

УДК 630.4-4/18-03.4

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ КРИТЕРИИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТИ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ
У КРОЛИКОВ ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ В ТЕРАПИИ ПРЕПАРАТА ТИЗОЛЯ**

Н.Г. КОРОТКИХ, И.Н. ЛЕСНИКОВА, К.В. БАРСУКОВА

ГБОУ ВПО «Воронежская государственная академия им. Н.Н. Бурденко»
394036, г.Воронеж, ул.Студенческая, д.10.

Аннотация: современное представление о применении в лечении лекарственных препаратов не возможно без анализа ультраструктур клеток. Морфологические критерии регенерации костных структур дают полную картину влияния всех факторов на восстановительный процесс. Детальное изучение всех критериев формирует полную и четкую картину регенерации.

Ключевые слова: регенерация, лекарственный препарат, нижняя челюсть.

**MORPHOLOGICAL CRITERIA OF THE MANDIBLE BONE IN THE RABBITS BY THE TISOL
PREPARATION USE IN THERAPY**

N.G. KOROTKIKH, I.N. LESNIKOVA, K.V. BARSUKOVA

N.N. Burdenko Voronezh state medical academy

Abstract: contemporary concept of medical preparations use in treatment is impossible without the cell ultrastructure analysis. Morphological criteria of the osseous structures regeneration provide with complete picture of how all factors impact the restoration process. The analysis of all criteria ensures the complete and accurate picture of regeneration.

Key words: regeneration, medical preparation, mandible.

На фоне совершенствования методов хирургического и комплексного лечения различных повреждений кости показатели травматизма, летальности, инвалидизации по-прежнему высоки [1, 3]. С каждым годом возрастает частота техногенных катастроф и дорожно-транспортных происшествий [2], а наибольший процент среди повреждений занимают сочетанные травмы, где немало важную процентную долю занимают повреждения костей лица, и в частности, нижней челюсти. Принимая во внимание, что транспортные травмы чаще всего происходят в молодом, работоспособном возрасте, то задача снижения травматизма и нивелирование его отдаленных последствий: длительного снижения работоспособности и высокой частоты инвалидизации становятся важной не только с медицинской, но и с социальной точки зрения [4, 6, 8]. В решении этих задач одним из основных подходов должно быть внедрение новых тактик и технологий во врачебную практику с целью ускорить процессы регенерации и максимально сократить период восстановления [2, 5, 7].

Цель исследования – изучение морфологических критериев регенерации кости нижней челюсти с применением Тизоля, что может послужить описанием нового способа усиления регенерации.

Материалы и методы исследования. Экспериментально-морфологическая часть работы выполнена на 48 половозрелых беспородных лабораторных кроликах с начальной массой 3,5 кг в условиях *экспериментально-биологической клиники (ЭБК) научно-исследовательского института экспериментальной биологии и медицины (НИИ ЭБМ)* Воронежской государственной медицинской академии им. Н.Н. Бурденко. Длительность содержания животных составляла не более 42 суток с учетом моделирования полного и неполного переломов на нижней челюсти (производили под эфирным наркозом). Все животные находились в условиях свободного перемещения и в свободном доступе к корму и воде. Содержание лабораторных животных, их участие в эксперименте соответствовало требованиям Международной конвенции Совета Европы о защите лабораторных и домашних животных (Женева-Стокгольм, 2008 г., п.п. 3.1.3-4.2.1).

В эксперименте были сформированы следующие группы:

Группа 1. Первая контрольная группа. В этой группе было 12 животных. Моделировался не полный перелом нижней челюсти. Регенерация была спонтанная (естественная), без применения дополнительных лекарственных средств.

Группа 2. Вторая контрольная группа. В этой группе было 12 животных. Моделировался полный перелом нижней челюсти. Регенерация была спонтанная (естественная), без применения дополнительных лекарственных средств.

Группа 3. Первая экспериментальная группа. В этой группе было 12 животных. Моделировался не полный перелом нижней челюсти. При регенерации использовался препарат Тизоля, наносимый на поверхность раны.

