

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ РЕГЕНЕРАЦИИ СЛИЗИСТОЙ ПОЛОСТИ РТА НА ФОНЕ РАЗЛИЧНЫХ МЕТОДОВ ФАРМАКОТЕРАПИИ

Поройский С.В.^{1,2}, Македонова Ю.А.^{1,2}, Адамович Е.И.¹, Марымова Е.Б.¹

¹ФГБОУ ВО «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Волгоград, e-mail: vlgmed@advent.avtig.ru;

²ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр», Волгоград

Значительно снижает качество жизни геронтостоматологического пациента наличие в полости рта долго не заживающих ран, эрозивно-язвенных поражений. В данной работе проведен сравнительный анализ репаративной регенерации биоптатов, полученных из ротовой полости собак, под влиянием различных методов местного лечения. У собак был смоделирован раневой дефект слизистой оболочки полости рта, который заживал при проведении традиционных методов лечения, инъекций тромбоцитарной аутоплазмы, лекарственной композиции Тизоля с L–аргинином и комбинированного метода лечения (PRP–терапия в сочетании с аппликациями Тизоля с L–аргинином). Изучение раневого дефекта проводили до лечения, на 3, 7 и 14-й день наблюдения. Исследовали площадь грануляционной и соединительной ткани, площадь воспалительного инфильтрата, количество новообразованных сосудов, наличие и степень выраженности отека, гиперемии, полнокровие сосудов, некротических осложнений. На основании данных морфологического исследования установлено, что при моделировании патологического процесса в полости рта наблюдаются незначительные или умеренно выраженные обратимые реактивные воспалительные процессы. Лекарственные препараты и методики их применения не вызывают грубых дегенеративно-дистрофических и деструктивных процессов. Результаты качественных и количественных критериев, полученных в ходе проведения эксперимента, доказывают высокие репаративные свойства комбинированного метода лечения.

Ключевые слова: регенерация, рана, собаки, репарация, тромбоцитарная аутоплазма.

EXPERIMENTAL STUDY OF THE DYNAMICS OF REGENERATION OF THE ORAL MUCOSA ON THE BACKGROUND OF VARIOUS METHODS OF PHARMACOTHERAPY

Poroyskiy S.V.¹, Makedonova Yu.A.^{1,2}, Adamovich E.I.¹, Marymova E.B.¹

¹FGBOU VO "Volgograd State Medical University" of the Ministry of Health of the Russian Federation., Volgograd, e-mail: vlgmed@advent.avtig.ru;

²GBU Volgograd Medical Research Center, Volgograd

Significantly reduces the quality of life of the patient gerontechnological the presence in the mouth not healing wounds, erosive and ulcerative lesions. In this paper, a comparative analysis of reparative regeneration of biopsies obtained from the oral cavity of dogs, under the influence of various methods of local treatment. Dogs were simulated wound defect of the mucous membrane of the mouth, which heal in the conventional methods of treatment, injection of platelet autoplasm, pharmaceutical compositions Tizol with L – arginine and combined treatment (PRP therapy in combination with applique Parts with L – arginine). The study of the wound defect was performed before treatment, on the 3rd, 7th and 14th day of observation. The area of granulation and connective tissue, the area of inflammatory infiltrate, the number of newly formed vessels, the presence and severity of edema, hyperemia, vascular fullness, necrotic complications were studied. On the basis of morphological data, it was found that in the modeling of the pathological process in the oral cavity, slight or moderately pronounced reversible reactive inflammatory processes are observed. Drugs and methods of their use do not cause gross degenerative-dystrophic and destructive processes. The results of qualitative and quantitative criteria obtained during the experiment prove the high reparative properties of the combined treatment method.

Keywords: regeneration, wound, dog, repair, platelet autoplasm.

