© Коллектив авторов, 2019
УДК 616.717.3:021.4
DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14163>
ISSN – 2073-8137

МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ЛЕКАРСТВЕННОГО УЛЬТРАФОНОФЕРЕЗА ГИДРОКОРТИЗОНОМ И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ

Е. В. Щетинин¹, С. В. Сирак¹, С. П. Рубникович², З. М. Кочкарова¹,
А. А. Андреев¹, А. Ю. Муратова¹, М. Г. Перикова¹, Г. Г. Петросян¹

¹ Ставропольский государственный медицинский университет,
Российская Федерация

² Белорусская медицинская академия последипломного образования,
Минск, Республика Беларусь

MORPHOMETRIC PARAMETERS OF REPARATIVE REGENERATION OF THE BONE TISSUE IN TERMS OF MEDICINAL PHONOPHORESIS WITH HYDROCORTISONE AND HYALURONIC ACID

Shchetinin E. V.¹, Sirak S. V.¹, Rubnikovich S. P.², Kochkarova Z. M.¹,
Andreev A. A.¹, Muratova A. Yu.¹, Perikova M. G.¹, Petrosyan G. G.¹

¹ Stavropol State Medical University, Russian Federation

² Belarusian Medical Academy of Postgraduate Education, Minsk, Republic Belarus

Представлены результаты исследования минерализации костного регенерата на различных стадиях репаративного остеогенеза в условиях стимуляции ультрафонофорезом с гидрокортизоном и гиалуроновой кислотой. На 54 годовалых кроликах установлено преимущественное стимулирующее действие ультрафонофореза с гиалуроновой кислотой на пролиферативную активность в костной ткани, которое отчетливо проявлялось в ранний период регенерации (20 суток) и на стадии формирования первичного остеона с образованием ангиогенной костной структуры (в срок 30 суток) по сравнению с ультрафонофорезом с гидрокортизоном, где наибольший эффект отмечен на стадии костной мозоли, когда формировалась пластинчатая костная ткань (в срок 60–120 суток).

Ключевые слова: остеогенез, минерализация, кость, перелом, гиалуроновая кислота, ультрафонофорез

The article presents the results of the study of bone regenerate mineralization at different stages of reparative osteogenesis under stimulation by ultraphonophoresis with hydrocortisone and hyaluronic acid. The experiment was conducted on 54-year-old rabbits. The study found the predominant stimulating effect of ultraphonophoresis with hyaluronic acid on reparative bone tissue regeneration, which was clearly manifested during the period of proliferation and differentiation of osteogenic cellular elements (20 days) and at the stage of formation of the primary osteon with the formation of angiogenic bone structure (within 30 days) compared with ultraphonophoresis with hydrocortisone, where the greatest effect was noted at the stage of callus, when lamellar bone tissue was formed (in a period of 60–120 days).

Keywords: osteogenesis, mineralization, bone, fracture, hyaluronic acid, ultraphonophoresis

Для цитирования: Щетинин Е. В., Сирак С. В., Рубникович С. П., Кочкарова З. М., Андреев А. А., Муратова А. Ю., Перикова М. Г., Петросян Г. Г. МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ В УСЛОВИЯХ ЛЕКАРСТВЕННОГО УЛЬТРАФОНОФЕРЕЗА ГИДРОКОРТИЗОНОМ И ГИАЛУРОНОВОЙ КИСЛОТОЙ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019; 14(4):660–663. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14163>

For citation: Shchetinin E. V., Sirak S. V., Rubnikovich S. P., Kochkarova Z. M., Andreev A. A., Muratova A. Yu., Perikova M. G., Petrosyan G. G. MORPHOMETRIC PARAMETERS OF REPARATIVE REGENERATION OF THE BONE TISSUE IN TERMS OF MEDICINAL PHONOPHORESIS WITH HYDROCORTISONE AND HYALURONIC ACID. *Medical News of North Caucasus*. 2019; 14(4):660–663. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14163> (In Russ.)

ГК – гиалуроновая кислота
УФГД – ультрафонофорез гидрокортизона

УФГК – ультрафонофорез гиалуроновой кислоты

Гиалуроновая кислота, являющаяся основным компонентом соединительнотканых элементов, участвует в процессах репаративной регенерации костной ткани [1–3]. Одними из мощных физических факторов, способных в сочетании с

гиалуроновой кислотой влиять на рост и структурную организацию костной ткани, могут выступать ультразвуковые потенциалы [4–6].

