

УДК 616.716.1-06:616.216.1-002-092.4

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ТРАВМА КАК МОДЕЛЬ ДЛЯ ИССЛЕДОВАНИЯ РЕПАРАТИВНЫХ МЕХАНИЗМОВ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНОГО СИНУСА

С.С. Едранов¹, В.Г. Цой²

¹Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2),

²ООО «Мобильная операционная бригада» (690078, г. Владивосток, ул. Авроровская, 17)

Ключевые слова: верхнечелюстная пазуха, перелом, верхнечелюстной нерв, апоптоз.

EXPERIMENTAL TRAUMA AS MODEL FOR STUDY OF THE REPARATIVE MECHANISMS OF THE MAXILLARY SINUS MUCOUS

S.S. Edranov¹, V.G. Tsouy²

¹Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690950 Russian Federation), ²Mobile operational brigade Ltd. (17 Avrorovskaya St. Vladivostok 690078 Russian Federation)

Summary. The critical analysis of the experimental trauma model and the state of the cells of the mucous membrane of the rat maxillary sinus is presented. The data about apoptosis and its regulation at cutting of the maxillary nerve and skull bones fracture are shown. The presence of the specific pattern of an expression of molecular apoptosis factors and their roles in regeneration and tissue growth is shown. This approach allows considering the state of the injured mucous membrane in general and different cell types depending on the level of their apoptotic death.

Keywords: maxillary sinus, fracture, maxillary nerve, apoptosis.

Pacific Medical Journal, 2014, No. 3, p. 9–13.

Нарушение целостности верхнечелюстной пазухи (ВЧП) сопровождается различными типами переломов костей скуло-орбито-верхнечелюстного комплекса. Несмотря на многочисленные исследования патофизиологии параназальных синусов, имеется лишь несколько работ, посвященных изучению развивающихся в них посттравматических репаративных процессов. Эту задачу осложняет проблема дифференциальной диагностики посттравматического воспаления и синуситов различного генеза, которые нередко сопровождают травму в клинической практике [3, 4].

Эффективное восстановление ткани после повреждения оценивается как баланс между пролиферативными и апоптотическими процессами, неизменно возникающими после травмы, а регуляция этих механизмов – очень перспективное направление в лечении посттравматических синуситов [1–4, 6, 7, 17]. В настоящей статье рассмотрены методологические и анатомогистологические аспекты изучения факторов апоптоза на модели травмы слизистой оболочки ВЧП.

Функциональная анатомия ВЧП крысы и модель экспериментальной травмы

ВЧП крысы имеет вид костного овального возвышения, расположенного на наружной поверхности верхней челюсти кпереди от подглазничного отверстия.

Цой Валерий Георгиевич (Цой Хак Бон) – врач-стоматолог ООО «Мобильная операционная бригада»; e-mail: buchento@list.ru

Медиальная стенка пазухи, являющаяся наружной стенкой лунки резца, практически плоская. Обе стенки пазухи, соединяясь, образуют щелевидное пространство, вытянутое в сагитальном направлении и расширяющееся кзади. В верхнем дистальном секторе расходящиеся стенки пазухи образует эллипсовидное отверстие размером 0,1×0,15 см, открывающееся к *foramen infraorbitalis*. Подглазничный нерв, выходящий из этого отверстия, является непосредственным продолжением *nervus maxillaris*, который иннервирует всю лицевую часть морды животного [3].

Конфигурация и размеры полости пазухи меняются относительно окружающих анатомических структур в медио-дистальном направлении, что придает ей форму горизонтальной запятой. Ее расширенная часть направлена дистально и кнаружи от лунки резца, не выходя своей задней границей за верхушку альвеолы. Суженная часть направлена вперед и медиально, она косо пересекает центральную ось резца чуть кпереди середины длины нижней кривизны лунки, где они образуют точечное соединение. Максиллярное отверстие открывается сразу под *maxillo-turbinalis* в передней части носовой полости. Общая длина верхнечелюстной пазухи от максиллярного отверстия до дистальной границы приблизительно 0,8 см, длина расширенной части 0,2–0,25 см, высота 3,8–4 см. Ширина пазухи на всем протяжении приблизительно одинакова и составляет в среднем 1 мм (рис. 1, а).

