

ХІРУРГІЧНА СТОМАТОЛОГІЯ

УДК [616.314.18-002.4-003.93:612.112]

В.Ф. Куцевляк, В.І. Куцевляк, І.В. Циганова

ПОРІВНЯЛЬНА ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА І КЛІНІЧНА ОЦІНКА ОСТЕОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ АУТОЛОГІЧНИХ СТОВБУРОВИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ І ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ

Харківська медична академія післядипломної освіти

Успіх відновного хірургічного лікування запальних хвороб пародонта багато в чому визначається процесами репаративної регенерації кісткової тканини пацієнта. Аналіз причин невдалого лікування таких хворих свідчить про те, що шляхи їх усунення полягають і в удосконаленні технології самого хірургічного втручання, і у створенні оптимальних умов для регенерації кісткової тканини [1;2].

Один із найперспективніших напрямів корекції процесу регенерації – це трансплантація стовбурових клітин різного походження [3].

Використання методу направленої регенерації кісткової тканини альвеолярного відростка з додаванням аутологічних стовбурових клітин у пародонтальній хірургії при лікуванні генералізованого пародонтиту II і III ступенів тяжкості дозволяє не тільки припинити запальний процес, а й анатомічно відновити структурні компоненти пародонта, насамперед альвеолярну кістку [4;5].

Метою дослідження була порівняльна характеристика остеогенних властивостей клітин кісткового мозку і жирової тканини.

Для досягнення поставленої мети виконано комплекс експериментальних і клінічних досліджень.

В експериментальних дослідженнях з вивчення впливу аутологічних клітин кролика, отриманих із кісткового мозку і жирової тканини, на загоєння дірчастих дефектів альвеолярного відростка були використані кролики-самці породи Шиншила віком 1 рік; тварини були розподілені на 8 серійних груп по 4 кролики в кожній.

Під тіопенталовим наркозом створювали дефект кісткової тканини на глибину кортикальної пластинки розміром 0,027 см³, який заповнювали таким чином: дефект під згустком; дефект і «Коллапан» Л; дефект, 100000 од. стовбурових клітин кісткового мозку, «Коллапан» Л; дефект, 500000 од. стовбурових клітин жирової тканини, «Колла-

пан» Л, дефект, 1 млн. од. СККМ, «Коллапан» Л; дефект, 100000 од. СКЖТ, «Коллапан» Л; дефект, 500000 од. СКЖТ, «Коллапан» Л; дефект, 1 млн. од. СКЖТ, «Коллапан» Л, після чого рану вшивали. Тварин виводили з експерименту методом повітряної емболії на 42 або 90 добу.

Морфометричні дослідження

Фрагменти щелеп із зоною регенерату фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, проводили декальцинацію в спиртовому розчині мурашиної кислоти, знежирювали і зневоднювали в ацетонах і спиртах. Гістологічні зрізи в сагітальній площині (6-10 мкм) виготовляли на санному мікромомі «Reichert», фарбували гематоксиліном Вейгерта та еозином, пікрофуксином за Ван Гізоном [6].

Джерелом первинної культури кістково-мозкових стовбурових клітин був кістковий мозок зі стегнових кісток щурів і клубових кісток кроликів. Підшкірний жир виділяли з невеликого розрізу пахової ділянки кроликів [7;8].

Клітини виділяли подвійним вимиванням із кістки розчином Хенкса і центрифугуванням отриманої суспензії при 1000 обертів/хвилину протягом 10 хвилин і ресуспендуванням осаду в живильному середовищі. Підшкірний жир виділяли з надрізу в паховій ділянці в шприц. Кубик жиру поміщали в пробірку, в розчин Хенкса [9].

Клінічні методи дослідження

Групу клінічних спостережень склали 20 хворих на генералізований пародонтит II-III ступенів, яким проведено комплексне лікування, що полягало в професійній гігієні порожнини рота, усуненні травматичної оклюзії, фармакотерапії, яка складалася з прийому антимікробних, остеопротекторних, десенсибілізуючих препаратів, вітамінних комплексів.

