

Алена Александровна Ганцгорн

Красноярский государственный аграрный университет, аспирант кафедры анатомии, патологической анатомии и хирургии, Красноярск, Россия

alena.rubay@mail.ru

Наталья Владимировна Донкова

Красноярский государственный аграрный университет, заведующая кафедрой анатомии, патологической анатомии и хирургии, доктор ветеринарных наук, профессор, Красноярск, Россия

dnv-23@mail.ru

**РЕГЕНЕРАЦИЯ АМПУТИРОВАННОЙ КОНЕЧНОСТИ ТРИТОНА
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ УЛЬТРАЗВУКА И CaCl₂**

Цель исследования – установить влияние сочетанного воздействия ультразвука и CaCl₂ на макро- и микроструктуру регенерирующих тканей грудной конечности тритона после ампутации. Определено, что после ампутации грудной конечности у тритона происходит поэтапная посттравматическая регенерация. Конечность восстанавливается полностью к 85-м суткам и становится физиологически, макро- и микроструктурно равноценной исходной конечности. При стимуляции регенерации сочетанным воздействием ультразвука и CaCl₂, добавленного в воду, процесс восстановления конечности протекает интенсивнее и завершается на 2–3 недели раньше, чем в контрольной группе. На 42-е сутки после ампутации длина регенерирующей культы в контрольной группе составляла 7,03±0,11 мм, а во второй группе, где применялся ультразвук, была длиннее, чем в контроле, на 13,3 % (P ≤ 0,05) и достигала 7,97±0,11 мм. В третьей группе при сочетанном воздействии ультразвука и CaCl₂ в течение 10 дней, экспозиция 30 с, длина культы превышала контрольное значение на 27,6 % (P ≤ 0,05) и достигала 8,97±0,18 мм. На 42-е сутки на микроструктурном уровне сформированы кожа с ороговевающим эпителием и железами, поперечно полосатые мышцы и кости, представленные хрящевой тканью. При этом наиболее выраженные и завершённые процессы остеогенеза отмечались в группе, где применяли сочетанное воздействие ультразвука и CaCl₂. Кости грудной конечности тритона после ампутации регенерируют за счет хрящевой ткани эпифизарных пластинок, сформировавшихся на месте мезенхимы. Хрящевая ткань представлена изогенными группами округлых хондроцитов, пространство между которыми заполнено безволоконистым матриксом – хондромукоидом. Стимуляция регенерации сочетанным воздействием ультразвуком и CaCl₂ ускоряет лишь процесс регенерации, но сохраняет закономерности развития хрящевой кости в зоне эпифизарных пластинок из мезенхимы.

Ключевые слова: тритон, регенерация, микроструктура грудной конечности, ультразвук, CaCl₂.

Alena A. Gantshorn

Krasnoyarsk State Agrarian University, Post-graduate Student at the Department of Anatomy, Pathological Anatomy and Surgery, Krasnoyarsk, Russia

alena.rubay@mail.ru

Natalia V. Donkova

Krasnoyarsk State Agrarian University, Head of the Department of Anatomy, Pathological Anatomy and Surgery, Doctor of Veterinary Sciences, Professor, Krasnoyarsk, Russia