В настоящее время проблема регенерации слизистой оболочки полости рта является достаточно актуальной [1]. Несмотря на огромное многообразие различных препаратов, обладающих ранозаживляющими свойствами, не всегда удается достичь более быстрой

репаративной регенерации, зачастую нарушение целостности эпителия характеризуется вялым и затяжным течением. Особенно данная закономерность выявлена при воспалительно-деструктивных процессах ротовой полости (эрозивно-язвенные поражения). Геронтостоматологическому больному наличие «болячек» доставляет дискомфорт при разговоре, приеме пищи и т.д., при этом существенно снижая его качество жизни [2]. При всем многообразии ранозаживляющих средств врачи обеспокоены проблемой побочных явлений и эффектов от проводимой фармакотерапии [3]. Современная стоматология в настоящее время получает свое развитие за счет применения таких методов лечения, при которых запускаются все звенья естественных процессов регенерации одновременно. Одним из таких методов является PRP–терапия (инъекции тромбоцитарной аутоплазмы), являющаяся естественной для собственных тканей человека, биодоступной, нетоксичной и иммунореактивной, ускоряющей при этом регенеративные процессы [4].

С целью изучения тканевых и клеточных механизмов репаративной регенерации раневого процесса слизистой оболочки полости рта в условиях применения нового комбинированного способа и традиционных методов лечения нами было проведено экспериментальное исследование.

Материалы и методы. Исследование выполнено в лаборатории моделирования патологии ГБУ «Волгоградский медицинский научный центр». Эксперимент выполнен на 30 собаках – самцах массой от 2 до 16 кг. Эксперименты были одобрены комитетом по этической экспертизе исследований Волгоградского государственного медицинского университета (протокол № 2036).

Премедикация животных осуществлялась путём введения в левую икроножную мышцу 0,1% атропина в количестве, соответствующем весу животного (согласно инструкции производителя). Наркотизация выполнялась препаратом «Золитил-100», который вводился внутримышечно в дозе 8 мг/кг (согласно инструкции производителя). После того как животное переставало реагировать на раздражение, его фиксировали с помощью устройства для фиксации экспериментального животного при заборе биопсийного материала из ротовой полости [5].

Фиксированным на операционном столе животным проводили ультразвуковую чистку зубов, удаление зубных отложений ручным способом, медикаментозную обработку слизистой полости рта антисептическим раствором хлоргексидина биглюконата 0,05% с целью устранения бактериального фактора, способного повлиять на ход эксперимента.

Экспериментальное моделирование патологического процесса проводили посредством создания дефектов слизистой оболочки полости рта на верхней и нижней челюстях справа и слева в области 1 премоляра в преддверии полости рта [6]. Четыре

раневых дефекта размером 1x1 см выполнялись в пределах слизистой оболочки (рис. 1).



Рис. 1. Моделирование патологического процесса

Для исключения влияния на конечный результат эксперимента дополнительных факторов, связанных с индивидуальными физиологическими особенностями, исследование опытных способов местного лечения осуществлялось в пределах одного организма.

- 1-я группа (основная) – внизу справа собакам раневой дефект СОПР обрабатывался традиционным методом лечения (аппликационно Целестодерм:Солкосерил=1:1).
- 2-я группа (сравнения) – вверху справа в комплексном лечении раневого дефекта СОПР применялись аппликации композиции Тизоля с L-аргинином.
- 3-я группа (сравнения) – вверху слева в схему лечения включены инъекции тромбоцитарной аутоплазмы.
- 4-я группа (сравнения) – внизу слева в область раневого дефекта СОПР с левой стороны инфильтрационно по переходной складке вводилась тромбоцитарная аутоплазма объемом 2,0 мл и аппликационно наносилась лекарственная композиция Тизоля с L-аргинином с использованием ранее описанной сэндвич-техники.

В эксперименте была проведена клиническая оценка состояния стандартного раневого дефекта слизистой оболочки полости рта экспериментальных животных, позволяющая количественно оценить динамику заживления раны на фоне проводимой терапии. Забор и гистологическое исследование биоптатов раневых дефектов СОПР проводили на 3, 7 и 14-е сутки эксперимента. Об успешности проводимой терапии судили на основании количественных, полуколичественных данных и качественных критериев (набухание, полнокровие, кровоизлияние сосудов, наличие или отсутствие лимфоидно-клеточной инфильтрации, явлений акантоза). С помощью шкалы полуколичественной оценки («-» - отсутствие признака; «+» - слабые; «++» - умеренные и «+++» - выраженные изменения) исследовали следующие показатели: выраженность воспаления; наличие отека; наличие

