DOI: 10.18499/2225-7357-2019-8-1-44-48

УДК 616.716.4–001.5–003.9–018.4

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

© Коллектив авторов, 2019

Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика процессов заживления экспериментальных переломов нижней челюсти

А. А. Матчин*, А. А. Стадников, Е. В. Носов, С. Х. Кириакиди

ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Оренбург, Россия

Цель исследования – экспериментально-гистологическая оценка влияния местного применения окситоцина на заживление переломов нижней челюсти.

Материал и методы. Материалом экспериментально-морфологического исследования служила нижняя челюсть в зоне перелома, скрепленного методом костного шва у 24 крыс-самцов линии Вистар массой 220–250 г. Препараты подвергались однотипной гистологической обработке на светооптическом уровне. Исследовали реакции с моноклональными антителами для идентификации экспрессии синтеза протеинов Ki67, p56, bcl 2, caspasa 3.

Результаты. Установлено, что динамика костно-раневого процесса при переломах нижней челюсти и оперативном закреплении отломков костным швом характеризуется фазностью. Светооптические и иммуноцитохимические исследования показали восстановление целостности поврежденной нижней челюсти после закрепления отломков костным швом посредством пролиферации клеток камбиального слоя надкостницы и малодифференцированных мезенхимальных стромальных костномозговых клеток. Полученные данные свидетельствуют об оптимизирующем воздействии на репаративный остеогенез включения в комплекс лечебных мероприятий окситоцина. При этом происходит коррекция элементарных репаративных процессов гистогенеза на уровне экспрессии про- и антиапоптотических генов клеток костной ткани (понижение апоптотической доминанты остеобластов по показателям экспрессии синтеза протеина p53, подавление ферментного каскада, реализация запрограммированной гибели этих клеток по показателю экспрессии белка caspasa 3). Одновременно в регенерате возрастала активность антиапоптотического гена bcl-2 и гена Ki-67 у остеобластов и эндотелиоцитов, определяющих пролиферативный компонент репаративного остеогенеза.

Ключевые слова: репаративный остеогенез, окситоцин, перелом нижней челюсти.

Morphological and Immunohistochemical Characteristics of Experimental Mandibular Fractures Healing Process

© A. A. Matchin*, A. A. Stadnikov, E. V. Nosov, S. Kh. Kiriakidi, 2019

Orenburg State Medical University, Orenburg, Russia

The aim of the study is histological assessment of the effect of oxytocin local application on mandibular fractures healing.

Material and methods. The investigated material was the lower jaw in the fracture zone, fastened by the bone suture method, of 24 Wistar male rats 220–250 g by mass. The preparations were subjected to the same histological processing and studied in light microscope. Reactions with monoclonal antibodies were performed to identify the expression of Ki67, p56, bcl 2, caspasa 3 proteins.

Results. It was established that the dynamics of the bone-wound process in mandibular fractures and the operative fastening of fragments by bone suture is characterized by phase. Light-optical and immunocytochemical studies showed the restoration of the integrity of the damaged mandible after the fragments were fixed with bone suture through the proliferation of the cambial layer cells of the periosteum and low-differentiated mesenchymal stromal bone marrow cells. The data obtained indicate that the use of oxytocin had an optimizing effect on reparative osteogenesis. When this occurs, the correction of elementary reparative processes of histogenesis at the level of expression of pro- and anti-apoptotic genes of bone tissue cells (decrease in the apoptotic dominant of osteoblasts in terms of p53 expression, inhibition of the enzyme cascade, implementation of programmed cells death in terms of caspasa 3) takes place. At the same time, the activity of the anti-apoptotic bcl-2 gene and the Ki-67 gene increased in osteoblasts and endothelial cells, which determines the proliferative component of reparative osteogenesis, increased in the regenerate.

Key words: reparative osteogenesis, oxytocin, mandibular fracture.

