

# ИЗУЧЕНИЕ ДИНАМИКИ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ОТРОСТКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ АУТОЛОГИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА ЖИВОТНЫХ

Проф. В. Ф. Куцевляк, проф. В. И. Куцевляк, канд. биол. наук Е. А. Омельченко\*,  
А. С. Забирник\*, И. В. Цыганова

Харьковская медицинская академия последипломного образования,  
\*Лаборатория «Вирола», г. Харьков

*Изучены особенности динамики регенерации костных дефектов нижней челюсти на 16 кроликах породы Шиншилла. Вводили аутологичные стволовые клетки, полученные из костного мозга, в сочетании с коллапаном в зону дырчатого дефекта размером 3 × 3 мм в количестве 100 тыс., 500 тыс., 1 млн. Установлено, что направленная регенерация костных дефектов нижней челюсти экспериментальных животных с введением 500 тыс. стволовых клеток, полученных из костного мозга, протекает наиболее благоприятно, без очагового некроза и зон секвестрирования, по сравнению с введением 100 тыс. и 1 млн тех же стволовых клеток. Следовательно, для восстановления дефектов костной ткани целесообразно использовать не более 500 тыс. стволовых клеток, полученных из костного мозга.*

**Ключевые слова:** направленная регенерация, аутологичные стволовые клетки, костный мозг, коллапан.

## ВИВЧЕННЯ ДИНАМІКИ РЕГЕНЕРАЦІЇ КІСТКОВИХ ДЕФЕКТІВ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ВІДРОСТКА З ВИКОРИСТАННЯМ АУТОЛОГІЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ТВАРИН

Проф. В. Ф. Куцевляк, проф. В. І. Куцевляк,  
канд. біол. наук О. А. Омельченко\*,  
А. С. Забірник\*, І. В. Циганова

*Вивчено особливості динаміки регенерації кісткових дефектів нижньої щелепи на 16 кроликах породи Шиншилла. Уводили аутологічні стовбурові клітини, отримані з кісткового мозку в поєднанні з коллапаном у зону дірчастого дефекту розміром 3 × 3 мм в кількості 100 тис., 500 тис., 1 млн. Установлено, що направлена регенерація кісткових дефектів нижньої щелепи в експериментальних тварин з уведенням 500 тис. стовбурових клітин, отриманих із кісткового мозку, має найсприятливіший перебіг, без осередкового некрозу та зон секвестрування, порівняно з уведенням 100 тис. і 1 млн тих же стовбурових клітин. Отже, для відновлення дефектів кісткової тканини доцільно використовувати не більше 500 тис. стовбурових клітин, отриманих із кісткового мозку.*

**Ключові слова:** направлена регенерація, аутологічні стовбурові клітини, кістковий мозок, колапан.

## THE REGENERATIVE DYNAMICS OF ALVEOLAR BONE IN THE USE OF AUTOLOGOUS STROMAL CELLS WITH KOLLAPAN MATRIX IN EXPERIMENTAL ANIMALS

V. F. Kutsevlyak, V. I. Kutsevlyak,  
E. A. Omelchenko\*, A. S. Zahirnyk\*,  
I. V. Tsyganova

*The study examined features of the dynamics of regeneration of bone defects of the mandible 16 Chinchilla rabbits. Administered autologous stromal cells derived from bone marrow in combination with kollapan in zone holey defect in an amount 100 thousand, 500 thousand, one million cells. It was established that the regeneration of bone directed mandible experimental animals with administration of 500 thousand stromal cells derived from bone marrow proceeds more favorably without focal areas of necrosis and sequestering compared to administration of 100 thousand and 1 million same stromal cells. Consequently, for restoring bone defect is advisable to use not more than 500 thousand stem cells from bone marrow.*

**Keywords:** directed regeneration, autologous stem cells, bone marrow, kollapan.

В последние годы повышенный интерес ученых и клиницистов к клеточной трансплантации во многом обусловлен активным изучением стволовых клеток (СК) как более перспективного клеточного материала для трансплантации

в регенеративной медицине [1, 2, 3]. Наиболее изучены мезенхимальные СК, выделенные из костного мозга, который содержит три основных типа клеток: эндотелиальные клетки, гемопоэтические СК, клетки стромы [4]. Методы идентификации,

культивирования, накопления клеточной массы и пересадки СК описаны в литературе, включая выделение линий гемопоэтических и мезенхимальных линий СК и детальный анализ [5, 6].