Слизистая оболочка верхнечелюстной пазухи выстлана однослойным многоядным мерцательным эпителием с ярко выраженным мукоциллиарным аппаратом, идентичным расположенному в носовой полости: количество реснитчатых эпителиоцитов – 170,9±7,3 на 1 мм², количество бокаловидных клеток – 10,8±2,1 на 1 мм² (отношение числа бокаловидных и реснитчатых эпителиоцитов – 1:15), толщина эпителиального слоя пазухи – 19,9±2,6 мкм [3]. Собственная пластинка слизистой оболочки содержит большое количество лимфоидных элементов, а также простых альвеолярных желез. Здесь также имеется большое количество тучных клеток с плотной базофильной зернистостью и слабоокрашенным ядром.

В опытах на кроликах было показано, что хроническое раздражение верхнего шейного симпатического ганглия приводит к развитию дистрофического процесса и деструктивно-воспалительных изменений в слизистой оболочке околоносовых пазух, характерных

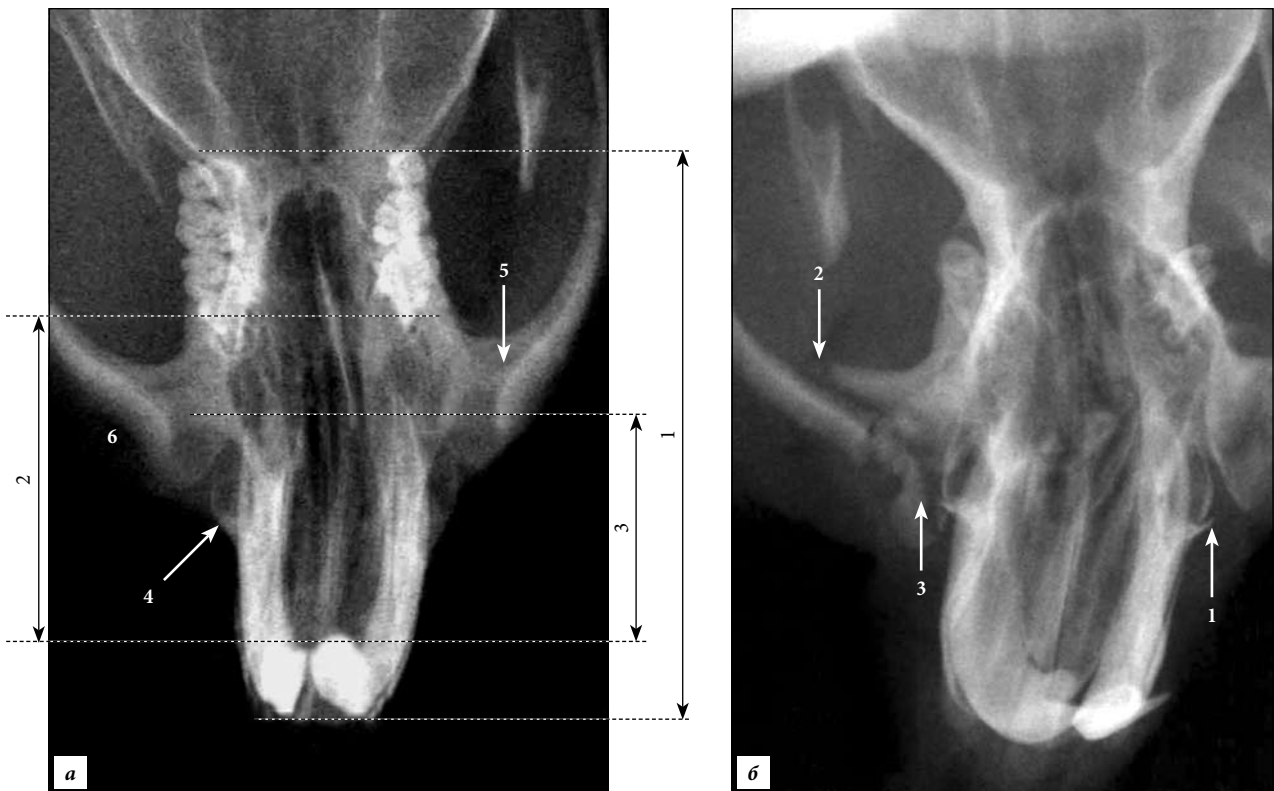


Рис. 1. Визиограмма лицевого отдела головы крысы в горизонтальной проекции:

