

ного диабета и применение витаминов и микроэлементов для их лечения и профилактики / М. И. Балаболкин // Реф. сборник "Новости науки и техники". – Серия "Медицина". – вып. "Клин. Эндокринология". – 2006. – № 6. – С. 1-7.

8. **Прозапальна** дія ліпополісахариду на слизову оболонку порожнини рота щурів / Левицький А.П., Дем'яненко С.О., Макарєнко О.А. [та ін.] // Одеський медичний журнал. – 2010. – № 2 (118). – С. 9-11.

9. **Ступак Е. П.** Развитие дисбиоза и воспаления в десне крыс с аллоксановым диабетом / Е. П. Ступак, А. К. Николишин, О.А. Макарєнко, И. А. Селиванская // Вісник стоматології. – 2012. – № 6 (спецвыпуск). – С. 127.

10. **Ульянов А. М.** Инсулярная система животных при хроническом дефиците гепарина / А. М. Ульянов, Ю. А. Тарасов // Вопросы медицинской химии. – 2000. – Т. 46, № 2. – С. 149-154.

11. **Стальная И. Д.** Метод определения малонового диальдегида с помощью тиобарбитуровой кислоты. В кн.: "Современные методы в биохимии" / И. Д.

Стальная, Т. Г. Гаришвили – М.: Медицина, 1977. – С. 66-68.

12. **Биохимические** маркеры воспаления тканей ротовой полости: Метод. рекомендации / Левицкий А.П., Денга О.В., Макарєнко О.А. [и др.]. – Одесса, 2010. – 16 с.

13. **Гири С. В.** Модификация метода определения активности каталазы в биологических субстратах / С. В. Гири // Лабораторная диагностика. – 1999. – № 4. – С. 45-46.

14. **Левицкий А. П.** Лизоцим вместо антибиотиков / А. П. Левицкий – Одесса: КП ОГТ, 2005. – 74 с.

15. **Ступак Е. П.** Влияние пробиотиков на биохимические маркеры воспаления и антиоксидантной защиты в десне крыс с экспериментальным диабетом 2 типа / Е. П. Ступак // Укр. стомат. альманах. – 2012. – № 4. – С. 10-14.



УДК 611.018.4+616.716.4

**З. Ш. Какабадзе¹⁻³, д. мед. н., Г.Т. Менабде², д. мед. н., М. З. Какабадзе¹,
И. Д. Амиранашвили², д. мед. н.,
А. Н. Мачавариани², К. М. Мазмишвили²,
Т. М. Грдзелидзе², К. С. Шанава¹,
К. Ш. Чуткерашвили¹, Е.Р. Беришвили¹⁻³, д. мед. н.**

¹Кафедра клинической анатомии Тбилисского Государственного медицинского университета

²Научно-исследовательский медицинский институт Государственного университета им. Ильи

³Отделение трансплантации клеток и тканей Грузинского национального Института медицинских исследований г. Тбилиси, Грузия

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ ДЕЦЕЛЮЛЯРИЗОВАННОГО, ЛИОФИЛИЗИРОВАННОГО И РЕЦЕЛЮЛЯРИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ У КРЫС

Представленная работа касается возможности применения децелюляризованного, лиофилизированного и рецелюляризованного костного матрикса для хирургического лечения обширных костных дефектов.

Эксперимент проведен на крысах линии Lewis. В качестве костного матрикса для заполнения дефекта кости нижней челюсти использовали алло-трансплантат, полученный от крыс-доноров. После децелюляризации и лиофилизации рецелюляризацию костного матрикса проводили стволовыми клетками костного мозга.

Проведенные исследования показали, что через 1 месяц после трансплантации костный дефект был полностью закрыт вновь образованной костной тканью.

Ключевые слова: децелюляризация, рецелюляризация, костная ткань.