dnv-23@mail.ru

AMPUTATED NEWT'S LIMB REGENERATION UNDER EXPOSURE TO ULTRASOUND AND CaCl₂

The aim of research is to establish the effect of the combined impact of ultrasound and CaCl₂ on the macro- and microstructure of the regenerating tissues of newt 's thoracic limb after amputation. It was determined that after amputation of the thoracic limb, the newt undergoes a phased post-traumatic regeneration. The limb is fully restored by the 85th day and becomes physiologically, macro- and microstructurally equivalent to the original limb. When the regeneration is stimulated by the combined effect of ultrasound and CaCl₂ added to the water, the process of limb recovery proceeds more intensively and ends 2–3 weeks earlier than in the control group. On the 42nd day after amputation, the length of the regenerating stump in the control group was 7.03 ± 0.11 mm, and in the second group, where ultrasound was used, it was longer than in the control, by 13.3 % ($P \leq 0.05$) and reached 7.97 ± 0.11 mm. In the third group, combined exposure to ultrasound and CaCl₂ for 10 days, exposition 30 s, the length of the stump exceeded the control value by 27.6 % ($P \leq 0.05$) and reached 8.97 ± 0.18 mm. On the 42nd day, skin with keratinizing epithelium and glands, striated muscles and bones, represented by cartilaginous tissue, were formed at the microstructural level. At the same time, the most pronounced and completed processes of osteogenesis were noted in the group where the combined effect of ultrasound and CaCl₂ was used. The bones of the newt 's thoracic limb after amputation are regenerated due to the cartilaginous tissue of the epiphyseal plates formed at the site of the mesenchyme. Cartilage tissue is represented by isogenic groups of rounded chondrocytes, the space between which is filled with a fibrous matrix – chondromucoid. Stimulation of regeneration by the combined effect of ultrasound and CaCl₂ accelerates only the regeneration process, but retains the regularities of the development of cartilaginous bone in the zone of the epiphyseal plates from the mesenchyme.

Keywords: *newt, regeneration, microstructure of the thoracic limb, ultrasound, CaCl₂.*

Введение. Поскольку механизм восстановления кости изучен недостаточно, в настоящее время проблема репаративной регенерации костной ткани является актуальной. Некоторые аспекты биохимических и морфологических механизмов и процессов рассмотрены в работах А.А. Корж, Г.В. Сорокина [2, 3]. Важно понять причины нарушения обмена веществ в костной ткани и в целом в организме в процессе регенерации. Установление механизма репаративного остеогенеза и причин его нарушения поможет в решении этой проблемы.

Способы и методы стимуляции репаративной регенерации делят на общие и местные. Также они подразделяются на физические (оперативные), химические (медикаментозные) и биологические [3].

В целях изучения стимуляции репаративного остеогенеза с 60-х гг. XX столетия началось активное исследование физических методов, без применения дорогостоящего оборудования, но дающих хорошие результаты. В настоящее время положительное влияние на репаративный остеогенез оказывают такие методы, как: высокочастотное переменное электромагнитное

поле; высокочастотное магнитное поле; постоянный ток; механо-акустические волны; ультразвук; ударно-волновая терапия; низкоинтенсивное лазерное излучение [4].

Ультразвук является перспективным методом стимуляции репаративной регенерации, но недостаточно изученным [4]. J. Harle установил, что ультразвук способствует модулированию аденилатциклазы, простагландина E, стимулирует экспрессию генов TGF [10]. R. Ramli показал, что ультразвук низкой интенсивности хорошо стимулирует неоангиогенез [13].

F.S. Oliver, Pires-De-Campos и другие зарубежные ученые получили хорошие результаты при использовании ультразвука малыми дозами на регенерирующую костную ткань [8, 12], также хорошие результаты дало применение ультрафонофореза (ультразвуковое воздействие через лекарственный препарат) [9]. Ультразвуковые колебания способствуют усилению проницаемости клеточных мембран и процессов диффузии, что обеспечивает более тщательное распространение лекарственного препарата из контактной среды в ткани [7]. На данный эффект указывают A. Azagury и K. Lii: отмечают возможность

применения лекарственных веществ в качестве контактной среды, при этом увеличивается возможность трансдермального введения лекарства [6, 11]. Двойное воздействие лекарственным веществом и ультразвуковой волной улучшает обмен веществ, усиливает репарацию и регенерацию костной ткани [5, 14]. Однако вопросы сочетанного воздействия ультразвука и CaCl_2 на регенерацию ампутированной конечности у тритонов исследованы недостаточно.

Цель исследования: установить влияние сочетанного воздействия ультразвука и CaCl_2 на макро- и микроструктуру регенерирующих тканей грудной конечности тритона после ампутации.

