

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

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

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

НАПРАВЛЕННАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ОТРОСТКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА КОЛЛАПАНОВОЙ ПОДЛОЖКЕ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Харьковская медицинская академия последипломного образования (г. Харьков)

Лаборатория «Вирола»* (г. Харьков)

tsyganova777@inbox.ru

Данная статья является частью научно-исследовательской работы кафедры стоматологии и терапевтической стоматологии Харьковской медицинской академии последипломного образования по теме «Клиническое течение основных стоматологических заболеваний с учетом соматической патологии в условиях экологически опасных факторов окружающей среды. Разработка схем профилактики, лечения и реабилитации больных с использованием отечественных стоматологических материалов». Номер госрегистрации 0110U002440.

Вступление. В последние годы повышенный интерес ученых и клиницистов к клеточной трансплантации во многом обусловлен активным изучением стволовых клеток как более перспективного клеточного материала для трансплантации в регенеративной медицине [2,5,6,7,10]. Наиболее изучены мезенхимальные стволовые клетки (СК), выделенные из костного мозга, которые содержат три основных типа клеток: эндотелиальные клетки, гемопоэтические стволовые клетки, клетки стромы [1,3,4]. Методы идентификации, культивирования, накопления клеточной массы и пересадки стволовых клеток описаны, включая выделение линий гемопоэтических и мезенхимальных линий стволовых клеток и детальный анализ [8,9].

Цель работы – изучить в эксперименте регенеративные способности костной ткани в зависимости от количества введенных аутологичных стволовых клеток костного мозга.

Объект и методы исследования. Аутологичные стволовые клетки костного мозга получали из бедренной кости экспериментальных животных. Изучение процесса заживления костных дефектов размером 3х3мм проведено на 16 кроликах породы Шиншилла. Для выполнения работы нами 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 часов до операции.

Все манипуляции с животными проводили в соответствии с Санитарными правилами по устройству,

оборудованию и содержанию экспериментально – биологических клиник (вивариев) № 1045-73 от 06.04.1973; Конвенцией по защите животных, используемых в эксперименте и других научных целях (г. Страсбург, Франция 1986); Директивой Совета 86/609/ЕЕС от 24.11.1986.

При операциях на животных использовали внутривенный тиопенталовый наркоз.

Основную группу составили 12 животных, 4 – контрольную. Стволовые клетки костного мозга в сочетании с коллапаном вводили в зону дырчатого дефекта нижней челюсти кроликов основной группы в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллиона. Забой животных производили на 42 и 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.

Статистическую обработку проводили с помощью программного обеспечения Statistica 10,0 (StatSoft Ins., США).

Результаты исследований и их обсуждение. Динамика структуры регенерата кости после введения 100 тысяч аутологичных СК с коллапаном на 42 сутки 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 трабекул – 32%.

Микроскопически на 42 сутки 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 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 разрежения фрагментов (**рис. 1**).

Гистологические исследования на 42 сутки 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 сутки после введения 100 тысяч 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.

Микроскопически на 90 сутки 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. 2).

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

На 42 сутки после введения 500 тысяч аутологичных СК с коллапаном на гистотопограммах из общей площади перестраивающегося регенерата 1,5% занимали участки некротически измененных тканей, клеточно-волоконистая ткань – 12%, 7% остеоидная ткань, 36% мелкопетлистая костная ткань, 45% крупнопетлистая костная ткань.

Микроскопически на 42 сутки 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 остеобразование сопровождалось активной резорбцией костного вещества отломков и пролиферацией клеточных элементов. На 42 сутки наблюдалось значительное увеличение клеточных элементов остеогенного характера за счет периостального остеобразования (рис. 3).

На 90 сутки после введения 500 тысяч аутологичных СК с коллапаном на гистотопограммах 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.

Микроскопически на 90 сутки 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



Рис. 1. Участок регенерации костной ткани нижней челюсти кролика. Введение 100 тыс. СК из костного мозга с коллапаном на 42 сутки. Выраженный остеогенез с трансформацией в мелкопетливую сеть костных балочек. Окрашивание Ван-Гизон x100.

