

На правах рукописи

Коняева Анастасия Денисовна

**МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ РАНЕВОЙ
ПОВЕРХНОСТИ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ПОЛОСТИ РТА
ПРИ ИСПОЛЬЗОВАНИИ НЕТКАНОЙ ПОЛИМЕРНОЙ
ПЬЕЗОЭЛЕКТРИЧЕСКОЙ МЕМБРАНЫ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

1.5.22. Клеточная биология

Автореферат

диссертации на соискание учёной степени
кандидата медицинских наук

Томск – 2023

Работа выполнена на базе федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

**Варакута
Елена Юрьевна**

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой анатомии человека федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Красноярский государственный медицинский университет имени профессора В.Ф. Войно-Ясенецкого» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Медведева
Надежда Николаевна**

доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой терапевтической стоматологии федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Токмакова
Светлана Ивановна**

Ведущая организация:

федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тюменский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита состоится _____ 2023 года в _ часов на заседании диссертационного совета 21.2.068.03 при ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России по адресу: 634050, г. Томск, Московский тракт, д. 2.

С диссертацией можно ознакомиться в научно-медицинской библиотеке ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России и на сайте www.ssmu.ru

Автореферат разослан _____ 2023.

Учёный секретарь
диссертационного совета

Мустафина Лилия Рамильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Заживление ран слизистой оболочки полости рта является актуальной проблемой (Nazir M.A., 2017). Несмотря на то, что слизистая оболочка полости рта обладает высоким регенераторным потенциалом (Lee K. et al., 2019, Sculean. et al., 2014), незакрытые раневые дефекты данной локализации подвержены повторному инфицированию и травматизации, вследствие чего происходит рубцевание (Singer A.J., 2021). Для предотвращения развития подобного осложнения необходима защита раны (Movaniya P.N. et al., 2021). Закрытие раневых дефектов возможно при использовании аутогенных материалов (Singh G., et al., 2018), но они дают плохой постоперационный прогноз в результате формирования негативных эстетических и функциональных нарушений в донорской области (Mittar G. et al., 2018).

Все чаще используются биосинтетические заменители для преодоления недостатков аутогенных трансплантатов. Они включают в себя эпидермальные (например, Apligraf®), дермальные (например, Alloderm®, Matriderm®) и композитные (например, Integra®, Biobrane®) мембраны. Однако ни одна из них не обладает всеми свойствами идеального материала для закрытия раневых дефектов слизистой оболочки полости рта (Srivastava A. et al., 2020).

Степень разработанности темы исследования

На сегодняшний день достаточно подробно изучены механизмы заживления раневых дефектов слизистой оболочки полости рта (Кузин М.И. и др., 2009, Быков В.Л., и др., 2019). Проведены исследования, изучающие влияние покровных мембран на основе силикона, фосфолипидных полимеров и коллагена на заживление ран данной локализации, по результатам которых был выявлен ряд недостатков данных материалов (Рябова Д.А. и др., 2016, Pandey A. et al, 2020, Srivastava A. et al., 2020).

Известны результаты использования нетканых материалов на основе VDF-TeFE в челюстно-лицевой хирургии для направленной регенерации костной ткани (Godin M. et al., 2003, Tefengraber J. et al., 2002). Они способствуют адгезии, пролиферации и дифференцировки остеобластов, росту нейритов, поддерживают рост шванновских клеток, стимулируют активность щелочной фосфатазы (Li Y. et al., 2019). Но отсутствуют сведения о результатах использования подобных мембран для регенерации слизистой оболочки ротовой полости при раневых дефектах.

Цель исследования: изучить морфологические изменения слизистой оболочки полости рта в ходе течения раневого процесса при использовании нетканых пьезоэлектрических полимерных мембран на основе сополимера винилиденфториды с тетрафторэтиленом.

Задачи исследования

1. Изучить морфологические изменения клеточного и волокнистого компонентов собственной пластинки слизистой оболочки полости рта в ходе регенерации в различные фазы раневого процесса при использовании нетканого полимерного покрытия и без него.

2. Изучить морфологические изменения сосудов микроциркуляторного русла слизистой оболочки полости рта в ходе регенерации в различные фазы раневого процесса при использовании нетканого полимерного покрытия и без него.

3. На основании данных иммуногистохимического и ультраструктурного исследований изучить состояние нервного аппарата слизистой оболочки полости рта в ходе регенерации в различные фазы раневого процесса при использовании нетканого полимерного покрытия и без него.

4. Изучить морфологические изменения эпителиального пласта слизистой оболочки полости рта в ходе регенерации в различные фазы раневого процесса при использовании нетканого полимерного покрытия и без него.

5. Сравнить эффективность использования полимерной пьезоэлектрической мембраны, модифицированной медью, и покрытия без модификации.

Научная новизна

Впервые были исследованы морфологические изменения слизистой оболочки полости рта в ходе заживления раневого дефекта при использовании полимерной пьезоэлектрической мембраны на основе VDF-TeFE, созданной в лаборатории гибридных биоматериалов НИ ТПУ.

Был разработан и апробирован способ хирургического лечения раневых дефектов слизистой оболочки полости рта, который способствовал оптимизации процесса их заживления и снижал риск развития послеоперационных осложнений.

Было установлено, что использование полимерной пьезоэлектрической мембраны способствовало закрытию раневого дефекта эпителиальным пластом уже на 3-и сутки исследования и исчезновению в нем патологических изменений в виде акантоза, акантолиза на 12-е сутки. В зоне дефекта наблюдались признаки активного перехода со стадии воспаления на стадию регенерации, что сопровождалось заменой клеток лимфогистиоцитарной инфильтрации на клетки фибробластического ряда уже на 3-и сутки и образованием рыхлой волокнистой соединительной ткани на 7-е сутки исследования. В свою очередь, в группе без покрытия преобладала плотная волокнистая соединительная ткань и сохранялась воспалительная клеточная инфильтрация до 12-ых суток исследования. Было отмечено восстановление показателей гемодинамики на 7-е сутки исследования в области раневого дефекта и образование периферических

нервов на 12-е сутки в группах с раневым покрытием.