Объекты, материалы и методы исследования. Исследования проводились в гистологической лаборатории кафедры анатомии, патологической анатомии и хирургии Института прикладной биотехнологии и ветеринарной медицины Красноярского государственного аграрного университета в 2021 г.

Объектом исследования послужили самки обыкновенного тритона (*Triturus vulgaris* Linnaeus).

Материалом для исследования послужили ампутированная грудная конечность тритона, отросшая конечность (культя) при разных сроках после ампутации.

Ампутацию грудной конечности проводили на 1–2 мм ниже плечевого сустава. Животное под-

вергалось гипотермии, понижению температуры воды с 23 до 0 °С, тритоны впадали в состояние анабиоза, за счет чего снижалась двигательная активность и чувствительность. Данный способ был выбран как физиологически комфортный и привычный для тритонов [1], и он предотвращал кровопотерю.

В случае использования препаратного наркоза (золетил или рометар) у тритонов открывалось кровотечение в месте ампутации [1].

Исследовали тритонов трех групп, в каждой – по три особи. Первая группа являлась контрольной, после ампутации тритоны регенерировали без каких-либо посторонних воздействий. Вторая группа на 28-й день после ампутации была подвергнута воздействию ультразвука при помощи аппарата «Ретона АУТн-01» в течение 10 дней, экспозиция 30 с. У третьей группы к стимуляции ультразвуком добавляли в воду CaCl_2 по 0,2 г на 10 л воды аквариума в течение 10 дней.

Результаты исследования. На месте ампутации воспалительных процессов не наблюдалось, происходило постепенное формирование регенераторной мозоли, и спустя 14 дней она достигала 2–3 мм (рис. 1, 2). Две недели спустя ампутированная конечность достигла размеров, позволяющих проводить точечное воздействие УЗ (рис. 3).



Рис. 1. 14-й день после ампутации



Рис. 2. 28-й день после ампутации



Рис. 3. УЗ-воздействие

Достоверные различия в скорости регенерации конечностей в контрольной и опытных группах наблюдались на 42-е сутки после ампутации. Быстрее грудная конечность отрастала в третьей группе: длина ее составила около $8,97 \pm 0,18$ мм, что на 27,6 % ($P \leq 0,05$) больше, чем в контрольной группе, при этом видны зачатки пальцев (рис. 4). Во второй группе к этому периоду был сформирован лишь запястный

сустав без пальцев, а полная длина регенерирующей конечности составила $7,97 \pm 0,11$ мм, что по сравнению с контрольной больше на 13,3 % ($P \leq 0,05$) (рис. 5). В первой группе (контрольной) регенерирующая конечность имела клиновидную форму и включала в себя отросшую плечевую кость, локтевой сустав и зачаток костей предплечья без запястья и костей пальцев и составляла $7,03 \pm 0,11$ мм (рис. 6).



Рис. 4. Третья группа



Рис. 5. Вторая группа



Рис. 6. Первая группа

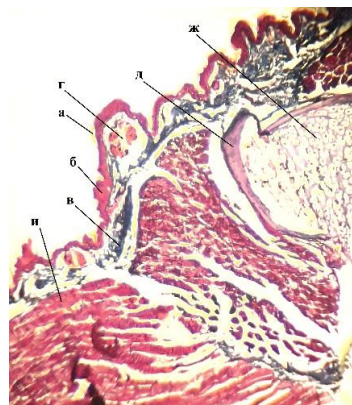
Ампутированную конечность погружали в 9 % раствор забуференного нейтрального формалина на 3 суток, затем – в 5 % водный раствор азотной кислоты на 5 суток, с ежедневной сменной раствора. Далее следовала промывка в проточной воде и проводка через батарею изопропиловых спиртов возрастающей концентрации и вазелиновое масло (проводка через 4 па-

рафина и заливка в парафиновые блоки). Нарезка препарата производилась на микротоме.

