛАШВИЛИ, С.Л. ГОМОЮНОВА

ГОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет Росздрава»
ГОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия Росздрава»

Уфа, Россия

РЕФЕРАТ. До настоящего времени остается нерешенными целый ряд вопросов, связанных с васкуляризацией регенерирующих скелетных мышц, особенно на микроциркуляторном уровне. В настоящей работе проведено экспериментальное исследование течения регенераторных процессов в модулях микроциркуляторного русла скелетных мышц после их резекции и свободной пластики. Изучены морфологические характеристики микроциркуляторного модуля и сосудисто-тканевых взаимоотношений в скелетных мышцах голени белых крыс, разработаны инструменты для резекции и аутотрансплантации скелетной мышечной ткани при экспериментальном моделировании. На экспериментальной модели разработан способ измельчения мышечной ткани для пластики. С позиций морфологического и морфометрического анализа показана динамика перестройки компонентов гемомикроциркуляторного модуля после резекции скелетных мышц и в сочетании резекции со свободной пластикой измельченной мышечной тканью. Авторами создана оригинальная математическая модель динамики течения регенераторных процессов скелетной мышцы после резекции и после резекции в сочетании со свободной пластикой измельченной мышечной тканью.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: аутотрансплантация, микроциркуляторное русло, мышечная ткань.

ВВЕДЕНИЕ

Проблема микроциркуляции крови в органах и тканях вызывает живой интерес исследователей самых разных специальностей. Объединение клиничко-морфологических исследований по проблеме микроциркуляции, необходимо для плодотворного использования достижения фундамен-

тальной науки в клинической практике (Мачс В.М., 2000; Чучков В.М. и соавт., 2005; Linten M. et al., 1995; Reedt D et al., 1996).

Все явления, характеризующие и воспаление, и заживление раны, возникают в связи с повреждением клеточных и волокнистых образований, ориентированных вокруг микроциркуляторной единицы и лимфатических образований (Блинков О.А. и соавт.,

1995; Омеляненко Н.П. и соавт, 1996; Котельников Г.П. и соавт., 2003; Мельченко С.С., 2003; Jackson J.R. et al., 1997).

Одной из главных проблем современной военной и экстремальной медицины остаются минно-взрывные травмы, которые приобрели статус важной медико-биологической и социальной проблемы (Фомин Н.Ф. и соавт., 1992,1996; Чиж И.М. и соавт., 2004). Массивность дефектов мышц, развитие склерозирования и контрактур обуславливали актуальность поисков методов восполнения объёмов мышечной ткани, резецированной в ходе хирургической обработки. Часть исследований опирается на экспериментальную модель, предложенную А.Н. Студитским.

Понимание механизмов восстановления сосудистого снабжения в регенерирующих скелетных мышцах затруднено сложностью их тканевого состава (Данилов Р.К., Одинцова И.А., 2001).

Существует необходимость установления закономерных процессов адаптации сосудов гемомикроциркуляторного русла и сосудисто-тканевых взаимоотношений в динамике. Это возможно при оценке морфометрической характеристики этапов восстановления сосудистого снабжения регенерации скелетных мышц. Проведение математического моделирования в рамках клинических и экспериментально-морфологических исследований является тем направлением, которое позволяет значительно повысить эффективность работы, получить новую ценную информацию, вскрыть закономерности процессов морфогенеза, а на заключительном этапе дает практические рекомендации или план дальнейших исследований (Гланц С.А., 1999; Боровиков В.П., 2001; Денисов-Никольский Ю.И. и соавт., 2002; Реброва О.Ю., 2003; Гелашвили П.А. и соавт., 2008).

Таким образом, до настоящего времени остается нерешенным целый ряд вопросов, связанных с васкуляризацией регенерирующих скелетных мышц, особенно на микроциркуляторном уровне. Сохраняется разноречивость мнений авторов в оценке компенсаторных возможностей кровеносной системы поврежденных скелетных мышц. Отсутствуют сведения о целостной характеристике структуры всех компонентов микроциркуляторного русла в зонах повреждения в зависимости от условий регенерации при удалении фрагмента повреждённых мышц.

