

15. Bukharin O. V., Valyshev A. V. Microbe inhibitors of lysozyme. *ZhMEI*. 2006; 4: 8-13.

16. Lysenkova I. I., Abdusalamova B. F., Saakyan T. Sh. The effectiveness of the use of “Hexalys” pills for the reduction of inflammatory phenomena in periodontal tissues. *Dental Forum*. 2008; 1: 63-66.

17. Furdychko A. I., Knava O. E. The biochemical markers of inflammation and dysbiosis at the application on oral mucous membrane of rats with gel with phytolysozyme, adsorbed on chitosan. *Visnyk stomatologii*. 2012; 2(79): 22-25.

18. Levitsky A. P., Selivanskaya I. A., Lapinskaya A. P. [i dr.]. Lysozyme as feed additive. *Zernovi produkty i kombikormy*. 2012; 2(46): 45-47.

19. Levitsky A. P., Glazunov O. A., Meladze I. N. Influence of quertulin on condition of parodont in rats with experimental metabolic syndrome. *Journal of Health Sciences*. 2014; 4(11): 133-144.

20. Novik G. I., Astapovich N. I., Ryabaya N. E. The production of hydrolases and antibiotic resistance of lactobacilli and bifidobacilli. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya*. 2007; 43 (2): 184-192.

21. Bazarnova M. A. *Rukovodstvo po klinicheskoy laboratornoy diagnostike* [Manual of Clinical Laboratory Diagnostics]. Ch. 1. Kiev, Vyshcha shkola, 1981: 55.

22. Goryachkovskiy A. M. *Klinicheskaya biokhimiya v laboratornoy diagnostike* [The clinical biochemistry in laboratorial diagnostics] [3rd ed.]. Odessa, Ekologiya, 2005: 616.

23. The instruction to the set of reagents for the determination of triglycerides in blood serum and plasma with enzymatic colorimetric method / TU U 24.4-24607793-020-2003.

24. Levitsky A. P., Denga O. V., Makarenko O. A. [i dr.]. *Biokhimicheskie markery vospaleniya tkaney rotovoy polosti: metodicheskie rekomendatsii* [Biochemical markers of inflammation of oral cavity tissue: method guidelines]. Odessa, KP OGT, 2010:16.

25. Levitsky A. P., Denga O. V., Selivanskaya I. A. [ta in.]. The method of estimation of the degree of dysbiosis (dysbacteriosis) of organs and tissues. Patent of Ukraine 43140. IPC (2009) G01N 33/48. Application number u 200815092. Date of filling: 26.12.2008. Publ.: 10.08.2009. Bul. № 15.

26. Lapach S. N., Chubenko A. V., Babich P. N. *Statisticheskiye metody v mediko-biologicheskikh issledovaniyakh s ispolzovaniem Excel* [Statistical methods in medical and biological research by using Excel]. Kiev, Morion, 2000: 320.

Поступила 16.02.15



УДК [616.314.18-002.4-003.93:612.112]-089-092.9

**В. Ф. Куцевляк, д. мед. н., В. И. Куцевляк, д. мед. н.,
Е. А. Омельченко*, к. биол. н., А. С. Забирник*,
И. В. Цыганова**

Харьковская медицинская академия последипломного образования
Лаборатория «Вирола»*

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ОСТЕОГЕННЫХ СВОЙСТВ АУТОЛОГИЧНЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА И ЖИРОВОЙ ТКАНИ КРОЛИКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

В результате проведенного исследования изучены особенности динамики регенерации костных дефектов нижней челюсти на 16 кроликах породы Шиншилла. Вводили аутологичные стволовые клетки, полученные из костного мозга и жировой ткани в сочетании с коллапаном, в зону дырчатого дефекта объемом 3x3 мм. Установлено, что направленная регенерация костных дефектов нижней челюсти экспериментальных животных с введением стволовых клеток, полученных из костного мозга, протекает наиболее

благоприятно по сравнению с введением стволовых клеток, полученных из жировой ткани.

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

**В. Ф. Куцевляк, В. И. Куцевляк,
О. А. Омельченко*, А. С. Забирник*, И. В. Цыганова**

Харківська медична академія післядипломної освіти
Лабораторія «Вірола»*

ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА ОСТЕОГЕННИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ АУТОЛОГІЧНИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ ТА ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ КРОЛИКА В ЕКСПЕРИМЕНТІ

В результаті проведеного дослідження вивчені особливості динаміки регенерації кісткових дефектів нижньої щелепи на 16 кроликах породи Шиншилла. Вводили стовбурові клітини, вилучені з кісткового мозку та жирової тканини, у поєднанні з коллапаном в зону дірчастого дефекту 3x3 мм. Встановлено, що направлена регенерація кісткових дефектів нижньої щелепи у експериментальних тварин з введенням стовбурових клітин кісткового мозку протікає найсприятливіше, порівняно з введенням стовбурових клітин жирової тканини.