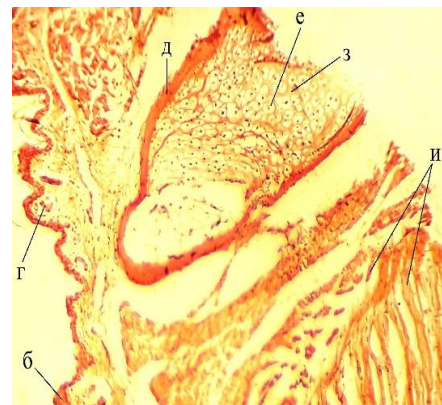
Полученные срезы окрашивали: гематоксилин-эозином, пикро-Маллори и Конго красным (рис. 7). При изучении контрольных препаратов с увеличением объектива 10× хорошо просматриваются все структурные единицы конечности.



Гематоксилин-эозин



Пикро-Маллори



Конго красный

Рис. 7. Микроструктура регенераторной мозоли: а – ороговевающий эпителий; б – эпителиальные клетки; в – рыхлая соединительная ткань; г – экзокринные железы; д – надхрящница; е – хондроциты; ж – хондробласты; з – межклеточное вещество (матрикс); и – мышечные волокна

Гистологически кожа представлена ороговевающим эпителием, отслоившимся от поверхности. Видны 2–4 ряда эпителиальных клеток с базофильно окрашенным ядром овальной формы. В коже хорошо видны крупные, округлые экзокринные железы, содержащие в себе секрет. Стенки желез выстланы однослойным эпителием. Далее рыхлая соединительная ткань переходит в мышечные волокна. Также при ок-

расе пикро-Маллори хорошо просматриваются коллагеновые и эластические волокна, представляющие собой связочный аппарат. Связками мышцы крепятся к надхрящнице, состоящей из единичных хондробластов вытянутой формы с овальным крупным базофильным ядром. В более глубоких участках кости хондробласты становятся хондроцитами – округлыми крупными клетками со смещенными эксцентрично

круглыми ядрами. Хондроциты располагаются изогенными группами по 2–4 клетки в группе, пространство между ними заполнено матриксом – хондромукоидом, окрашиваемым оксифильно.

Наиболее яркая картина формирования хрящевой кости наблюдается на 28-е сутки регенерации грудной конечности (рис. 8).



Гематоксилин-эозин

Пикро-Маллори

Конго красный

Рис. 8. Микроструктура регенераторной мозоли:
МК – мезенхимные клетки; ХК – хрящевые клетки

Эпидермис кожи представлен 2–6 рядами округлых эпителиальных клеток с ярко-базофильными крупными ядрами. В соединительнотканной дерме обнаруживаются крупные экзокринные железы округлой формы, содержащие вязкий оксифильный секрет. Стенки желез выстланы однослойным низко призматическим эпителием. Глубже рыхлая соединительная ткань гиподермы переходит в эпимизий пучков поперечно-полосатых мышечных волокон, который в области эпифизов переходит в коллагеновые волокна сухожилий. Хрящевая основа культи имеет четко выраженные границы. Клетки в области эпифизарных пластинок на границе суставов активно делятся, образуя точку роста хрящевой ткани, и находятся на высоком уровне метаболизма. Кость растет за счет формирования хрящевой ткани, находящейся в эпифизах. В центре хряща хорошо видны мезенхимные клетки, ориентированные поперек кости, проксимально и дистально мезенхимные клетки переходят в хондробласты и затем в хондроциты, формируя эпифизарные пластинки. Мезенхимные клетки отростчатые, вытянутой веретенообразной формы. Совокупность клеток образует синцитий (соклетие), широкие отростки клеток переходят без заметных границ в отростки смежных клеток. Ядра мезенхимных клеток вытянуты вдоль длинной оси клеток.

Межклеточное пространство слабо выражено. В проксимальных и дистальных направлениях мезенхимные клетки округляются, ядра становятся шаровидными, структура синцития исчезает. Клетки отодвигаются друг от друга, между ними появляется хондромукоид, а ткань приобретает вид дефинитивной хрящевой ткани с типичными округлыми хондроцитами, расположенными группами, и межклеточным веществом. По краям эпифизарных пластинок отчетливо различимы хондробласты.

