

В.П. Русанов, Г.Т. Ермуханова, У.Р. Мирзакулова, К.С. Бименов, Ж.Б. Ахметов, М.Р. Рысулы,
Б.А. Амантаев, Н.М. Турдыев, А.М. Халмурзаев

Казахский Национальный медицинский университет имени С.Д. Асфендиярова,

Кафедра хирургической стоматологии,

Кафедра стоматологии детского возраста

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНО - КЛИНИЧЕСКОЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ В ХИРУРГИИ ПАРОДОНТА

Изучена клиничко - морфологическая картина течения репаративного остеогенеза на полученной модели экспериментального пародонтита у кроликов с пластикой послеоперационной костной полости композитным трансплантатом на основе костного коллагена, гидроксилатапата и аутологичных стволовых клеток

Ключевые слова: экспериментальный пародонтит, костный коллаген, гидроксилатапатит, стволовые клетки, репаративная ренерация.

Актуальность проблемы. Пластика костных дефектов, возникающих в результате воспалительно-деструктивных процессов в тканях пародонта остается до сих пор не в полной мере разрешенной проблемой, вследствие большой их распространенности и разнообразием форм патологии. При этих заболеваниях процессы репаративного остеогенеза протекают в большинстве случаев в условиях непрерывно текущего хронического воспалительного процесса на фоне резко нарушенной микроциркуляции крови, а вследствие этого, выраженной тканевой гипоксии, что приводит к значительному снижению остеорепаративной функции костной ткани [1].

При комплексном лечении генерализованного пародонтита важнейшими задачами являются купирование процессов воспаления и обеспечение оптимальных процессов репаративной регенерации костной ткани альвеолярного отростка челюсти, утраченных в результате воспалительной резорбции. Обнадеживающего лечебного эффекта при лечении генерализованного пародонтита можно достичь только лишь при использовании в качестве оптимизаторов репаративной регенерации различных остеопластических материалов, обладающих выраженными остеоиндуктивными свойствами, слабой антигенностью, пластичностью, быть не токсичными и устойчивыми к инфекции. [2] Однако, многочисленные исследования показали, что использование биологических пластических материалов, способно лишь временно улучшить клиническое состояние тканей пародонта и рентгенологическую картину кости альвеолы [3].

В современной регенеративной медицине на лидирующие позиции выходят исследования в области клеточной биологии, направленные на изучение стволовых клеток, обладающих способностью к самообновлению путем асимметричного деления и дифференцировке *in vivo* и *in vitro* более чем в 200 различных клеточных типов [4,5]. Трансплантируемые стволовые клетки, обеспечивающие непосредственное восстановление костной ткани, представляют собой культуру остеогенных клеток-предшественников, которые могут быть получены путем направленной дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга, жировой ткани или других источников, таких, как надкостница, селезенка, тимус, плацента и др. [6]. Одним из перспективных источников ММСК является жировая ткань (ЖТ). Исследования иммунофенотипа ММСК из жировой ткани и красного костного мозга показали, что они практически идентичны друг другу. Однако, жировая ткань обладает значительными преимуществами, важными из которых являются сравнительная доступность, простота и безопасность их получения, в сравнении с методиками забора стволовых клеток из других источников[7].

В настоящее время в пластической хирургии широко используется костный коллаген и имплантационный материал – гидроксилатапатит (ГА). К основным достоинствам костного коллагена, как пластического материала, следует отнести его свойство оптимизировать репаративный остеогенез, низкую токсичность и антигенность, устойчивость к тканевым протеазам[8]. Гидроксилатапатит, являющийся нерезорбируемым или резорбируемым поликристаллическим, высоко биосовместимым остеотропным материалом, активно оптимизирующим остеогенные клетки, образуя костную матрицу [9].

Целью работы явилось изучение клиники и морфологии течения репаративного остеогенеза на экспериментально полученной модели локального пародонтита у кроликов с пластикой послеоперационной костной полости композитным трансплантатом на основе костного коллагена, гидроксилатапата и аутологичных стволовых клеток жировой ткани.