Ключові слова: спрямована регенерація, аутологічні стовбурові клітини, кістковий мозок, жирова тканина, коллапан.

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

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education
Laboratory «Virola»*

COMPARATIVE CHARACTERISTICS OF THE OSTEOGENIC PROPERTIES OF AUTOLOGOUS STROMAL CELLS OF BONE MARROW AND ADIPOSE TISSUE OF RABBIT IN EXPERIMENT

ABSTRACT

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 and adipose tissue in combination with kollapan in zone holey defect in an amount 500 thousand. It was established that the regeneration of bone directed mandible experimental animals with administration of stromal cells derived from bone marrow proceeds more favorably then stromal cells from adipose tissue.

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

Проблема регенерации костной ткани является одной из древнейших в медико-биологической науке. В последние десятилетия, в связи с ухудшением экологической обстановки, воздействием мощных стрессовых факторов на организм, отмечено снижение регенераторных возможностей костной ткани, и, следовательно, интенсивности регенераторных процессов.

Одним из перспективных и новых направлений коррекции процесса регенерации является применение биологически активных тканей эмбрионетап-центарного комплекса, а также трансплантация ство-

ловых клеток различного происхождения.

Ранее, в тканевой инженерии, использовались стромальные клетки костного мозга. Сейчас внимание привлекает жировая ткань, имеющая мезодермальное происхождение, хорошо развитую строму, она мультипотентна [5, 6, 8, 9].

По сравнению со стромальными клетками костного мозга (СККМ) стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ) имеют ряд преимуществ – они более доступны, выделяются в большем количестве, их способность дифференцироваться в остеогенном направлении меньше зависит от возраста донора [4,7,10].

Цель работы. Проанализировать морфологические изменения, происходящие в костной ткани челюсти кролика при использовании аутологичных стволовых клеток, полученных из костной и жировой ткани.

Материалы и методы. Аутологичные стволовые клетки костного мозга получали из бедренной кости экспериментальных животных. Аутологичные стволовые клетки жировой ткани получали из подкожного жира, полученного из паховой области животных.

Изучение процесса заживления костных дефектов размером 3х3мм проведено на 16 кроликах породы Шиншилла. 12 животных составили основную

группу, 4 – контрольную. Основная группа была поделена на четыре подгруппы по 3 кролика. Аутологичные стволовые клетки, полученные из жировой ткани и костного мозга, на коллапановой подложке вводили в зону дырчатого дефекта нижней челюсти кроликов основной группы. Забой первой половины животных производили на 42, второй – на 90 сутки. 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 и по Ван-Гизон.

Результаты собственных исследований. На 42 сутки после введения аутологичных СКЖТ на гистотопограммах определялась зональность структуры регенерата с разделением на поверхностную и глубокую зоны.

Если в первой преобладала клеточно-волоконная ткань с многочисленными капиллярами, во второй обнаруживалась сеть новообразованных костных трабекул с многочисленными остеобластами на поверхности, богатая клеточными элементами и кровеносными сосудами в межтрабекулярных пространствах (рис. 1).

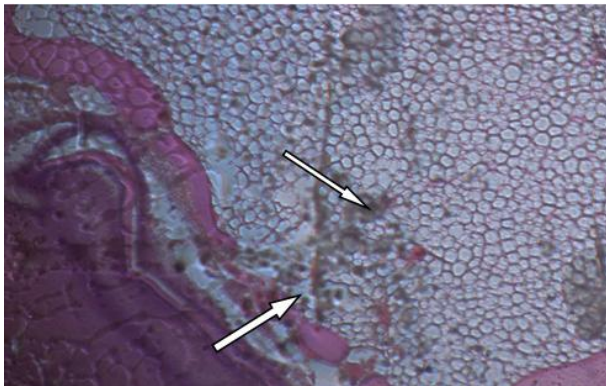


Рис. 1. Формирование клеточных элементов остеогенной направленности в зоне регенерата после введения СК из жировой ткани с коллапаном на 42-е сутки. Окрашивание гематоксилин-эозин x 100.