Основній групі з 10 хворих-добровольців із діагнозом «генералізований пародонтит II-III

ступеня» на хірургічному етапі лікування при проведенні клаптевих операцій для стимуляції остеогенезу використовували аутологічні стовбурові клітини з кісткового мозку; 10 пацієнтам групи контролю проводили аналогічні клаптеві операції без застосування стовбурових клітин.

Виконували клаптеву операцію з використанням аутологічних стовбурових клітин з урахуванням обсягу дефекту, що склало 2 млн. стовбурових клітин.

В експериментальних дослідженнях вивчено вплив аутологічних клітин кролика в кількості 100 тисяч, 500 тисяч, 1 мільйон, отриманих із кісткового мозку і жирової тканини, на загоєння дірчастих дефектів альвеолярного відростка об'ємом 0,027 см³.

На 42 добу після введення 100 тисяч аутологічних СКЖТ із «Коллапаном» (табл.1) некротичні ділянки займали 6%, гематома - 8%, грану-

ляційна тканина - 54%, дрібнопетляста мережа кісткових трабекул –12%. На 90 добу дрібно- і крупнопетляста мережа кісткових трабекул - 20% і 10% відповідно.

На 42 добу після введення 500 тисяч аутологічних СКЖТ у структурі регенерату 55% складала клітинно-волокниста тканина, 32% - новоутворені кісткові трабекули. На 90 добу клітинно-волокниста тканина становила 8%, мережа остеоїдних і дрібних кісткових трабекул - 55%, крупнопетлястих - 9%. У периферичних ділянках формувалася кортикальний шар - 7%.

На 42 добу після введення 1 млн. аутологічних СКЖТ: 39% - грануляційна тканина, 8% - клітинно-волокниста тканина, 10% - остеоїд, 40% - новоутворені кісткові трабекули.

На 90 добу після введення 1 млн. аутологічних СКЖТ грануляційна тканина становила 48 %, дрібні й крупні трабекули - 27% 23% відповідно.

Таблиця 1
Характеристика морфологічних змін структури регенерату кістки на 42 і 90 добу (СКЖТ)

Показники в %	100 тис. СКЖТ		500 тис. СКЖТ		1 млн. СКЖТ	
	42 доба	90 доба	42 доба	90 доба	42 доба	90 доба
Зона некрозу	6	4	0	0	3	3
Гематома	8	0	1	0	0	0
Грануляційна тканина	54	66	0	8	39	38
Клітинно-волокниста тканина	0	0	55	0	8	0
Остеїдна тканина	20	0	12	0	10	7
Дрібні кісткові трабекули	12	20	32	55	40	27
Крупні кісткові трабекули	0	10	0	30	0	23
Кортикальний шар	0	0	0	7	0	0

На 42 добу після введення 100 тисяч аутологічних СКЖТ (табл. 2) 5% регенерату займали некротичні тканини, 35% - грануляційна тканина, 28% - остеоїдна тканина, дрібнопетляста мережа кісткових трабекул – 32%.

На 90 добу некроз займав 3%, 32% - остеоїд, 32% - дрібнопетляста, 21% - крупнопетляста мережа кісткових балочок, 12% - грануляційна тканина.

На 42 добу після введення 500 тисяч аутологічних СКЖТ 1% займав некроз, клітинно-волокниста тканина складала 13%, 4% - остеоїд, 36% - дрібнопетляста кісткова тканина, 46% - крупнопетляста кісткова тканина.

На 90 добу виявлялася цілісна структура з новоутвореної кісткової тканини, в якій 38% займала дрібнопетляста мережа кісткових трабекул, 46% - крупнопетляста мережа кісткових трабекул, 16% - кортикальний шар.

