

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

**НАПРАВЛЕННАЯ РЕГЕНЕРАЦИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ОТРОСТКА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ СТВОЛОВИХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ НА КОЛЛАПАНОВОЙ ПОДЛОЖКЕ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ**

*В результате проведенного исследования изучены особенности динамики регенерации костных дефектов нижней челюсти на 16 кроликах породы Шиншилла. Вводили аутологичные стволовые клетки, полученные из жировой ткани в сочетании с коллапаном, в зону дырчатого дефекта объемом 3х3 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 жировой ткани, 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 полученных из жировой ткани.*

**Ключевые слова:** направленная регенерация, аутологичные стволовые клетки жировой ткани, коллапан.

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

Харківська медична академія післядипломної освіти

**СПРЯМОВАНА РЕГЕНЕРАЦІЯ КІСТКОВИХ ДЕФЕКТІВ АЛЬВЕОЛЯРНОГО ВІДРОСТКА З ВИКОРИСТАННЯМ СТВОЛОВИХ КЛІТИН ЖИРОВОЇ ТКАНИНИ НА КОЛЛАПАНОВОЙ ПІДКЛАДЦІ У ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН**

*В результаті проведеного дослідження вивчені особливості динаміки регенерації кісткових дефектів нижньої щелепи на 17 кроликах породи Шиншилла. Після введення стволових клітин, вилучених з жирової тканини, 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 стволових клітин жирової тканини протікає найсприятливіше, без осередкового некрозу та зон секвестрації, порівняно і з введенням 100 тисяч і 1 мільйона тих же стволових клітин, отже, для відновлення дефектів кісткової тканини доцільно використовувати не більш 500 тисяч СК ЖТ.*

**Ключові слова:** спрямована регенерація, аутологичні стовбурові клітини жирової тканини, коллапан.

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

Kharkiv Medical Academy of Postgraduate Education

**DIRECTIONAL REGENERATION OF ALVEOLAR BONE DEFECTS USING STROMAL CELLS OF ADIPOSE TISSUE WITH KOLLAPAN SUBSTRATE ON EXPERIMENTAL ANIMALS**

*The study examined features of the dynamics of regeneration of bone defects of the mandible 16 Chinchilla rabbits. Administered autologous stromal cells derived from adipose tissue in combination with kollapan in zone hole 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 adipose tissue 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 from adipose tissue.*

**Key words:** directed regeneration, autologous adipose stem cells, Collapan.

Воспалительные заболевания пародонта занимают значительное место в патологии зубочелюстной системы.

Однако процент неудач при использовании традиционной терапии требует поиска и разра-

ботки новых, более эффективных методик. Одним из новых перспективных направлений коррекции процесса регенерации является трансплантация стволовых клеток (СК) различного происхождения[1-3].

Ранее, в тканевой инженерии, использовали стромальные клетки костного мозга. Сейчас внимание привлекает жировая ткань, имеющая мезодермальное происхождение, в ней были обнаружены стромальные клетки, обладающие мультипотентными свойствами [5, 6, 8, 9].

По сравнению со стромальными клетками костного мозга (СК КМ) стромальные клетки жировой ткани (СК ЖТ) 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 исследования.** Изучить регенеративные возможности стволовых клеток, выделенных из жировой ткани у экспериментальных животных.

Изучить в эксперименте регенеративные способности костной ткани в зависимости от количества введенных аутологичных КС ЖТ.

**Материалы и методы исследования.** 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 три подгруппы по 4 кролика. Аутологичные стволовые клетки, полученные из жировой ткани, на коллапановой подложке вводили в зону дырчатого дефекта нижней челюсти кроликов основной группы в количестве соответственно по 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллион. 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.** Динамика структуры регенерации кости после введения 100 тысяч аутологичных СК ЖТ с коллапаном на 42 сутки прослеживалась следующим образом: после образования дырчатого дефекта и развития регенерата на 42 сутки на гистотопограммах нижней челюсти, согласно морфометрическим данным, некротические участки занимали 6 %, гематома 8 %, грануляционная ткань 54 %, остеоидная 20 %, мелкопетлистая сеть костных трабекул 12 %.

Микроскопически на 42 сутки зона дефекта расширилась, образуя в кости дефект с относительно ровными краями. Определялись участки деструкции в кортикальной пластинке по нижней поверхности ложа резца, значительная резорбция альвеолярного отростка. На отдельных участках прослеживалась выраженная лакунарная резорб-

ция фрагментов кости, очагово - и диффузно инфильтрированной лейкоцитами.