Материалы и методы исследования. Экспериментальное исследование произведено на 18 кроликах породы «Шиншилла» весом 3500 – 4500 грамм, которым на первом этапе эксперимента воспроизводился локальный пародонтит. Животные разделены на две равные группы - контрольная и подопытная. У подопытных животных сразу после наложения проволочных лигатур забирался жир из большого сальника, располагающегося на передней поверхности поперечно- ободочной кишки брюшной полости кролика, помещался в раствор Хенкса и отправлялся в лабораторию для приготовления мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК). Спустя две недели после наложения лигатур в области развившегося локального пародонтита формировался костный дефект в межкорневой перегородке центральных резцов нижней челюсти диаметром 2 мм и проводилась операция – остеогингивопластика. В контрольной группе животных послеоперационная костная полость заполнялась композитным трансплантационным материалом на основе костного коллагена и гидроксилатапата в равных весовых пропорциях, а в опытной группе кроликов костный дефект замещался композитным материалом, отличающегося от биокомпозита, применяемого в контрольной группе животных тем, что в него дополнительно вводилась взвесь культуры аутологичных ММСК жировой ткани, полученная в лаборатории ТОО «Научно-

производственное предприятие «Антиген» с концентрацией 1 миллион клеток в 1 см³. Введённый в костный дефект трансплантационный материал в обеих группах животных покрывался коллагеновой мембраной. В послеоперационном периоде проводилось динамическое изучение клинического течения после операции – остеогингивопластики.

Кролики выводились из опыта на 15, 30 и 90-е сутки после операции.

Выпиленные костные блоки из области операции фиксировались в 10 % растворе нейтрального формалина, декальцинировались в азотной кислоте, обезжовивались в спиртах, заливались в парафин и проводились серийные срезы толщиной 10-12 микрон. Срезы окрашивались гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону.

Результаты и обсуждения. Клинические наблюдения послеоперационного периода в обеих группах животных показали, что спустя сутки после оперативного вмешательства в области травмы определялся умеренный отек мягких тканей, который постепенно увеличивался и достигал максимальных размеров к третьим суткам. Затем послеоперационный отек мягких тканей постепенно уменьшался и полностью исчезал в контрольной группе к 9 суткам, в подопытной же группе к 6 суткам. Послеоперационные раны в контрольной группе животных зажили первичным натяжением на 11 сутки, а в подопытной группе на 8 сутки после операции. В последующие сроки наблюдения за животными не выявили какого-либо отличия в клиническом течении.

Экспериментально-морфологическое исследование в контрольной группе животных

На 15 сутки от начала эксперимента большая часть послеоперационного дефекта заполнена грануляционной тканью содержащей в свое составе многочисленные кровеносные сосуды и волокнистые структуры молодой волокнистой соединительной ткани с дифференцирующимися клеточными элементами. Вокруг костного дефекта отмечается декомпозиция остеонов с утратой обычных тинкториальных свойств, в остеоцитах обнаруживаются признаки дистрофии с кариолизом и кариопикнозом. Среди клеток появляется тонкие коллагеновые волокна, слабо окрашивающиеся по методу Ван-Гизона. По периферии грануляционной ткани появляются слабо выраженные хондронидные структуры (рис.2). В этой зоне гаверсовы каналы расширены, сосуды полнокровны, местами в виде полостей неопределенной формы. Резорбтивные процессы со стороны материнской кости слабо выражены, здесь появляются группы остеокластов, с очагами пазушного и лакунарного рассасывания стенок полостей и лакун. Последние начинают заполняться молодым окрашенным гематоксилином в розовый цвет хондронидным и костным веществом. Остаточные микрофрагменты биокомпозита темно-синего цвета располагаются в основном в центральных отделах дефекта небольшими скоплениями (рисунок 1,2).