***Автор для переписки:**

Матчин Александр Артемьевич

Кафедра стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава России, ул. Советская, 6, г. Оренбург, 460000, Российская Федерация.
E-mail: almatchin@bk.ru***Corresponding author:**

Aleksandr Matchin

Department of dentistry and maxillofacial surgery, Orenburg State Medical University, ul. Sovetskaya, 6, Orenburg, 460000, Russian Federation
E-mail: almatchin@bk.ru**Введение**

Многочисленные клинические наблюдения свидетельствуют, что частота повреждений лицевого черепа за последние десятилетия увеличилась в 2–3 раза [5, 7]. При этом переломы нижней челюсти составляют около 85% всех повреждений костей лицевого скелета. Несмотря на применение современных методов лечения, количество воспалительных осложнений при переломах нижней челюсти остается высоким и варьирует от 5.5% до 41% [8].

Очень сложными в лечении остаются внутрисуставные переломы мышечковых отростков нижней челюсти, которые сопровождаются не только повреждением костных структур, но и мягкотканых элементов височно-нижнечелюстного сустава (ВНЧС). Такие переломы, особенно двусторонние, сопровождаются выраженными анатомо-функциональными изменениями и нередко при консервативном лечении приводят к нарушениям прикуса, развитию контрактуры или анкилоза ВНЧС, сопровождаются повреждением суставного диска, связок, капсулы, гемартрозом [4]. Все это свидетельствует о целесообразности поиска более эффективного способа оптимизации лечения переломов нижней челюсти [2, 6].

Цель исследования – морфологическая и иммуногистохимическая оценка влияния местного применения окситоцина на заживление переломов нижней челюсти в эксперименте.

Материал и методы исследования

Проведены экспериментально-морфологические исследования на 24 крысах-самцах линии Вистар массой 220–250 г. Животным под эфирным наркозом формировалась модель линейного перелома нижней челюсти в пределах зубного ряда. Отломки нижней челюсти скрепляли полиамидной проленовой нитью.

Содержание, кормление, уход за животными и выведение их из эксперимента осуществляли в соответствии со строгим соблюдением принципов, изложенных в Конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других це-

лей (г. Страсбург, Франция, 1986) и согласно Правилам надлежащей лабораторной практики Российской Федерации (приказ МЗ РФ N199н от 1.04.2016 г.).

Объектом исследования служили нижняя челюсть в зоне перелома, скрепленного методом костного шва.

В 1-й серии разработана экспериментальная модель открытого перелома нижней челюсти в пределах зубного ряда, зафиксированная швом из пролена.

Во 2-й серии после фиксации отломков в окружающую нижнюю челюсть мягкие ткани тонкой иглой вводили окситоцин с помощью шприца в разовой дозе 1ЕД (Гедеон Рихтер А. О. Будапешт, Венгрия). В дальнейшем окситоцин вводили в той же дозе 1 раз в день на 2-, 4-, 6-, 8-е сут после операции.

Животных путем ингаляции летальной дозы эфира выводили из опыта на 4-, 6-, 10-е сут после операции по 4 особи в каждой серии.

Для светооптических исследований материал фиксировали в 10% водном растворе нейтрального формалина, спирт-формоле, затем проводили декальцинацию костных объектов в 4% растворе ЭДТА (трилона В) в течение 10 сут и дофиксировали вновь в 10% растворе нейтрального формалина. После фиксации материал обезживали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в целлоидин – парафин. Приготовление серийных срезов толщиной 5–6 мкм осуществлялось на ротационном микротоме МПС-2. Депарафинированные срезы были окрашены гематоксилином Майера и эозином. Для идентификации клеток с признаками пролиферации (синтезирующих протеин Ki67), для оценки эксперсии синтеза протеинов p53, caspasa 3 и антиапоптотического белка bcl-2 использовали метод иммуногистохимии. Для этого срезы инкубировали с соответствующими моноклональными антителами (наборы «Kit» фирмы ДАКО, Дания) в рабочем разведении 1:50. Докрашивание ядер клеток проводили 0.5% раствором метиленового зеленого на 0.1 М ацетатном буфере. Для визуализации структур использовали стрептавидин-биотиновый пероксидазный метод [1]. Подсчет окрашенных иммунопозитивных клеток (в %) осуществляли при просмотре не менее 1000 клеток в различных полях зрения микроскопа МБИ – 15.25 мм², об. 90, ок. 10.