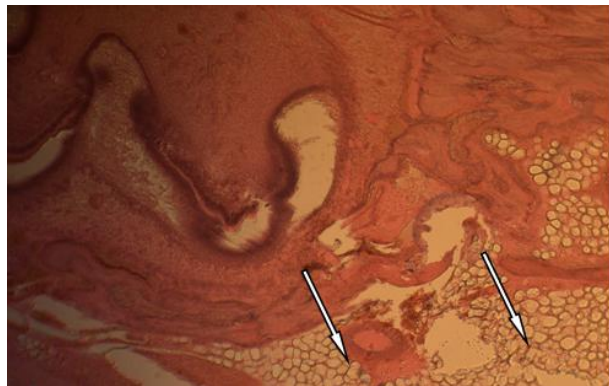


Рис. 2. Гистотопограмма Введение СК из костного мозга с коллапаном на 42 сутки Окрашивание Ван-Гизон x100.

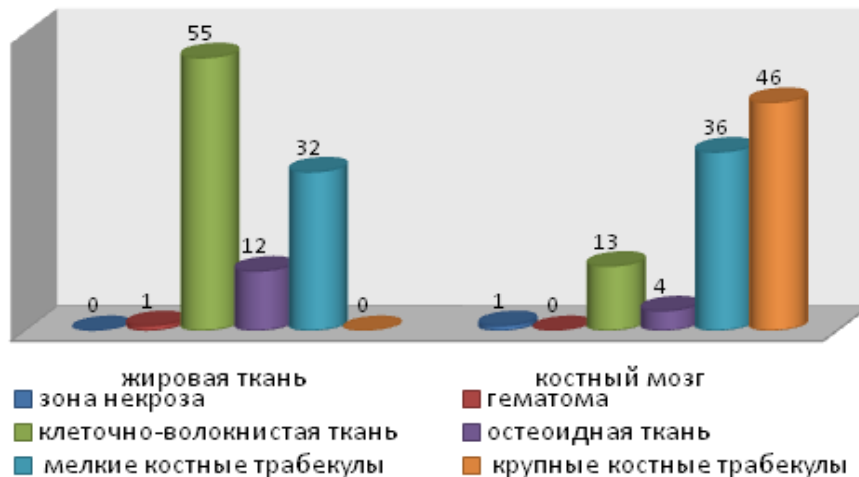


Рис. 3. Сравнительная характеристика репаративного остеогенеза костной ткани челюсти кролика при использовании аутологичных стволовых клеток, полученных из костной и жировой ткани на 42 сутки.

Согласно морфометрическим данным после введения аутологичных СКЖТ в структуре регенерата 1 % занимали остатки гематомы в поверхностной зоне, 55 % – клеточно-волоконная ткань, 12 % – остеоидные и 32 % новообразованные мелкие костные трабекулы.

Микроскопически (рис. 2) на 42 сутки после введения аутологичных СКЖТ с коллапаном 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 сутки на гистотопограммах после введения аутологичных СКЖТ с коллапаном из общей площади перестраивающегося регенерата 1 % занимали участки некротически измененных тканей, клеточно-волоконная ткань – 13 %, 4 % остеоидная ткань, 36 % мелкопетлистая костная ткань, 46% крупнопетлистая костная ткань (рис. 3).

Таким образом, на 42 сутки в структуре регенерата после введения аутологичных СКЖТ с коллапа-

ном преобладала клеточно-волоконная ткань хорошо васкуляризованная, почти без лейкоцитарной инфильтрации, а зоны остеогенеза занимали глубокие отделы дефекта, а в группе животных с введением СКЖТ наблюдалось значительное увеличение клеточных элементов остеогенного характера за счет периостального костеобразования.

На 90 сутки после введения аутологичных СКЖТ с коллапаном на гистотопограммах, согласно морфометрическим данным, клеточно-волоконная ткань составляла в структуре регенерата всего 8 %, а сеть новообразованных костных трабекул 85 %, причем 9 % из них имели крупно-петлистый характер. В периферических участках сети костных трабекул обнаруживалось формирование новообразований кортикального слоя, который занимал 7 % (всего 92 %).

Микроскопически в регенерате кости, после введения аутологичных СКЖТ с коллапаном, на 90 сутки на отдельных участках, преимущественно вокруг фрагментов из пластинчатой кости определялась лакунарная резорбция с напластованиями новообразованной костной ткани по перистальной и эндостальной поверхности и незначительной очаговой лейкоцитарной инфильтрацией грануляционной ткани, окружающей эти поля (рис. 4.)