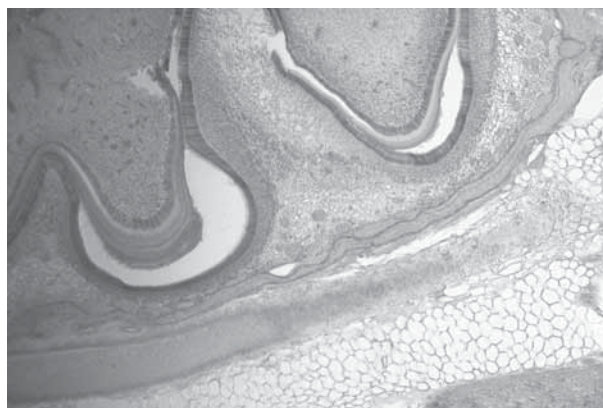


Рис. 2. Участок регенерации костной ткани нижней челюсти кролика. Введение 100 тыс. СК из костного мозга с коллапаном на 90 сутки. Выраженный остеогенез с участками резорбции фрагментов костной ткани и образованием внутрифрагментарных полостей с трансформацией в мелкопетливую сеть костных балочек. Формирование крупнопетливой сети трабекул, четко отграниченных плотно прилегающей грануляционной тканью в зоне дефекта. Окрашивание Ван-Гизон x100.

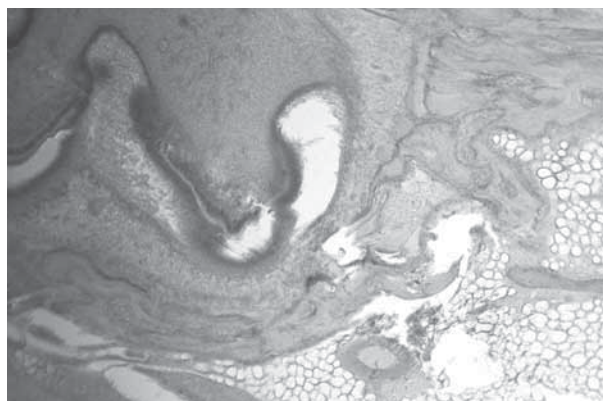


Рис. 3. Участок регенерации костной ткани нижней челюсти кролика. Введение 500 тыс. СК из костного мозга с коллапаном на 42 сутки. Активная резорбция костных отломков с пролиферацией клеточных элементов в зоне регенерата. Окрашивание Ван-Гизон x100.

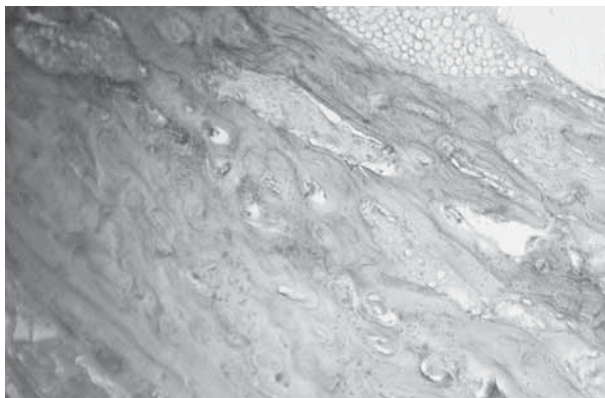


Рис. 4. Участок регенерации костной ткани нижней челюсти кролика. Введение 500 тыс. СК из костного мозга с коллапаном на 90 сутки. Интенсивное остеообразование за счет формирования сети мелкопетлистых и крупнопетлистых трабекул в зоне регенерата. Окрашивание Ван-Гизон x100.