а – пазуха интактного животного: 1 – лицевой отдел, 2 – носовой отдел, 3 – корни резцов, 4 – верхнечелюстного синуса, 5 – вырезка подглазничного отверстия, *б* – височный отросток верхней челюсти (передний отдел скуловой дуги); *б* – пазуха травмированного животного: 1 – перелом наружной стенки верхнечелюстного синуса, 2 – перелом скуловой кости и дуги, 3 – перелом верхней челюсти.

для синюита [6]. Это наблюдение позволяет считать нейротрофическую регуляцию ведущим фактором, влияющим на состояние слизистой оболочки носа и ВЧП [5, 15].

Нейротрофические расстройства мы исследовали на модели деафферентации путем одностороннего пересечения верхнечелюстного нерва в месте его выхода из полости черепа в крыловидно-небную ямку. Травма нерва за скуловой костью в подглазничной борозде исключала повреждение ВЧП при оперативном доступе. После анестезии животное иммобилизовали на трех нитях-держалках (две резцовые и одна щечная на стороне вмешательства). Щечная держалка формировалась путем проведения толстой капроновой нити прямой иглой из преддверия полости рта наружу через жевательную мышцу на стороне вмешательства. Верхняя и нижняя резцовые держалки в виде петель накладывались на соответствующие зубы. Левая рука оператора фиксировала щечную и верхнюю резцовые нити, при их натяжении открывалось преддверие полости рта на стороне операции. Натянутая ассистентом нижняя резцовая нить фиксировала рот животного в максимально открытом положении. Для предупреждения аспирации крови голова животного поворачивалась набок, на сторону вмешательства.

Оперативный доступ выполнялся на участке верхнего этажа преддверия полости рта от скуловой

уздычки до последнего верхнего моляра. Слизистая оболочка преддверия рта рассекалась горизонтальным разрезом длиной 5–8 мм. Края раны разводились распатором. При помощи специально изготовленного крючка с плоской заточкой и изгибом по отношению к оси $\frac{3}{4}$ и диаметром изгиба 3 мм, тупым путем раздвигали клетчатку и выводили в рану верхнечелюстной нерв. Рассечение нервного ствола осуществляли скальпелем. При разделении нерва на центральный и периферический отрезки крючок самопроизвольно освобождался. Операционная рана обрабатывалась раствором слабого антисептика, в качестве повязки использовалась кератопластическая мазь. Общее время операции, без учета введения в наркоз, составляло 30–40 с.

Для формирования острой травмы верхнечелюстного синуса животным на фоне анестезии проводили однократную компрессию в подглазничной области зажимом типа Бильрот без повреждения целостности кожных покровов. У травмированных крыс на визиограммах в горизонтальной проекции определялись множественные повреждения костей лицевого отдела: перелом наружной стенки пазухи, перелом скуловой кости и дуги и перелом верхней челюсти с изменением конфигурации подглазничного канала и компрессией подглазничного нерва (рис. 1, б).