Для оценки достоверности различий между двумя группами экспериментальных животных при нормальном распределении количественных данных использовали t-критерий Стьюдента.

Результаты и их обсуждение

Проведенные экспериментально-морфологические исследования показали, что

Рис. 1. Фрагмент перелома нижней челюсти крысы (1-я серия опыта) на 6-е сут. Фиксация: 10% р-р нейтрального формалина, окраска гематоксилином Майера и эозином. Об. 40, ок. 10. Обозначения: * – вращание мало дифференцированной соединительной ткани между костными отломками.

Рис. 2. Регенерат в области перелома нижней челюсти крысы (1-я серия опыта) на 10-е сут. Фиксация: 10% р-р нейтрального формалина, окраска гематоксилином Майера и эозином. Об. 40, ок. 10. Обозначения: * – формирование костных балок.

динамика костно-раневого процесса при переломах нижней челюсти и оперативном закреплении отломков костными швами (пролен) характеризуется фазностью и отражают возникшую при травме деструкцию кости, весь комплекс непосредственных реакций на повреждение и поступательное развитие восстановительных процессов. Непосредственно после травмы наблюдается развитие первичных деструктивных изменений в костной ткани с последующим формированием кровяного сгустка. В это время развивается острое воспаление в тканях и выраженная резорбция в поврежденных зонах костных фрагментов нижней челюсти за счет активизации остеокластов. Нарастают морфологические изменения в виде дистрофий, а затем некроза костных балок, надкостницы, костномозговых элементов. Продукты, накапливающиеся в зоне местного нарушения гомеостаза, приводят к существенным изменениям проницаемости стенок сосудов микроциркуляторного русла и экстравазации плазмы и форменных элементов крови (плазматическая экссудация

и клеточная инфильтрация). К нейтрофильной инфильтрации вскоре присоединяется макрофагальная (моноцитарного генеза), что характеризует собой начало отграничения некротических участков от жизнеспособных тканей. В этот период дегенеративно-воспалительные процессы сменяются продуктивной (пролиферативной) фазой воспаления. Между участками сшитой кости, в том числе и в области возникшей гематомы, происходит вращение мало дифференцированной соединительной ткани (грануляционной) (рис. 1).

Следует особо подчеркнуть, что формирующаяся грануляционная ткань не уменьшает резорбции костной ткани в зоне перелома нижней челюсти, что очевидно связано с активной деятельностью макрофагальных элементов.

Фаза образования молодой соединительной ткани складывается из двух стадий. В первой из них преобладают острые воспалительные реакции, во второй – продуктивные, в результате чего формируется грануляционная ткань. На 7–14-е сут после закрепления отломков нижней челюсти формируется пул остеобластов вокруг микроциркуляторной сети сосудов челюсти. Вдоль них образуются первичные костные балочки, характерные для ретикулофиброзной костной ткани (рис. 2). Формирующаяся сеть трабекул была связана с краями костной раны и включает в свой состав $8.3 \pm 0.6\%$ остеобластов, $5.7 \pm 0.7\%$ остеоцитов, $3.9 \pm 0.5\%$ остеокластов. Таким образом, между структурами, зафиксированными фрагментами сломанной челюсти, образуется предварительная костная мозоль без признаков ее трансформации в пластинчатую костную ткань. При этом значительная часть остеобластов подвергается атрофии и постепенно исчезает из зоны повреждения нижней челюсти. Происходит созревание клеточно-волоконистой ткани с постепенной ее остеогенной перестройкой и построением на ее основе остеонидных балочек.