Группа 4. Вторая экспериментальная группа. В этой группе было 12 животных. Моделировался полный перелом нижней челюсти. При регенерации использовался препарат Тизоля, наносимый на поверхность раны.

Забор материала проводился на 14, 28 и 42 сутки эксперимента (табл. 1).

Таблица 1

Количественные параметры эксперимента

Группы	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 4
	(кол-во животных)			
14 сутки	4	4	4	4
28 сутки	4	4	4	4
42 сутки	4	4	4	4
Всего в группе	12	12	12	12
Всего в эксперименте	48			

Для морфологического исследования иссекали фрагмент нижней челюсти, включая участок сращения проксимального и дистального отломков. Фиксацию материала проводили в 10% растворе нейтрального формалина в течении 14-20 дней, после чего тщательно промывали в проточной воде не менее 2-х суток. Принимая во внимание большую подвижность концов отломков и костного регенерата все процедуры подготовки материала для декальцинации, промывки и обезвоживания производили исключительно пальцами без пинцета, тупоконечными глазными ножницами под контролем налобной анатомической лупы.

Декальцинация материала проведена в содержащей азотную кислоту смеси при этом осуществляется текущий контроль элиминации минерального комплекса кости с помощью длинной острой препаральной иглы, которой протыкали костную ткань и определяли уровень сопротивления сохранившейся кости. После декальцинации материал промывали несколько суток в проточной воде, проводили через батарею спиртов возрастающей концентрации и диоксан. Обезвоженные тканевые блоки заливали в парафин, после чего проводилась серийная резка на ультрамикротоме. Срезы изготавливались толщиной 3-5 мкм.

Таблица 2

Методики морфологического исследования и анализа

№ п/п	Структура, вещество	Способ идентификации	Литературный источник
1.	Обзорная микроскопия кости	Окраска гематаксином Карацци-эозином	Г.А. Меркулов, 1961
2.	Коллагеновые волокна	Окраска пикрофуксином-гемотоксином Ганзена	
3.	Ретикулиновые волокна	Импregnация азотнокислым серебром по Футу	
4.	Нейтральные гликопротеины	ШИК -реакция с периодатным окислением	McManus, 1948, P. Hothckiss, 1948
5.	Гиалуриновая кислота	Реакция с "ферригидроксидзолем" pH 2,0	O. Muller, 1956
6.	Сульфатированные кислые гликопротеины	Метахромазия с ТС pH 4,5	L. Belanger, G. Harnett, 1960

Математическая обработка результатов исследования включала дескриптивный анализ для получения первичных статистик-математического ожидания, среднеквадратического отклонения, ошибки средней, коэффициента вариации Пирсона, значений коэффициентов асимметрии и эксцесса, параметров распределения. В качестве критерия схожести-различимости использован критерий Вилкоксона в модификации С.Р. Рао, М.Дж. Кендалла, А. Стюарта. Позволяющий получить значение критерия, его верхних и нижних границ с учетом длины сравниваемых выборок. Необходимая величина цифрового массива определена методом аккумулярованных средних. Временные тенденции изменения содержания ГК и НПП по мере дифференцировки костной ткани и редукции определены сплайновыми аппроксимациями на основе коэффициента линейного уравнения третьего порядка. Расчеты выполнены на ПЭВМ.

Результаты и их обсуждение. На 14 сутки в первой и второй экспериментальных группах различия не наблюдалось. Регенерация соответствовала нормальному процессу. Сосуды микроциркуляции прорастали аморфное вещество, в большинстве сосудов уже отмечалась структурированность и довольно хорошая кровенаполняемость, но вокруг еще наблюдались единичные остеокластные группы, признаков формирования остецитов визуально не установлено. В полях зрения наблюдаются единичные тканевые базофилы, что свидетельствует о начале процесса регенерации, связанного с активным выделением в аморфное вещество БАВ (гепарина и гистамина). Интенсивность накопления нейтральных гликопротеинов свидетельствует о степени формирования аморфного вещества: в контрольных группах на 14 сутки накопление не превышало 3-4 единиц оптической плотности. Ретикулиновые волокна являются основным компонентом стромы как регенераторного, так и нормального участка костной ткани. Волокна создают каркас для развивающихся клеток (osteocytes, osteoblasts, тканевых базофилов и фибробластов). В контрольных группах за счет начала формирования коллагеновой стромы идет процесс синтеза про-ретикулина (белка-предшественника), из которого потом и будет формироваться коллагено-ретикулиновый каркас. Гиалуриновая кислота является специфичным катализатором регенеративных процессов в соединительной ткани (и в костной соответственно). При классическом