Цель исследования:

Выявить в эксперименте течение регенераторных процессов в модулях микроциркуляторного русла скелетных мышц после её резекции и свободной пластики.

Задачи исследования

1. Изучить особенности морфологической характеристики микроциркуляторного модуля и сосудисто-тканевых взаимоотношений в скелетных мышцах голени белых крыс.
2. Разработать инструменты для резекции и ауто-трансплантации скелетной мышечной ткани при экспериментальном моделировании.
3. Разработать на экспериментальной модели способ измельчения мышечной ткани для пластики.
4. Изучить с позиций морфологического и морфометрического анализов динамику перестройки компонентов гемомикроциркуляторного модуля в скелетных мышцах после резекции мышцы.
5. Изучить с позиций морфологического и морфометрического анализов динамику структурной перестройки компонентов модулей микроциркуляторного русла скелетных мышц крыс после резекции мышцы в сочетании со свободной пластикой измельченной мышечной тканью.
6. Создать математическую модель динамики течения регенераторных процессов скелетной мышцы после резекции и после резекции в сочетании со свободной пластикой измельченной мышечной тканью.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Авторами изучены пути гемомикроциркуляции в скелетных мышцах в условиях эксперимента на 414 препаратах, полученных при обработке экспериментального биологического материала (от 42 белых крыс). Животные использовались в экспериментах согласно международным и российским этическим принципам и нормам биоэтики (Хельсинская декларация Всемирной медицинской ассоциации, 1964; Европейская конвенция по биоэтике, 1996; Основы законодательства РФ //Ведомости съезда народных депутатов РФ и ВС РФ, 1993.- №33).

Исследуемым материалом служили икроножные мышцы голени белых крыс и ее фасции. Сроки за-

бора материала: 1-е сутки, 5-е сутки, 15-е сутки, 30 сутки. Отдалённые сроки - 90 суток после операции.

Проведено две серии экспериментов. Первая серия экспериментов – резекция скелетной мышцы. Под эфирным наркозом после обработки операционного поля спиртом и удаления волосяного покрова производится разрез кожи задней поверхности голени длиной 18 - 23 мм. Края раны разводятся, дно операционной раны - *caput mediale m. gastrocnemii*, фасция мышцы рассекается продольно, разрезом 8-10 мм. В рану выводится участок *m. gastrocnemii*. Производится резекция 3-6 мм² мышечной ткани. Фасция мышцы ушивается однорядным узловым швом атравматичной иглой полигликолидом или викрилом 3/0 наглухо. Узловые швы на кожу. Обработка шва раствором бриллиантового зеленого. В данной серии использовано 17 опытных крыс и 3 интактных.

Вторая серия экспериментов – резекция скелетной мышцы с последующей пластикой свободным измельчённым аутооттрансплантатом. Под эфирным наркозом после обработки операционного поля спиртом и удаления волосяного покрова производится разрез кожи задней поверхности голени длиной 18 - 23 мм. Края раны разводятся, дно операционной раны - *caput mediale m. gastrocnemii*, фасция мышцы рассекается продольно, разрезом 8 - 10 мм. В рану выводится участок *m. gastrocnemii*. Производится резекция 3-6 мм² мышечной ткани. Резецированные волокна в стерильных условиях (специальным устройством, обработанном антисептиками) рассекаются в продольном и поперечном направлениях до состояния «фарша» в течение 20 секунд. После этого «фарш» помещается на место дефекта мышцы. Фасция мышцы ушивается однорядным узловым швом атравматичной иглой полигликолидом или викрилом 3/0 наглухо. Проверка на гемостаз, инородные тела – сухо, нет. Узловые швы на кожу. Обработка шва раствором бриллиантового зеленого. В данной серии использовано 19 опытных крыс и 3 интактных.

Выявление микроциркуляторного русла. Во всех сериях опыта готовили просветленные и гистологические тотальные препараты мышц после инъекции кровеносного русла по оригинальной методике (Гелашвили П.А. и соавт., 2003).

После просветления в ксилоле срезы толщиной 40-800 мкм просматривались с целью изучения общей ангиоархитектоники.

