

## ИЗУЧЕНИЕ РЕГЕНЕРАЦИИ ТКАНЕЙ НА БИОЛОГИЧЕСКИХ МОДЕЛЯХ И В КЛИНИКЕ

*Кафедра биологии Тверской ГМА, профессор М.Б. Петрова,  
профессор Г.В. Хомулло*

75 лет назад на базе Ленинградского стоматологического института был создан Калининский медицинский институт. С первых дней открытия нашего вуза параллельно с разработкой всех аспектов учебно-методического процесса сотрудники кафедры биологии определили ведущее направление научного исследования коллектива и уже в 1954 г. начали поисковые работы по теме «Основные закономерности регенерации и морфогенеза тканей». На первых этапах в изысканиях, выполнявшихся под руководством Г.В. Хомулло, применялись морфологические, цитологические и гистохимические методы. В 1971 г. при кафедре была организована лаборатория электронной микроскопии, открытие которой позволило перейти на новый, более высокий ультраструктурный уровень изучения процесса регенерации. Появилась возможность накопить данные о морфологических особенностях тканей и органов на всех уровнях структурной организации: от субклеточного до организменного. Теоретические исследования приобрели экспериментально-клиническую направленность, что обусловило привлечение большого числа исполнителей различных кафедр, в связи с чем в 1972 г. на основе базисной выделилась комплексная тема с названием «Морфофункциональные аспекты гормональной стимуляции посттравматической регенерации различных органов и тканей». Эта работа проводилась совместно со Всесоюзным НИИ технологии кровезаменителей и гормональных препаратов (г. Москва).

Экспериментальными моделями исследований служили асептические, ожоговые, инфицированные раны, костные переломы, заживление которых изучалось в условиях применения стимулирующего фактора. На первом этапе в качестве стимуляторов

использовались гормоны гипофиза, коры надпочечника и щитовидной железы, в том числе, кальцитонин (КТ), вырабатываемый в С-клетках щитовидной железы.

Экспериментально было выявлено, что стимулирующий эффект КТ при заживлении ран связан не только с его влиянием на обмен коллагена и ускорение формирования тканей регенерата, но и усиление контракции раны. Клинико-экспериментальные исследования, посвященные выяснению роли кальций-регулирующей системы в язвенногенезе, проведены совместно с кафедрой факультетской терапии. Исследованиями установлено, что развитие экспериментальных язв желудка у кроликов, воспроизводимых травмой солнечного сплетения, происходит на фоне изменения кальциевого и фосфорного баланса. Было доказано, что паратиреоидин усиливает нарушения кальциевого и фосфорного баланса, сосудистые и дистрофические процессы, способствует развитию в желудке микроциркуляторных нарушений и язв. Напротив, кальцитонин повышает реакции адаптации и нормализует микроциркуляцию, активизирует процессы репарации, препятствует развитию сосудистых расстройств и язв. Это позволило считать, что КТ обладает протективными свойствами, а повышение функциональной активности парашитовидных желез в период рецидива язвенной болезни является патогенетической реакцией, способствующей формированию язвенного процесса. Полученные данные явились основанием для разработки нового метода лечения рецидива язвенной болезни с включением в комплекс терапии КТ, который позволил достоверно ускорить ликвидацию основных симптомов болезни, на 6 дней сократить сроки лечения, ускорить рубцевание язв.

Результаты экспериментальных исследований по изучению регенерации кости в условиях применения кальцитонина отчетливо показали стимулирующее влияние гормона. КТ приводит к ускоренному образованию соединительно-тканной матрицы, которая в дальнейшем, обогащаясь солями кальция и фосфора, способствует ускоренному формированию губчатой, а затем и пластинчатой костной ткани. Эти данные послужили основанием для изучения влияния КТ на заживление осложненных переломов трубчатых костей в клинике. В исследовательской работе, выполненной на базе отделения травматологии и ортопедии областной детской больницы, использовался комплекс различных методик. Анализ результатов работы показал, что КТ уменьшает декальцификацию костной ткани, угнетает остеолит, особенно при состояниях, характеризующихся повышенной скоростью резорбции костной ткани.