Заключение. После тотальной резекции грудной конечности у самок тритона обыкновенного происходит поэтапная посттравматическая регенерация. Конечность восстанавливается полностью к 85-м суткам и становится физиологически, макро- и микроструктурно равноценной исходной конечности. При стимуляции регенерации сочетанным воздействием ультразвука и CaCl_2 , добавленного в воду, процесс восстановления конечности протекает интенсивнее и завершается на 2–3 недели раньше, чем в контрольной группе. На 42-е сутки после ампутации длина регенерирующей культи в контрольной группе составляла $7,03 \pm 0,11$ мм, а во второй группе, где применялся ультразвук, была длиннее, чем в контроле, на 13,3 % ($P \leq 0,05$) и достигала $7,97 \pm 0,11$ мм. В третьей группе при сочетании ультразвука и CaCl_2 в тече-

ние 10 дней, экспозиция 30 с, длина культи превышала контрольное значение на 27,6 % ($P \leq 0,05$) и достигала $8,97 \pm 0,18$ мм. На 42-е сутки на микроструктурном уровне сформированы кожа с ороговевающим эпителием и железами, поперечно-полосатые мышцы и кости представлены хрящевой тканью. При этом наиболее выраженные и завершённые процессы остеогенеза отмечались в группе, где применяли сочетанное воздействие ультразвука и CaCl_2 . Кости грудной конечности тритона после ампутации регенерируют за счёт хрящевой ткани эпифизарных пластинок, сформировавшихся на месте мезенхимы. Хрящевая ткань представлена изогенными группами округлых хондроцитов, пространство между которыми заполнено безволоконистым матриксом – хондромукоидом.

Стимуляция регенерации сочетанным воздействием ультразвука и CaCl_2 ускоряет процесс регенерации, при этом сохраняются общие закономерности развития хрящевой кости в зоне эпифизарных пластинок из мезенхимы.

Список источников

1. Донкова Н.В., Рубай А.А. Микроструктура регенерирующих тканей грудной конечности тритона // Вестник КрасГАУ. 2014. № 8 (95). С. 92–96.
2. Корж А.А., Белоус А.М., Панков Е.Я. Репаративная регенерация кости. М.: Медицина, 1972. 232 с.
3. Методы стимуляции репаративной регенерации при лечении переломов конечностей с применением новых биотехнологий / Г.В. Сорокин [и др.] // Кафедра травматологии и ортопедии. 2012. № 2. С. 36–40.
4. Применение физических факторов для оптимизации костной регенерации (обзор литературы) / Л.Б. Резник [и др.] // Гений ортопедии. 2015. № 1. С. 89–95.
5. Ушаков Р.В., Ушаков А.Р., Дьяконова М.С. Применение препаратов гиалуроновой кислоты Ревидент в хирургической стоматологии // Медицинский алфавит. 2017. № 24. С. 47–50.
6. Azagury A., Kost J., Khoury L., Enden G. Ultrasound mediated transdermal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014; 72(4):127–143

7. Biomolecular ultrasound and sonogenetics / D. Maresca [et al.] // *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2018; 9(1):229–252.
8. Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneus tendon / F.S. Oliveira [et al.] // *Lasers in Surgery and Medicine*. 2009 ; 41(4):271–276.
9. Enhanced Transdermal Drug Delivery by Sonophoresis and Simultaneous Application of Sonophoresis and Iontophoresis / J. Park [et al.] // *AAPS PharmSciTech*. 2019;20(3):96. DOI: 10.1208/s12249-019-1309-z.
10. Harle J., Mayia F., Olsen I., Salih V. Effects of ultrasound on transforming growth factor-beta genes in bone cells *Eur. Cell. Mater*, 2005, Vol. 10, pp. 70–76.
11. Lee K.L., Zhou Y. Quantitative evaluation of sonophoresis efficiency and its dependence on sonication parameters and particle size // *Journal of Ultrasound in Medicine*. 2015;34(3):519–526. DOI: 10.7863/ultra.34.3.519.
12. Pires-De-Campos M.S.M., De Almeida J., Wolf-Nunes V., Souza-Francesconi E., Grassi-Kassisse D.M. Ultrasound associated with caffeine increases basal and beta-adrenoceptor response in adipocytes isolated from subcutaneous adipose tissue in pigs // *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. 2016;18(2):116–123
13. Ramli R., Reher P., Harris M., Meghji S. The effect of ultrasound on angiogenesis: an in vivo study using the chick chorioallantoic membrane // *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, 2009, Vol. 24, No. 4, pp. 591–596.
14. Ultrasound-enhanced delivery of antibiotics and antiinflammatory drugs into the eye / M. Nabili [et al.] // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2013; 39(4): 638–646. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2012.11.010.