**Цель работы** — изучить в эксперименте регенеративные способности костной ткани в зависимости от количества введенных аутологических СК костного мозга.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Аутологичные СК костного мозга получали из бедренной кости экспериментальных животных. Изучение процесса заживления костных дефектов размером 3 × 3 мм проведено на 16 кроликах породы Шиншилла. Для выполнения работы были использованы животные без внешних признаков заболевания, прошедшие карантинный режим в условиях вивария. Все животные находились на одинаковом пищевом рационе и проходили предоперационную подготовку в течение 12 ч до операции.

Манипуляции с животными проводили в соответствии с Конвенцией по защите животных, используемых в эксперименте и других научных целях (г. Страсбург, Франция, 1986). При операциях на животных использовали внутривенный тиопенталовый наркоз.

Основную группу составили 12 животных, 4 — контрольную. СК костного мозга в сочетании с коллапаном вводили в зону дырчатого дефекта нижней челюсти кроликов основной группы в количестве 100 тыс., 500 тыс., 1 млн. Забой животных производили на 42 и 90 сут. Выделяли фрагменты челюстей с зоной регенерата, фиксировали в формалине и заключали в парафиновые блоки. Гистологические препараты готовили из фрагментов нижних челюстей и окрашивали гематоксилин-эозином по Ван-Гизон.

Статистическую обработку проводили с помощью программного обеспечения Statistica 10.0 (StatSoft Ins., США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Динамика структуры регенерата кости после введения 100 тыс. аутологичных СК с коллапаном на 42 сут развивалась следующим образом. На гистотопограммах, согласно морфометрическим данным, из общей площади регенерата 5 % занимают некротические ткани, 35 % — грануляционная ткань, 28 % — остеоидная ткань, мелкопетлистая сеть костных trabeculae — 32 % (рис. 1).

Микроскопически на 42 сут определялись весьма ограниченные участки некроза, отделенные зонами грануляционной ткани от полей из сети новообразованных костных балочек. На отдельных участках обнаруживались выраженные проявления остеогенеза с трансформацией

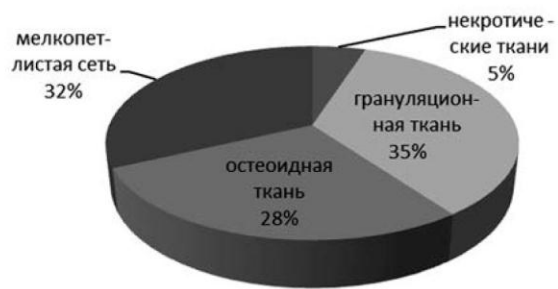


Рис. 1. Структура регенерата кости после введения 100 тыс. аутологичных СК с коллапаном на 42 сут

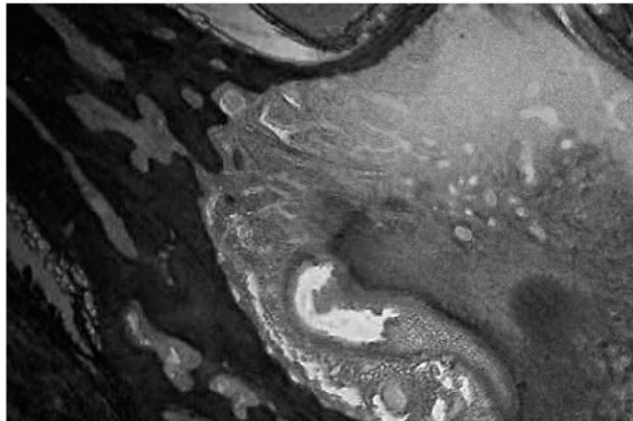


Рис. 2. Введение 100 тыс. СК из костного мозга с коллапаном на 42 сут. Выраженный остеогенез с трансформацией в мелкопетлистую сеть костных балочек. Окрашивание по Ван-Гизон × 100

в мелкопетлистую сеть костных балочек. Фрагменты из компактной костной ткани в некоторых участках подвергались выраженному разрежению и срастались с полями новообразованных костных балочек по поверхности разряжения фрагментов (рис. 2).

Гистологические исследования на 42 сут свидетельствуют о том, что в структуре регенерата начинали преобладать дифференцированные компоненты, а узкие участки некротически измененной ткани определялись, скорее всего, как следствие недостаточного формирования микроциркуляторного русла.