С целью объяснения механизма действия КТ на репаративные процессы в костной ткани было изучено влияние гормона на щитовидную железу. Помимо морфологических методик, в этом исследовании использовалось радиоиммунологическое определение концентрации ТТГ аденогипофиза, тироксина и трийодтиронина щитовидной железы и эндогенного КТ. Доказано, что введением КТ создается оптимальный уровень тиреоидных гормонов, что и является одним из механизмов стимулирующего влияния КТ на заживления переломов.

В.И. Лотова изучала особенности восстановительного процесса в коже при гипоксии и дополнительном введении соматотропного генно-инженерного гормона. Автором для изучения синтеза ДНК в различных зонах регенерирующей кожи был использован автордиографический метод с использованием  $H^3$ -тимидина. Именно начиная с этой работы новая методика была внедрена в комплекс, применяемый на кафедре для изучения заживления кожи, и использовался последующими исследователями.

В конце 80-х годов на кафедре для изучения некоторых биохимических изменений в осуществлении раневого процесса у животных, находившихся в условиях стимуляции, стали применяться такие методы исследования, как тонкослойная хроматография фосфолипидов и их фракций, проточная хроматография с определением диацилглицеролов, газожидкостная хроматография – исследование арахидоновой кислоты в грануляционной ткани.

С 1994 г. коллектив кафедры принимает участие в разработке комплексной темы «Применение оптических квантовых генераторов в челюстно-лицевой хирургии и онкологии», выполняемой совместно с кафедрой хирургической стоматологии и реконструктивной челюстно-лицевой хирургии. Сотрудниками кафедры изучено влияние на заживление мягких тканей трех видов лазерного излучения, отличающихся длиной волны. На основании проведенных экспериментальных исследований установлено, что излучение красного лазера ускоряет течение всех фаз репаративного процесса. Лазер оказывает се-

лективное действие на клеточное размножение, что подтверждается методом гистоавтордиографии и биохимическими исследованиями, выполненными совместно с кафедрой органической и бионеорганической химии. Нами выявлено, что излучение красного лазера способствует ускоренному выведению из состава клеточных мембран лизоформ фосфолипидов при параллельном накоплении их ведущих фракций – сфингомиелинов и фосфатидилхолинов. В результате увеличивается рабочая поверхность мембран, повышается активность ферментов, ускоряются процессы деления клеток, а значит, регенерация кожи.

По данным сотрудников кафедры, оптимизирующий эффект лучей инфракрасного спектра на процессы репарации у животных наиболее выражен на стадии воспаления. Результаты эксперимента позволили рекомендовать применение этого вида излучения для лечения больных с флегмонами челюстно-лицевой области, назначая его со 2-го дня после операции в комплексе с общепринятыми методами. Результаты дополнительных, более поздних исследований, выполненных совместно с сотрудниками кафедры микробиологии, показали, что инфракрасные лучи снижают активность ферментных систем микроорганизмов, угнетают их жизнеспособность, что приводит к более быстрому очищению раны от гнойно-некротических масс.

Данные, полученные при изучении гистологических препаратов гемангиом области лица и шеи, позволили подобрать оптимальный режим их облучения лазером зеленого спектра и добиться максимальной резорбции сосудов опухоли. Результаты наших исследований используются в виде рекомендаций при применении этого лазера в стоматологической клинике для лечения гемангиом лица и шеи.

Изучение особенностей посттравматической регенерации в условиях электропунктуры и применения биологически активных веществ проводилось совместно с биохимической лабораторией НИЦ. В 2001 г. это направление получило статус комплексной темы «Влияние гормонов и излучений, реализующих свой эффект через обмен различных фосфолипидов и их метаболитов, на процессы регенерации».