После моделирования травмы в слизистой оболочке наблюдались характерные деструктивные

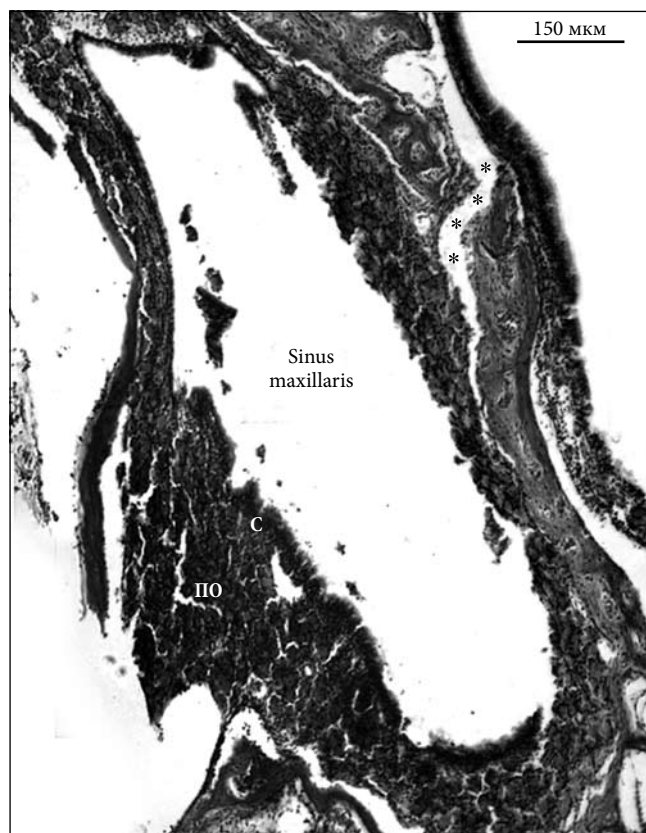


Рис. 2. ВЧП крысы при переломе скуловой кости, 3-и сутки эксперимента:

в слизистой оболочке (С) и подслизистой основе (ПО) определяется воспалительно-пролиферативная реакция (звездочки – участок перелома). Окр. гематоксилином и эозином.

и репаративно-пролиферативные изменения (рис. 2). С 1-х по 3-и сутки после в срезах слизистой оболочки регистрировалась выраженная воспалительная и тучноклеточная реакция. При этом форма ядер тучных клеток значительно изменялась: они приобретали неправильные очертания с выпячиваниями и инвагинациями, преимущественно конденсированный хроматин располагался под ядерной мембраной. На 7-е сутки эксперимента вблизи зоны повреждения определялись тканевой отек и выброс секреторных гранул тучных клеток в межклеточное пространство [3]. Изменения репаративно-продуктивного характера начинались примерно на 14-е сутки. В этом сроке тучноклеточная реакция была выражена незначительно, секреторные гранулы определялись лишь во внеклеточном пространстве и в меньшем количестве. В самих мастоцитах развивались дистрофические изменения в виде вакуолизации цитоплазмы и фестончатости наружного контура. Наряду с этим определялась пролиферация фибробластов. В межклеточном пространстве развивались явления коллагенообразования. В отдаленные сроки (21–28-е сутки после травмы) в слизистой оболочке ВЧП оставалось небольшое количество недифференцируемых клеток с поврежденным ядром и клеточный детрит.

Следует подчеркнуть, что на всех сроках после травмы отмечается своеобразная дегенерация клеток с резким изменением формы ядра и его фрагментацией,