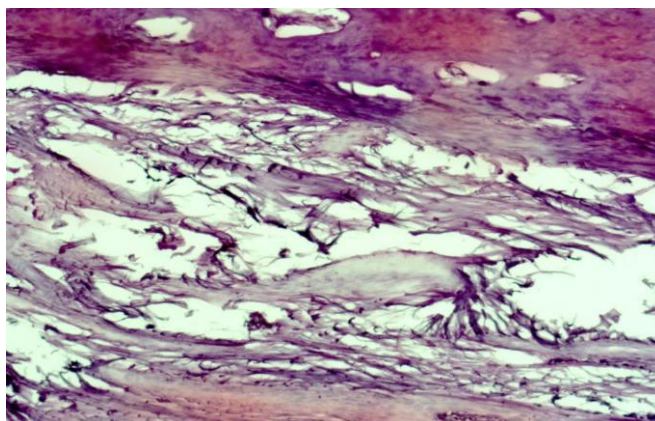


Рисунок 1 - Вновь образованные клеточно-волокнистые структуры и остатки биокомпозита, заполняющие костный дефект. Нарушение остеонной структуры костной ткани с ее очаговой деструкцией. Контрольная группа животных, 15 сутки. Окраска гематоксилин-эозин x100.

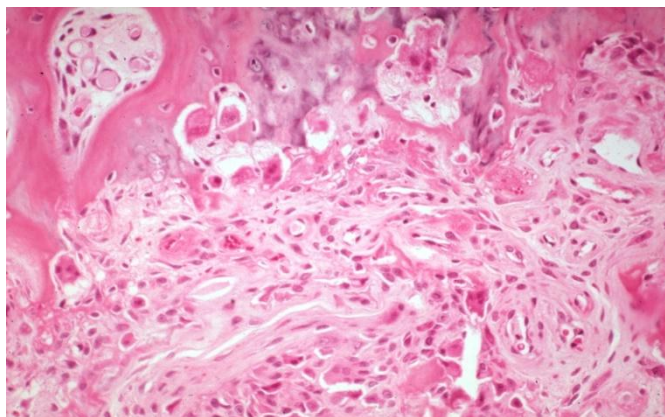


Рисунок 2 - Преобладание рыхлой соединительной ткани в центре костного дефекта на фоне многочисленных тонкостенных кровеносных капилляров. Контрольная группа животных, 15 сутки. Окраска гематоксилин-эозин x100

Через 30 суток от момента операции по центральной части костного дефекта выявляются крупные очаги разрастания грубой клеточно-волокнутой соединительной ткани с волокнистыми структурами, которые окрашиваются пикрофуксином по Ван-Гизону в насыщенно красные тона препараты. Среди клеточно-фиброзной волокнутой ткани в периферических частях костного дефекта появляются хондроидные структуры. В центре костного регенерата формируются костные балочные структуры без четкой остеонной ориентации, которые соединяясь друг с другом образуют молодые трабекулярные структуры. Резорбтивные процессы с участием остеокластов со стороны материнской кости становятся менее выраженными. В стенке полостей и лакун, появляются очаги молодого костного вещества. В межбалочном пространстве формируются очаги фиброной ткани с малочисленными клеточными элементами (рис.6). Процессы репаративного остеогенеза выражены слабо. Остеобласты слабодифференцированы и имеют мозаичное расположение в формирующихся участках молодой костной ткани (рисунок 3,4).