Использованные в работе биохимические методы позволили выявить, что при электропунктуре точек активности общего действия процесс фосфорилирования фосфоинозитидов смещается в сторону образования полифосфоинозитидов. В эти же сроки в макрофагах отмечается повышенный уровень диацилглицеролов, которые, как и другие вторичные посредники, образуются при гидролизе полифосфоинозитидов. Эти соединения регулируют активность клеточных элементов, участвующих в развитии всех структур регенерата, и особенно в формировании грануляционной ткани. Совокупность полученных изменений приводит к сокращению общих сроков заживления на 2–3 дня и позволяет рекомендовать применение электропунктуры для стимуляции репаративных процессов.

Гиалуроновая кислота является биологически активным веществом и относится к группе гликозаминогликанов. Проведенные исследования показали, что гиалуроновая кислота оптимизирует заживление инфицированных ран, что особенно ярко проявляется на заключительном этапе – эпителизации ран. У животных, находившихся под воздействием гиалуроновой кислоты, через 18 дней после операции на месте раневого дефекта формируется органоспецифический регенерат. У контрольных животных даже через 21 день после операции только завершается процесс полной эпителизации и на месте повреждения остается рубец большой протяженности. Результаты морфологических исследований находятся в полном соответствии с изменением уровня содержания фосфоинозитидов и продуктов их метаболизма, в частности простагландинов. Они являются медиаторами воспаления и стимулируют синтез коллагена, поэтому их называют «местными», или «клеточными», гормонами. Кроме того, простагландины ускоряют процессы пролиферации и дифференцировки эпителия. Результаты исследований рекомендованы в качестве патоморфологического обоснования применения гиалуроновой кислоты при заживлении инфицированных ран и болезней кожи в клинической практике.

В настоящее время на кафедре биологии продолжается активный поиск оптимальных методов стимуляции репаративных процессов. Привлечение к работе врачей разных специальностей позволило расширить не только список стимуляторов, но и спектр применяемых методик. Совместно с кафедрой хирургической стоматологии и реконструктивной челюстно-лицевой хирургии коллектив кафедры биологии принял участие в установлении морфофункциональных особенностей заживления ран кожи под влиянием льняного масла.

Совместно с кафедрой фундаментальной и клинической фармакологии изучался эффект применения иммуномодулятора «Ронколейкин», хитозана и препарата «Суперлимф» на процессы репарации. Доказано их положительное влияние на течение процесса заживления ран кожи. Препарат «Суперлимф» является комплексом природных цитокинов и относится к группе фармакологических средств, корригирующих активность иммунной системы. При работе с ним в комплексе с традиционными морфологическими методами были использованы новые современные методы исследования. Примененный иммуноферментный метод позволил исследовать концентрацию неоптерина, IL-2, IL-10 в сыворотке крови и супернатанте гомогената грануляционной ткани животных. С помощью фотометрического метода исследовалась концентрация лизоцима и SH-групп в сыворотке крови и супернатанте гомогената грануляционной ткани животных. Нашими исследованиями установлено, что под влиянием «Суперлимфа» происходит ускорение заживления экспериментальных ран кожи на  $2,0 \pm 0,5$  суток вследствие повышения антиоксидантной активности и усиление клональной проли-

ферации лимфоцитов Th2, интенсификации окислительно-восстановительных реакций и активации клеточного иммунитета, на что указывает снижение уровня содержания SH-групп и неоптерина в грануляционной ткани раны. Иммуномодулятор «Суперлимф» оптимизирует течение фазы воспаления, делая ее более интенсивной с первых часов после повреждения кожи, но, ограничивая продолжительность, активизирует гибель избыточного количества нейтрофилов через апоптоз.

Среди средств, стимулирующих репаративный процесс, широкое распространение получили препараты на основе органических кислот, в частности производные аминокaproновой кислоты, в том числе и ацесамовая кислота, разрабатываются новые лекарственные формы этих препаратов. Целью одного из проведенных экспериментальных исследований совместно со Всероссийским научным центром биологически активных веществ (г. Купавна) было изучение влияния разработанной ими лекарственной формы ацесамовой кислоты (спрей) на репаративные процессы кожи. Выявлено, что испытуемый препарат ускоряет миграцию клеточных элементов крови в зону повреждения, увеличивает их физиологическую активность, что приводит к сокращению первой фазы регенерации – воспалительной – и стимулирует образование грануляционной ткани. Стимулирующий эффект препарата Ацемин в новой лекарственной форме проявился в общем сокращении сроков регенерации полнослойных дефектов кожи.