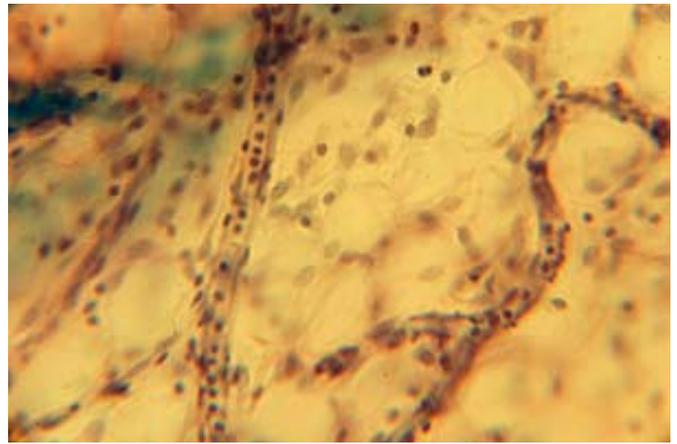


Рис. 1 Новообразование сосудов рыхлой соединительной ткани паратравматической зоны, 5 сут. Инъекция, докраска гематоксилином-эозином. Ув. x400.

Оставшаяся часть материала заливалась в парафин и готовились стандартные гистологические срезы, толщиной от 8 до 20 мкм. Окраска последних проводилась гематоксилином-эозином и пикрофуксином по ван Гизону (Артишевский А.А. и др., 1999).

Электронная микроскопия. Участки мышц каждой группы животных фиксировали в 2,5% растворе глутарового альдегида на 0,1 М фосфатном буфере в течение 2 ч. Материал обезжизнялся в спиртах возрастающей концентрации и ацетоне, заливали в аралдит по общепринятой методике. Для прицельной ультрамикроскопии и морфометрии использовали полутонкие срезы. Окрашивали их 1% раствором метиленового синего.

Морфометрия. С гистологических препаратов на микроскопе МБИ-15 У42 были сделаны микрофотографии цифровой фотокамерой (Olympus C4000z, Canon EOS 300D, Nikon D80). Морфометрия компонентов гемомикроциркуляторного русла и окружающих структур производилась на ПЭВМ при помощи программы обработки и анализа изображений Image Tool версии 3.0, разработанной Научным центром здоровья Техасского университета США, Сан-Антонио. Предварительно проведена геометрическая калибровка изображений для различных условий съемки (увеличение объектива и разрешение снимка). Для этого на микроскопе сделаны фотоснимки окулярной сетки на различных увеличениях и разрешениях, которые откалиброваны и внесены в сервис «Геометрическая калибровка» - «Spatial Calibration». Измерялись диаметры артериол, прекапилляров, капилляров, посткапилляров, венул, углы ветвления микрососудов, размеры окружающих тканевых структур. Измерялись длина и ширина капиллярных ячеек.

Установленные особенности внутримышечного расположения микрососудистого русла следует учитывать при производстве разрезов этих мышц. Уменьшение степени повреждения микроциркуляторного русла при разрезах реально способствует сужению зоны ишемии, более быстрому восстановлению объемных конструкций микрососудистых сетей, следовательно, восстановлению микроциркуляции крови и регенерации мышечных волокон. В эксперименте, после иссечения фрагмента мышцы выделяется три части: проксимальная и дистальная культя, и расположенная между ними зона иссечения. На концах проксимальной и дистальной культей после травмы возникает зона ценкеровского некроза, где в дальнейшем происходят перестройка и восстановление тканей. Участок культей, прилежащий к зоне некроза, обозначен как паратравматическая зона. В дистальной культе она занимает большую протяженность по длине мышцы. К концу 1-х суток после резекции мышцы достоверно увеличиваются по сравнению с контролем все изученные параметры – диаметры капилляров, посткапилляров, венул и поперечник мышечных волокон в паратравматической зоне.

На 5-е сутки полнокровие капилляров, посткапилляров, венул и отек мышечных волокон, по сравнению с острым периодом, уменьшаются. Диаметры венозных компонентов микроциркуляторного русла достоверно выше значений интактных животных. Со второй недели опыта диаметры капилляров стабилизируются на значениях, не отличающихся от контрольных. Расширенные посткапилляры впадают в полнокровные венулы под углом, приближающимся к прямому. При этом посткапилляры и венулы весь период наблюдения были полнокровными.