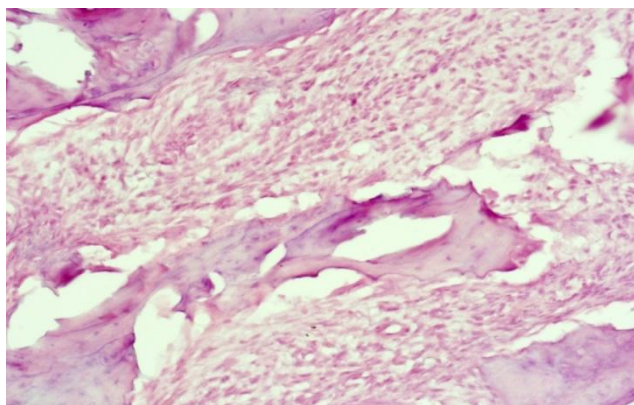


Рисунок 3 - Несформированная фиброно-остеоидная ткань в полости дефекта. Контрольная группа, 30 суток. Окраска гематоксилин-эозин x100

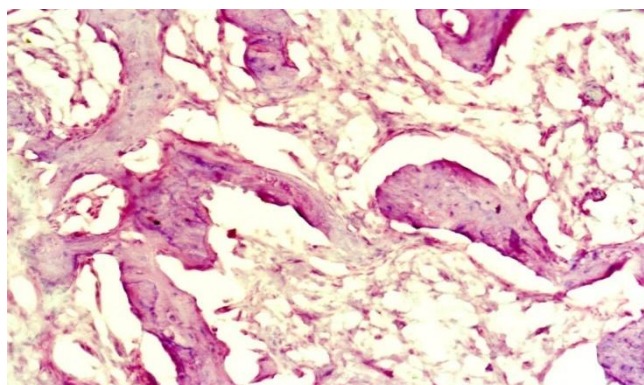


Рисунок 4 - Широкие межтрабекулярные пространства заполнены клеточно-волокнутой соединительной тканью с наложениями остеоида. Контрольная группа, 30 суток. Окраска гематоксилин-эозин x100

На 90 суток костный дефект полностью заполнен грубой костной тканью в периферической части дефекта. Пласты костного регенерата представлены **толстыми трабекулами**. В центральных отделах костного дефекта еще определяются участки остеоидной ткани, без процессов минерализации, остеонные системы слабо развиты, костные трабекулы расположены хаотично. Костный регенерат, заполняющий послеоперационный дефект, продолжает претерпевать дальнейшую перестройку, отмечается частичная компактизация новообразованного костного вещества, костный матрикс грубоволокнутой. В центральной части регенерата костный матрикс приобретает пластинчатое строение (рисунок 5).

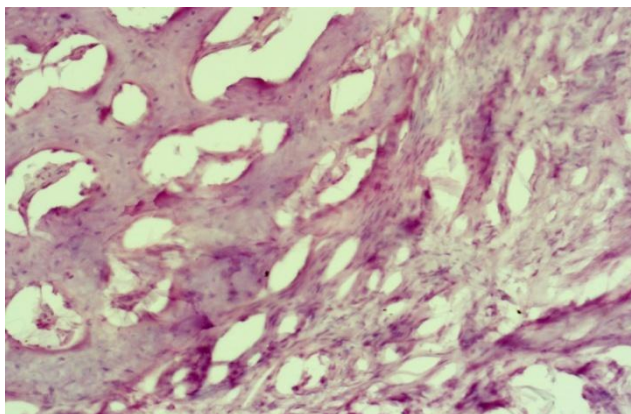


Рисунок 5 - Костный дефект заполнен толстыми трабекулярными структурами и грубой волокнистой соединительной тканью с хаотично расположенными кровеносными сосудами. Контрольная группа животных, 90 сутки. Окраска гематоксилин-эозин x200

Таким образом, экспериментально –морфологическое исследование показало, что в контрольной группе кроликов **через 15 суток** после эксперимента полость костного дефекта заполнена молодой грануляционной тканью, богатой сосудами. В области материнской кости на границе с послеоперационным дефектом отмечаются дистрофические изменения в структуре костной ткани, наряду с этим появляются слабоминариализованные очаги остеонной ткани. Резорбтивные процессы со стороны материнской кости слабо выражены. **На 30 сутки** после операции в центре костного дефекта выявляются крупные очаги разрастания грубой клеточно-волокнутой ткани. В периферических отделах костного дефекта появляются примитивные костные балочки, которые образуют трабекулярные структуры. В центральных отделах еще сохраняются хондроидные структуры. **Спустя 90 суток** эксперимента костный дефект полностью заполнен грубой костной тканью. В периферической части дефекта костная ткань представлена толстыми трабекулами, в центральной части имеются участки остеонной ткани, костные трабекулы расположены беспорядочно, остеонная система слабо выражена.