В последующем изучалась посттравматическая регенерация костной ткани в условиях применения ацесамовой кислоты (АК). Эксперимент проведен с использованием рентгенологических и гистологических методик и позволил установить, что при пероральном введении АК происходит одинаково интенсивное формирование периостальной, интермедиальной и эндоостальной мозолей на различных этапах костеобразовательного процесса. Ускоренное образование губчатой кости, состоящей из широких костных перекладин, имеющих крупнопетлистый рисунок, сочетается с активной трансформацией грубоволокнистой ткани в пластинчатую, что связано с быстрым восстановлением и интенсивным прорастанием тканей регенерата кровеносными капиллярами, появлением первичных ядер кристаллизации и последующим отложением солей, что значительно сокращает окончательные сроки заживления.

С целью изучения влияния новой гелеобразующей системы на основе водных растворов природной аминокислоты L-цистеина и нитрата серебра на заживление были созданы модели гнойных ран кожи на белых крысах. Проведенные исследования показали, что местное применение L-цистеин-серебряного геля оказывает выраженное регулирующее действие на раневой процесс в коже. Это вещество способствует активной миграции в рану нейтрофилов, которые препятствуют проникновению патогенных микроорганизмов. Учитывая микродозы исследуемых растворов, можно заключить, что L-цистеин-сереб-

ряный гель в указанных концентрациях обладает бактериостатическим действием на патогенные и условно-патогенные микроорганизмы. Фаза воспаления протекает более энергично, но по времени занимает более короткие сроки, поэтому протеолитические ферменты нейтрофилов действуют только в ране и не успевают повредить окружающие ткани. Аппликации геля стимулируют и активизируют репаративный процесс, но не дают ему перерасти в гиперэргическую реакцию с повреждением окружающих здоровых тканей и образованием келоидного рубца.

Комплексирование с клиническими кафедрами позволило изучать основную научную проблему, разрабатываемую коллективом кафедры биологии, в различных направлениях. Совместно с сотрудниками кафедры общей хирургии проведено испытание разработанного ими нового биологически активного хирургического шовного материала. Проведенные исследования с применением комплекса цитологических, гистологических и электронно-микроскопических методов, выявили его положительное влияние на течение раневого процесса, которое проявлялось в меньшей выраженности воспаления, быстрым его разрешением и более эффективным течением репаративных процессов. Было доказано, что применение нового шовного материала приводит к повышению деформационно-прочностных характеристик формирующегося при заживлении раны рубца. После экспериментальных и клинических испытаний разработанный шовный материал был рекомендован для применения в экстренной и плановой хирургии, особенно у пациентов со сниженной репаративной функцией и высоким риском развития местных послеоперационных осложнений.

Новое направление работы сотрудников кафедры биологии совместно с клиническими кафедрами основано на изучении возможности применения кристалломорфологического метода в диагностике некоторых заболеваний человека. На сегодняшний день установлены особенности кристаллизации биологических жидкостей в норме. Известно, что нарушения клеточного метаболизма при патологических процессах приводят к изменению химического состава жидкостей организма, которое можно зафиксировать, кристаллизуя изучаемый объект. Следовательно, количественные и качественные характеристики кристаллов могут служить объективными показателями функционального состояния организма.

Объектами для кристаллизации при комплексной работе с сотрудниками кафедр факультетской терапии, нервных болезней, хирургии стоматологического факультета, акушерства и гинекологии служили: ликвор, участки вен нижних конечностей, слюна, плазма крови, амниотическая жидкость.

Совместно с кафедрой нервных болезней изучена кристаллизация ликвора с целью диагностики некоторых заболеваний центральной нервной системы. Для сопоставления кристалломорфологических картин были закристаллизованы раствор кристалло-

образующего вещества, ликвор и кристаллообразующее вещество в комплексе с ликвором здоровых и больных лиц. Отмечена закономерная смена форм кристаллов, связанная с изменением химического состава ликвора при различной патологии, что может быть использовано при дифференциальной диагностике заболеваний ЦНС.