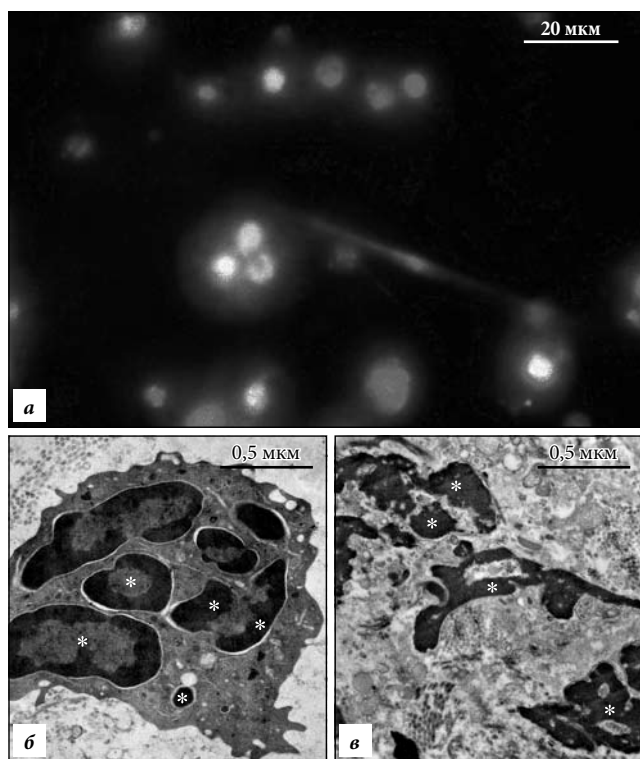


Рис. 3. Апоптоз клеток слизистой оболочки ВЧП крысы после травмы.

а – TUNEL-иммунофлуоресцентные клетки в подслизистой основе при переломе костей верхней челюсти крысы на 7-е сутки эксперимента; б, в – электроннограммы клеток собственной пластинки слизистой оболочки с признаками апоптотической гибели, 3-й (б) и 7-й (в) день после перерезки верхнечелюстного нерва: апоптотические тельца (звездочки), свободно лежащие в цитоплазме на месте разрушенного ядра.

что, возможно, является проявлением травматического стресса и/или апоптоза [2, 7, 9, 13].

Феномен апоптоза в слизистой оболочке ВЧП при экспериментальной травме костей черепа и перерезке верхнечелюстного нерва

Как известно, апоптоз является общебиологическим феноменом, позволяющим регулировать численную популяцию ткани, избавляя ее от устаревших или утративших свое функциональное значение клеточных элементов [5, 12]. Поэтому иммуноцитохимически выявляемые с помощью метода TUNEL свидетельства апоптоза могут быть обнаружены в тканях интактной слизистой оболочки – незначительное число эпителиоцитов, а также популяция фибробластов собственной пластинки, подслизистой и фиброзной основы слизистой оболочки неизменно присутствуют в тканях контрольных животных [1].

Интенсивная флуоресценция ядер апоптотических клеток, окрашенных с помощью метода TUNEL, показывает признаки фрагментации ДНК (рис. 3, а). Последние выглядят как флуоресцирующие точки (апоптотические тельца), которые, сливаясь, образуют кольца, полукольца, а также сплошные однородные конгломераты (рис. 3). Морфология апоптотических клеток не зависит от вида и сроков нанесения травмы, меняется лишь их количество и локализация по слоям слизистой оболочки. Так, при перерезке