На 90 сут после введения 100 тыс. аутологичных СК с коллапаном на гистотопограммах из общей площади регенерата 2,8 % занимали некротически измененные ткани, в основном в интермедиарной зоне, 32 % — остеоидная ткань, 30,2 % — мелкопетлистая сеть костных балочек, 23 % — крупнопетлистая сеть костных балочек, 12 % — грануляционная ткань (рис. 3).

Микроскопически на 90 сут обнаруживалось преобладание полей новообразованной костной ткани, за счет которой формировался компактный слой, хотя между этими полями и определялись небольшие участки некроза, а также подвергающиеся резорбции секвестры. На отдельных участках

определялись поля из крупнопетливой сети костных балочек, четко отграниченные от прилегающей грануляционной ткани, богатой пучками коллагеновых волокон. В других участках, наряду с выраженным остеогенезом, обнаруживалась резорбция фрагментов костной ткани с образованием массивных внутрифрагментарных полостей (рис. 4).

На 90 сут гистологические исследования свидетельствуют об увеличении объема пролиферирующей ткани с преобладанием в составе регенерата остеогенных клеточных элементов.

На 42 сут после введения 500 тыс. аутологичных СК с коллапаном на гистопограммах из общей площади перестраивающегося регенерата 1,5 % занимали участки некротически измененных тканей, клеточно-волокнистая ткань — 12 %, остеοидная ткань — 7 %, мелкопетлистая костная ткань — 36 %, крупнопетлистая костная ткань — 45 % (рис. 5).

Микроскопически на 42 сут процессы перестройки в зоне дефекта нижней челюсти имели выраженный характер. В зоне регенерата наблюдались периостальные наслоения по нижнему

краю челюсти. В альвеолярном отростке, в сравнении с предыдущим наблюдением, изменений не было выявлено. Периостальное костеобразование сопровождалось активной резорбцией костного вещества отломков и пролиферацией клеточных элементов. На 42 сут наблюдалось значительное увеличение клеточных элементов остеοгенного характера за счет периостального костеобразования (рис. 6).

На 90 сут после введения 500 тыс. аутологичных СК с коллапаном на гистопограммах обнаруживалась целостная структура из новообразованной костной ткани, в которой 38 % занимает мелкопетлистая сеть костных трабекул, 44 % — крупнопетлистая сеть костных трабекул, 18 % занимал кортикальный слой, который без четкой границы формировался из сети костных трабекул (рис. 7).

Микроскопически на 90 сут развитие остеогенеза имело более выраженный характер, что приводило к интенсивному костеобразованию и восстановлению целостности кости нижней челюсти, но с наличием тех компонентов (сеть мелкопетлистых и крупнопетлистых трабекул), которые будут подвергаться окончательной перестройке еще на протяжении длительного периода (рис. 8).



Рис. 3. Структура регенерата кости после введения 100 тыс. аутологичных СК с коллапаном на 90 сут

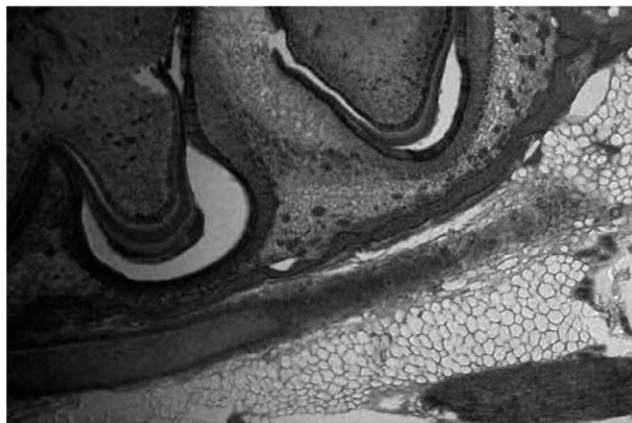


Рис. 4. Введение 100 тыс. СК из костного мозга с коллапаном на 90 сут. Выраженный остеогенез с участками резорбции фрагментов костной ткани и образованием внутрифрагментарных полостей с трансформацией в мелкопетлистую сеть костных балочек. Формирование крупнопетливой сети трабекул, четко отграниченных плотно прилегающей грануляционной тканью в зоне дефекта. Окрашивание по Ван-Гизон  $\times 100$