Хроническая венозная недостаточность приобрела острое социальное значение. Однако до настоящего времени отсутствует единая классификация стадий заболевания, что затрудняет диагностику и лечение больных.

Целью следующего фрагмента работы, выполненной совместно с сотрудниками кафедры хирургии стоматологического факультета, явилась идентификация стадий варикозной болезни вен, основанной на сравнительном анализе гистологических методов и предложенном нами кристалломорфологическом методе. В результате исследований установлен параллелизм морфологических изменений стенок вен на разных стадиях варикозной болезни и соответствующих им форм кристаллов, что может быть использовано для дифференцировки стадий данной болезни.

Проведенными исследованиями установлен факт закономерной смены форм кристаллов в зависимости от изменения химического состава кристаллизующего объекта. Однако визуальные характеристики являются субъективными и могут применяться только для предварительной классификации групп заболеваний. В связи с этим была предложена авторская количественная оценка процесса кристаллизации в биологических объектах, основанная на критериях, характеризующих закономерности кинетики роста кристаллов в неорганических средах. Проведен подсчет центров кристаллизации (ЦК), числа кристаллов, размеров и количества лучей, скорости роста кристаллов. Выявлена корреляция между количеством ЦК и процессом выздоровления, что может быть использовано для мониторинга эффективности проводимых лечебных мероприятий.

В настоящее время изыскания по практическому использованию кристалломорфологии в медицине продолжаются. В качестве кристаллизата использовалась слюна, плазма крови, амниотическая жидкость, желчь.

По результатам экспериментального исследования по применению кристалломорфологического метода сотрудниками кафедр опубликовано 27 статей в местной и центральной печати; получены положительные решения по 2 заявкам на изобретение и 5 удостоверений на рационализаторские предложения. Кристалломорфологический метод диагностики заболеваний ЦНС и определение стадий варикозной болезни используются в диагностической и лечебной работе кафедры нервных болезней, хирургического отделений 4-й городской и нервного отделения железнодорожной больницы г. Твери; защищена диссертационная работа «Кристаллизация в биологических средах и ее применение в медицине».

Среди разрабатываемых в современной морфологии проблем фундаментального и прикладного характера значительная роль отводится исследованиям по миогистологии, в связи с чем совершенно новым научным направлением, определенным в качестве исследовательской работы кафедры биологии, явилось изучение особенности организации пищевода и выявление закономерностей его эволюционных трансформаций у различных таксонов позвоночных. Детально изучена структурная организация пищевода на органном, тканевом и ультраструктурном уровнях организации у представителей всех классов позвоночных животных, выявлена специфика линейных размеров органа в зависимости от варианта организации дыхательной системы. Установлены типы мышечной ткани в составе стенки пищевода, расположение по длине органа, обнаружены ранее неизвестные особенности строения пищевода рептилий и птиц. Обнаружены параллели филогенетических преобразованиях мышечных тканей пищевода с направлениями эволюции собственно мышечных тканей: исходным типом ткани являлась гладкая, затем появилась поперечнополосатая. Предложена

схема филогенетических преобразований мышечной оболочки пищевода с учетом факторов среды, особенностей питания и дыхания различных групп позвоночных. Полученные в процессе работы данные имеют важное теоретическое значение, так как представляют систематическое описание изменений структуры пищевода и его оболочек в ряду позвоночных и раскрывают механизмы адаптации этого органа к различным эволюционным факторам. По результатам научных исследований М.Б. Петровой защищена диссертация на соискание ученой степени доктора биологических наук.

Таким образом, основной темой научной работы на кафедре биологии является проблема репаративной регенерации. Комплекс морфологических и биохимических показателей позволил доказать стимулирующий эффект различных факторов в процессе заживления ран кожи и кости и тем самым патогенетически обосновать применение изученных стимуляторов в клинической практике. Вместе с тем сотрудники кафедры ведут активную экспериментальную работу и по другим актуальным научным направлениям.