На 42 добу після введення 1 млн. аутологічних СКЖТ 6% займали некроз, 4% - грануляційна тканина, 40% - крупнопетляста мережа кісткових трабекул, 30% - остеоїд, 20% - безклітинне поле, заповнене гомогенними еозинофільними масами. На 90 добу некроз займав 1%, клітинно-волокниста тканина - 15%, остеоїд – 33%, дрібно- і крупнопетляста мережа кісткових трабекул – 35% і 16% відповідно.

Таблиця 2
Характеристика морфологічних змін структури регенерату кістки на 42 і 90 добу (СКЖТ)

Показники (%)	100 тис. СКЖТ		500 тис. СКЖТ		1 млн. СКЖТ	
	42 доба	90 доба	42 доба	90 доба	42 доба	90 доба
Зона некрозу	5	3	1	0	6	1
Гематома	0	0	0	0	0	0
Грануляційна тканина	35	12	0	0	4	0
Клітинно-волокниста тканина	0	0	13	0	0	15
Остеїдна тканина	28	32	4	0	30	33
Дрібні кісткові трабекули	32	32	36	38	0	35
Крупні кісткові трабекули	0	21	46	46	40	16
Кортикальний шар	0	0	0	16	0	0
Безклітинне поле	0	0	0	0	20	0

Було проведено порівняльну характеристику репаративного остеогенезу при застосуванні стовбурових клітин кісткового мозку і жирової тканини. У всіх дослідних групах при введенні СК, отриманих як із жирової тканини, так і з кісткового мозку, на носії «Коллапан», наявна стимуляція остеогенезу. Однак згідно з морфометричними даними виявлено, що на 42 добу утворення остеогенних тканин у групах із уведенням СККМ було на 14% більше порівняно з СКЖТ. На 90 добу утворення остеогенних тканин у групах тварин, яким вводили СККМ, було в 3 рази

більше, ніж у групах з уведенням СКЖТ. Якщо порівняти структуру тканин регенерату залежно від кількості клітин, більш оптимальною та інтенсивною була стимуляція остеогенезу при введенні 500 тис. СККМ для дефекту об'ємом 0,027 см³.

Результати клінічних досліджень

На первинному обстеженні середні показники індексної оцінки стану пародонта у хворих обох груп були рівнозначними (табл. 3).

Таблиця 3
Індексна оцінка стану пародонта до і після комплексного лікування

Показники	Первинне дослідження		Через 6 місяців		Через 12 місяців	
	I	II	I	II	I	II
Проба Шіллера - Писарева	5,15±0,05 p ₁ > 0,05	5,15±0,05	1,3±0,1 p<0,05 p ₁ < 0,05	1,8±0,05 p<0,05	1,3 ± 0,1 p<0,05 p ₁ > 0,05	2,0 ± 0,5 p<0,05
ГІ за Федоровим – Володкіною	3,0 ± 0,5 p ₁ > 0,05	3,0 ± 0,5	1,1±0,1 p<0,05 p ₁ > 0,05	1,3±0,03 p<0,05	1,1 ± 0,1 p<0,05 p ₁ > 0,05	1,3 ± 0,5 p<0,05
Індекс крово-точивості за Muhlermann (PBI)	3,0 ± 0,05 p ₁ > 0,05	3,0 ± 0,05	0	1,0±0,02 p<0,05	0	2,0 ± 0,3 p<0,05
Кістковий індекс Фукса	0,48±0,05 p ₁ > 0,05	0,48±0,05	0,73±0,5 p<0,05 p ₁ > 0,05	0,70±0,5 p<0,05	0,74±0,5 p<0,05 p ₁ < 0,05	0,64±0,3 p<0,05
Рухомість зубів за шкалою Міллера	1-2 p ₁ > 0,05	1-2	0	0	0	0

Примітка: p – достовірність розрахована відносно показників первинного обстеження;
p₁ – відносно групи порівняння.

У хворих контрольної групи на ортопантограмах виявляли ущільнення, посилення кісткового малюнка в порівнянні з первинними.