В ходе сравнительного анализа было выявлено, что подобные благоприятные изменения были более выражены в группе, где использовалось покрытие, модифицированное медью.

Теоретическая и практическая значимость

Анализ и обобщение результатов исследования морфологических изменений в ходе регенерации раны при использовании полимерной матрицы на основе VDF-TeFE позволили расширить фундаментальные знания об адаптивных, компенсаторно-приспособительных и регенераторных процессах в слизистой оболочке полости рта.

Проведенные качественные и количественные измерения подтвердили необходимость использования покровных материалов для раны от травматического воздействия и микробной контаминации, что делает методику лечения раневого дефекта под мембраной более предпочтительной для снижения риска возникновения постоперационных осложнений.

Полученные результаты помогут совершенствовать подходы к лечению раневых дефектов слизистой оболочки полости рта, улучшая качество жизни стоматологических больных.

Данные, полученные в ходе исследования, будут полезны специалистам в области экспериментальной хирургии, гистологии, стоматологии, челюстно-лицевой хирургии, а, значит, могут быть использованы в учебном процессе на кафедрах анатомии, гистологии, эмбриологии и цитологии для студентов лечебного, педиатрического и стоматологического факультетов.

Основные материалы диссертации доложены и обсуждены на: XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Перспективы развития фундаментальных наук" (Томск, 2018), XVII Международной научно-практической конференции "Микитаевские чтения" (Нальчик, 2021), Общероссийской научно-практической конференции "Эстафета вузовской науки" (Москва, 2021), XVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых "Перспективы развития фундаментальных наук" (Томск, 2021).

Методология и методы исследования

Методологической основой исследования является сравнительное изучение структурно-функциональной организации слизистой оболочки полости рта 3-х месячных крыс линии Wistar на модели раневого дефекта в условиях его закрытия полимерной пьезоэлектрической мембраной и без нее. В работе использован комплекс гистологических, иммуногистохимических, электронно-микроскопических и морфометрических методов исследования слизистой оболочки полости рта экспериментальных животных, который позволил охарактеризовать регенераторные процессы, происходящие на разных этапах раневого

процесса.

Все процедуры с животными выполнялись в соответствии с директивой Европейского парламента №2010 от 22.09.2010 «О защите животных, используемых для научных целей».

Положения, выносимые на защиту

1. Использование полимерной пьезоэлектрической мембраны, особенно модифицированной медью, при хирургических вмешательствах на слизистой оболочке полости рта способствует полному перекрытию раны эпителиальным пластом и снижению воспалительной реакции уже на 3-и сутки исследования, а также миграции и дифференцировке клеток фибробластического ряда в область раневого дефекта на 7-е сутки, что индуцирует развитие грануляционной ткани на первых этапах заживления раны и рыхлой волокнистой соединительной ткани в дальнейшем.

2. При использовании раневого покрытия быстрее восстанавливается трофический аппарат в области повреждения, что выражается в образовании и созревании новых сосудов на 7-е сутки исследования и обнаружении нервных волокон на 12-е сутки в собственной пластинке слизистой оболочки полости рта, благодаря чему снижается риск развития маловаскуляризованной плотной волокнистой соединительной ткани, и, как следствие, возникновения рубцовой деформации.

Степень достоверности и апробация результатов

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается выполнением работы на достаточном экспериментальном материале с использованием современных гистологических, электронно-микроскопических, иммуногистохимических и морфометрических методов исследования. Полученные результаты статистически обработаны с помощью современных методов доказательной медицины.

По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 - в рецензируемых центральных научных изданиях, рекомендованных ВАК Минобразования РФ для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата и доктора медицинских наук, 4 - в изданиях, входящих в базу Scopus и Web of Science.

Внедрение результатов работы в практику

Основные научные данные и теоретические положения, разработанные на их основе настоящего исследования, интегрированы в процесс преподавания на кафедрах анатомии и гистологии, цитологии и эмбриологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации для студентов лечебного,

педиатрического и стоматологического факультетов.

В дальнейшем планируется клиническое исследование полимерных пьезоэлектрических мембран и регистрация способа лечения ран слизистой оболочки полости рта.

Личный вклад автора

Автор принимал непосредственное участие в разработке концепции, дизайна и планировании научного исследования. Им лично выполнена серия экспериментов *in vivo* с забором и подготовкой слизистой оболочки полости рта экспериментальных животных для световой и электронной микроскопии, проведены гистологические исследования. Статистическая обработка полученных результатов, оформление диссертации и автореферата выполнены лично автором.

Структура и объём диссертации

Диссертация состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов исследования, результатов собственных исследований, обсуждения, выводов, списка литературы. Работа изложена на 178 страницах машинописного текста, иллюстрирована 9 таблицами и 84 рисунками. Список литературы содержит 177 источника, в том числе 24 отечественных и 153 зарубежных авторов.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Эксперимент был выполнен на 60-ти крысах-самцах линии Wista, которые были разделены на четыре группы: экспериментальную №1 (n=15), с открытым раневым дефектом согласно стандартному ведению раневого процесса в полости рта, экспериментальную №2 (n=15), которым раневой дефект перекрывался полимерной матрицей на основе VDF-TeFE и экспериментальную №3 (n=15), которым раневой дефект перекрывался полимерной матрицей на основе VDF-TeFE, модифицированной медью. Группа №4 контрольная (n=15) - крысы с интактной слизистой оболочкой.

Под внутривенным наркозом препаратом «Золетил» крысам был иссечен лоскут слизистой оболочки в области щеки размером 7*4 мм. Далее животным экспериментальных групп №2 и №3 по краям раны атравматичной иглой простыми узловыми швами фиксировалась полимерная мембрана.

Выведение животных производилось на 3-и, 7-е и 12-е сутки исследования путем введения в состояние гипоксии в CO₂-камере. Далее повторно иссекалась слизистая оболочка щеки на месте раневого дефекта с захватом тканей с периферии (отступ 0,5 см).