**З. Ш. Какабадзе, Г.Т. Менабде, М. З. Какабадзе, І. Д. Амїранашвілі,
А. Н. Мачаваріані, К. М. Мазмішвілі, Т. М. Грдзелідзе, К. С. Шанава,
К. Ш. Чуткерашвілі, Є. Р. Берішвілі**

Кафедра клінічної анатомії Тбіліського Державного медичного університету
Науково-дослідного медичний інститут Державного університету ім. Ілії
Відділення трансплантацій кліток і тканин Грузинського Національного
інституту медичних досліджень, м. Тбілісі, Грузія

МОЖЛИВІСТЬ ЗАСТОСУВАННЯ ДЕЦЕЛЮЛЯРИЗОВАНОГО, ЛІОФІЛІЗОВАНОГО І РЕЦЕЛЮЛЯРИЗОВАНОГО КІСТКОВОГО МАТРИКСУ ДЛЯ ЗАМІЩЕННЯ ДЕФЕКТІВ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ У ЩУРІВ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Представлена робота стосується можливості застосування децелюляризованого, ліофілізованого і рецелюляризованого кісткового матриксу для хірургічного лікування обширних кісткових дефектів.

Експеримент проведений на щурах лінії Lewis. Як кістковий матрикс для заповнення дефекту кістки нижньої щелепи використовували алло-трансплантат, отриманий від щурів-донорів. Після децелюляризації і ліофілізації рецелюляризацію кісткового матриксу проводили стволовими клітинами кісткового мозку.

Проведені дослідження показали, що через 1 місяць після трансплантації кістковий дефект був повністю закритий знов утвореною кістковою тканиною.

Ключові слова: децелюляризація, рецелюляризація, кісткова тканина.

**Z. Sh. Kakabadze, G. T. Menabde, M. Z. Kakabadze, I. D. Amiranashvili, A. N. Machavariani,
K. M. Mazmiashvili, T. M. Grdzeldize, K. S. Shanava, K. Sh. Chutkerashvili, E. R. Berishvili**

Department of Clinical Anatomy Tbilisi State Medical University
Scientific Research Institute of Medicine, Ilia State University
Division of Cell Transplantation and Tissue Engineering, Georgian National Institute of Medical Research
Tbilishi, Georige

REPLACEMENT OF LOWER JAW DEFECTS IN RATS BY DECELULARIZED, LYOPHILIZED AND RECELULARIZED BONE SCAFFOLD

This work concerns to the possibility of application of decelularized, lyophilized and recelularized bone scaffold for large defects replacement of flat facial bones and bones of the skull as well. The studies were performed on Lewis inbred rats. The bone matrix was obtained from donor rats. After decelularisation and lyophilization bone matrix was recelularized with bone marrow derived stem cells. Post operative studies have shown, that the lower jaw bone defect was completely filled with the newly formed bone tissue with large number of full-fledged blood vessels by the end of three weeks. At later time points (one month), the bone defect was completely obscured by the newly formed bone tissue. Thus we can conclude that the healing of bone injuries, characteristics and rate of regenerative process is directly related to osteoinductive and osteoconductive potency of biological material used in the experiment. The decelularized, lyophilized bone scaffold recelularized with bone marrow stem cells might serve as a biomaterial.

The aim of the study is to determine the possibility of the application of decellulased, frozen-dried and recellulased bone matrix from allotissue of lower jaw as the material for the replacement of defects in jaw.

The experimental studies have shown, that the healing of bone wound, peculiarities and the speed of the formation and the maturation of bone regenerate is connected directly to the osteoinductive and osteoconductive potential of the biomaterial, used in the experiment.

The initial studies have shown, that decellulased, frozen-dried and recellulased bone matrix can be used for the surgical treatment of extensive defects of not only flat bones of facial skeleton, but also the bones of calvarium in whole.

Key words: *detselyulyarization, Retselyulyarization, biomaterial.*

Пластическое замещение дефектов нижней челюсти является одной из важных проблем реконструктивной челюстно-лицевой хирургии [1, 2]. В последнее десятилетие для замещения дефектов нижней челюсти используются различные синтетические материалы, алло- и ксенотрансплантаты [3-6]. Широкое применение получили ауто трансплантации мягкотканно-

костных комплексов, содержащих ребро, гребень подвздошной кости, малоберцовую кость, фрагменты лучевой кости и наружного края лопатки [7, 8].

Цель исследования. Определить возможность использования в качестве материала для замещения дефектов челюсти децелюляризованного, лиофилизированного и рецелюляри-

рованного костного матрикса из аллоткани нижней челюсти.