течении процесса регенерации она начинает накапливаться после 10 суток заживления. В контрольных группах ее оптическая плотность достигла $1,13 \pm 0,02$ единицы. В этом же сроке но уже в экспериментальных группах (3 и 4 группы животных в исследовании) наблюдалась следующая картина: В группах полного и неполного переломов кости, где использовалось соединение титана аквакомплекс глицеросольвата (Тизоль[®]), как вспомогательное вещество на срезах, окрашенных гематоксилином-эозином, наблюдалось усиление формирования сосудов микроциркуляции всего пространства перелома, видны формирующиеся остециты, видны формирующиеся (а местами уже и сформированные) костные лакуны, наблюдается единичные процессы погружения костных клеток в них, усиленные тинкториальные свойства препаратов свидетельствуют о повышенных обменных процессах. Преваскулярные зоны светлые, уже видны зачатки формирующийся коллагеновой стромы, и тинкториальные свойства ткани выраженнее не зависимо от того был ли это полный или неполный перелом. Появляются единичные участки формирования коллагеновых волокон III типа, а по тинкториальным свойствам аморфного вещества можно сделать вывод о том, что уже достаточно количество синтетического компонента для формирования коллагенового матрикса. В полях зрения наблюдаются единичные тканевые базофилы, стремящиеся к β -метахромазии, т.е. приобретают синтетические свойства, которые морфологически определяются нарастающим числом гранул в цитоплазме клеток. Такой тип метахромазии свидетельствует о наличии активных тканевых базофилов, секретирующих пролиферативный компонент костной ткани, а также веществ, которые регулируют метаболизм основных компонентов хряща и коллагеновых волокон. Причем, такое явление в экспериментальной группе наблюдается независимо от формы повреждения кости. В препаратах начинают преобладать синтетические компоненты аморфного вещества, что подтверждается усилением тинкториальных свойств окрашенных микропрепаратов. Рисунок развивающихся ретикулиновых волокон усилен, аморфное вещество вокруг уплотнено и структурировано – т.е. идет процесс созревание волокон. Подобная картина наблюдалась независимо от полноты повреждения кости. В условиях эксперимента, уже на 14 сутки независимо от повреждения кости, гиалуроновая кислота в большей степени расположена в матриксе стромы, а не вблизи сосудов, и ее оптическая плотность составила $2,34 \pm 0,03$ единицы (что выше контрольных значений почти в 2 раза). Все эти изменения в регенерации костной ткани свидетельствуют о том, что, по сравнению с контрольной группой животных, в эксперименте с Тизолем процесс регенерации на 14 день исследования ускорен в среднем на 4-5 суток.