Список источников

1. Донкова Н.В., Рубай А.А. Микроструктура регенерирующей ткани грудной конечности тритона // Вестник КрасГАУ. 2014. № 8 (95). С. 92–96.
2. Корж А.А., Белоус А.М., Панков Е.Я. Репаративная регенерация кости. М.: Медицина, 1972. 232 с.

3. Metody stimulyatsii reparativnoj regeneratsii pri lechenii perelomov konechnostej s primeneniem novyh biotekhnologij / G.V. Sorokin [i dr.] // Kafedra travmatologii i ortopedii. 2012. № 2. S. 36–40.
4. Primenenie fizicheskikh faktorov dlya optimizatsii kostnoj regeneratsii (obzor literatury) / L.B. Reznik [i dr.] // Genij ortopedii. 2015. № 1. S. 89–95.
5. Ushakov R.V., Ushakov A.R., D'yakonova M.S. Primenenie preparatov gialuronovoj kisloty Revident v hirurgicheskoj stomatologii // Medicinskij alfavit. 2017. № 24. S. 47–50.
6. Azagury A., Kost J., Khoury L., Enden G. Ultrasound mediated transdermal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2014; 72(4):127–143
7. Biomolecular ultrasound and sonogenetics / D. Maresca [et al.] // *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*. 2018; 9(1):229–252.
8. Effect of low level laser therapy (830 nm) with different therapy regimes on the process of tissue repair in partial lesion calcaneus tendon / F.S. Oliveira [et al.] // *Lasers in Surgery and Medicine*. 2009 ; 41(4):271–276.
9. Enhanced Transdermal Drug Delivery by Sonophoresis and Simultaneous Application of Sonophoresis and Iontophoresis / J. Park [et al.] // *AAPS PharmSciTech*. 2019;20(3):96. DOI: 10.1208/s12249-019-1309-z.
10. Harle J., Mayia F., Olsen I., Salih V. Effects of ultrasound on transforming growth factor-beta genes in bone cells *Eur. Cell. Mater*, 2005, Vol. 10, pp. 70–76.
11. Lee K.L., Zhou Y. Quantitative evaluation of sonophoresis efficiency and its dependence on sonication parameters and particle size // *Journal of Ultrasound in Medicine*. 2015;34(3):519–526. DOI: 10.7863/ultra.34.3.519.
12. Pires-De-Campos M.S.M., De Almeida J., Wolf-Nunes V., Souza-Francesconi E., Grassi-Kassisse D.M. Ultrasound associated with caffeine increases basal and beta-adrenoceptor response in adipocytes isolated from subcutaneous adipose tissue in pigs // *Journal of Cosmetic and Laser Therapy*. 2016;18(2):116–123
13. Ramli R., Reher P., Harris M., Meghji S. The effect of ultrasound on angiogenesis: an in vivo study using the chick chorioallantoic membrane // *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.*, 2009, Vol. 24, No. 4, pp. 591–596.
14. Ultrasound-enhanced delivery of antibiotics and antiinflammatory drugs into the eye / M. Nabili [et al.] // *Ultrasound in Medicine & Biology*. 2013; 39(4): 638–646. DOI: 10.1016/j.ultrasmedbio.2012.11.010.