Некротические изменения в области пересеченных мышечных волокон наблюдаются в течение 10 дней. В первые пять суток после травмы саркоплазма на концах поврежденных волокон приобретает зернистое строение или распадается на крупные глыбки. Образовавшиеся продукты некроза находятся внутри базальных мембран разрушенных частей мышечных волокон. После травмы в зоне резекции интенсивно развивается соединительная ткань, заполняющая зону вокруг кровоизлияния. Соединительнотканьные элементы проникают проксимально и дистально между пересеченными концами мышечных волокон, активно идет прорастание сосудов и формирование сосудисто-

тканевых соотношений в зоне регенерации. На 5-е сутки процесс резорбции некротического материала протекает замедленно. В интерстициальном пространстве зоны некроза определяются нейтрофильные лейкоциты, макрофаги и фибробласты. Электронномикроскопически в зоне некроза отмечается мелкозернистый материал, фрагменты миофибрилл, осмиофильные тельца и вакуоли небольших размеров без определенной ориентации. На 10-е сутки коллагеновые волокна замуровывают отдельные деструктивно измененные концы мышечных волокон. Преобладающими элементами в регенерате становятся фибробласты. Направление роста микрососудов соответствует продольной оси мышцы. Признаков дальнейшего распада мышечных волокон не отмечается. Резорбция некротического материала, в основном, закончена.

К 30-м суткам соединительнотканьный рубец сформирован, по его периферии отмечаются отдельные молодые мышечные волокна, окруженные элементами соединительной ткани. В паратравматической зоне сохраняется полнокровие отво-

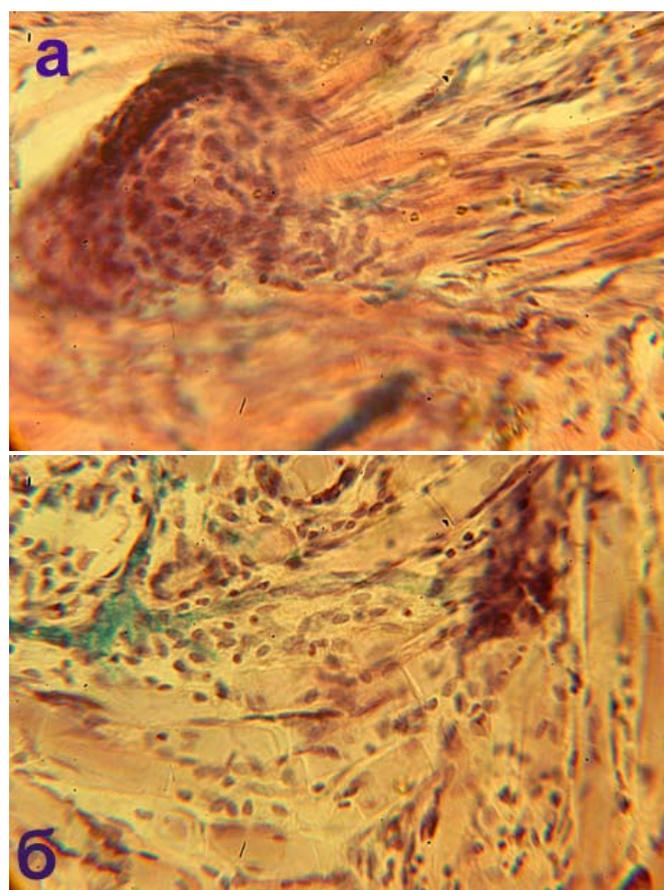


Рис. 4 Сформированная соединительная ткань на месте аутотрансплантата (мышечного «фарша»). Икроножная мышца белых крыс после резекции и пластики ауто-трансплантатом. 30-е сутки опыта. Инъекция берлинской лазурью, докраска гематоксилином-эозином. Ув.: а – x100, б – x160.

ционного процесса достоверно не изменялись диаметры артериол, капилляров и мышечных волокон. Различия были значимы на 30-е сутки, в сравнении с 15-ми у диаметров прекапилляров ($p=0,000$), посткапилляров ($p=0,006$), венул ($p=0,002$).