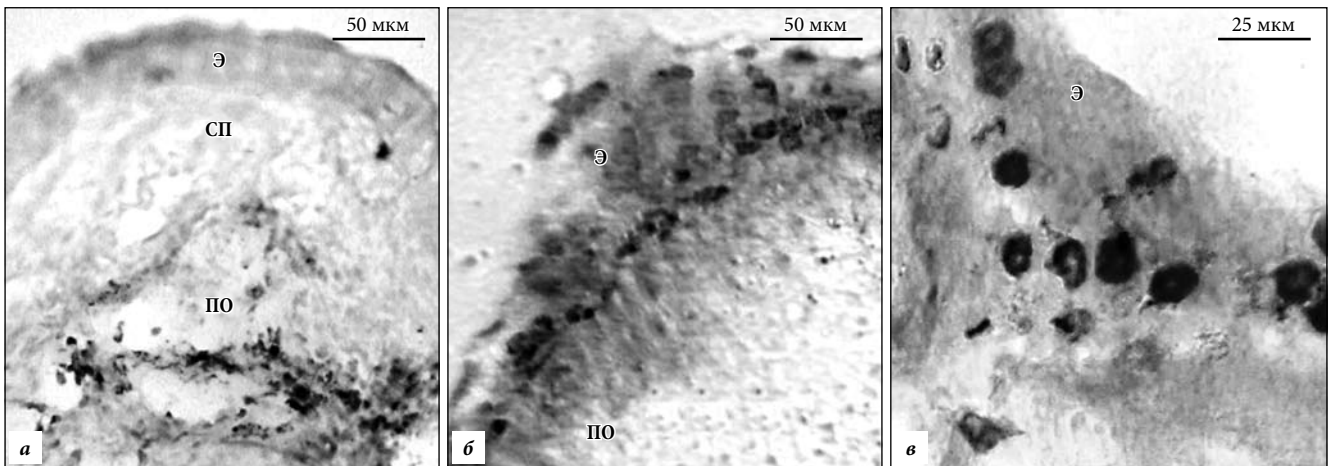


Рис. 4. Локализация про- и антиапоптотических факторов в слизистой оболочке ВЧП крысы после перелома костей черепа: а, б – топография р53-иммунореактивных клеток на 3-и (а) и 14-е (б) сутки после травмы: смещение маркированных структур из эпителиального слоя (Э) в подслизистую основу (ПО), СП – собственная пластинка слизистой оболочки; в – Bcl-2-иммунореактивные клетки в эпителиальном слое (Э) и собственной пластинке слизистой оболочки крысы, 7-е сутки посттравматического периода. Препараты докрашены толуидиновым синим.

верхнечелюстного нерва они преобладают в эпителиальном слое в ближайший период после травмы (1–7-е сутки), градиентно «смещаясь» в глубокие отделы слизистой оболочки. На 14–21-е сутки эксперимента большая часть маркированных клеток локализуется в подслизистой основе, где они концентрируются, главным образом, в периваскулярных пространствах. При этом стенки микрососудов с TUNEL не реагируют. Локализация р53- и Bcl-2-иммунореактивности в слизистой оболочке верхнечелюстной пазухи не совпадает и зависит от сроков нанесения травмы [1].

В 1-е сутки р53-иммунореактивные клетки выявляются в эпителиальном слое как единичные скопления. Затем их количество начинает преобладать, достигая максимума на 14–21-й день после перерезки нерва. Картина распределения Bcl-2-иммунореактивных клеток имеет противоположную тенденцию. В 1–3-и сутки они обнаруживаются практически повсеместно с преимущественной локализацией в эпителиальном слое и периваскулярных пространствах подслизистой основы. В позднем периоде после перерезки нерва локализация Bcl-2-иммунореактивных клеток существенно не меняется, однако интенсивность иммунореактивности значительно повышается в подслизистой основе и фиброзном слое слизистой оболочки. Можно полагать, что экспрессия белка Bcl-2 в отсроченный период деафферентации лимитирует количество апоптотических клеток и создает благоприятный фон для пролиферации, выживания и активного функционирования соответствующих слоев слизистой оболочки [1].

Как показали наши исследования, выраженность апоптоза в тканях травмированной слизистой оболочки имеет двухфазную динамику с максимумом на 3-и и 21-е сутки. В этом случае трудно идентифицировать, какая популяция эпителиоцитов (реснитчатых или бокаловидных) страдает в большей мере. Апоптотические ядра визуализируются по всей толще многорядного эпителия и на протяжении слизистой оболочки имеют тенденцию к очаговым группировкам. Наряду с участками, содержащими активно погибающие клетки, встречаются

зоны, где выраженность апоптоза минимальна и находится на контрольных уровнях. Кроме того, встречаются участки, где в процесс вовлечены исключительно клетки, ядродержащие сегменты которых расположены в поверхностных слоях эпителиального пласта.

Вторая волна апоптоза формируется на 21-е сутки. Можно предположить, что типичный ячеистый, «дырявый» вид эпителия на препаратах, докрашенных метиловым зеленым, возникает благодаря предшествующей гибели именно бокаловидных эпителиоцитов. Апоптоз клеточных элементов собственной пластинки и подслизистой основы сопровождается последовательной активацией процесса в тучных клетках, а затем в цитоплазме фибробластов. Именно эти клетки становятся доминирующим типом, выявляемым на последующих этапах с помощью метода TUNEL. Наибольшую активность при травме процессы апоптоза приобретают в тканях фиброзной основы. За время эксперимента удельная плотность фибробластов, вовлеченных в апоптоз, увеличивается втрое. Топография распределения TUNEL-позитивных структур соотносится с локализацией про- и антиапоптотических факторов р53 и Bcl-2 (рис. 4). Нами диагностированы эпителиоциты с высокой активностью р53 в ранние сроки после травмы. Такие клетки локализуются в основном в верхних уровнях эпителиального пласта. В этот период Bcl-2 здесь практически не определяется. Количество Bcl-2-реактивных клеток начинает возрастать примерно с 7-х суток после нанесения повреждения и прослеживается в течение 20 дней. В этот период р53-иммунореактивные элементы появляются в подслизистой основе и наружной фиброзной оболочке.