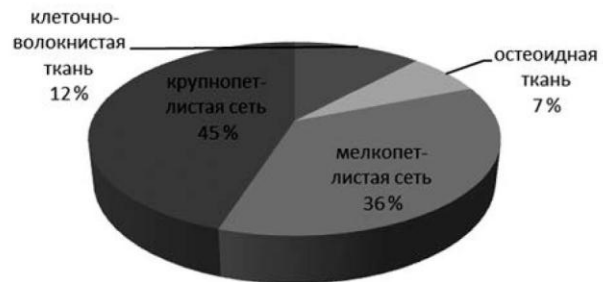


Рис. 5. Структура регенерата кости после введения 500 тыс. аутологичных СК с коллапаном на 42 сут

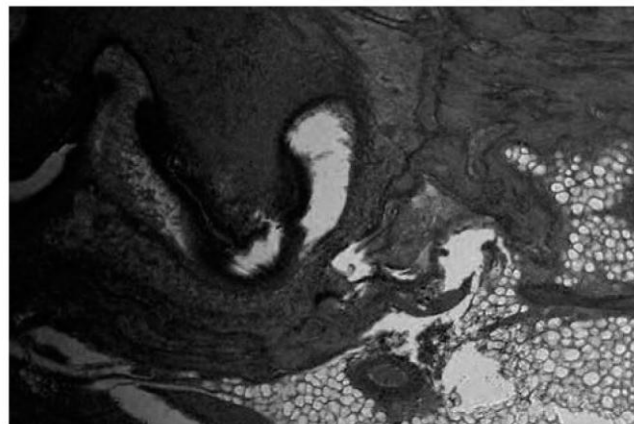


Рис. 6. Введение 500 тыс. СК из костного мозга с коллапаном на 42 сут. Активная резорбция костных отломков с пролиферацией клеточных элементов в зоне регенерата. Окрашивание по Ван-Гизон  $\times 100$



Рис. 7. Структура регенерата кости после введения 500 тыс. аутологичных СК с коллапаном на 90 сут

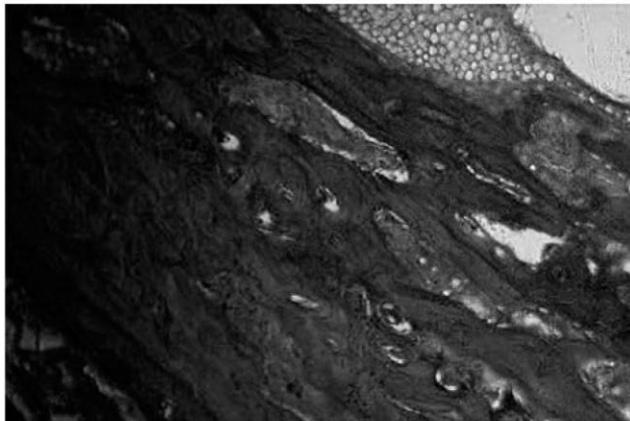


Рис. 8. Введение 500 тыс. СК из костного мозга с коллапаном на 90 сут. Интенсивное остеообразование за счет формирования сети мелкопетлистых и крупнопетлистых трабекул в зоне регенерата. Окрашивание по Ван-Гизон  $\times 100$

Введение аутологичных СК из костного мозга в количестве 500 тыс. в сочетании с коллапаном на 90 сут в зоне регенерата создавали условия для более интенсивного развития остеогенеза и на этой основе приводили к интенсификации пролиферативных процессов и процессов дифференциации по остеогенному типу.

На 42 сут после введения 1 млн аутологичных СК с коллапаном на гистотопограммах согласно морфометрическим данным, из общей площади регенерата 6 % занимали некротически измененные ткани, грануляционная ткань — 4 %, крупнопетлистая сеть костных трабекул — 40 %, остеоидная ткань — 30 %, бесклеточное поле — 20 %, заполненное гомогенными эозинофильными массами (рис. 9).