В краевых участках поврежденной нижней челюсти сохранялись признаки выраженного остеопороза (на 6-е–10-е сут эксперимента). Особенно эти явления наблюдались в кортикальной пластинке, которая резко истончилась. Надкостница в данных участках была утолщена в основном за счет фиброзного слоя, тогда как сосудистый ее слой был слабо выражен.

Местное применение окситоцина оптимизировало стадии репаративного остеогенеза. Он включал в себя скопления остеогенных элементов – остеобластов и костных трабекул, ориентированных вдоль пучков коллагеновых волокон.

Формирующаяся ретикулофиброзная костная ткань состоит из первичных костных балок, располагающихся вокруг крупных ге-

Таблица

Содержание проапоптотических белков p53, caspase 3, антиапоптотического белка bcl 2 и протеина Ki67 в посттравматическом регенерате нижней челюсти (в промилле ‰)

Протеины	I серия			II серия (применение окситоцина)		
	4-е сутки	6-е сутки	10-е сутки	4-е сутки	6-е сутки	10-е сутки
Остеобласты						
p53	2.8±0.04	3.01±0.02	4.6±0.09	1.1±0.01*	1.4±0.02*	1.9±0.01*
caspase 3	3.1±0.02	4.7±0.03	4.9±0.07	2.2±0.03*	2.6±0.07*	3.1±0.09*
bcl 2	4.1±0.06	4.9±0.07	4.8±0.05	4.6±0.07*	5.5±0.08*	5.7±0.07
Ki67	1.9±0.03	1.3±0.08	1.5±0.01	2.8±0.06*	3.1±0.04*	3.9±0.06
Эндотелиоциты						
p53	3.9±0.06	4.1±0.05	4.7±0.07	4.9±0.03	1.9±0.04*	1.1±0.04*
caspase 3	6.1±0.09	5.9±0.04	5.6±0.09	3.1±0.02*	2.8±0.07*	2.1±0.07*
bcl 2	2.6±0.04	2.4±0.01	2.9±0.02	3.7±0.01*	4.1±0.08*	4.0±0.07*
Ki67	2.2±0.01	2.1±0.01	2.5±0.03	3.9±0.02*	3.8±0.04	3.7±0.02

Примечание: * – различия достоверны по сравнению с I серией эксперимента ($p < 0.05$)

Рис. 3. Фрагмент костного перелома нижней челюсти крысы (2-я серия опытов) на 10-е сут. Фиксация: 10% р-р нейтрального формалина, окраска гематоксилином Майера и эозином. Об. 40, ок. 10. Обозначения: А – участок ретикулофиброзной костной ткани, В – участок пластинчатой костной ткани.

мокапилляров. В краевых участках регенерата регистрируются хондробласты и малодифференцированные хондроциты. К 10-м сутм эксперимента в этих участках формируются типичные изогенные группы хондроцитов, продуцирующие межклеточный матрикс и выступающие за края отломков нижней челюсти (рис. 3).

В этой связи, можно предположить, что окситоцин, вероятно, создает условия для реализации в зоне раневого дефекта эволюционно более древних свойств репарации скелетных тканей (по принципу хондрогенеза). С другой стороны появление новообразованной хрящевой ткани в зоне репарации (в наблюдаемые сроки 10 суток) можно оценить и как неблагоприятный момент, который может привести к образованию механической нестойкости регенерата. При этом отмечено уменьшение проапоптотических остеобластов, эндотелиоцитов и возрастание аналогичных клеток, экспрессирующих синтез белка Ki-67 и антиапоптотического белка bcl 2 (табл.).

При оценке состояния гистологических структур нижней челюсти в области погра-

ничной с зоной перелома отмечено, что введение окситоцина приводило к сохранности костных балок без признаков ремоделирования остеокластической резорбции. При этом отсутствовали резорбционные лакуны как показатели выраженного остеопороза и деминерализации.