Вполне оправданным следует считать интерес к стимуляции физическими факторами внешней сре-

ды эндостальных и периостальных источников регенерации при травматическом повреждении костей лицевого скелета с учетом органоспецифических особенностей нижней челюсти, отличающих ее от длинных трубчатых костей, на которых и получены основные данные о остеорепарации ультразвуком [7–9]. В этой связи дополнительная терапия переломов плоской кости нижней челюсти с использованием амбивалентных лекарственных веществ, вводимых чрескожно с помощью ультразвуковых колебаний, безусловно, заслуживает особого внимания как малоинвазивная и перспективная методика лечения.

Цель исследования – оценка морфологической динамики в области перелома нижней челюсти при использовании ультрафонофореза с гиалуроновой кислотой или гидрокортизоном.

Материал и методы. Исследования выполнены на 54 беспородных половозрелых кроликах массой 2,5–3 кг, которых содержали в обычных условиях вивария на привычном для них пищевом рационе. Всем животным под внутривенным рометаровым наркозом производили односторонний перелом и иммобилизацию фрагментов нижней челюсти с помощью иммобилизационного устройства по авторской методике [10] с целью получения линейных переломов в точно заданных местах при помощи жестких направляющих спиц.

Все животные разделены на 3 группы (по 18 особей в каждой). В основных группах в качестве контактного вещества использовали гиалуроновую кислоту и гидрокортизон. Животным контрольной группы после операции лечебные мероприятия не проводили. Кролики основных групп получали через выбритую часть нижней челюсти наочно по 10 сеансов ультрафонофореза гиалуроновой кислоты (УФГК) и гидрокортизона (УФГД) в области перелома начиная с 7-х суток после операции (процедуры повторялись через день). Для ультрафонофореза использовали модифицированный отечественный аппарат «Интрадонт», работающий с частотой 850 кГц. Озвучивание проводили малыми терапевтическими дозами в импульсном режиме интенсивностью 0,4 Вт/см² с экспозицией 5 мин через день, начиная с 5-х суток после операции в течение 20 суток (всего 10 процедур).

Животных выводили из опыта через 10, 20, 30, 60, 90 и 120 суток. Оперированную половину нижней челюсти освобождали от мягких тканей и выпиливали блоки, которые фиксировали в 10 % растворе нейтрального формалина. Подготовка материалов для морфометрического исследования с их оценкой производилась по ранее описанной методике [8]. Подсчет клеток выполняли на единицу площади.

Результаты анализировали, цифровые данные подвергали статистической обработке с применением однофакторного дисперсионного анализа и критерия множественных сравнений Ньюмена – Кейсла в программе «Primer of Biostatistics 4.03» для Windows. Достоверными считали различия при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение. В первые 10 суток после моделирования травмы у животных опытных и контрольной групп в регенерате преобладали деструктивно-некротические процессы. В зоне перелома выявлялись все признаки воспалительного процесса с фрагментами кости, выполняющими роль флогогена, явлениями эмиграции клеточных элементов крови (единичные эритроциты, нейтрофилы). В мелких расширенных кровеносных сосудах присутствовали различные этапы реакции микроциркуляторного русла – от артериальной гиперемии до стаза. Костные элементы обнаруживали состояние

начинающейся пролиферации: в периостальной и межотломковой зонах отмечена малодифференцированная соединительная ткань, которая представлена бластными клетками и нежными коллагеновыми волокнами [8].

Анализ качественного состава клеточных элементов в срок 10 дней с их количественной оценкой показал наличие достоверных сдвигов в структуре лимфоцитов, остеобластов и остеокластов, несмотря на проведение в эти сроки только двух процедур УФГК и УФГД (табл.). Наиболее существенной следует признать реакцию со стороны остеобластов: при УФГК остеобластов в регенерате выявлено почти в 7 раз, а при УФГД – в 4 раза больше, чем в контрольной группе (различия статистически достоверны, $p < 0,05$). Количество других клеток коротким курсом ультрафонофореза стимулировалось менее отчетливо.