Несмотря на различия по срокам возникновения интенсивной перестройки, все же имеются общие черты изменений путей гемомикроциркуляции, наблюдаемые как при резекции мышцы, так и при резекции в сочетании с пластикой свободным ауто-трансплантатом.

Проведено сравнение изменения диаметров компонентов гемомикроциркуляторного модуля и мышечных волокон по срокам между двумя опытами (резекцией мышцы – опыт 1 и резекции в сочетании с ведением ауто-трансплантата - опыт 2).

На 5-е сутки диаметры капилляров и посткапилляров в двух опытах не отличались между собой. При этом достоверные различия в мышцах разных опытов установлены между артериолами ($p=0,000$), прекапиллярами ($p=0,000$), венулами ($p=0,038$) и мышечными волокнами ($p=0,000$).

На 15-е сутки в обоих опытах диаметры капилляров, венул, мышечных волокон значимо не различались. Достоверные различались диаметры артериол ($p=0,000$), прекапилляров ($p=0,000$) и посткапилляров ($p=0,005$) разных опытов.

На 30-е сутки по-прежнему не отличались между собой диаметры капилляров в мышцах разных опытов, а также и поперечник мышечных волокон. На 30-е сутки значимо различались диаметры артериол ($p=0,000$), прекапилляров ($p=0,000$), посткапилляров ($p=0,029$), венул ($p=0,005$).

При проведении системного многофакторного анализа изученных параметров – диаметров всех компонентов гемомикроциркуляторных модулей и окружающих мышечных волокон в комплексе можно сделать следующие обобщения. После резекции мышцы (опыт 1) величина интегрального показателя характеризующего состояние микроциркуляторных модулей и мышечных волокон (миоангионов) уменьшается в течение 15-ти суток, а через 2 недели после резекции компенсаторные процессы в значительной степени улучшают структурно-функциональное состояние мышц.

Интегральный показатель после резекции в сочетании со свободным ауто-трансплантатом (опыт 2), колеблется незначительно во все периоды наблюдения. Однако при этом, четкой стабилизации не происходит. Математическое моделирование дока-

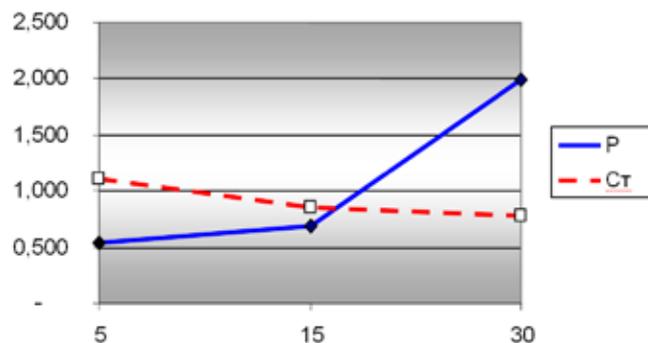


Рис. 6 Системный многофакторный анализ. Взаимоотношения интегральных показателей диаметров компонентов гемомикроциркуляторных модулей и мышечных волокон икроножной мышцы крыс в опыте 1 (P) и опыте 2 (Cm).

зывает, что к 30-м суткам состояние микроциркуляторных модулей далеко от контроля (рис.6).

При расчете интегрального показателя без учета диаметра мышечных волокон динамика также похожа на первый вариант показателя.

Следовательно, не только морфологический анализ, но и математическое моделирование показывает четкую связь между всеми компонентами микрососудистого модуля и мышечными волокнами в динамике адаптационной перестройки после повреждения мышцы.

Изменения микроциркуляции при ранении обуславливаются реактивными явлениями со стороны артериол, капилляров и венул и их повреждением, а также изменениями в лимфатических капиллярах. К первым реактивным явлениям относится спазм сосудов в области раны, сменяемый паралитическим их расширением. В то же время в результате кровотечения включаются механизмы гемостаза. Происходит повышение проницаемости сосудистой стенки и быстро нарастает отек. Травматический отек характеризуется наличием свободной жидкости в межклеточных пространствах (собственно отек), а также набуханием тканей вследствие повышения гидрофильности их коллоидов. Развивающиеся гипоксия и ацидоз, изменение состояния коллоидов, повышение осмотического давления способствуют прогрессированию травматического отека.