На 28 сутки исследования в контрольной группе животных, независимо от степени повреждения структуры нижней челюсти, степень развития сосудов микроциркуляции соответствовало сроку. Кровенаполнение в них было достаточным, просветы были различимы, вокруг сосудов начинали формироваться костные пластинки, состоящие на данном этапе из концентраций нейтральных гликопротеинов и коллагеновых волокон. В 3 и 4 группах уже практически полностью (не менее 80% от основной площади) были сформированы участки коллагеновых волокон III и IV типов, независимо от степени повреждения. Такое состояние костной ткани опережает нормальное заживление на 4-5 суток. В этих же экспериментальных группах наблюдалось усиление рисунка сосудов микроциркуляции, кровенаполнение было выраженнее, чем у животных 1 и 2 контрольных групп. Оксифильно окрашенные поля, сформированные вокруг центральных сосудов, практически полностью содержат остециты, что свидетельствует об ускорении процессов регенерации на 4-7 суток. При этом матрикс отличается высокой фуксинофилией, активно визуализируются направления роста волокон. Такое состояние процесса регенерации для костной ткани свидетельствует о формировании плотного очага ния поврежденных отломков и высокой прочности конгломерата (подобные процессы в плотно волокнистой соединительной ткани может привести к формированию очагов соединительно-тканной и коллагенозной «грубости соединения», вплоть, до образования рубцов). Но в костной ткани, такое состояние только идет на пользу регенерации. В контрольных группах независимо от степени повреждения, в полях зрения наблюдалось от 2 до 4 тканевых базофилов с признаками β -метахромазии, что соответствовало сроку регенерации (28 суток), накопление нейтральных гликопротеинов происходило умеренно: еще не полностью сформирован коллагеново-матриксный аппарат, микроциркуляторные капилляры адекватно не справляются со своими основными задачами. В экспериментальных группах плотность НГП уже значительно распределена по матриксу (до 4,1 оптических единиц), что подтверждается усиленным образованием коллагена III и IV типа. Ретикулиновые волокна формировали довольно плотную и оформленную сеть, которая была более выражена в экспериментальных группах, независимо от степени дефекта по сравнению с контрольной группой. Оптическая плотность гиалуроновой кислоты в опыте была выше на 35% по сравнению с контрольной группой. Такое состояние аморфного вещества свидетельствует об усилении регенерации костной ткани, и опережении данного процесса в среднем не более 7 суток по сравнению со стандартным процессом.

На 42 сутки эксперимента уже можно говорить о полном завершении регенераторного процесса во всех экспериментальных группах: зрительно было уже практически не отличить степень повреждения и группу исследования. сосуды микроциркуляции были сформированы полностью, клеточный состав соответствовал нормальному распределению, оптическая плотность нейтральных гликопротеинов соответствовала плотности нормальной кости, а структура стромы была уже давно и полностью сформирована.

Выводы. Таким образом, морфологическое исследование процесса регенерации костной ткани выявило следующее:

- более выраженную и ускоренную регенерацию микроциркуляторного русла (на 3-5 суток) в исследовании по сравнению с контрольным процессом;
- аморфное вещество восстанавливалось в эксперименте интенсивнее: плотность гиалуроновой кислоты возросла на 40% по сравнению с контролем;
- коллагеново-ретикулиновый каркас в эксперименте формировался на 6-8 сутки что опережало нормальный процесс на 5 суток.

Проведенные морфологические исследования могут свидетельствовать об ускорении процессов регенерации при использовании Тизоля по сравнению с нормальным течением процесса на 5-7 суток независимо от степени повреждения кости.

Литература

1. *Адамян, А.А.* Современные подходы к разработке, изучению и методологии применения перевязочных средств: тез. докл. Первый конгресс ассоциации хирургов им. И.И. Пирогова / А.А.Адамян, С.В.Добыш.– Ташкент, 1996.– С.4–5.
2. *Аничков, Н.Н.* Морфология заживления ран / Н.Н.Аничков, К.Г.Волкова, В.Г.Гаршин.– М.: Медгиз, 1951.– 123 с.
3. *Бульнин, В.И.* Лечение ран / В.И. Бульнин, А.А. Глухов, И.П. Мошуров.– Воронеж, 1998.– 248 с.
4. Роль тепловидения в оценке терапевтического воздействия иммобилизованных протеолитических ферментов на заживление ран / В.К. Гостищев [и др.] // *Клин. хирургия.*– 1985.– № 1.– С.11–12.
5. *Толстых, А.Л.* Особенности содержания гликопротеинов различного класса в регенерате костной ткани в присутствии озона /А.Л. Толстых, Э.Г. Быков // *Материалы научной конференции.*– С-Пб, 2001.– С.83
6. *Толстых, А.Л.* Оптимизация остеогенеза озонированным изотоническим раствором натрия хлорида при лечении переломов трубчатых костей, автореф. диссертации... - к.мед. наук./ А.Л. Толстых, М., 2002.– 21 с.
7. *Peacock, E.* Wound Repair / E. Peacock// Philadelphia-London-Toronto: Saunders, 1976.– 699 p.
8. *Venaker, Ed.L.* Biologic basis of wound healing / Ed.L. Venaker.– New-York; London: Harper and Row, 1975.– 344 p.