Следует отметить, что травматическое повреждение тканей слизистой оболочки сопровождается нарушением целостности внутренней оболочки сосудов. Начиная с первых суток посттравматического периода в апоптоз вступают эндотелиальные клетки. Это явление в равной мере представлено как в мелких сосудах собственной пластинки слизистой оболочки, так и в кавернозных венах подслизистой основы.

Известно по крайней мере несколько генов, ответственных за развитие апоптоза в слизистых оболочках. Среди них есть как индукторы – Fas/apo-1, p53, так и ингибиторы апоптоза – bcl-2, bcl-x, bax [8–11, 16]. Наиболее изученными являются гены раннего немедленного ответа и соответствующие им белки. В частности, белок p53, известный как регулятор клеточного цикла и супрессор опухолей, участвует в восстановлении ДНК поврежденной клетки. Так, при экспериментальной травме нервных трактов в спинном мозге максимум содержания p53 определяется через двое суток, к седьмым суткам посттравматического периода этот белок исчезает. Обнаруживается p53 и на некотором удалении от места травмы спинного мозга, и это является ранним ответом, предшествующим валлеровской дегенерации волокон [14, 18, 19].

Таким образом, суммарный эффект моделируемой травмы можно оценить как сумму первичной гибели клеток слизистой оболочки и вторичного распространенного повреждения – апоптоза – вблизи места травмы и на отдалении.

Заключение

Представленные модели совершенно необходимы для углубленного исследования роли модулирующих цитопротективных и цитотоксических эффектов в процессах репарации. Моделируемая травма инициирует в клетках слизистой оболочки апоптотическую гибель, которая соотносится с балансом p53- и Bcl-2-иммунореактивности. Нарушение этого баланса может влиять на эффективность регенераторных процессов при повреждении. При интенсивной экспрессии Bcl-2 в раннем периоде после травмы верхнечелюстного нерва отмечается низкая экспрессия белка p53 и, соответственно, низкий апоптотический индекс. В отсроченный период после травмы резко возрастает экспрессия p53 и критически снижается экспрессия Bcl-2, что сопровождается интенсивным апоптозом клеток слизистой оболочки. Посттравматическая регенерация протекает одновременно с уменьшением плотности апоптотических эпителиоцитов и нарастанием апоптотического индекса в глубоких слоях слизистой оболочки на поздних сроках деафферентации. Травматическое повреждение слизистой оболочки сопровождается нарушением целостности внутренней оболочки сосудов вследствие массивного апоптоза эндотелиальных клеток. Значение этого механизма усиливается в отсроченный период после травмы.

Литература

1. Едранов С.С., Мотавкин П.А. Апоптоз как механизм повреждения слизистой оболочки максиллярной пазухи крыс при экспериментальном пересечении верхнечелюстного нерва // Бюл. эксперимент. биол. и мед. 2012. Т. 153, № 4. С. 518–523.
2. Едранов С.С., Цой Хак Бон, Хетеева И.П. Динамика апоптоза и его регуляция при травме верхнечелюстного синуса // Тихоокеанский медицинский журнал. 2013. № 1. С. 12–16.
3. Едранов С.С. Посттравматический гайморит: вопросы патогенеза. Экспериментальное и клиническое исследование. Владивосток: Медицина ДВ, 2013. 167 с.