Наиболее полные данные, при определении жизнеспособности тканей, можно получить только при сочетании с гистологическим исследованием.

Таким образом, при резекции скелетной мышцы структурная организация гемомикроциркуляторного русла и параметры взаимоотношений микрососудов с мышечными волокнами, составляют

структурную основу нарушения гемодинамики и метаболизма в скелетной мышце. В эксперименте после резекции в сочетании с аутотрансплантацией измельчённой мышцей морфологические параметры компонентов кровеносного русла, тканевых структур свидетельствуют о снижении уровня микроциркуляции более выраженном, чем при резекции и без аутотрансплантации. При проведении первичной хирургической обработки после ранения скелетных мышц необходимо учитывать различия динамики восстановления пространственной организации микроциркуляторного кровеносного русла на разном удалении от резекции в области разных типов мышечных волокон.

ВЫВОДЫ

При резаной ране в скелетной мышце структурная организация гемомикроциркуляторного русла и параметры взаимоотношений микрососудов с мышечными волокнами, составляют морфологическую основу нарушения гемодинамики и метаболизма в скелетной мышце.

Структура стенки и диаметр сосудов микроцир-

куляторного русла в условиях резекции мышцы и первичной хирургической обработки изменяются разнообразно и гетерохронно. В большей степени изменено венозное звено (посткапилляры и венулы).

В эксперименте после резекции в сочетании с аутотрансплантацией измельчённой мышцей морфологические параметры компонентов кровеносного русла, тканевых структур и математическое моделирование свидетельствуют о более выраженном снижении уровня микроциркуляции, чем при резекции и ушивании мышцы.

Мышечный аутотрансплантат, развивающийся из измельченной мышечной ткани, отличается от замещенной им мышцы разнонаправленным расположением мышечных волокон, преобладанием соединительно-тканной стромы, длительным расширением микрососудов.

Разработанные для экспериментального моделирования инструменты позволяют сократить эргономические затраты в клинической практике и стандартизировать экспериментальное моделирование регенерации мышечной ткани при исследовании в морфологических лабораториях.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ СОКРАЩЕНИЙ

А – артериолы

ПрК – прекапилляры

К – капилляры

ПсК – посткапилляры

В – венулы

ЛИТЕРАТУРА

1. Гелашвили П.А. Комплексность анализа перестройки гемомикроциркуляторного русла при экспериментальных морфологических исследованиях /Гелашвили П.А., Юхимец С.Н., Гелашвили О.А., Чемидронов С.Н., Галахов Б.Б., Подсевалова И.В. //Новые технологии в медицине (экспериментальные, клинические, морфологические и социальные аспекты) / Матер. конф.- Волгоград: ООО «Принт», 2004.- С. 231-232..
2. Гелашвили П.А. Микротопографические особенности васкуляризации скелетных мышц млекопитающих и человека в связи с задачами хирургии мышц /Гелашвили П.А., Гелашвили О.А., Чемидронов С.Н., Юхимец С.Н //Естествознание и гуманизм /Сб. научных трудов.- Томск, 2005.- Т. 2.- № 5.- С.72
3. Чучков В. М. Микрохирургические аспекты морфологии скелетных мышц млекопитающих и человека /Чучков В. М., Гомоюнова С.Л., Чемидронов С.Н., Гелашвили О.А., Дрогобыч О.В. // Морфологические ведомости № 3-4, 2006. – С. 64-65.
4. Гелашвили О.А. Микротопографические особенности васкуляризации скелетных мышц млекопитающих и человека в связи с задачами хирургии мышц /Гелашвили О.А., Юхимец С.Н, Чемидронов С.Н. //Саратовский научно – медицинский журнал № 3(13), 2006. - С. 11-12
5. Структурная перестройка компонентов гемомикроциркуляторного русла скелетных мышц крыс после иссечения участка мышечного брюшка /Чемидронов С.Н., Гомоюнова С.Л., Павлова И.А., Гелашвили П.А. //Морфологические ведомости № 1-2, 2007. -С 144-147.