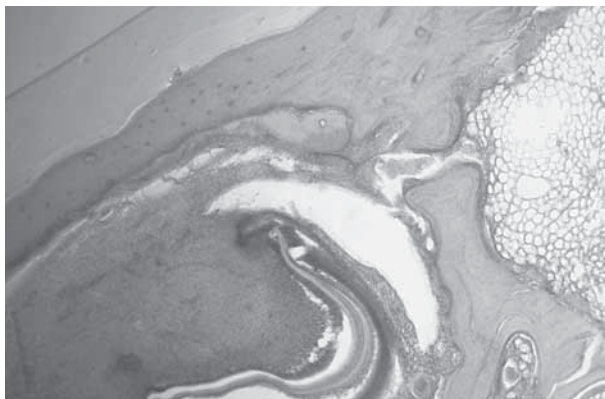


Рис. 5. Участок регенерации костной ткани нижней челюсти кролика. Введение 1 млн. СК из костного мозга с коллапаном на 42 сутки. Обширные поля грануляционной ткани с участками некроза и секвестрами инфильтрированными лейкоцитами. Формирование полей новообразованной костной ткани в зоне регенерата. Окрашивание Ван-Гизон x100.

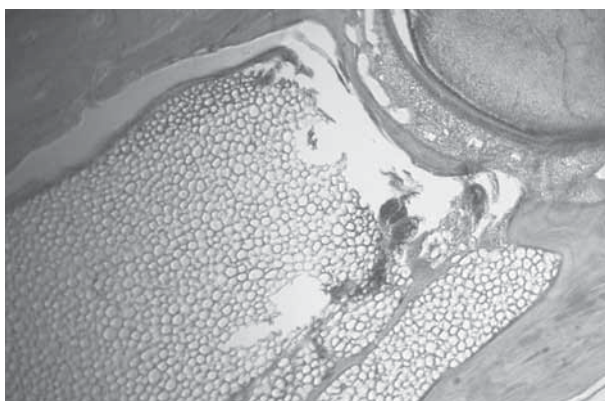


Рис. 6. Участок регенерации костной ткани нижней челюсти кролика. Введение 1 млн. СК из костного мозга с коллапаном на 90 сутки. Активная пролиферация клеточных элементов периостальной зоны и дифференцировка их в остеобласты. Формирование сети костных трабекул и полей клеточно-волоконистой ткани с активным ангиогенезом. Окрашивание Ван-Гизон x100.

крупнопетлистых трабекул), которые будут подвергаться окончательной перестройке еще на протяжении длительного периода времени (**рис. 4**).

Введение аутологических СК из костного мозга в количестве 500 тысяч 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.

На 42 сутки после введения 1 миллиона аутологических СК с коллапаном на гистотопограммах согласно морфометрическим данным, из общей площади регенерата 6% занимали некротически измененные ткани, грануляционная ткань 4%, 40% – крупнопетлистая сеть костных трабекул, 30% – остеоидная ткань, 20% – бесклеточное поле, заполненное гомогенными эозинофильными массами.

Микроскопически на 42 сутки 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 которых была сращена мелкопетлистой сетью новообразованных костных балочек (**рис. 5**).

На 42 сутки 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 тысяч СК.

На 90 сутки после введения 1 миллиона аутологических СК с коллапаном на гистотопограммах из общей площади регенерата 1% занимают некротические ткани, клеточно-волоконистая ткань 15%, остеоидная ткань – 32%, 35% – мелкопетлистая сеть костных трабекул, 12% – крупнопетлистая сеть костных трабекул.

Микроскопически на 90 сутки 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 клеточно-волоконистая ткань, что свидетельствовало об интенсификации ангиогенеза (**рис. 6**).

Следовательно, на 90 сутки СК в дозе 1 млн. в сочетании с биоматериалом коллапаном оказывали существенное влияние на структурно-функциональные особенности клеточных элементов регенерата, их распределение и взаимоотношение с межклеточным веществом, что в свою очередь определяло

формирование тканевых структур и темпы восстановительных процессов.

Выводы. На основании сравнительного анализа репаративных процессов костной ткани нижней челюсти кроликов при введении 500 тысяч аутологичных СК из костного мозга уже на 42 сутки наблюдалось значительное увеличение клеточных элементов остеогенного характера за счет периостального костеобразования, по сравнению со 100 тысячами аутологичных СК из костного мозга, а также отсутствие зон некроза и секвестров, отграниченных грануляционной тканью и инфильтрированных лейкоцитами при введении 1 млн. аутологичных СК из костного мозга.