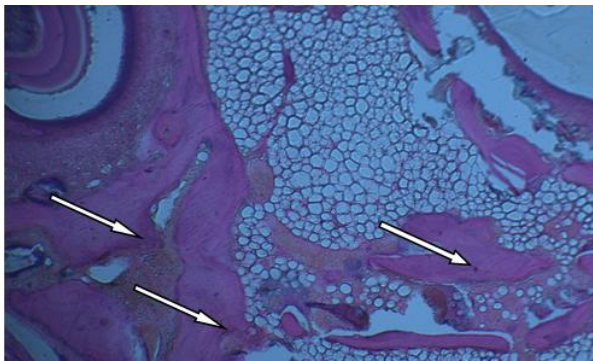


Рис. 4. Введение СК из жировой ткани с коллапаном на 90 сутки. Участки лакунарной резорбции вокруг фрагментов пластинчатой кости с напластованиями новообразованной костной ткани в зоне регенерата. Окрасивание гематоксилин-эозин x 100

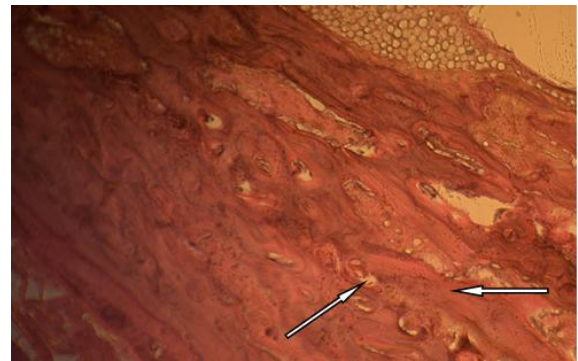


Рис. 5. Введение СК из костного мозга с коллапаном на 90 сутки. Интенсивное костеобразование за счет формирования сети мелкопетлистых и крупнопетлистых трабекул в зоне регенерата. Окрасивание Ван-Гизон x100.

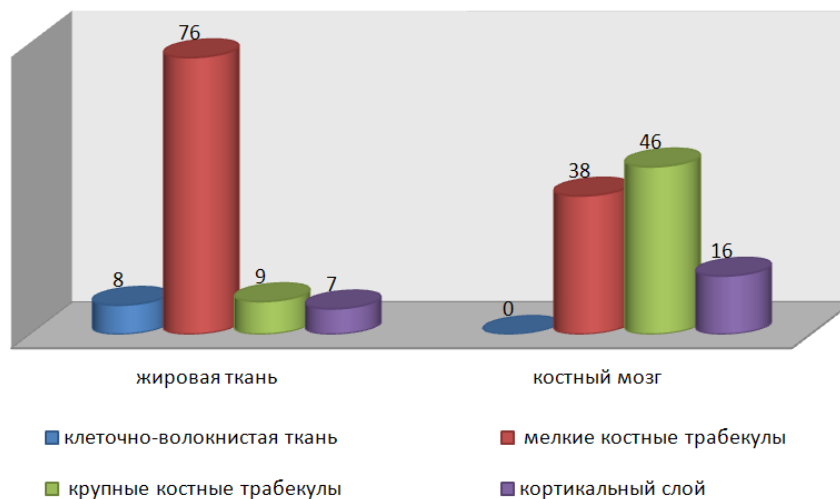


Рис. 6. Сравнительная характеристика репаративного остеогенеза костной ткани челюсти кролика при использовании аутологичных стволовых клеток, полученных из костной и жировой ткани на 90 сутки.

Микроскопически на 90 сутки после введения аутологичных СКЖМ с коллапаном 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 времени (рис. 5.)

На 90 сутки на гистотопограммах после введения аутологичных СКЖМ с коллапаном обнаруживалась, согласно морфометрическим данным, целостная структура из новообразованной костной ткани, в которой 38 % занимает мелкопетлистая сеть костных трабекул, 46 % – крупнопетлистая сеть костных трабекул, 16 % занимал кортикальный слой, который без четкой границы формировался из сети костных трабекул (рис. 6).

Таким образом, в регенерате кости, после введения аутологичных СКЖТ с коллапаном в период с 42 до 90 суток определялось существенное качественное изменение темпов остеогенеза в структуре регенерата, что привело к значительному увеличению новообразованных костных структур.

Введение аутологичных СКЖМ в зону дырчатого дефекта экспериментальным животным в сочетании с коллапаном на 90 сутки 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.

Выводы. 1. Введение аутологичных СКЖМ в сочетании с коллапаном усиливает восстановительные процессы в зоне регенерата и приводит к более быстрому формированию новообразованной костной ткани, чем приведении СКЖТ.