Таблица

**Морфометрическая оценка активности
репаративного остеогенеза
у экспериментальных животных (M±m)**

Сроки исследования	Группы животных		
	Контроль	УФГК	УФГД
Лимфоциты (показатель интактных животных: 0,28±0,03)			
10-е сутки	0,43±0,13	0,95±0,41*	0,86±0,54*
20-е сутки	1,96±0,25*	0,92±0,73*	0,84±0,09
30-е сутки	1,68±0,23*	0,96±0,38*	0,49±0,05
60-е сутки	1,22±0,74*	0,76±0,81	0,54±0,43
90-е сутки	0,99±0,65*	0,69±0,55	0,38±0,27
120-е сутки	0,83±0,48	0,42±0,05	0,32±0,08
Остеобласты (показатель интактных животных: 15,62±2,53)			
10-е сутки	6,24±1,18	44,96±3,68*	26,23±8,95*
20-е сутки	24,84±4,29*	49,46±14,33*#	24,49±6,73*
30-е сутки	29,52±7,83*	39,22±11,09*#	23,38±8,45*
60-е сутки	19,46±3,98	23,59±10,42*	42,54±0,43*#
90-е сутки	12,59±8,84	19,94±8,75#	44,73±12,07*#
120-е сутки	11,73±4,61	23,42±0,05*#	47,32±10,54*#
Остеокласты (показатель интактных животных: 0,57±0,05)			
10-е сутки	0,23±0,19	1,55±0,54*#	0,66±0,04
20-е сутки	0,66±0,15	1,92±0,18*#	0,54±0,07
30-е сутки	0,68±0,22	0,76±0,32	0,39±0,06
60-е сутки	0,59±0,54	0,53±0,79	0,46±0,13
90-е сутки	0,41±0,63	0,49±0,25	1,88±0,36*#
120-е сутки	0,33±0,26	0,55±0,08	1,25±0,22*#

Примечание: * – $p < 0,05$ относительно показателей интактных животных; # – $p < 0,05$ относительно показателей контрольной группы.

Стадия дифференцировки клеток (20 суток) морфологически характеризуется активизацией пластических реакций с очищением костной раны и заполнением дефекта нижней челюсти формирующимся регенератом. В эти сроки животные опытных групп получили по 7 сеансов ультрафонофореза, причем только использование гиалуроновой кислоты обеспечило достоверный прирост пролиферативной активности – остеобластов выявлялось $49,46 \pm 14,33$ на единицу площади, остеокластов – $1,92 \pm 0,18$ ($p < 0,05$). Гидрокортизон не только не увеличил количество клеточных элементов, но отчетливо обеспечил противовоспалительный эффект.

В стадию формирования первичного остеона с образованием ангиогенной костной структуры (30-е сутки наблюдения) у некоторых животных заметно увеличивалось количество остеобластов – от $29,52 \pm 7,83$ в контрольной группе до $39,22 \pm 11,09$ в группе с УФГК ($p < 0,05$). Напротив, в группе с УФГД число остеобластов имело тенденцию к уменьшению ($23,38 \pm 8,45$ – наименьший показатель за весь период эксперимента в этой группе), что свидетельствовало о сохранении противоопролиферативной активности гидрокортизона. Данное обстоятельство можно трактовать с позиции более быстрой дифференцировки остеобластов в остециты, позволяющей ускорить образование первичного остеона и гаверсовых канальцев, именно в условиях ультрафонофореза с гиалуроновой кислотой. Именно поэтому использование УФГК способствовало ускорению образования первичной костной мозоли по сравнению с животными контрольной группы и группы с УФГД.

К 60-м суткам наблюдения у всех животных, в том числе контрольной группы, отмечалась частичная консолидация переломов. Но костная мозоль у животных, подвергнутых УФГК, представляла из себя скопления остеобластов (рис., а), вновь образованные балочки с наличием малодифференцированной соединительной ткани в межбалочном пространстве. Соединительнотканые элементы пронизаны кровеносными сосудами различного диаметра, прорастающими в регенерат капиллярами и участками новообразованной хрящевой ткани (рис., б).

Оценка клеточного состава регенерата выявила существенные различия в группах животных. Если в контрольной группе с 60-х до 120-х суток постепенно уменьшалось число бластных клеток, при УФГД периоды снижения активности остеобластов (10–30-е сутки) чередовались с периодами усиленной их пролиферации (60–120-е сутки), достигая максимума к 90–120 суткам в количестве $47,32 \pm 10,54$ клеток на единицу площади ($p < 0,05$).