Материал и методы. Эксперимент проведен на 30 белых лабораторных крысах обоего пола линии Lewis, массой 250-300 г. Для получения костного матрикса и стволовых клеток костного мозга животных-доноров умерщвляли методом введения летальных доз тиопентала натрия.

Донорский материал костного матрикса получали методом резекции нижней челюсти с экзартикуляцией, используя технику анатомического препарирования. Стволовые клетки костного мозга выделяли, вымывая костный мозг из эпифизов бедренных костей крыс. Полученную суспензию клеток культивировали до 1-го пассирования в среде DMEM, содержащей 20 % фетальной телячьей сыворотки (Sigma), затем культуру переносили на среду DMEM, содержащую 10 % фетальную телячью сыворотку (Sigma). На третьем пассаже культуру стволовых клеток костного мозга пассировали на децелюляризованный лиофилизированный костный матрикс. Через 24 часа среду меняли на остеогенную (среда DMEM с 10% фетальной телячьей сывороткой (Sigma), 0,01мкМ 1,25-дегидроксивитамина D₃ (Sigma), 50мкМ аскорбат-2 фосфата (Sigma), 10мМВ глицерофосфата (Sigma)). Клетки культивировали в течение 15 дней со сменой раствора через каждые 3 суток. Дифференцировку клеток оценивали по гистологической окраске на активность щелочной фосфатазы (NBT/VciP Stock Solution-Roche Diagnostics) и по окраске на кальцификацию внеклеточного матрикса (Alizarin RedS, Sigma).

Животным-реципиентам под общим ингаляционным эфирным наркозом моделировали костный дефект нижней челюсти. Скальпелем производили разрез кожи длиной 1,5-2 см по нижнему краю нижней челюсти. Тупым способом при помощи распатора отслаивали жевательную мышцу и обнажали поверхность кости нижней челюсти в области ее угла. Стоматологическим бором создавали дефект кости диаметром 4 мм, сообщающийся с полостью рта.

Созданный костный дефект восстанавливали децелюляризованным, лиофилизированным и рецелюляризованным костным матриксом.

Децелюляризация нижней челюсти. После тщательного отделения всех тканей от кости нижней челюсти донора, приступали к процессу децелюляризации. Кость промывали 20 мл 0,9 % физиологического раствора и замораживали при температуре -80⁰С в течение 24 часов. Замороженный материал оттаивали при 4⁰С в течение 6-8 часов. Далее объект помещали в специальный флакон, наполненный раствором PBS (Sigma).

Флакон фиксировали к шейкеру и мешали в течение 24 часов. Далее раствор PBS последовательно заменяли растворами: 0,1 % раствор SDS, 1 % раствор SDS, 3% раствор SDS и 5 % раствор SDS (Sigma). Не останавливая шейкер, промывание объекта проводили в течение 96 часов. Далее материал промывали 1% раствором Тритон X-100 (Sigma) в течение 24 часов для удаления остатков SDS. Децелюляризованную кость промывали PBS в течение 5 часов, после чего стерилизовали в 0,1 % растворе надуксусной кислоты (Sigma) в PBS в течение 3 часов. Далее объект промывали с PBS и хранили в стерильном PBS, содержащим антибиотики, при 4⁰С.

Децелюляризацию оценивали с помощью гистологических методов (окрашивание гематоксилин-эозином), а также на наличие ДНК.

Лиофилизация нижней челюсти. Лиофилизация децелюляризованной нижней челюсти проводилась на сушилке "QUARCO" Q-Technologies Group GmbH и состояла из 2-х этапов: глубокая заморозка объекта до -50⁰С и разморозка объекта в условиях вакуума.

Максимальный срок наблюдения за животными составил 3 месяца. В течение всего срока проводились рентгенологические, морфологические и лабораторные методы исследования. Животные выводились из эксперимента в различные сроки после операции – на 1, 3, 9, 15, 30, 60 и 90 сутки. Объектом исследования служили фрагменты нижней челюсти с искусственно созданным дефектом и трансплантированным костным матриксом.