2. Введение аутологичных СКЖТ с коллапаном в зону регенерата также во все сроки исследований оказывали влияние на перестройку в дифференцированные костные структуры. Однако полноценного восстановления дефекта кости не происходило, что свидетельствует о замедленных темпах морфогенеза за счет неравномерного распределения клеточных элементов для пролиферативных процессов.

Список литературы

1. **Алексеева И. С.** 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, А. С. Григорьян [и др.] // Материалы Всеросс. науч. школы-конф. для молодежи «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования». – М., 2009. – С. 53.
2. **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.
3. **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.
4. **Стромальные** клетки костного мозга, жировой ткани и кожи человека в ходе экспансии, иммунофенотип и дифференцировочный потенциал мезенхимальных стволовых клеток / А. Ю. Петренко, Ю. А. Петренко, Н.Г. Скоробогатова [и др.] // Трансплантология. – 2008. – Т. 10, №1. – С. 84-86.

5. **Савченкова И. П.** 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. Чупилова, С. З. Шарифуллина // Цитология. – 2008. – №5. – С. 855-860.

6. **Сергеев В. С.** Иммунологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / В. С. Сергеев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – № 2. – С. 39-42.

7. **Трактуев Д. О.** 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. **Cao Y, Zhao** human adipose tissue- derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo/ Y. Cao, Z. Sun, I. Iiao, Y. Meng, G. Han // Biochem biophys res commun. – 2005. – P. 370-379.

9. **Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine** / J. M. Gimble, A. J. Katz, B. A. Bunnell [et al] // Circulation Research – 2007. – №100. – P.1249-1260.

10. **Rubina K.** Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation / K. Rubina, N. Kalinina, A. Eflmenko, T. Lopatina, V. Melikhova [et al.] // Tissue Eng Part A. – 2009. – № 15.(8). – P. 2039-2050.

REFERENCES

1. **Alekseeva I. S., Volkov A.V., Kulakov A.A., Grigoryan A.S. i dr.** Perviy opyt primeneniya kombinirovannogo kletchnogo transplantata na osnove multipotentnykh stromalnykh kletok (MSK) iz zhirovoy tkani u patsientov s vyrazhennym defitsitom kostnoy tkani v oblasti verhney i nizhney chelyustey. [The first experience of the combined cell transplant on the basis of multipotent stromal cells (MSCs) from adipose tissue in patients with severe deficiency of bone tissue in the upper and lower jaws]. *Materialy Vseross. nauch. shkolyi-konf. dlya molodezhi «Autologichnyie stvolovyye kletki: eksperimentalnyie i klinicheskie issledovaniya. M., 2009:53.*
2. **Volozhin A. A. Kiseleva E. V., Kalashnikova T. G.** Multipotent adipose tissue cells: prospects for use in oral and maxillofacial surgery. *Kafedra. 2007; 6: 20-25.*
3. **Karpjuk V. B., Perova M. D., Shubich M. G.** By studying the freshly - autologous stromal cells of subcutaneous fat for regeneration of biological tissues. *Institut stomatologii. 2009; 3: 74-76.*
4. **Petrenko A. Yu., Petrenko Yu. A., Skorobogatova N. G. i dr.** Bone marrow stromal cells , adipose tissue and skin of the person in the course of expansion, the immunophenotype and differentiation potential of mesenchymal stem cells. *Transplantologiya. 2008; 10 (1): 84-86.*
5. **Savchenkova I. P., Rostovskaya M. S., Chupikova N. I., Sharifullina S. Z.** Differentiation of multipotent mesenchymal stromal cells isolated from the bone marrow and subcutaneous adipose tissue in bone cells. *Tsitologiya. 2008; 5 (10): 855-860.*
6. **Sergeev V. S.** Immunologicheskie svoystva multipotentnykh mezenhimalnykh stromalnykh kletok. [Immunological properties of multipotent mesenchymal stromal cells]. *Kletchnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya. 2005: 39-42.*
7. **Traktuev D. O., Parfenova E. V., Tkachuk V. A., March K. L.** Adipose tissue -derived stromal cell - cell type plastic possessing a high therapeutic potential. *Tsitologiya 2006; 83-94.*
8. **Cao Y., Sun Z, Iiao I., Meng Y., Han. G** Zhao human adipose tissue- derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo. *Biochem biophys res commun. 2005; 370-379.*
9. **Gimble J. M., Katz A.J., Bunnell B. A.** Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine. *Circulation Research, 2007; 100: 1249-1260.*
10. **Rubina K., Kalinina N., Eflmenko A., Lopatina T., Melikhova V. [et al.]** Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation. *Tissue Eng Part A. 2009;15(8): 2039-2050.*

Поступила 09.02.15