4. Едранов С.С., Цой Хак Бон, Хетеева И.П. Клиническая морфология посттравматического воспаления и репарации скуло-верхнечелюстного комплекса // Российский стоматологический журнал. 2013. № 2. С. 13–16.
5. Калинин С.Г., Матвеева Н.Ю. Морфологическая характеристика апоптоза и его значение в нейрогенезе // Морфология. 2007. Т. 131, № 2. С. 16–28.
6. Коломийцев В.П., Коротченко В.В. Состояние нейронов верхнего шейного симпатического и гассерова ганглиев в условиях экспериментального синусита // Современные методы диагностики и лечения заболеваний верхних дыхательных путей. Киев: [Б.и.], 1990. С. 90–111.
7. Пальцев М.А. Молекулярные основы апоптоза // Вестник РАМН. 2002. Т. 72, № 1. С. 13–21.
8. Chae I.H., Park K.W., Kim H.S., Oh B.H. Nitric oxide-induced apoptosis is mediated by Bax/Bcl-2 gene expression, transition of cytochrome c, and activation of caspase-3 in rat vascular smooth muscle cells // Clin. Chim. Acta. 2004. Vol. 341. P. 83–91.
9. Chung E.Y., Kim S.J., Ma X.J. Regulation of cytokine production during phagocytosis of apoptotic cells // Cell Res. 2006. Vol. 16. P. 154–161.
10. Ferri K. Apoptosis control in syncytia induced by thy HIV type 1-envelope glycoprotein complex, role of mitochondria and caspase // J. Exp. Med. 2000. Vol. 192. P. 1081–1092.
11. Hengarten O.M. The biochemistry of apoptosis // Nature. 2000. Vol. 407. P. 770–775.
12. Meier P., Finch A., Evan G. Apoptosis in development // Nature. 2000. Vol. 407. P. 796–801.
13. Moll U.M., Zaika A. Nuclear and mitochondrial apoptotic pathways of p53 // FEBS Lett. 2001. Vol. 493. P. 65–69.
14. Neary J.T., Zimmermann H. Trophic functions of nucleotides in the central nervous system // Trends Neurosci. 2009. Vol. 32. P. 189–198.
15. Niidome T., Morimoto N., Iijima S. [et al.] Mechanisms of cell death of neural progenitor cells caused by trophic support deprivation // Eur. J. Pharmacol. 2006. Vol. 548. P. 1–8.
16. Perecko T., Drabikova K., Rackova L. [et al.] Molecular targets of the natural antioxidant pterostilbene: effect on protein kinase C, caspase-3 and apoptosis in human neutrophils in vitro // Neuroendocrinol. Lett. 2010. Vol. 28. P. 34–38.
17. Sloviter R. Apoptosis: a guide for perplexed // Trends Pharmacol Sci. 2002. Vol. 23. P. 19–24.
18. Van Delft M.F., Huang D.C. How the Bcl-2 family of proteins interact to regulate apoptosis // Cell Res. 2006. Vol. 16. P. 203–213.
19. Yan N., Shi Y. Mechanisms of apoptosis through structural biology // Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 2005. Vol. 21. P. 35–56.

Поступила в редакцию 03.05.2014.

Экспериментальная травма как модель для исследования репаративных механизмов слизистой оболочки верхнечелюстного синуса

С.С. Едранов¹, В.Г. Цой²

¹ Тихоокеанский государственный медицинский университет (690950, г. Владивосток, пр-т Острякова, 2), ² ООО «Мобильная операционная бригада» (690078, г. Владивосток, ул. Авроровская, 17)

Резюме. Представлен критический анализ модели экспериментальной травмы и состояния клеток слизистой оболочки верхнечелюстной пазухи крысы. Приведены данные, касающиеся апоптоза и его регуляции при перерезке верхнечелюстного нерва и переломе костей черепа. Показано наличие специфического паттерна экспрессии молекулярных факторов апоптоза и их роли в регенерации и восстановлении ткани. Этот подход позволяет рассмотреть состояние травмированной слизистой оболочки в целом и отдельных типов клеток в зависимости от уровня их апоптотической гибели.

Ключевые слова: верхнечелюстная пазуха, перелом, верхнечелюстной нерв, апоптоз.