Фрагменты челюсти фиксировали в 4 % растворе параформальдегида на фосфатном буфере (рН 7,4) не менее 24 часов. После фиксации их декальцинировали в растворе «Биодек R» (BioOptica Milano, Италия) в течение 24 часов, обезвоживали в серии этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. Срезы толщиной 5-7мкм окрашивали гематоксилином и эозином по Ван Гизону и изучали под световым микроскопом Opton (Германия) при увеличении до 800-1200. Проводили гистохимические и иммуногистохимические методы исследования.

Результаты исследования и их обсуждение. При проведении эксперимента из 30 животных выжили 29 (96,6 %). Одна крыса погибла на 2-е сутки после операции, что было связано с технической погрешностью операции. Остальные животные хорошо перенесли операцию и послеоперационный период. Функциональные результаты лечения оценивались по следующим критериям: открывание рта, жевание и глотание.

Рентгенологические методы показали, что дефект нижней челюсти уже практически не оп-

ределялся к концу первого месяца.

Проведенные гистоморфологические исследования показали, что в первые сутки в области искусственно созданного дефекта развивается воспаление, экссудация, миграция лейкоцитов, что влечет за собой отек тканей.

Начиная со 2-х суток, вместе с процессом разрушения, некроза погибших элементов наблюдается начало процесса восстановления, регенерации. Уже на 8-10 сутки на некоторых участках дефекта кости присутствовали фрагменты рыхлой волокнистой соединительной ткани и грануляции, сформированные отдельные островки молодой костной ткани.

К концу 3-ей недели дефект был полностью закрыт молодой костной тканью с большим числом полнокровных кровеносных сосудов.

К концу 1-го месяца костный дефект был полностью закрыт вновь образованной костной тканью.

Таким образом, экспериментальные исследования показали, что заживление костной раны, особенности и скорость образования и созревания костного регенерата напрямую связана с остеоиндуктивным и остеокондуктивным потенциалом использованного в эксперименте биоматериала.

Проведенные начальные исследования на этом этапе показали, что децеллюляризованный, лиофилизированный и рецеллюляризованный костный матрикс может быть применен для хирургического лечения обширных дефектов не только плоских костей лицевого скелета, но и костей свода черепа в целом.

Список литературы

1. **Wong R. C.** Effect of replacement of mandibular defects with a modular endoprosthesis on bone mineral density in a monkey model / Wong R. C., Lee S., Tideman H. [et al.] // *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* – 2011. – Vol. 40, N. 6. – P. 633-639.
2. **Mazzoleni G.** Reconstruction of the TM alJ and ramus in otomandibular dysplasia, by grafting of TMJ and homologous bone branch / Mazzoleni G., Cicognini A., Rizzo R. [et al.] // *Rev. Stomatol. Chir. Maxillofac.* – 2010. – Vol. 111, N. 2. – P. 94-97.
3. **Fülöp M.** Role of fibula in replacement of mandible / Fülöp M., Branzaniuc K., Kásler M. // *Magy Onkol.* – 2009. – Vol. 53, N. 3. – P. 259-262.
4. **Deleyiannis F.W.** Reconstruction of the through-and-through anterior mandibulectomy defect: indications and limitations of the double-skin paddle fibular free flap / Deleyiannis F.W., Rogers C., Ferris R.L. [et al.] // *J. Laryngoscope.* – 2008. – Vol. 118, N. 8. – P. 1329-1334.
5. **Adamopoulos O.** Nanostructured bioceramics for maxillofacial applications / O. Adamopoulos, T. Papadopoulos // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2007. – Vol. 18, N. 8. – P. 1587-1597.
6. **Warnke P. H.** The mechanical integrity of in vivo engineered heterotopic bone / Warnke P. H., Springer I. N., Acil Y. [et al.] // *Biomaterials.* – 2006. – Vol. 27., N. 7. – P. 1081-1087.
7. **The bone** formation in vitro and mandibular defect repair using PLGA porous scaffolds / Ren T., Ren J., Jia X., Pan K. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2005. – Vol. 15; 74, N. 4. – P. 562-569.
8. **Henkel K. O.** Repair of bone defects by applying biomatrices with and without autologous osteoblasts / Henkel K. O., Gerber T., Dörfling P. [et al.] // *J. Craniomaxillofac. Surg.* – 2005. – Vol. 33, N. 1. – P. 45-49.