Экспериментально-морфологическое исследование в опытной группе животных

Через 15 суток центральная часть костного дефекта заполнена **зрелой клеточно- волокнутой соединительной тканью**, которая окрашивается в ярко-красный цвет по методу Ван-Гизона, в составе которой еще много мелких сосудов и клеточных элементов типа макрофагов, лимфоцитов и фибробластов. Отдельные микрофрагменты биокомпозита (справа в нижнем углу) обнаруживаются в краевых отделах дефекта. Исследование влияния разработанного биокомпозита на регенерацию костной ткани в эксперименте на животных опытной группы в эти сроки эксперимента показывает усиление резорбции путем гладкого и пазушного рассасывания; при этом формируется множественные очаги грануляционной ткани, содержащей большое количество кровеносных сосудов капиллярного типа с тонкой стенкой. На периферии этих очагов появляются фокусы созревания грануляций с формированием зрелой соединительной ткани, растущей из периферических зон со стороны костной ткани, окружающей костный дефект. В материнской кости на границе с дефектом кости новообразованные костные структуры на различных стадиях дифференцировки с образованием хондроидных участков и сети новообразованных костных балочек, отмечается **пазушная и лакунарная резорбция** с образованием полостей различной формы. В этих полостях появляются крупные клетки типа фибробластов и макрофагов. Костные края дефекта неровные и заполнены новообразованным костным веществом. Перестройка в зоне костного дефекта сопровождается с образованием широкопетлистых костных трабекул в пристеночной области послеоперационной полости. В зонах прилегающих к материнской кости отмечается расширение сосудистых и нутритивных каналов, а также расширенных костно- мозговых пространств. В этих зонах появляются **новообразованные костные вещества**, возникшие в следствия процессов репаративного остеогенеза. Широкие межтрабекулярные пространства были заполнены рыхлой соединительной тканью с большим числом костных элементов (рисунок 6,7).

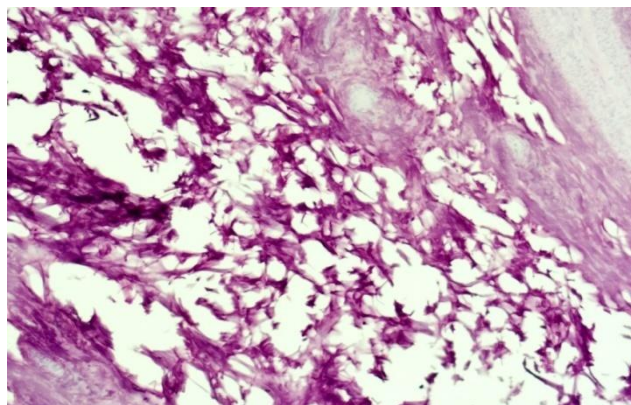


Рисунок 6 - Фиброзные и остеонидные структуры по краю костного дефекта. Опытная группа животных, 15 сутки. Окраска гематоксилин-эозин x100

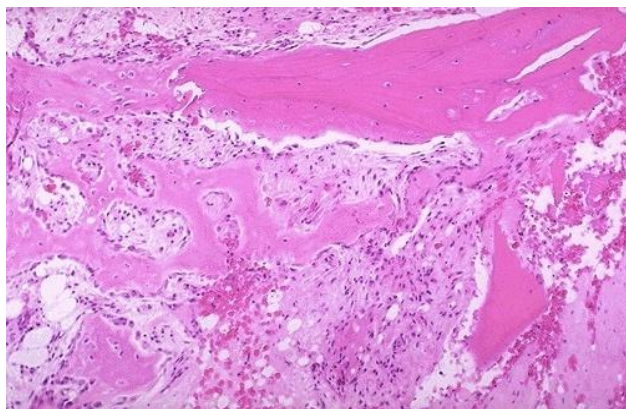


Рисунок 7 - Заполнение костного дефекта фиброзно-хондройдной тканью. Опытная группа животных, 15 сутки. Окраска гематоксилин-эозин x100