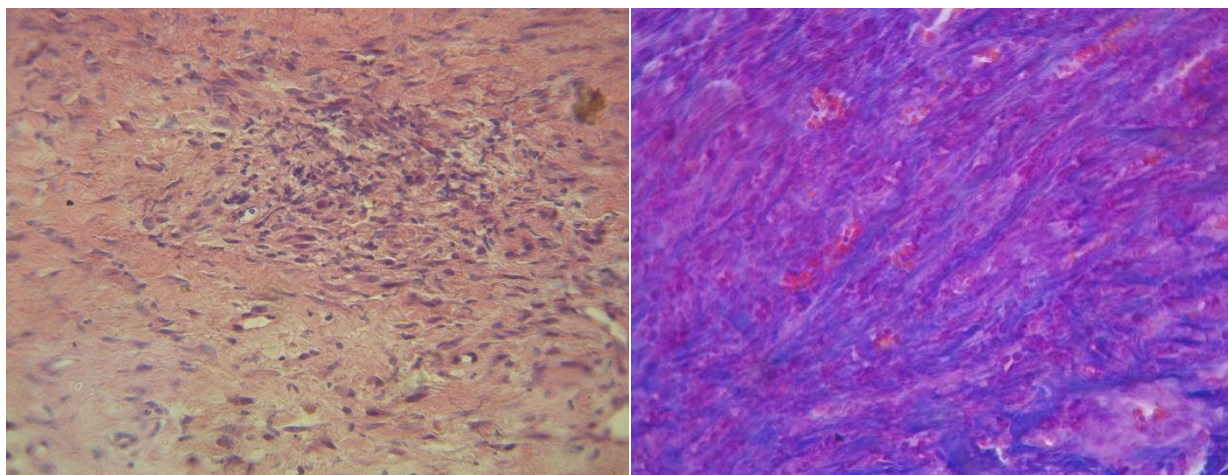
некротических изменений; состояние сосудов.

С помощью морфометрического метода исследовали количественные критерии: площадь воспалительного инфильтрата (%), площадь грануляционной и соединительной ткани (%), а также объёмную долю кровеносных сосудов (%). Морфометрический анализ проводили с помощью компьютерной программы «Видео ТестМорфо-4» (Россия). На всем этапе было проанализировано 120 фотографий и 120 гистологических препаратов.

Данные, полученные в результате исследований, обрабатывали вариационно-статистическим методом с помощью персонального компьютера и программы Microsoft Excel к программной операционной системе MS Windows XP (Microsoft Corp., США) в соответствии с общепринятыми методами медицинской статистики, а также с использованием пакета прикладных программ Stat Soft Statistica v6.0. (Кулаичев А.П., 2006). Статистический анализ проводился методом вариационной статистики с определением средней величины (M), ее средней ошибки ($\pm m$), оценки достоверности различия по группам с помощью критерия Стьюдента (t). Различие между сравниваемыми показателями считалось достоверным при $p < 0,05$, $t \geq 2$ (Сабанов В.И., Комина Е.Р., 1996; Спрейс И.Ф. с соавт., 2006).

Результаты. У всех лабораторных животных со всех четырех сторон получена положительная динамика в восстановлении целостности эпителия. Однако характер, сроки, изменение морфологической картины были достоверно разными в зависимости от типа проводимой терапии.

Морфологическая картина биоптатов слизистой оболочки полости рта со всех четырех сторон до начала лечения у всех лабораторных животных характеризовалась выраженной лимфоидно-клеточной инфильтрацией с доминированием нейтрофильных лейкоцитов. Отмечались некротические процессы в клеточных элементах многослойного плоского неороговевающего эпителия, отек, мукоидное и фибриноидное набухание стенок сосудов и волокнистого компонента собственной пластинки. Обнаруживалось умеренно выраженное полнокровие кровеносных сосудов с диапедезом единичных эритроцитов и интерстициальный отёк. Определялась умеренная лейкоцитарная инфильтрация преимущественно сегментоядерными нейтрофильными гранулоцитами. Отмечался достаточно выраженный очаговый акантоз (рис. 2).



A

Б

Рис. 2. Биоптат слизистой оболочки собак до начала лечения:

А. Окраска гематоксилином и эозином. Начальное увеличение x100.