Рентгенологічно у хворих дослідної групи визначалося збільшення висоти міжальвеолярних перегородок на 1-1,5 мм порівняно з доопераційними ортопантомограмами. Ущільнився малюнок губчастої кістки міжзубних перегородок і підвищилася його рентгеноконтрастність.

Наведені дані свідчать про те, що застосування аутологічних стовбурових клітин на хірургічному етапі комплексного лікування хвороб пародонта має явні переваги над традиційними хірургічними методами лікування цих хвороб, оскільки відбувається відновлення структури пародонта, усуваються пародонтальні кишень, встановлюється тривала ремісія, що підтверджується покращенням рівня гігієни порожнини рота, нормалізацією індексної оцінки стану пародонта, процесами регенерації кісткової тканини. Доведено, що на 42 добу остеогенних тканин у групах з уведенням СККМ було на 14% більше, а на 90 добу – в 3 рази більше, ніж у групах із СКЖТ.

Нами визначено, що після введення 500 тисяч аутологічних СКЖТ із «Коллапаном» у дефект розміром 0,027 см³ у період із 42 до 90 днів визначалася істотна якісна зміна темпів остео-

генезу в структурі регенерату, що привело до значного збільшення новоутворених кісткових структур (із 44% до 85%). Уведення 500 тисяч аутологічних СККМ із «Коллапаном» за 90 днів привело до відновлення гістологічної структури нижньої щелепи кролика.

Отже, нами доведено, що застосування аутологічних стовбурових клітин на хірургічному етапі комплексного лікування хвороб пародонта має явні переваги перед традиційними хірургічними методами лікування цих хвороб, оскільки відбувається відновлення структури пародонта, усуваються пародонтальні кишень, встановлюється тривала ремісія.

Література

1. Первый опыт применения комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных стромальных клеток (МСК) из жировой ткани у пациентов с выраженным дефицитом костной ткани в области верхней и нижней челюстей / И. С. Алексеева, А.В. Волков, А.А. Кулаков [и др.] //Материалы Всеросс. науч. школы-конф. для молодежи «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования». – М., 2009. –С. 53.
2. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel

- maturation / K. Rubina, N. Kalinina, A. Eflmenko [et al.] // Tissue Eng Part A. - 2009. - № 15. - S.-8. - P. 2039-2050.
3. Воложин А. А. Мультипотентные клетки жировой ткани: перспективы использования в челюстно-лицевой хирургии / А.А. Воложин, Е.В. Киселева, Т.Г. Калашникова // Кафедра. - 2007. -№ 6. - С. 20-25.
 4. Дифференцировка мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из костного мозга и подкожно жировой клетчатки, в клетки костной ткани / [И.П. Савченкова, М.С. Ростовская, Н.И. Чупикова, С.З. Шарифуллина] // Цитология.- 2008. - №5. - Разд.10. - С. 855-860.
 5. Gimble J.M. Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine / J.M. Gimble, A.J. Katz, B.A. Bunnell // Circulation Research. - 2007. - S. 100. - P.1249-1260.
 6. Сергеев В.С. Иммунологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / В.С. Сергеев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2005. - С. 39-42.
 7. Стромальные клетки жировой ткани - пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом / [Д.О. Трактуев, Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук, К.Л. Марч] // Цитология. - 2006.- С. 83-94.
 8. Zhao human adipose tissue- derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo/ Y. Cao, Z. Sun, I. liao [et al.] // Biochem biophys res commun. -2005. - P.370-379.
 9. Карпюк В. Б. К изучению свежeweделенных - аутологичных стромальных клеток подкожной жировой клетчатки для регенерации биологических тканей / В.Б. Карпюк, М.Д., Перова М.Г. Шубич // Институт стоматологии. - 2009. - № 3. - С. 74-76.

**Стаття надійшла
16.11.2018**

Резюме

За результатами оцінки динаміки регенерації кісткових дефектів нижньої щелепи при введенні стовбурових клітин із «Коллапаном» у зону дефекту встановлено, що перебіг найсприятливіший у разі введення стовбурових клітин кісткової тканини порівняно з уведенням СК жирової тканини.