Изготовленные по стандартной методике гистологические срезы, окрашивали гематоксилином и эозином и по методике Ван Гизона пиррофуксином и гематоксилином.

Для иммуногистохимического окрашивания использовались кроличьи

поликлональные антитела VEGF, CD-34, S-100, которые наносились на ранее подготовленные гистологические срезы. Докрашивание ядер производилось гематоксилином.

Полутонкие и ультратонкие срезы изготавливали на ультратоме LKB-5, BROMMA (Швеция) из материала, подготовленного по стандартной методике. Полутонкие срезы толщиной 1 мкм окрашивали толуидиловым синим, ультратонкие срезы толщиной 0,1 мкм контрастировали уранил ацетатом и цитратом свинца.

На срезах толщиной 4-5 мкм, окрашенных гематоксилином и эозином и по методике Ван Гизона пирюфуксином и гематоксилином, подсчитывали показатели удельной площади (%) рыхлой волокнистой соединительной ткани, плотной волокнистой соединительной ткани, грануляционной ткани, лимфогистиоцитарной инфильтрации, удельной площади и относительной плотности (на 1 мм² среза), среднего диаметра венул, артериол, капилляров, индекса перикапиллярной диффузии (площадь ткани, которую кровоснабжает один капилляр) как соотношение среднего диаметра капилляров к их удельной площади, индекса Керногана (показатель пропускной способности микроциркуляторного русла) как соотношение толщины сосудистой стенки артериол к радиусу их просвета, толщины эпителиального пласта и его слоев. На полутонких срезах толщиной 1мкм, окрашенных толуидиновым синим, подсчитывали относительную плотность в 1 мм² среза нейтрофилов, макрофагов, фибробластов, эозинофилов, плазмочитов, лимфоцитов и тучных клеток. На ультратонких срезах толщиной 0,1 мкм, контрастированных уранил ацетатом и цитратом свинца, изучали ультраструктуру клеток лимфогистиоцитарной инфильтрации, грануляционной ткани, эпителия, нервно-трофического аппарата. При работе с изображениями использовалась программа обработки графических изображений Axio Vision, CarlZeiss (Германия) и Image, версия 1.52u (США).

Статистическую обработку проводили в программе Statistica 10.0, IBM (США). Проверку статистических гипотез на характер распределения признака проводили при помощи критерия Колмогорова-Смирнова. При обработке полученных результатов использовали методы описательной и непараметрической статистики. Исследуемые параметры описывали как медиану и квартили, М (Q1;Q3). При сравнении независимых выборок использовали критерий Краскала-Уоллиса с медианным тестом, для парных сравнений использовали критерий Вилкоксона. Для корреляционного анализа использовали коэффициент ранговой корреляции Спирмена. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости $p < 0,05$.

Результаты собственных исследований и их обсуждение

На 3-и сутки во всех экспериментальных группах по краям раны наблюдались некротические ткани, обсемененные микроорганизмами.

Некроз тканей, согласно уже проведенным ранее исследованиям Krishnan и Chen, был обусловлен местным ацидозом в результате анаэробного гликолиза. В этих условиях важную роль играла стерильность раны (Krishnan K. et al., 2017).

1-й этап протекал с преобладанием воспалительной реакции. Она была направлена на ограничение дефекта, содержащего некротические ткани, микроорганизмы и элементы первичной контаминации от здоровых тканей, удаление патологических продуктов, ликвидацию последствий повреждения, а также активацию цитокинов и факторов роста (Avishai, E. et al., 2017). При этом происходили сложные межклеточные взаимодействия, которые были направлены на восстановление целостности ткани и защиту ее от агрессивных воздействий со стороны ротовой полости (Быков В.Л. и др., 2019). В области раневого дефекта наблюдалась обширная клеточная инфильтрация, представленная фибробластами, макрофагами, тучными клетками и пришлыми клетками.

Основную роль в воспалении играли нейтрофилы, численная плотность которых в 1 мм^2 среза достоверно увеличивалась в 242 раз для 1-ой группы, в 147 для 2-ой и в 112 раз для 3-ей ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой, а их фагоцитарная активность, по данным электронной микроскопии, повышалась.

При использовании мембраны, особенно с медным напылением, наблюдалась более активная смена нейтрофилов на макрофаги, чья численная плотность в 1 мм^2 среза во 2-ой и 3-ей группах была в 1,65 и 2,26 раз достоверно больше, чем в 1-ой группе, и в 7,8 и 10,7 раз значимо больше, чем в группе контроля ($p < 0.05$). Во 2-ой и 3-ей группах они имели ультраструктурные признаки, указывающие на высокий уровень синтетических процессов, что по данным Serra, было связано с образованием биологически активных веществ, координирующих воспалительные и регенераторные процессы (Serra M.B. et al., 2017, Kotwal G.J., et al., 2018).

Важную роль в воспалительной реакции играли тучные клетки, которые участвовали в ремоделировании межклеточного матрикса и регуляции тонуса сосудистой стенки для миграции других клеток в очаг воспаления, благодаря выделению биологически активных веществ (Vidal MT et al., 2013, Виноградов А.Б. и др., 2004). В связи с дегрануляцией тучные клетки не выявлялись на уровне световой микроскопии, что сопровождалось достоверным снижением их численной плотности в 1 мм^2 среза в 3,75 раз для 1-ой, в 2,6 раз для 2-ой и 3-ей групп ($p < 0.05$).

Rousselle и соавторы утверждали, что последовательность сосудистых реакций в ране имеет свои закономерности и зависит от стадии раневого процесса (Rousselle P. et al., 2019, Kloc M. et al., 2018), что и продемонстрировало наше исследование.