Б. Окраска по Маллори. Начальное увеличение x50

При сравнении морфологической картины биоптатов исследуемой ткани доказано, что при моделировании раневого процесса в ротовой полости собак морфометрические показатели были идентичны и свидетельствовали об активном воспалении с лимфоидно-клеточной инфильтрацией и образованием воспалительно-клеточных инфильтратов в подлежащей области. При определении достоверных различий в полуколичественных показателях на момент начала лечения получено не было.

На 3-и сутки после начала лечения и моделирования раневого процесса были выявлены качественные и количественные различия: отмечался отек разной степени выраженности, наличие кровоточивости и некротических изменений. При определении морфометрических параметров: площади воспалительного инфильтрата, площади грануляционной и соединительной ткани, объемной доли кровеносных сосудов - также получены достоверно различные результаты между сравниваемыми группами. Было отмечено, что интенсивность морфометрических показателей в области раневого процесса имела различия при применении разных методов медикаментозного лечения.

Гистологическое исследование препаратов слизистой оболочки, полученных в результате эксперимента, объективно свидетельствовало о структурно-морфологических различиях экспериментально созданной модели раневой поверхности в зависимости от типа проводимой терапии. В биоптатах слизистой оболочки, заживающих с применением традиционных методов лечения, в ранние сроки после операции доминировали процессы острого воспаления, отмечался умеренно выраженный отек, некротические изменения умеренного характера. Площадь воспалительного инфильтрата на 3-и сутки составляла

55,3±2,5% и сохранялось до 7-го дня 23,4±1,4%. Признаки развития грануляционной ткани отсутствовали. Объемная доля кровеносных сосудов составила 9,52±0,33%. В субэпителиальной области отмечалось лимфогистиоцитарное скопление клеточных элементов. В сравнении с гистологическими препаратами слизистой оболочки, взятыми для исследования вверху справа (II группа – аппликации Тизоля с L-аргинином), явления некротических изменений и воспаления также присутствовали. Площадь воспалительного инфильтрата достоверно не отличалась от I группы и составила 47,3±1,8%. Признаков развития грануляционной, а тем более соединительной ткани, не отмечалось. Объемная доля кровеносных сосудов составила 9,28±0,28%, что достоверно не отличалось от аналогичного показателя в первой группе ($p>0,05$). Морфометрический анализ биоптатов, полученных вверху слева (III группа – инъекции тромбоцитарной аутоплазмы), также не показал достоверных различий относительно первой и второй групп ($p>0,05$). Площадь воспалительного инфильтрата равнялась 53,4±2,1%, объемная доля кровеносных сосудов составила 9,41±0,32%. Признаки развития новой грануляционной ткани отсутствовали. Полуколичественные данные показали наличие умеренного воспаления, умеренно выраженного отека и некротических изменений. На данном сроке наблюдения у собак слева снизу (IV группа) в области раневой поверхности при осмотре слизистой оболочки отмечалось покраснение поверхности и отек мягких тканей. При оценке гистологической картины слизистой оболочки на 3-и сутки отмечалась умеренная нейтрофильная и лимфогистиоцитарная инфильтрация, полнокровие. Площадь воспалительного инфильтрата достоверно отличалась относительно I и III групп и равнялась 45,4±1,7% ($p<0,05$). Объемная доля кровеносных сосудов составила 9,11±0,25%, разница между группами сравнения была недостоверной ($p>0,05$).

На 7-й день лечения в биоптатах качественные и количественные отличия между группами и относительно 3-го дня наблюдения сохранялись в зависимости от проводимого лечения. Во всех группах явления воспаления, отека уменьшались. Выраженность некротических изменений также снижалась. Морфометрически отмечалось наличие грануляционной и соединительной ткани, уменьшение площади воспалительного инфильтрата, увеличение количества новообразованных сосудов. Так, площадь воспалительного инфильтрата в первой группе уменьшилась в 2,4 раза относительно 3-дневного показателя и составила 23,4±1,4%. Аналогичный показатель во второй группе достоверно отличался от первой группы и составил 16,3±1,2%, что на 43,5% меньше ($p<0,05$). При заживлении раневого процесса в III и IV группах площадь воспалительного инфильтрата составила 18,5±1,0% и 12,4±1,1%. В IV группе данный показатель был достоверно меньше аналогичного показателя в I, II и III группах ($p<0,05$).