Ключові слова: спрямована регенерація, аутологічні стовбурові клітини, кістковий мозок, жирова тканина, «Коллапан».

Резюме

По результатам оценки динамики регенерации костных дефектов нижней челюсти при введении стволовых клеток с «Коллапаном» в зону дефекта установлено, что течение наиболее благоприятное при введении стволовых клеток костной ткани по сравнению с введением СК жировой ткани.

Ключевые слова: направленная регенерация, аутологичные стволовые клетки, костный мозг, жировая ткань, «Коллапан».

UDC: [616.314.18-002.4-003.93:612.112]

COMPARATIVE EXPERIMENTAL AND CLINICAL EVALUATION OF OSTEOGENIC PROPERTIES OF BONE MARROW AND FATTY AUTOLOGICAL STOMATIC CELLS

V. F. Kutsevlyak, V. I. Kutsevlyak, I.V. Tsyganova

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education

Summary

The success of restorative surgical treatment of periodontal inflammatory diseases is largely determined by the processes of reparative regeneration of bone tissue of the patient. Analysis of the causes of unsuccessful treatment of such patients suggests that the ways of overcoming them consist both in improving the technology of the surgical intervention itself and in creating optimal conditions for regeneration of bone tissue.

One of the most promising directions for correcting the regeneration process is the transplantation of stem cells of various origin.

Using the method of directed regeneration of bone tissue of the alveolar process with the addition of autologous stem cells in periodontal surgery in the treatment of generalized periodontitis II and III degree of severity will not only eliminate the inflammatory process, but also anatomically restore the structural components of the periodontal, in particular, the alveolar bone.

The purpose of the study was to compare the osteogenic properties of bone marrow and adipose tissue cells.

A complex of experimental and clinical research has been carried out. In experimental studies on the effects of rabbit's autologous cells derived from bone marrow and adipose tissue, rabbits-male Chinchilla breeds of 1 year old were used to heal the pustular defects of the alveolar process; the animals were divided into 8 ordinal groups.

Under thiopental anesthesia a defect of bone tissue was created at a depth of the cortical plate in the size

of 0.027 cm³, which was filled as follows: a defect under the cluster; Defect and Collapan L; defect, 100000 units bone marrow stem cells, Collapan L.; defect, 500000 units Stem cells of adipose tissue, Collapan L, defect, 1 million units. CCMC, Collapan L.; defect, 100000 units SCJT, Collapan L.; defect, 500000 units SCJT, Collapan L.; defect, 1 million units. SCJT, Collapan L., after which the wound was sutured. Animals were brought out from the experiment by air embolism for 42 or 90 days.

In the initial survey, the average indexes of periodontal disease in patients of both groups were equal.

Radiologically, in patients of the experimental group, an increase in the height of interalveolar septal walls was determined at 1-1.5 mm, in comparison with preoperative orthopantomograms. There was an increase in the density of the spongy bone of the interdental partitions, an increase in its X-ray contrast.

The use of autologous stem cells at the surgical stage of complex treatment of periodontal diseases has evident advantages over the traditional surgical methods of treating these diseases, since restoration of the periodontal structure is restored, periodontal pockets are eliminated, long remission is established, which is confirmed by the improvement of the level of oral hygiene, the normalization of the index assessment of the periodontal condition, processes of bone tissue regeneration.

Thus, we have proved that the use of autologous stem cells at the surgical stage of complex treatment of periodontal diseases has evident advantages over traditional surgical methods of treatment of these diseases, since restoration of periodontal structure is restored, periodontal pockets are eliminated, long-term remission is established.

As a result of the evaluation of the dynamics regeneration of bone defects of the mandible in case of the introduction of stem cells with Collapan into the defect zone, we found that the course was most favorable for the administration of bone tissue stem cells comparing to the introduction of adipose tissue stem cells.

Keywords: directed regeneration, autologous stem cells, bone marrow, adipose tissue, Collapan.