К 90 суткам после введения 500 тысяч аутологичных СК из костного мозга развитие остеогенеза имело самый выраженный характер, с интенсивным костеобразованием и восстановлением целостности кости нижней челюсти, с наличием сети мелкопетлистых и крупнопетлистых трабекул, по сравнению с остальными группами.

Наиболее целесообразным и перспективным для восстановления костных дефектов размера 3х3мм является введение аутологичных СК из

костного мозга в количестве 500 тысяч в сочетании с коллапаном, так как это создает благоприятные условия для более интенсивного развития остеогенеза, интенсификации пролиферативных процессов и процессов дифференциации по остеогенному типу.

Современное развитие биотехнологии, молекулярной и клеточной биологии позволяет рассматривать клетку не только как главный объект лечебного воздействия, но и как средство лечения многих заболеваний. Таким образом, несмотря на многие нерешенные вопросы относительно оптимального источника СК, их количества, путей и введения, исследование СК и их использование для клеточной терапии весомое экспериментальное обоснование, а также четкие перспективы и направления для дальнейшей разработки.

Перспективы дальнейших исследований. Дальнейшие исследования в этом направлении позволяют разработать эффективные протоколы применения СК в комплексном лечении больных генерализованным пародонтитом и определить четкие показания и противопоказания к их клиническому использованию.

Литература

1. Алексеева И. С. Первый опыт применения комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных стромальных клеток (МСК) 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. 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. Воложин А. И. Использование мезенхимальных стволовых клеток для активации репаративных процессов костной ткани челюсти в эксперименте / А. И. Воложин, А. Ю. Васильев, Н. Н. Мальгинов // Стоматология. – 2010. – № 1. – С. 10–14.
4. Грудянов А. И. Клеточные технологии в пародонтологии / А. И. Грудянов, ВЛ. Зорин, А. И. Зорина, И. И. Степанова // Стоматология. – 2009. – № 1. – С. 71–73.
5. Использование мезенхимальных стволовых клеток для восстановления межкорневых перегородок при хроническом пародонтите / Н. А. Боброва, Л. Я. Богашова, И. П. Ярынич-Бучинская [и др.] // Журнал АМН України. – 2010. – № 16. – С. 27–28.
6. Карпюк В. Б. К изучению свежесывороточных 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.
7. 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. Чуликова, С. З. Шарифуллина // Цитология. – 2008. – № 5, разд. 10. – С. 855-860.
8. Сергеев В. С. Иммунологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / В. С. Сергеев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005. – С. 39-42.
9. 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.
10. 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.

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

СПРЯМОВАНА РЕГЕНЕРАЦІЯ КІСТКОВИХ ДЕФЕКТІВ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ВІДРОСТКА З ВИКОРИСТАННЯМ СТВОЛОВИХ КЛІТИН КІСТКОВОГО МОЗКУ НА КОЛЛАПАНОВИЙ ПІДКЛАДЦІ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

Куцевляк В. Ф., Куцевляк В. І., Омельченко О. А., Забірник А. С., Циганова І. В.

Резюме. В результаті проведеного дослідження вивчені особливості динаміки регенерації кісткових дефектів нижньої щелепи на 16 кроликах породи Шиншила. Вводили стовбурові клітини, вилучені з кісткового мозку, у поєднанні з коллапаном в зону дірчастого дефекту 3х3 мм в кількості 100 тисяч, 500 тисяч, 1 мільйону. Встановлено, що направлена регенерація кісткових дефектів нижньої щелепи у експериментальних тварин

з введенням 500 тисяч стовбурових клітин кісткового мозку протікає найсприятливіше, без осередкового некрозу та зон секвестрації, порівняно і з введенням 100 тисяч і 1 мільйона тих же стовбурових клітин. Отже, для відновлення дефектів кісткової тканини доцільно використовувати не більш 500 тисяч стовбурових клітин, вилучених з кісткового мозку.

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

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

НАПРАВЛЕННАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ОТРОСТКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА НА КОЛЛАПАНОВОЙ ПОДЛОЖКЕ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Куцевляк В. Ф., Куцевляк В. И., Омельченко Е. А., Забирник А. С., Цыганова И. В.