Заключение

Полученные нами данные свидетельствуют о фазном характере пролиферативного и апоптотического потенциалов остеобластов в регенерате, а также о корректирующем влиянии окситоцина на соотношение числа камбиальных клеток с апоптозной доминантой.

В своей совокупности результаты исследования подтверждают ранее сформулированное положение о том, что включение в комплекс лечебных мероприятий окситоцина оказывает существенное оптимизирующее воздействие на регенераторные процессы клеток и тканей [3]. Механизм этого влияния определяется коррекцией элементарных процессов гистогенезов на уровне экспрессии про- и антиапоптотических генов клеток костной ткани.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Список литературы

1. Киясов А. П. Современные технологии морфологических исследований. Казань: КГМУ; 2001. 38 [Kiyasov A. Sovremennye tekhnologii morfologicheskikh issledovaniy. Kazan': KGMU; 2001] (in Russian).
2. Савельев А. Л. Использование индивидуальной на костной пластины в лечении больных с переломами угла нижней челюсти. Фундаментальные исследования. 2012; 7: 172–176 [Savel'ev AL. Use of personal extramedullary plate in the treatment of patients with fractures angle of the mandible. Fundamental Research. 2012;(7):172–176.] (in Russian).

3. Стадников А. А. Роль гипоталамических нейропептидов во взаимодействиях про- и эукариот: структурно-функциональные аспекты. Уральское отделение Российской академии наук. Екатеринбург, 2001. 244 [Stadnikov AA. Rol' gipotalamicheskikh neuropeptidov vo vzaimodeistviyakh pro- i eukariot: strukturno-funktsional'nye aspekty. Ural'skoe otделение Rossiiskoi akademii nauk; 2001] (in Russian).
4. Темерханов Ф. Т., Юрмазов Н. Б. Хирургическое лечение переломов мыщелкового отростка нижней челюсти с применением титановых устройств. Бюллетень СО РАМН. 2003; 23(3): 102–107 [Temerchanov F, Yurmazov N. Surgical treatment of condylar process fractures using the titanium devices. The Bulletin of Siberian Branch of Russian Academy of Medical Sciences. 2003;23(3):102–7] (in Russian).
5. Шаргородский А. Г., Стефанцев Н. М. Повреждения мягких тканей и костей лица. М.: ВУНМЦ; 2000. 240 [Shargorodskii A, Stefantsev N. Povrezhdeniya myagkikh tkanei i kostei litsa. Moscow: VUNMTs; 2000.] (in Russian).
6. Harshitha K, Reddy M, Srinath K. Etiology and pattern of mandibular fracture in and around Kolar: A retrospective study. International Journal of Applied Research. 2016;2(4):562–5.
7. Khan M, Ashraf N, Ud Din Q. Loss of Consciousness in Mandibular Fractures. Pakistan Oral & Dental Journal. 2011 Jun;31(1):33–6.
8. Cankaya AB, Erdem MA, Cakarar S, Cifter M, Oral CK. Iatrogenic Mandibular Fracture Associated with Third Molar Removal. International Journal of Medical Sciences. 2011;8(7):547–53. doi: 10.7150/ijms.8.547

Поступила в редакцию 12.12.2018
Принята в печать 4.03.2019

Received 12.12.2018
Accepted 4.03.2019

Для цитирования: Матчин А.А., Стадников А.А., Носов Е.В., Кириакиди С.Х. Морфологическая и иммуногистохимическая характеристика процессов заживления экспериментальных переломов нижней челюсти. Журнал анатомии и гистопатологии. 2019; 8(1): 44–48. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-1-44-48.

For citation: Matchin AA., Stadnikov AA., Nosov EV., Kiriakidi SKh. Morphological and immunohistochemical characteristics of experimental mandibular fractures healing process. Journal of Anatomy and Histopathology. 2019; 8(1): 44–48. doi: 10.18499/2225-7357-2019-8-1-44-48.