В фазу воспаления наблюдалась выраженная сосудистая реакция на

периферии раны, проявляющаяся в увеличении диаметра венул и капилляров и сужении просвета артериол. Отражением этого процесса являлось изменение артериоло-венулярного взаимоотношения, которое достоверно уменьшалось во всех группах в 1,9 раз по сравнению с показателями контрольной группы ($p < 0,05$). Изменялись индекс перикапиллярной диффузии и индекс Керногана. Достоверное уменьшение первого показателя в 1,7 раз для всех групп по сравнению с интактной слизистой оболочкой ($p < 0,05$) свидетельствовало об ишемии тканей слизистой оболочки полости рта на периферии раневого дефекта. Значимое повышение второго показателя в 2 раза для 1-ой группы, в 1,8 для 2-ой и в 1,6 раз для 3-ей экспериментальных групп ($p < 0,05$) характеризовало нарушение пропускной способности капилляров. Изменение всех вышеперечисленных показателей способствовало венозному застою и развитию отека, в результате чего раневой дефект ограждался от здоровых тканей, не позволяя продуктам распада клеток и бактериям распространяться по организму. Кроме того, отек содействовал сближению краев раны (Alim M.A. et al., 2020).

Также на периферии раневого дефекта во всех экспериментальных группах наблюдалось большое количество измененных сосудов с тромбозом, сладжем форменных элементов и периваскулярным отеком. На ультраструктурном уровне в клетках эндотелия определялось расширение цистерн эндоплазматического ретикулума и комплекса Гольджи, набухание митохондрий. О снижении метаболизма, трансапикалярного обмена и синтетических процессов в клетках эндотелия свидетельствовали уменьшение количества микропиноцитозных пузырьков и микроворсинок, преобладание гетерохроматина над эухроматином и обеднение клеток органеллами. Наблюдалось нарушение межклеточных контактов, что, по мнению Kelly, могло происходить на фоне действия проангиогенных факторов уже существующих сосудов для запуска процесса неангиогенеза (Kelly E. et al., 2014).

На 3-и сутки исследования визуализировалась молодая грануляционная ткань с большим количеством новообразованных сосудов. Ее развитие, как в своем исследовании указывают Velnar и Bailey, способствовало отторжению мертвого субстрата, являлось барьером для предотвращения распространения микроорганизмов, а также было основой для формирования молодой соединительной ткани на последующих стадиях регенерации раны (Velnar T. et al., 2009).

Базисным механизмом заживления раны, по мнению Wehrhan, являлся неангеогенез (Wehrhan F. et al., 2009). Во всех экспериментальных группах наблюдалось образование капилляров грануляционной ткани. У новообразованных сосудов визуализировалась тонкая стенка, их просвет был расширен. На ультраструктурном уровне определялась прерывистая тонкая базальная мембрана. В группах с покрытием плазмолемма

эндотелия капилляров образовывала многочисленные микроворсинки, в области ее люминального края располагались микропиноцитозные пузырьки, что свидетельствовало о высоком уровне трансапикалярного обмена. В 1-ой экспериментальной группе микроворсинки визуализировались редко, количество микропиноцитозных пузырьков было незначительным.

Неоангиогенез и воспалительная реакция способствовали высвобождению эндотелием и клетками воспалительного инфильтрата проангиогенных молекул, в частности фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Ранее было отмечено, что присутствие VEGF также поддерживает воспалительный ответ (Lucas T. et al, 2010) и увеличивает проницаемость сосудов, что способствует отеку окружающих тканей (Пронина Е.А. и др., 2019). В нашем исследовании экспрессия VEGF достоверно увеличивалась в 3,4 раза в 1-ой группе и в 4,6 раз во 2-ой и 3-ей по сравнению с интактной слизистой оболочкой ($p < 0.05$), что указывало на более интенсивное сосудобразование.

В качестве маркера, отражающего созревание кровеносных и лимфатических сосудов, используется CD34 (Nielsen J. S. et al., 2008, Smane-Filipova L. et al, 2016, Vasuri F. et al., 2016). Экспрессия этого маркера достоверно увеличивалась в 1,4 раза для 2-ой группы и в 1,8 для 3-ей ($p < 0.05$) по сравнению с контрольными значениями, а в группе без покрытия достоверно уменьшалась в 1,8 раз ($p < 0.05$). Наблюдалась корреляция между численной плотностью нейтрофилов и экспрессией CD34, так как в условиях повышенного воспалительного ответа, реализуемого нейтрофилами, снижалась экспрессия CD34 (Smane-Filipova L. et al, 2016).

Важным аспектом успешного ранозаживления являлась эпителизация раны (Pereira D. et al., 2021), поэтому эпителиоциты претерпевали ряд изменений на ультраструктурном уровне. Клетки базального слоя увеличивались в размерах, уплощались, теряли апикально-базальную полярность, десмосомы между клетками и полудесмосомы с базальной мембраной деградировали. Благодаря этому могла происходить миграция эпителиоцитов от краев к центру раны (Koivisto L. et al., 2012).

Высокая пролиферативная активность клеток базального слоя наблюдалась только в группах с покрытием, в которых раневой дефект был полностью перекрыт 3-5 слоями эпителия. В группе без раневого покрытия, где эпителий наблюдался только по краям дефекта, мы наблюдали отсутствие ультраструктурных признаков высокой пролиферативной активности. Wehrhan и Schultze-Mosgau связывали этот феномен с тем, что мигрирующие клетки не могут делиться до момента полного перекрытия раневого дефекта слоем эпителия (Wehrhan F. et al., 2009).

На 7-е сутки исследования клеточный состав инфильтрата

сохранялся. Ведущая роль в воспалительном процессе переходила к макрофагам, которые становились доминирующей популяцией по сравнению с нейтрофилами, и их численная плотность в 1 мм^2 среза была достоверно больше, чем в интактной слизистой оболочке в 11,3 раза для 1-ой, в 9,0 раз для 2-ой и 6,9 раз для 3-ей групп соответственно ($p < 0.05$). Помимо фагоцитоза погибших нейтрофилов и микроорганизмов (Rousselle P. et al., 2019), макрофаги влияли на пролиферацию фибробластов, способствуя секреции цитокинов и факторов роста, и играли важную роль в развитии соединительной ткани (Kloc M, et al., 2019, Smigiel K.S. et al., 2018).