К 30 суткам костный дефект полностью замещен новообразованными костными структурами, преимущественно представленными вновь образованными молодыми трабекулами. Матрикс костной ткани приобрел фиброзный характер. В центральной части формируется тонковолокнистый пластичный костный матрикс, костные пластинки имели незрелый характер, беспорядочно ориентированы местами с образованием концентрических структур вокруг капилляров.

В структуре костной ткани идут процессы дальнейшей перестройки за счет значительного снижения доли фиброзного матрикса. На периферии костного регенерата появляются трабекулярные структуры, вследствие чего регенерат становится более мощным и зрелым. На границе с костью альвеолярного отростка (край дефекта) нередко обнаруживаются компактно расположенные вновь сформированные остеоны.

Ближе к стенке дефекта костный регенерат проявляет тенденцию к компактизации, появляются трабекулярные структуры с **толстыми костными балками** и неравномерным расположением остеонов. В межбалочном пространстве нередко обнаруживаются участки жирового костного мозга. Процессы костеобразования перемещаются от края полости к ее центру. В процессе созревания костных структур появляются хорошо минерализованные костные пластинки с многочисленными линиями склеивания, ориентированные в одном направлении с сосудистыми каналами, вследствие чего границы регенерата и материнской кости становятся малозаметными (рисунок 8, 9, 10).

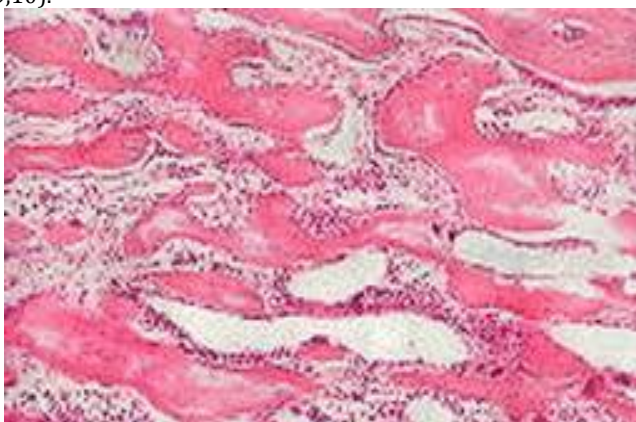


Рисунок 8 - Костные пластинки беспорядочно ориентированы, уменьшение площади фиброзного матрикса. Опытная группа животных, 30 сутки. Окраска гематоксилин-эозин x100

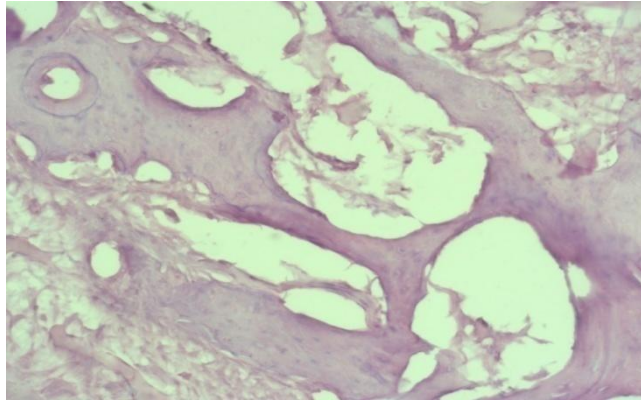


Рисунок 9 - Новообразованные костные трабекулы со структурами, заполняющие просвет костного дефекта образующими широкопетлистую сеть вновь образованных остеонных систем. Опытная группа животных, 30 сутки. Окраска гематоксилин-эозин x100