Микроскопически на 42 сут определялись отдельные зоны некроза и секвестры, отграниченные грануляционной тканью и инфильтрированные лейкоцитами. За грануляционной тканью на сохранившихся участках компактной костной ткани обнаруживались поля новообразованной костной ткани. Местами отчетливо определялись фрагменты из компактной костной ткани частично с безостеоцитными зонами, поверхность

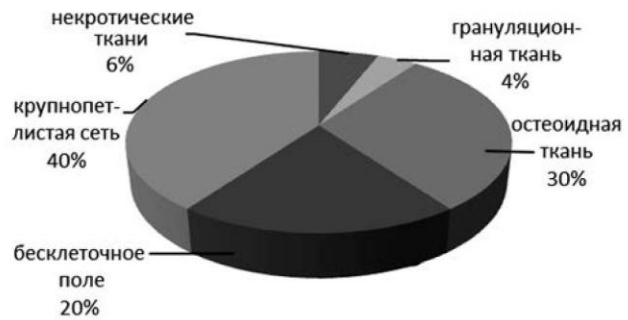


Рис. 9. Структура регенерата кости после введения 1 млн аутологичных СК с коллапаном на 42 сут

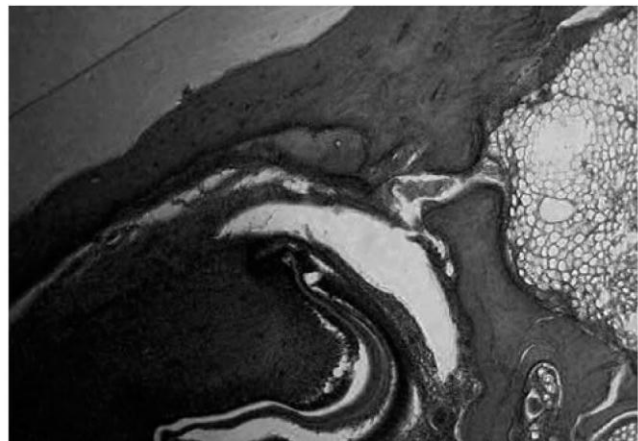


Рис. 10. Введение 1 млн СК из костного мозга с коллапаном на 42 сут. Обширные поля грануляционной ткани с участками некроза и секвестрами инфильтрированными лейкоцитами. Формирование полей новообразованной костной ткани в зоне регенерата. Окрашивание по Ван-Гизон  $\times 100$

которых была сращена мелкопетлистой сетью новообразованных костных балочек (рис. 10).

На 42 сут гистологические исследования свидетельствуют о замедлении восстановительного процесса, связанного с уменьшением объема пролиферирующей ткани и неравномерным распределением клеточных элементов в зоне регенерата по сравнению с этим же сроком при введении дозы 500 тыс. СК.

На 90 сут после введения 1 млн аутологичных СК с коллапаном на гистотопограммах из общей площади регенерата 1 % занимают некротические ткани, клеточно-волокнистая ткань — 15 %, остеоидная ткань — 32 %, мелкопетлистая сеть костных трабекул — 35 %, крупнопетлистая сеть костных трабекул — 12 % (рис. 11).

Микроскопически на 90 сут отмечались незначительные деструктивные изменения и резорбция альвеолярного отростка в области корней зуба. На отдельных участках наблюдалась активная пролиферация камбиальных клеточных элементов периостальной зоны и дифференцировка их в остеобласты. В структуре регенерата определялись участки из мелкопетлистой и крупнопетлистой сети костных трабекул, а также хорошо васкуляризованная

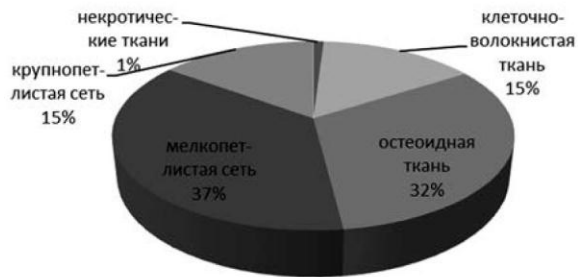


Рис. 11. Структури регенерата кістки після введення 1 млн аутологічних СК з коллапаном на 90 сут