Спустя две недели площадь воспалительного инфильтрата во всех группах сравнения равнялась нулю, что свидетельствовало об отсутствии явлений воспаления, отека, некротических изменений в полости рта. В полости рта активными темпами происходила репаративная регенерация соединительной ткани.

Площадь грануляционной и соединительной ткани в препаратах слизистой оболочки, заживающей при применении традиционного метода лечения, составила на 7-е сутки $23,5 \pm 1,2\%$ и $12,3 \pm 1,1\%$, а на 14-е сутки $15 \pm 1,2\%$ и $25,2 \pm 1,1\%$ соответственно. Площадь грануляционной и соединительной ткани в препаратах слизистой на фоне применения аппликаций Тизоля с L-аргинином на 7-е сутки составила $26,6 \pm 0,92\%$ и $14,2 \pm 1,1\%$, а на 14-е сутки $15,8 \pm 1,1\%$ и $25,1 \pm 1,2\%$. Аналогичный показатель в биоптатах, полученных слева сверху (PRP-терапия), показал: $21,2 \pm 0,81\%$ площадь грануляционной ткани и $19,8 \pm 1,2\%$ - площадь соединительной ткани на 7-е сутки и $12,3 \pm 0,9\%$ и $28,4 \pm 1,1\%$ на 14-е сутки соответственно. В IV группе, в которой в качестве медикаментозной терапии применялся комбинированный метод лечения – сочетание инъекций тромбоцитарной аутоплазмы с лекарственной композицией Тизоля с L-аргинином, площадь грануляционной и соединительной ткани составила $25 \pm 1,2\%$ и $15,6 \pm 1,3\%$ спустя 7 дней и $10,4 \pm 1,25$ и $35 \pm 1,2\%$ соответственно на 14-е сутки.

Исходя из полученных данных, можно сказать, что уменьшение площади грануляционной ткани и увеличение площади соединительной ткани активнее происходило на тех участках слизистой, которая заживала на фоне комбинированного метода лечения. Так, площадь соединительной ткани в данной группе составила $35 \pm 1,2\%$, что было достоверно выше на $39,9\%$ относительно первой группы, на $39,4\%$ относительно второй и на $23,2\%$ - третьей группы наблюдения (при $p < 0,05$).

Кроме того, в препаратах слизистой внизу слева было выявлено большое количество новообразованных тонкостенных сосудов, присутствующих в структуре грануляционной ткани. Так, объемная доля кровеносных сосудов в IV группе достоверно увеличилась относительно 3-го дня ($p < 0,05$) и составила $15,62 \pm 0,18\%$ через неделю и $24,1 \pm 0,24\%$ спустя 2 недели. То есть отмечена положительная тенденция в процессах ангиогенеза. В группе, где применялись только инъекции тромбоцитарной аутоплазмы, объемная доля кровеносных сосудов также достоверно изменилась и составила $14,13 \pm 0,85\%$ через 7 дней и $23,4 \pm 0,43\%$ спустя 14 дней. Разница между данным показателем в III и IV группе была недостоверной ($p > 0,05$). Однако в группе, где применялось традиционное лечение, и в группе, где применялись аппликации Тизоля с L-аргинином, объемная доля кровеносных сосудов практически не изменилась на всем этапе наблюдения и составила $10,31 \pm 0,89\%$ спустя 7 дней и $9,5 \pm 0,45\%$ спустя 14 дней – в I группе и $11,52 \pm 0,67\%$ спустя 7 дней и $13,27 \pm 0,35\%$

через 14 дней наблюдения, что было достоверно ниже относительно III и IV групп ($p > 0,05$). Такое обогащенное сосудами строение новой грануляционной ткани, а в дальнейшем соединительной способствует улучшению микроциркуляции [7].

При оценке динамики заживления раневой поверхности наличие осложнений не выявлено ни в одной группе. Достаточно быстрое купирование воспалительного процесса в полости рта можно объяснить тем, что при традиционном медикаментозном лечении использовались лекарственные средства противовоспалительного действия. Применение инъекций тромбоцитарной аутоплазмы способствовало оптимизации течения регенераторного потенциала и улучшению механизмов регенерации, чем в первой группе, но уступало по своему клиническому эффекту относительно IV группы, о чем свидетельствует достоверная разница в показателе при определении площади грануляционной и соединительной ткани на разных этапах наблюдения. Однако подтверждена способность тромбоцитарной аутоплазмы стимулировать процессы неангиогенеза, о чем свидетельствует достоверное повышение объемной доли кровеносных сосудов относительно первой и второй групп сравнения.