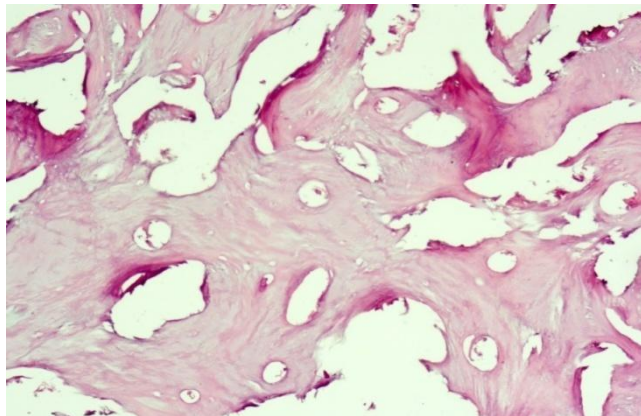


Рисунок 10 - Полость бывшего костного дефекта заполнена зрелой костной тканью с пластинчатым строением, с участками фиброзного матрикса. Опытная группа, 30 сутки, окраска гематоксилин-эозин x100

Спустя 90 суток в опытной группе кроликов гистологически определить место костного дефекта в альвеолярном отростке нижней челюсти становится невозможным, так как структуры костного регенерата и материнской кости составляет единое целое (рисунок 11).

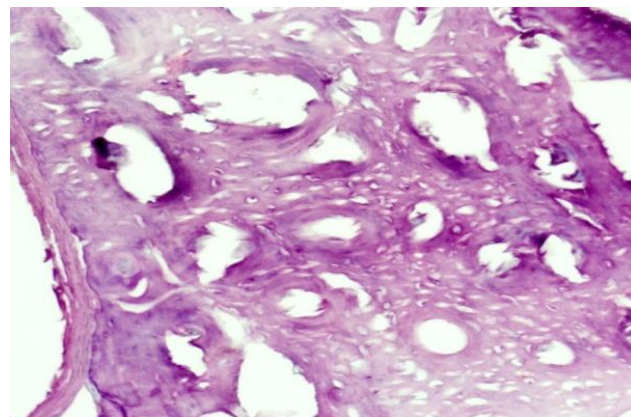


Рисунок 11 - Зрелая новообразованная костная ткань с участками оссификации, сливающаяся с материнской костной тканью по краю дефекта. Опытная группа животных, 90 сутки, Окраска гематоксилин-эозин x100