Первичная костная мозоль формировалась и перестраивалась спустя три месяца после операции (рис., в). Под влиянием ультрафонофореза с гидрокортизоном и, особенно, с гиалуроновой кислотой эти преобразования проявлялись активным образованием остеоидных балок. Именно УФГК способствовал появлению в регенерате уже к 3-му месяцу наблюдения костной структуры из балочек и активных бластных элементов. Важно, что консолидация переломов нижней челюсти у животных контрольной группы наблюдалась в среднем на 20–30 суток позднее, чем у животных основных групп (рис., г).

Представленные результаты качественной и количественной оценки зон перелома у экспериментальных животных свидетельствуют об эффективности ультрафонофореза с гиалуроновой кислотой в отношении процессов ремоделирования в челюстных костях, обеспечивающих пролиферацию и диффе-

ренцировку остеогенных клеточных элементов как в ранние сроки, так и на стадии формирования первичного остеона с образованием ангиогенной костной структуры (в срок – 30 суток). Эффект ультрафонофореза с гидрокортизоном существенно ограничивал лимфоцитарную инфильтрацию во все сроки исследования со смещением остеоконструктивной активности на стадию спонгиозации первичного регенерата (костной мозоли), когда формировалась пластинчатая костная ткань (в срок – 60–120 суток).

Рис. Микропрепараты челюстной кости основной группы с УФГК (а, б), УФГД (в) и контрольной группы (г) животных на 60-е (а, б) и 90-е (в, г) сутки эксперимента:
а – сшивание костных обломков (1) коллагеновыми волокнами ретикулофиброзной костной ткани (2);
б – трансформация ретикулофиброзной костной ткани (1) в пластинчатую (2) с участками новообразованной хрящевой ткани (3); в – резорбция костной ткани с образованием узур (1) посредством остеокластов (2) и соединительной ткани (3); г – вращение соединительной ткани (1) в узур костной балки (2), в центре – формирующийся остeon (3).
Окраска по Массону (а, г), гематоксилином и эозином (б, в).
Об. 10, ок. 10 (в, г), об. 20, ок. 20 (а, б)

Закключение. Под влиянием ультрафонофореза с гиалуроновой кислотой выявлено потенцирование пролиферативной активности остеобластов в раннем посттравматическом периоде. Их дифференцировка в остециты с активацией регенерации наблюдалась в ранние сроки воспалительного процесса с оптимизацией его течения. В позднем посттравматическом периоде в условиях ультрафонофореза с гидрокортизоном, обладающего мощным противовоспалительным действием, выявлены новые морфологические данные, свидетельствующие об особенностях противоопролиферативной активности гидрокортизона в виде смены периодов низкой и усиленной дифферен-

цировки остеобластов и существенного ограничения лимфоцитарной инфильтрации.

Информированное согласие: Экспериментальное исследование проведено в полном соответствии с требованиями надлежащей лабораторной практики (изложенными в национальном стандарте «Принципы надлежащей лабораторной практики» ГОСТ Р 53434–2009), с соблюдением Международных принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов и других научных целей (Страсбург, 1986), в соответствии с

международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985), «Общими этическими принципами экспериментов на животных» (Россия, 2011), правилами лабораторной практики в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 267 от 19.06.2003) и положительным заключением этического комитета.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература/References