Во 2-ой и 3-ей экспериментальных группах выраженность воспалительного процесса стихала в связи с гибелью нейтрофилов, их численная плотность уменьшалась. В 1-ой группе наблюдалась обширная нейтрофильная инфильтрация, которая сопровождалась увеличением численной плотности макрофагов, что могло говорить о сохранении активного воспалительного ответа. Чрезмерная воспалительная реакция на этом этапе в дальнейшем станет, основываясь на исследовании Wang, причиной выраженного фиброза на месте раневого дефекта (Wang, H. et al., 2015). Наблюдалась прямая корреляция между повышенной численной плотностью нейтрофилов и снижением экспрессии VEGF в 1-ой группе, что в дальнейшем станет причиной развития фиброза в условиях недостаточного кровоснабжения (Pardali E. et al., 2010).

Наблюдалось значимое увеличение численной плотности тучных клеток в 1 мм^2 среза в 2,8 раз для 1-ой, 4,9 раз для 2-ой и 7,1 раз для 3-ей групп соответственно ($p < 0.05$). Их миграции в зону дефекта, вероятно, способствовали пьезоэлектрические свойства мембраны, так как клетки этой популяции в большом количестве присутствовали во 2-ой и 3-ей опытных группах по сравнению с 1-ой группой. Появление тучных клеток в месте раневого дефекта, имело важное значение для формирования рыхлой волокнистой соединительной ткани (Alim M.A. et al., 2020). Секретируя биологически активные вещества, они участвовали в процессах ремоделирования межклеточного матрикса посредством стимуляции пролиферации фибробластов и синтеза коллагена (Бирин В. В. и др., 2019).

На 7-е сутки исследования доминирующим процессом становилась пролиферация, основную роль в которой играли фибробласты (Jiang, D. et al., 2020). В группах с покрытием, модифицированным медью, их численная плотность значимо увеличилась в 1,35 раз ($p < 0.05$) по сравнению с группой без него. На ультраструктурном уровне наблюдалось усиление их синтетической активности во 2-ой и 3-ей экспериментальных группах, благодаря чему в этих группах происходило значимое увеличение удельной площади рыхлой волокнистой соединительной ткани в 3,4 раза для 2-ой и в 4,5 раз для 3-ей группы по сравнению с 1-ой

экспериментальной группой ($p < 0.05$). В 1-ой группе визуализировались юные фибробласты с низкой синтетической активностью.

На 7-е сутки в 3-ей группе диаметр венул, артериол и капилляров достигал контрольных значений, на фоне этого восстанавливались артериоло-венулярное взаимоотношение и индекс Керногана. В обеих группах с покрытием снижалась выраженность периваскулярного отека, стенки большинства сосудов приобретали толщину, соответствующую контрольным значениям. Измененные сосуды с тромбозом и сладжем визуализировались в отдельных полях зрения. Благодаря этому степень ишемии ткани и выраженность ацидоза снижались (Bao P. et al., 2008). В группе без покрытия диаметр капилляров, венул и артериол по-прежнему значимо отличался от контрольных значений, как и морфометрические показатели гемодинамики – артериоло-венулярное взаимоотношение, индекс Керногана и индекс перикапиллярной диффузии. Во многих полях зрения встречались измененные сосуды микроциркуляторного русла с тромбозом, сладжем и отеком.

На 7-е сутки исследования площадь новообразованных сосудов уменьшалась в 3 раза для 1-ой группы и в 2 раза для 2-ой и 3-ей групп, что было следствием развития рыхлой волокнистой соединительной ткани, а также могло быть связано с дальнейшей облитерацией сосудов из-за формирования рубца, как отмечали в своем исследовании Xu и Huang (Xu X. et al., 2020). Этот процесс также отражало достоверное снижение экспрессии VEGF и CD 34 в 1,7 и 2,1 раза соответственно для 1-ой группы по сравнению с группами с покрытием ($p < 0.05$), что являлось предпосылкой к дальнейшему недостатку кровоснабжения в области раневого дефекта.

Вблизи кровеносных сосудов по краям от раневого дефекта обнаруживались периферические нервы с периневральным и эндоневральным отеком.

Для стадии пролиферации были характерны дифференцировка клеток эпителия и утолщение его слоев. На ультраструктурном уровне восстанавливались апикально-базальная полярность базального слоя, десмосомальные контакты между клетками и полудесмосомы с базальной мембраной. Также выявлялись признаки нарастающей пролиферации. В 1-ой группе количество слоев эпителия и выраженность межклеточных контактов были меньше, чем во 2-ой и 3-ей экспериментальных группах. Во всех экспериментальных группах выявлялись патологические изменения в виде акантоза и акантолиза, что характеризовалось наличием тканевого детрита в межклеточном пространстве и утолщением шиповатого слоя.

На 12-е сутки исследования происходила рубцовая реорганизация, где основное значение имело взаимодействие тучных клеток и фибробластов, по мнению Ud-Din и др. При повышенном содержании первых

наблюдалось выраженное формирование фиброзной ткани (Ud-Din S. et al., 2020), которое мы наблюдали в 1-ой экспериментальной группе, где их численная плотность была в 2,9 раз достоверно больше, чем в интактной слизистой оболочке и в группах с покрытием ($p < 0.05$). В 1-ой экспериментальной группе наблюдалось сохранение макрофагальной инфильтрации, что, на основании исследования Xu и Gu, являлось предпосылкой к развитию рубцовых изменений (Xu X. et al., 2020). В группах с покрытием численная плотность в 1 мм^2 среза почти всех клеточных элементов достигала контрольных значений, за исключением численной плотности лимфоцитов, которая была в 9,0 раз достоверно больше, чем в интактной слизистой оболочке, для 2-ой группы и в 7,75 для 3-ей ($p < 0.05$). Они, вероятно, принимали участие в остаточной перестройке рубца (Carlavan I, et al., 2018). Также во 2-ой экспериментальной группе численная плотность нейтрофилов достоверно уменьшалась в 8,6 раз по сравнению с предыдущей контрольной точкой ($p < 0.05$).