Таким образом, клинические наблюдения послеоперационного периода в обеих группах животных показали, что послеоперационный отек мягких тканей постепенно уменьшался и полностью исчезал в контрольной группе к 9 суткам, в подопытной же группе к 6 суткам. Послеоперационные раны в контрольной группе животных зажили первичным натяжением на 11 сутки, а в подопытной группе на 8 сутки после операции. В последующие сроки наблюдения за животными обеих групп не выявили какого-либо отличия в клиническом течении. Результаты морфологического исследования свидетельствуют, что введение в состав биокомпозита стволовых клеток из аутологической жировой ткани в опытной группе животных интенсифицирует все этапы репаративной регенерации костной ткани в области костного дефекта, начиная с формирования фиброзно-волоконистой, хрящевой и остеодной ткани, заканчивая образованием полноценной костной ткани.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 Мусиенко А.И., Мусиенко С. И., Кушнир Д.В., Мусиенко А. А. Комплексный подход к планированию лечения заболеваний пародонта фактором роста // *Стоматология Казахстана*. - 2014. - №3(4). - С. 67-68.
- 2 Модина Т.Н., Вольвач Ю.Ю., Кашеев Б.В., Петрук А.В., Бабусенко Л.В. Комплексное лечение пациентов с генерализованным пародонтитом // *Клиническая стоматология*. - 2015. - №2. - С.14-17.
- 3 Jurgens W., Oedayrajsilgh-Varma M., Helder M. et al. Effekt of tissue-harvesting site on yield of stem cells derived from adipose tissue : implications for cell-based therapies // *Cell Tissue Res*. - 2008. - №3. - P. 415-426.
- 4 Алексеева И.С., Волков А.В., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В. Клинико-экспериментальное обоснование использования комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани у пациентов с выраженным дефицитом костной ткани челюстей // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. - 2012. - №1. - С. 97-105.
- 5 Francis J. Hughes Mesenchymal Stem Cells and Periodontal Regeneration // *Hughes Curr Oral Health Rep*. - 2014. - №1. - P. 1-8.
- 6 Бухарова Т.Б., Арутюнян И.В., Шустров С.А., Алексеева И.С., Федюнина И.А., Логовская Л.В., Волков А.В., Ржанинова А.А., Григорьян А.С., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В. Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани и материала «Остеоматрикс» для регенерации костной ткани // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. - 2011. - №3. - С.167-171.
- 7 Мартиросян А.К. Использование остеопластических биорезорбируемых материалов на основе минерального сырья и костного коллагена при хирургических вмешательствах в челюстно-лицевой области: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук – Тверь, 2013. – 23 с.
- 8 Бисултанов Х.У., Лепилин А.В., Ерокина Н.Л. и др. Сравнительный анализ применения отечественных гидроксиапатит содержащих костнопластических материалов при лечении пародонтита // *Российский стоматологический журнал*. - 2012. - №3. - С.31-34.

**В.П. Русанов, Г.Т. Ермуханова, У.Р. Мирзакулова, К.С. Бименов, Ж.Б. Ахметов, М.Р. Рысулы,
Б.А. Амантаев, Н.М. Турдыев, А.М. Халмурзаев**

*С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ Ұлттық медицина университеті
Хирургиялық стоматология кафедрасы,
балалар жасындағы стоматология кафедрасы*

ХИРУРГИЯДА МАЙ ТІНДЕРІНІҢ АУТОЛОГИЯЛЫҚ БАҒАНАЛЫ ЖАСУШАЛАРЫН ПАРОДОНТТА ҚОЛДАНУ АРҚЫЛЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬДІ - КЛИНИКАЛЫҚ ЖӘНЕ МОРФОЛОГИЯЛЫҚ НЕГІЗДЕМЕ

Түйін: Қояндарда эксперимент нәтижесінде алынған модельде отадан кейінгі пластикасымен, сүйек қуысын композитті материалмен яғни сүйек коллагені, гидроксилapatит және аутологиялық бағаналы жасушалары, репаративті регенерация пародонтиттің остеогенез ағымының клинико-морфологиялық кескіні зерттелді.

Түйінді сөздер: экспериментальді пародонтит, сүйек коллагені, гидроксилapatит, бағаналы жасушалар, репаративті регенерация.

**V.P. Russanov, G.T. Ermuchanova, U.R. Mirsakulova, K.S. Bimenov, G.B. Achmetov, M.R. Rysyly,
B.A. Amanraev, N.M. Turdiev, A.M. Khalmirzaev**

*Asfendiyarov Kazakh National medical university
Department of Surgical Dentistry,
Department of Pediatric Dentistry*

EXPERIMENTAL - CLINICAL AND MORPHOLOGICAL SUBSTANTIATION OF USE AUTOLOGOUS STEM CELLS OF FATTY TISSUE IN SURGERY OF PARODONT

Resume: The clinical and morphological picture of the course of reparative osteogenesis on the obtained model of experimental periodontitis in rabbits with plasty of the postoperative bone cavity with a composite graft based on bone collagen, hydroxylapatite and autologous stem cells was studied.

Keywords: Experimental periodontitis, bone collagen, hydroxylapatite, stem cells, reparative regeneration.