1. Петров И. Ю., Ларионов Е. В., Ипполитов Ю. А., Бут Л. В., Петров А. И. Морфогистохимические исследования остеопластического материала на основе гиалуроновой кислоты, хондроитинсульфата и недеминерализованного костного коллагена для восстановления костных дефектов в эксперименте. *Вестник новых медицинских технологий*. 2018;3:41-46 [Petrov I. Yu., Lariyov E. V., Ippolitov Yu. A., But L. V., Petrov A. I. Morfogistohimicheskie issledovaniya osteoplas-ticheskogo materiala na osnove gyaluronovoy kisloty, hondroitinsulfata i nedeminerizovannogo kostnogo kollagena dlja vosstanovleniya kostnyh defektov v jeksperimente. *Vestnik novyh medicinskih tehnologij*. – *Bulletin of New Medical Technologies*. 2018;3:41-46. (In Russ.)].
2. Ефимович О. И. Использование препаратов гиалуроновой кислоты в комплексном лечении воспалительных заболеваний пародонта. Обзор литературы. *Клиническая стоматология*. 2018;1:28-33. [Efimovich O. I. Ispol'zovanie preparatov gyaluronovoy kisloty v kompleksnom lechenii vospalitel'nyh zabolevanij parodonta. *Obzor literatury. Klinicheskaja stomatologija*. – *Clinical Dentistry*. 2018;1:28-33. (In Russ.)].
3. Grimm W. D., Arnold W. A., Sirak S. W., Vukovich M. A., Videra D., Giesenhausen B. Clinical, radiographic, and histological analyses after transplantation of crest-related palatal-derived ectomesenchymal stem cells (paldscs) for improving vertical alveolar bone augmentation in critical size alveolar defects. *Journal of Clinical Periodontology*. 2015;42(S17):366b-366.
4. Ивашенко С. В. Минеральный состав костной ткани челюсти кролика после фонофореза кальцийсодержащих веществ в эксперименте. *Медицинский журнал*. 2009;2:51-54. [Ivashenko S. V. Mineralnyj sostav kostnoj tkani cheljusti kroljika posle fonoforeza kal'cijsoderzhashhih veshhestv v jeksperimente. *Medicinskij zhurnal*. – *Medical Journal*. 2009;2:51-54. (In Russ.)].
5. Sirak S. W., Entschladen F., Shchetinin E. W., Grimm W. D. Low-level laser irradiation (810 nm) with toluidinblue photosensitizer promotes proliferation and differentiation of human oral fibroblasts evaluated in vitro. *Journal of Clinical Periodontology*. 2015;42(S17):328a-328.
6. Hsieh Y.-L., Yang C.-H., Chen H.-Y., Yang C.-C. Analgesic effects of transcutaneous ultrasound nerve stimulation in a rat model of oxaliplatin-induced mechanical hyperalgesia and cold allodynia. *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2017;43(7):1466-1475. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2017.03.002>
7. Goyal N., Thatai P., Sapra B. Surging footprints of mathematical modeling for prediction of transdermal permeability. *Asian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2017;12(4):299-325. <https://doi.org/10.1016/j.ajps.2017.01.005>
8. Щетинин Е. В., Сирак С. В., Петросян Г. Г., Кочкарова З. М., Андреев А. А. [и др.]. Оценка механизмов минерализации костной ткани в различные стадии репаративного остеогенеза в условиях лекарственного ультрафонофореза. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2019;14(1):260-264. [Shchetinin E. V., Sirak S. V., Petrosyan G. G., Kochkarova Z. M., Andreev A. A. [et al.]. Estimation of mechanisms of bone tissue mineralization in different stages of reparative osteogenesis in the conditions of ultrafonophoresis. *Meditsinskij vestnik Severnogo Kavkaza*. – *Medical News of North Caucasus*. 2019;14(1):260-264. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2019.14029>
9. Montalti C. S., Souza N. V. C. K. L., Rodrigues N. C., Toma R. L., Renno A. C. M. Effects of low-intensity pulsed ultrasound on injured skeletal muscle. *Brazilian Journal of Physical Therapy*. 2013;17(4):343-350. <https://doi.org/10.1590/S1413-35552012005000101>
10. Слетов А. А., Сирак С. В., Щетинин Е. В., Жидовинов А. В., Слетова В. А. [и др.]. Устройство для фиксации фрагментов нижней челюсти у экспериментального животного. Патент на изобретение RU 2682615, 04.12.2017 [Sletov A. A., Sirak S. V., Shchetinin E. V., Zhidovinov A. V., Sletova V. A. [et al.]. Device for fixation of mandible fragments in experimental animal. Patent RU 2682615, 04.12.2017. (In Russ.)].

Сведения об авторах:

Щетинин Евгений Вячеславович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии; тел.: (8652)352684; e-mail: ev.cliph@rambler.ru

Сирак Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой стоматологии; тел.: (8652)350551; e-mail: sergejsirak@yandex.ru

Рубникович Сергей Петрович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой ортопедической стоматологии и ортодонтии с курсом детской стоматологии

Кочкарова Зухра Магомедовна, аспирант кафедры гистологии; тел.: (8652)352628; e-mail: azrch_1991@rambler.ru

Андреев Антон Александрович, аспирант кафедры стоматологии; тел.: (8652)350551; e-mail: kafedra@mail.ru

Муратова Анна Юрьевна, доктор медицинских наук, профессор кафедры клинической биохимии; e-mail: clinbiochem@mail.ru

Перикова Мария Григорьевна, кандидат медицинских наук, доцент кафедры стоматологии; тел.: (8652)350551; e-mail: masha.perikova@yandex.ru

Петросян Григорий Григорьевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры патологической физиологии; тел.: (8652)352684; e-mail: ev.cliph@rambler.ru