Резюме. Данная статья является частью научно-исследовательской работы кафедры стоматологии и терапевтической стоматологии Харьковской медицинской академии последипломного образования по теме «Клиническое течение основных стоматологических заболеваний с учетом соматической патологии в условиях экологически опасных факторов окружающей среды. Разработка схем профилактики, лечения и реабилитации больных с использованием отечественных стоматологических материалов». Номер госрегистрации 0110U002440.

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 в сочетании с коллапаном, в зону дырчатого дефекта объемом 3x3 мм в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллиона. Установлено, что направленная регенерация костных дефектов нижней челюсти экспериментальных животных с введением 500 тысяч стволовых клеток, полученных из костного мозга, протекает наиболее благоприятно, без очагового некроза и зон секвестрирования, по сравнению с введением 100 тысяч и 1 миллиона тех же стволовых клеток. Следовательно, для восстановления дефектов костной ткани целесообразно использовать не более 500 тысяч стволовых клеток, полученных из костного мозга.

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

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

Directional Regeneration of Alveolar Bone Defects using Stromal Cells of Bone Marrow with Kollapan Substrate on Experimental Animals

Kutsevlyak V. F., Kutsevlyak V. I., Omelchenko E. A., Zabirnyk A. S., Tsyganova I. V.

Abstract. The problem of regeneration of bone is one of the oldest in the medical and biological science. In recent decades, due to environmental degradation, the powerful influence of stressors on the body, a reduction of bone regenerative capabilities and intensity of regenerative processes.

One promising new directions and correction of the regeneration process is the use of biologically-active tissue embryos – placenta complex and transplantation of stem cells of different origins:

Type 1 – is embryonic stromal cells. But the application of embryonic stromal cells may have an ethical issue plan.

Type 2 – abortive or fetal cells. Get them out of the 6-21-week-old fetuses removed during the operation of abortion.

Type 3 – stromal cell cord blood harvesting which occurs during childbirth. These cells are more specialized.

Type 4 – is their autologous stromal cells are derived from bone marrow and adipose tissue of the patient. In this case, removed all bioethical issues plan.

The first method of cell therapy, which entered into clinical practice, it is bone marrow transplantation. But since the 80s, it is widely used in the treatment of certain cancers and hematological diseases. It should be noted that the main role in the restoration of normal hematopoiesis after radiotherapy play just stem cells.

Stromal cells – the cells that retain the potential to develop in different directions. From stromal cells can arise from leather and nerve cells and blood cells. Previously it was believed that adult stromal cells are the body missing, that their existence is limited to the earliest period of embryonic development. However, – 70 years. have found these cells in the. mesenchyme(stroma) of the adult bone marrow. In affiliation to the stroma them later became known as stromal stromal cells.

Stromal cells constitute a significant recovery and reserve in the body and contribute to displacement defects that arise from these or other circumstances.

Inflammatory periodontal diseases occupy a great place in the pathology of the tooth system. According to various statistical sources, 80% of adults suffer from periodontal disease of varying severity. Modern dental science provides an integrated approach to treatment in which a major role is played by surgical methods. However, the failure rate when using traditional methods of treatment requires finding and developing new, more effective methods.

Using directional regenerate bone of the alveolar process with the addition of autologous stem cells in periodontal surgery in the treatment of chronic generalized periodontitis 2 and 3 degrees of severity will not only eliminate the inflammation in periodontal, but anatomically restore structural components of periodontal primarily alveolar bone.

Inflammatory periodontal diseases occupy a significant place in the pathology of the teeth- jaw system. According to various statistical sources, up to 80 percent of adults suffer from periodontal disease of varying severity.

Modern dental science suggests a comprehensive approach to treatment in which have major surgical techniques are currently for restorative treatment in such situations using autologous bone. Despite the convenience, benefits and prevalence of these agents, they are not universal because have significant limitations: nerve damage, pain, infection, limited donor material, etc.

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 100,000 and 1 million same stromal cells. Consequently, for restoring bone defect is advisable to use not more than 500,000 stem cells from bone marrow.

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

Рецензент – проф. Аветіков Д. С.

Стаття надійшла 05. 03. 2015 р.