Отсутствие осложнений некротического и воспалительного характера в IV группе (комбинированный метод лечения), с нашей точки зрения, обусловлено тем, что лекарственная композиция Тизоля с L-аргинином препятствует развитию инфекции и является барьером для ее проникновения, обладает тканевой проводимостью, не вызывает иммунных реакций и не травмирует грануляционную ткань, обладает противоотечным действием, улучшающим трофику и регенерацию тканей. При применении инъекций тромбоцитарной аутоплазмы происходит активирование сроков регенерации слизистой оболочки раневой поверхности, что, несомненно, способствует уменьшению полученного дефекта за счет интенсивного формирования новой соединительной ткани, состоящей из пучков коллагеновых волокон с расположенными среди них многочисленными клетками и сосудами.

Выводы. Таким образом, применение комбинированного метода лечения (аппликации лекарственной композиции Тизоля с L-аргинином в комбинации с инъекциями тромбоцитарной аутоплазмы) для лечения раневой поверхности на слизистой оболочке полости рта положительно влияет на динамику клинического процесса: ускоряет регенерацию слизистой оболочки, предотвращает развитие осложнений и побочных явлений, способствует уменьшению количества воспалительных явлений и некротических изменений полученной раны. В результате чего происходит более интенсивное формирование стойкой грануляционной, а впоследствии и соединительной ткани.

Наибольшие изменения значений показателей характерны для традиционного метода

лечения. В ближайшие сроки наблюдения и лечения практически все значения морфометрических показателей достоверно ($p < 0,05$) увеличены по отношению к IV группе исследования. Динамика морфологических показателей при использовании лекарственной композиции характеризовалась более интенсивным купированием признаков воспаления и усилением регенерации относительно группы, где применялось традиционное лечение, но более замедленной репаративной регенерацией по сравнению с III и IV группами наблюдения.

В результате эксперимента установлено, что применение современных лекарственных препаратов целесообразно назначать для лечения раневого процесса в полости рта с целью усиления регенерации слизистой оболочки, однако свойства репаративной репарации более выражены при использовании комбинированного метода лечения.

Список литературы

1. Сирак С.В., Чеботарев В.В., Сирак А.Г., Григорьян А.А. Опыт использования местных ранозаживляющих средств при лечении вульгарной пузырчатки с локализацией на слизистой оболочке полости рта и губах // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2013. - Т. 8. - № 1. - С. 59-62.
2. Мочалова Д.А. Экспериментально-клиническое изучение особенностей регенерации слизистой оболочки полости рта с использованием полимерной мембраны: дис. ... канд. мед. наук. – Нижний Новгород, 2015. – 158 с.
3. Вайцнер Е.Ю. Клинико-лабораторное исследование влияния ангиогенного фактора роста тромбоцитарной плазмы на восстановление микроциркуляции при лечении хронического пародонтита хирургическими методами: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Москва, 2013. – 24 с.
4. Ахмеров Р.Р., Зарудий Р.Ф., Овечкина М.В. и др. Технология Plasmolifting – инъекционная форма тромбоцитарной аутоплазмы для лечения хронических катаральных гингивитов // Пародонтология. – 2012. – Т. 17. - № 4. - С. 80-84.
5. Македонова Ю.А. Устройство для фиксации экспериментального животного при заборе биопсийного материала из ротовой полости / И.В. Фирсова, С.В. Поройский, Р.С. Кобелева, Е.В. Кобелев: патент на полезную модель № 162527 от 09.11.2015.
6. Фирсова И.В., Воробьев А.А., Македонова Ю.А. и др. Экспериментальная модель для исследования влияния метода комбинированного плазмолифтинга на слизистую оболочку полости рта // Пародонтология. - 2015. - № 3 (76). – С. 28-33.
7. Максимовская А.Н. Бактериологическое обоснование лечения красного плоского

лишая слизистой оболочки рта с использованием лазерного излучения / А.Н. Максимовская, В.Н. Царев, С.С. Гусейнова // Труды VI съезда Стоматологической ассоциации России. – М., 2000. – С. 275–277.