В группах с покрытием, в отличие от группы без него, преобладала удельная площадь рыхлой волокнистой соединительной ткани над рубцовой, а также наблюдались преимущественно синтетически не активные фиброциты.

Происходило уменьшение количества сосудов микроциркуляторного русла во всех экспериментальных группах, что было связано с их регрессией на фоне снижения экспрессии проангиогенных факторов, таких как VEGF и CD34 (Пронина, Е. А. и др., 2019) – в 1-ой экспериментальной группе экспрессия VEGF и CD34 была значимо ниже в 1,45 и 1,8 раз соответственно ($p < 0.05$), чем в интактной слизистой оболочке, что объясняло уменьшение численной плотности сосудов микроциркуляторного русла ниже показателей контроля. Это свидетельствовало об ухудшении кровоснабжения, что по мнению Pardali, является одной из основных причин развития рубцовой деформации (Pardali E. et al., 2010). В группах с покрытием экспрессия данных маркеров была выше контрольных значений, а численная плотность артериол, венул и капилляров соответствовала контрольным значениям. В 3-ей группе наблюдалась обратная корреляция между численной плотностью фибробластов и экспрессией VEGF, что, по мнению Zhao и др., свидетельствовало о том, что при повышении численной плотности синтетически активных фибробластов на этой стадии ведет к образованию маловаскуляризованной соединительной ткани (Zhao N. et al., 2019).

Во 2-ой и 3-ей группах практически все показатели гемодинамики достигали контрольных значений, измененные сосуды не визуализировались, ткань была богато васкуляризована. В группе без покрытия индекс Керногана был в 1,4 раза достоверно больше, а индекс перикапиллярной диффузии и артериоло-венулярное взаимоотношение в 1,6 и 1,3 раз значимо меньше, чем в группе контроля ($p < 0.05$), что

говорило об ишемии тканей. Численная плотность сосудов уменьшалась по сравнению с контрольной группой из-за развития рубцовой ткани. На ультраструктурном уровне у эндотелиоцитов 1-ой группы по-прежнему сохранялись признаки нарушения транскапиллярного обмена.

На 12-е сутки, по данным электронной микроскопии, в группах с раневым покрытием визуализировались периферические нервы, содержащие безмиелиновые нервные волокна, в группе без него они не определялись. В 1-ой группе по краям от раневого дефекта обнаруживались периферические нервы с признаками периневрального и эндоневрального отека и митохондриями с деструкцией крист.

В ходе фазы ремоделирования в группах с раневым покрытием восстанавливались толщина эпителиального пласта, количество его слоев, определялись хорошо выраженные межклеточные десмосомальные контакты и полудесмосомы с базальной мембраной, рельеф собственной пластинки слизистой становился типичным в виде сосочков.

De Ryck и Vanlancker наблюдали, что при нарушении целостности эпителиального пласта, в случае открытой раны, микроорганизмы проникали на дно дефекта, их экзотоксины воздействовали на рану как изнутри, так и снаружи, вызывая апоптоз эпителиоцитов и нарушая их пролиферацию и миграцию (De Ryck T. et al., 2015). В результате этого нами наблюдалось истончение эпителиального пласта и снижения количества его слоев в группе без покрытия, а также сохранение таких патологических изменений как акантоз и акантолиз.

Таким образом, в группах с покрытием почти все рассматриваемые показатели, характеризующие восстановление слизистой оболочки полости рта после ранения, достигали контрольных значений в отличии от группы, где использовалась стандартная методика ведения раневого дефекта.

При этом, при использовании полимерной пьезоэлектрической мембраны, модифицированной медью, уже на 7-е сутки исследование наблюдалось более активное утолщение эпителиального слоя, происходила более быстрая смена нейтрофильной инфильтрации на макрофагальную, а также активное образование рыхлой волокнистой соединительной ткани на 7-е сутки исследования при увеличении численной плотности фибробластов и тучных клеток. В то же время на 12-е сутки в группе с медным покрытием наблюдалась наименьшая удельная площадь плотной волокнистой соединительной ткани, которая была в 3,9 и 1,3 раз значимо меньше, чем в 1-ой и во 2-ой группах соответственно ($p < 0.05$). Наблюдалось ускоренное снижение численной плотности измененных артериол и венул, восстановление индекса перикапиллярной диффузии и артериоло-венулярного взаимоотношения и уменьшение индекса перикапиллярной диффузии на 7-е сутки исследования. Наблюдалось более быстрое созревание новообразованных сосудов в

области раневого дефекта, что выражалось в высокой экспрессии CD34 на 3-и и 7-е сутки исследования. Таким образом, использование полимерной пьезоэлектрической мембраны, модифицированной медью, показывает более эффективные результаты при восстановлении раневых дефектов слизистой оболочки полости рта.

Таким образом представляется следующая схема патоморфогенеза раневого процесса: в условиях защиты раневого дефекта сокращалась длительность воспалительной фазы, и происходил более быстрый переход на фазу регенерации, что выражалось повышением численной плотности макрофагов уже на 3-и сутки исследования, что наряду с полным перекрытием области ранения эпителиальным пластом способствовало отторжению мертвого субстрата и очищению зоны ранения. В таких благоприятных условиях, а также благодаря пьезоэлектрическим свойствам мембраны (Bolbasov et al., 2020) наблюдалось значимое увеличение численной плотности фибробластов, которые в группах с покрытием были окружены отдельными пучками соединительнотканых волокон, в отличие от 1-ой группы, где визуализировалась только грануляционная ткань.

В группе без покрытия преобладала нейтрофильная инфильтрация, которая постепенно замещалась на макрофагальную только на 7-е сутки исследования, что увеличивало продолжительность стадии воспаления.