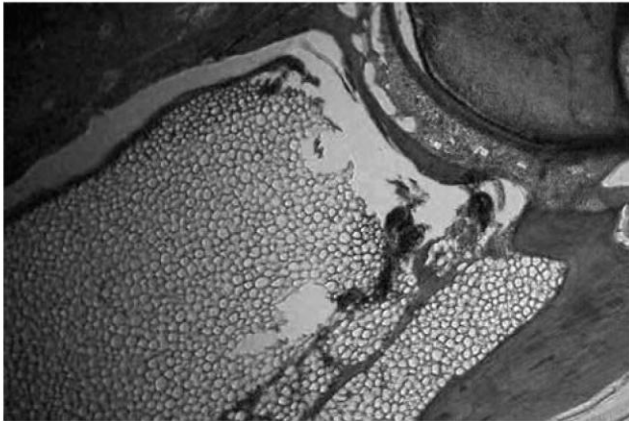


Рис. 12. Введення 1 млн СК із кісткового мозгу з коллапаном на 90 сут. Активна проліферація клітинних елементів періостальної зони і диференціювання їх в остеобласти. Формування сітки кісткових трабекул і полів клітинно-волокнистої тканини з активним ангиогенезом. Окрашення по Ван-Гізон  $\times 100$

клітинно-волокниста тканина, що свідчувало про інтенсифікацію ангиогенезу (рис. 12).

Следователно, на 90 сут СК в дозі 1 млн в поєднанні з біоматеріалом коллапаном оказу-

вали суттєве впливання на структурно-функціональні особливості клітинних елементів регенерата, їх розподіл і взаємозв'язок з міжклітинним речовиною, що, в свою чергу, визначало формування тканинних структур і темпи відновлювальних процесів.

## ВИВОДИ

На основі порівняльного аналізу репаративних процесів кісткової тканини нижньої щелепи кроликів при введенні 500 тис. аутологічних СК із кісткового мозгу вже на 42 сут спостерігалося суттєве збільшення клітинних елементів остеогенного характеру за рахунок періостального кісткоутворення, порівняно з 100 тис. аутологічних СК із кісткового мозгу, а також відсутність зон некрозу і секвестрів, обмежених грануляційною тканиною і інфільтрованих лейкоцитами при введенні 1 млн аутологічних СК із кісткового мозгу.

К 90 сут після введення 500 тис. аутологічних СК із кісткового мозгу розвиток остеогенезу мав найбільш виражений характер, з інтенсивним кісткоутворенням і відновленням цілості кістки нижньої щелепи, з наявністю сітки мелкопетлистої і крупнопетлистої трабекул, порівняно з іншими групами.

Найбільш цілеспрямованим і перспективним для відновлення кісткових дефектів розміром  $3 \times 3$  мм є введення аутологічних СК із кісткового мозгу в кількості 500 тис. в поєднанні з коллапаном, так як це створює сприятливі умови для більш інтенсивного розвитку остеогенезу, інтенсифікації проліферативних процесів і процесів диференціації по остеогенному типу.

## СПИСОК ІСПОЛЬЗОВАНИХ ІСТОЧНИКІВ

1. Воложин А. І. Використання мезенхімальних стовбурових клітин для активації репаративних процесів кісткової тканини щелепи в експерименті / А. І. Воложин, А. Ю. Васильєв, Н. Н. Мальгінов // *Стоматологія*. — 2010. — № 1. — С. 10–14.
2. Використання мезенхімальних стовбурових клітин для відновлення міжкорневих перегородок при хронічному пародонтиті / Н. А. Боброва, Л. Я. Богашова, І. П. Ярынич-Бучинська [і др.] // *Журнал АМН України*. — 2010. — № 16. — С. 27–28.
3. Клітинні технології в пародонтології / А. І. Грудянов, В. Л. Зорин, А. І. Зорина, І. І. Степанова // *Стоматологія*. — 2009. — № 1. — С. 71–73.
4. Оцінка впливу аутологічних клітинних культур на відновлення дегенеративно пошкодженого сухожилля в експерименті / О. О. Коструб, В. І. Грищенко, Р. І. Блонський, О. І. Гончарук // *Вісник ортопедії та протезування*. — 2011. — № 2. — С. 10–12.
5. Стромальні клітини кісткового мозгу, жирової тканини і шкіри людини в ході експансії, імуннофенотип і диференційовувальний потенціал мезенхімальних стовбурових клітин / А. Ю. Петренко, Ю. А. Петренко, Н. Г. Скоробогатова [і др.] // *Трансплантологія*. — 2008. — Т. 10, № 1. — С. 84–86.
6. Differentiation of rodent bone marrow mesenchymal stem cells into intervertebral disk-like cells following coculture with rat disk tissue / W. Aiqun, A. Sylvia, H. T. Chung [et al] // *Tissue Engineering Part A*. — 2009. — Vol. 15 (9). — P. 2581–2595.