Во всех экспериментальных группах снижалась численная плотность тучных клеток, которые не визуализировались за счет дегрануляции, что, по данным Vidal (Vidal M.T. et al., 2013), было причиной сосудистой реакции на периферии от раневого дефекта в виде венозного застоя и развития отека, которые также способствовали отторжению мертвого субстрата. В условиях ацидоза, по данным Zhao (Zhao N. et al., 2019) увеличивалась экспрессия VEGF, что отражало активный неоангиогенез. В группах с раневым покрытием определялось усиление экспрессии CD34, маркера созревания сосудов (по данным Smane-Filipova L. et al., 2016). В группе без раневого покрытия экспрессия данного маркера была значимо ниже, чем в контрольной группе на 3-и сутки.

На 7-е сутки в группах с покрытием наблюдались остаточные воспалительные явления – численная плотность макрофагов и нейтрофилов снижалась, на фоне восстановления показателей гемодинамики уменьшалась выраженность ацидоза (по данным Zhao N. et al., 2019). Доминирующей становилась стадия регенерации, характеризующаяся увеличением численной плотности фибробластов, относительной площади рыхлой волокнистой соединительной ткани и созреванием сосудов. Последний процесс происходит в условиях постепенного снижения экспрессии VEGF и увеличения экспрессии CD34.

В группах без покрытия наблюдалась повышение численной плотности макрофагов и нейтрофилов, в этих условиях сохранялся ацидоз, который

влият на активность фибробластов, чья численная плотность была ниже, чем в группах с покрытием. Более выраженное снижение экспрессии VEGF в 1-ой группе приводило к нарушению неоангиогенеза и усилению облитерации сосудов.

На 12-е сутки исследования в группах с покрытием численная плотность фибробластов, макрофагов, нейтрофилов и тучных клеток, показатели гемодинамики, а также экспрессия VEGF и CD34 достигали контрольных значений. Как итог наблюдалось преимущественное образование рыхлой волокнистой соединительной ткани.

В группе без покрытия сохранялось увеличение численной плотности тучных клеток, макрофагов и нейтрофилов, которые на более поздних стадиях регенерации раны, по данным Alim (Alim M.A. et al., 2020) отвечали за выделение биологически активных веществ, влияющих на функционирование фибробластов и образование плотной волокнистой соединительной ткани. Этот факт и недостаточность кровоснабжения, отражением которой являлось уменьшение экспрессии VEGF и CD34 ниже контрольных значений, свидетельствовали о рубцовой деформации как результате регенерации раневого дефекта.

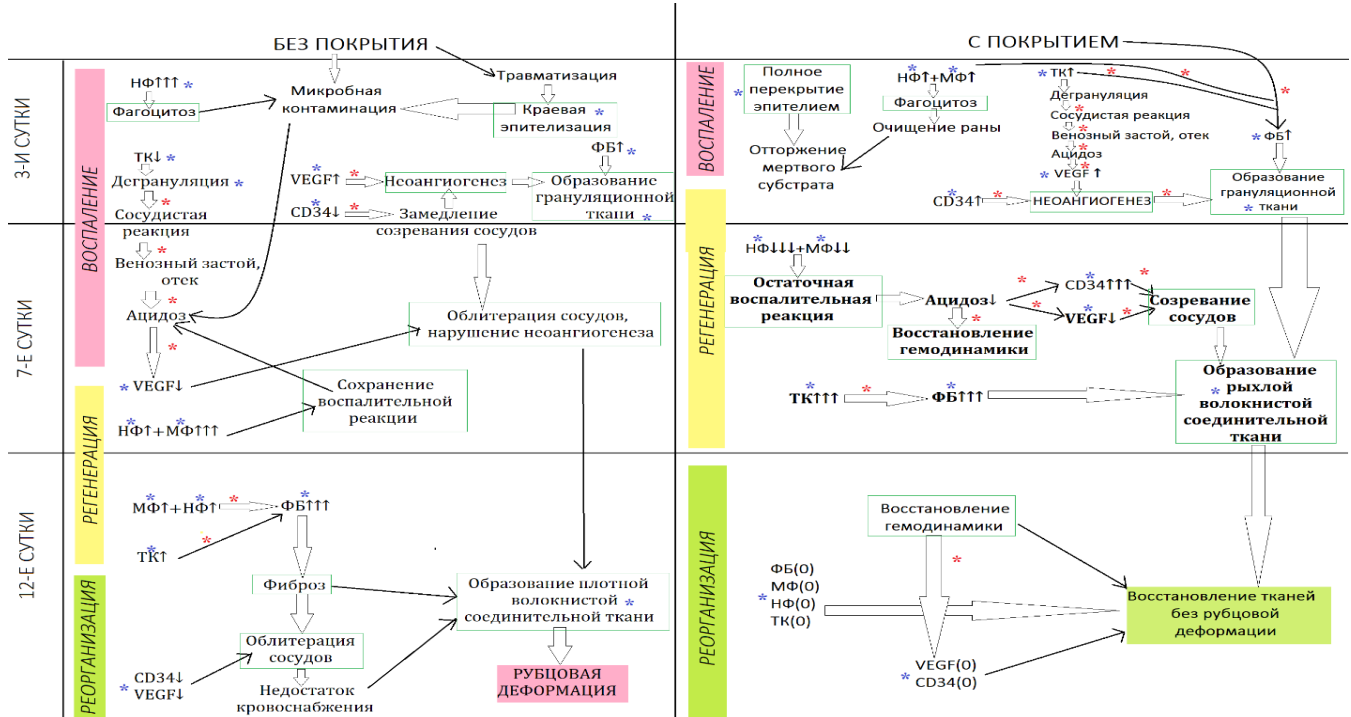


Рис. 85. Схема патоморфогенеза заживления раневого дефекта слизистой оболочки полости рта.

Синяя звездочка – данные собственных исследований, красная звездочка - по данным Bolbasov et al., 2020, Zhao N. et al., 2019, Vidal M.T. et al., 2013, Smane-Filipova L. et al, 2016, Alim M.A. et al., 2020, зеленая рамка – ключевые события, ↑ - увеличение показателя, ↑↑↑ - выраженное увеличение показателя, ↓ - уменьшение показателя, ↓↓↓ - выраженное уменьшение показателя, (0) – достижение контрольного значения.

ВЫВОДЫ

1. Закрытие раневых дефектов слизистой оболочки полости рта полимерными пьезоэлектрическими мембранами способствовало смене стадии воспаления на стадию регенерации на 3-и сутки исследования и преимущественному образованию рыхлой волокнистой соединительной ткани с 7-ых суток исследования, в отличии от 1-ой экспериментальной группы, где воспалительная реакция сохранялась до 12-ых суток, а регенерация сопровождалась образованием обширных очагов плотной волокнистой соединительной ткани.

2. Использование полимерных пьезоэлектрических мембран стимулировало образование и созревание новых сосудов на 7-е сутки исследования, что приводило к восстановлению микроциркуляторного русла в области дефекта. В группе без покрытия признаки нарушения гемодинамики сохранялись на 12-е сутки исследования.

3. При использовании полимерных пьезоэлектрических мембран прорастание периферических нервов, содержащих безмиелиновые нервные волокна, в область регенерирующего раневого дефекта определялось на 12-е сутки исследования, в группе без покрытия нервные элементы не визуализировались.

4. В условиях закрытия раневого дефекта полимерной пьезоэлектрической мембраной происходило полное перекрытие раневого дефекта эпителием на 3-и сутки и восстановление его толщины на 12-е сутки исследования. В группе без покрытия перекрытие раны эпителием обнаруживалось на 7-е сутки исследования, толщина эпителиального пласта не восстанавливалась к 12-ым суткам, присутствовали патологические изменения в виде акантоза и акантолиза.

5. При использовании полимерного пьезоэлектрического покрытия, модифицированного медью, наблюдалось более выраженное снижение воспалительной реакции, образование эпителиального пласта, рыхлой волокнистой соединительной ткани и восстановление ряда показателей гемодинамики по сравнению с другими экспериментальными группами.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Коняева А.Д. Возможность использования полимерных матриц на основе политетрафторэтилена в качестве раневого покрытия при дефектах слизистой оболочки ротовой полости / А.Д. Коняева, С.А.Крикова / В сборнике: Перспективы развития фундаментальных наук. Сборник научных трудов XV Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. В 7-ми томах. Под редакцией И.А. Курзиной, Г.А. Вороновой. – Томск, 2018. - С. 87-89.

2. Коняева А.Д. Использование модифицированных полимерных

мембран на основе сополимервинилиденфторида с тетрафторэтиленом при раневых дефектах слизистой оболочки полости рта / А.Д.Коняева, Е.Ю., С.А. Крикова, Е.Н. Больбасов, С.И. Твердохлебов, А.Д. Бадараев // Морфология. - 2019. - № 2 (155).- С. 161.

3. Коняева А.Д. Эффективность использования нетканых пьезоэлектрических полимерных мембран на основе сополимера винилиденфторида с тетрафторэтиленом для закрытия раневых дефектов слизистой оболочки полости рта / А.Д. Коняева А.Д., Е.Ю. Варакута, А.Е. Лейман, А.Д. Бадараев, Е.Н. Больбасов // Журнал анатомии и гистопатологии. - 2020. - № 2 (9). - С. 40-45.

4. Koniaeva A.D. Piezoelectric polymer membranes with thin antibacterial coating for the regeneration of oral mucosa / A.D.Badaraev, E.N.Bolbasov, K.S.Stankevich, S.I.Tverdokhlebov, A.DKoniaeva, S.A.Krikova, E.Y.Varakuta, E.V.Shesterikov, A.L.Nemoykina, V.M.Bouznik, Y.M.Zhukov, I.P.Mishin // Applied Surface Science. - 2020. - Т.504. - С. 144068.

5. Коняева А.Д. Морфофункциональные изменения сосудов микроциркуляторного русла в слизистой оболочке полости рта в ходе заживления раневого дефекта при использовании полимерной мембраны / А.Д. Коняева, Е.Ю.Варакута, А.Е. Лейман // Биомедицина. - 2021. - № 4(17). - С. 57-67.

6. Коняева А.Д. Композитные сегнетоэлектрические мембраны, содержащие противовоспалительный агент, для регенерации слизистых оболочек ротовой полости: пилотное исследование / А.Д. Коняева, Т.С. Твердохлебова, А.Р. Коврижина // В сборнике: Перспективы развития фундаментальных наук. Сборник научных трудов XVIII Международной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых. В 7-ми томах. Под редакцией И.А. Курзиной, Г.А. Вороновой. – Томск. - 2021. - С. 85-87.

7. Koniaeva A.D. Changes in the cellular composition of the inflammatory infiltrate and connective tissue of the oral mucosa in rats during wound healing using a protective piezoelectric coating / A.D. Koniaeva, E.Yu. Varakuta, A.E. Leiman, E.N.Bolbasov, K.S. Stankevich // Clinical and Experimental Morphology. - 2022. - № 1(11). - С.50-61.

8. Koniaeva A.D. Restoration of the microvasculature and hemodynamics in the oral mucosa wound defects area with and without a piezoelectric polymer membrane / A.D. Koniaeva, E.Yu. Varakuta, A.E.Leiman, E.N.Bolbasov, K.S. Stankevich // Clinical and Experimental Morphology. - 2022. - № 3(11). - С. 56-61.

9. Коняева А.Д. Особенности неоваскуляризации раневого дефекта слизистой оболочки полости рта в ходе его регенерации при закрытии полимерной пьезоэлектрической мембраной. / А.Д.Коняева, Е.Ю.Варакута, А.Е.Лейман, Е.Н.Больбасов, У.В.Чернова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2022. - №12 (174). – с.780-785.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

НИ ТПУ – национальный исследовательский Томский
политехнический университет

VDF-TeFE - винилиденфторид с тетрафторэтиленом

VEGF – фактор роста эндотелия сосудов