Участки новообразованной костной ткани выявлены в толще грануляционной ткани, разделяющей поле некроза (рис. 1).

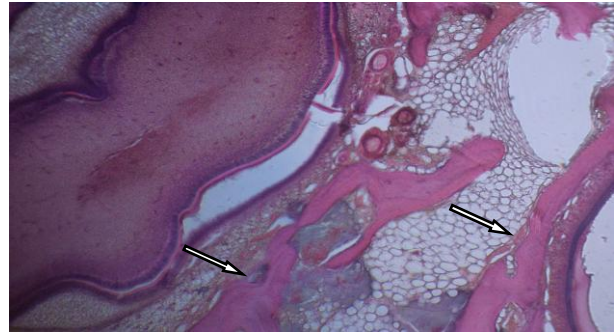


Рис. 1. Формирование новообразованной костной ткани в толще грануляционной ткани на 42 сутки после введения 100 тыс. СК с коллапаном. Окрашивание гематоксилин-эозин x 100.

В межблочных пространствах таких полей определялась хорошо васкуляризованная клеточно-волоконная ткань почти без лейкоцитарной инфильтрации.

Таким образом, в структуре регенерата преобладала клеточно-волоконная ткань с остеогенными потенциями, а участки остеогенеза обнаруживались по периферии регенерата, где сохранилось микроциркуляционное русло.

На 90 сутки на гистотопограммах остатки гематомы и некротических участков занимали 4 % площади регенерата, клеточно-волоконная ткань 60 %, мелко и крупнопетлистая сеть новообразованных костных трабекул – 36 %.

Микроскопически на 90 сутки в зонах некроза наблюдались узкие поля грануляционной ткани, чередовавшиеся с полями выраженной лейкоцитарной инфильтрации.



Рис. 2. Введение 100 тыс. СК с коллапаном на 90 сутки. Участки лакунарной резорбции с формированием участков новообразованной костной ткани по периостальной и эндостальной поверхности. Окрашивание Ван-Гизон x 100.

На отдельных участках, преимущественно вокруг фрагментов из пластинчатой кости определялась лакунарная резорбция с напластованиями новообразованной костной ткани по перистальной и эндостальной поверхности и очаговая лейкоцитарная инфильтрация грануляционной ткани, окружающей эти поля (рис. 2).

Таким образом, на 90 сутки в структуре регенерата кости преобладала клеточно-волоконная ткань с многочисленными капиллярами.

После введения 500 тысяч аутологичных СК с коллапаном на 42 сутки на гистотопограммах определялась зональность структуры регенерата с разделением на поверхностную и глубокую зоны.

В первой преобладала клеточно-волоконная ткань с многочисленными капиллярами, во второй обнаружена сеть новообразованных костных трабекул с многочисленными остеобластами на поверхности, и множество клеточных элементов и кровеносных сосудов в межтрабекулярных пространствах. В структуре регенерата 1 % – остатки гематомы в поверхностной зоне, 55 % – клеточно-волоконная ткань, 12 % – остеоидные и 32 % – новообразованные костные трабекулы (рис. 3).

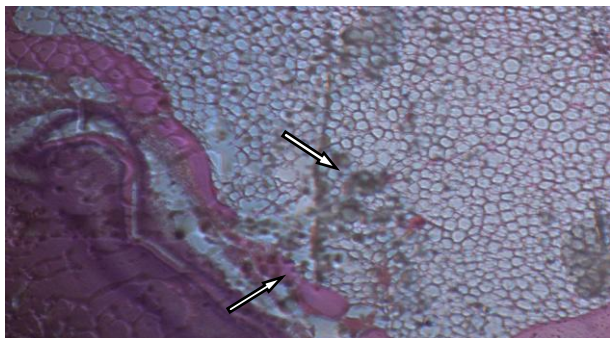


Рис. 3. Формирование клеточных элементов остеогенной направленности в зоне регенерата после введения 500 тыс. СК из жировой ткани с коллапаном на 42-е сутки. Окрашивание гематоксилин-эозин x 100.

Таким образом, в структуре регенерата преобладала клеточно-волоконная ткань, хорошо васкуляризованная, почти без лейкоцитарной инфильтрации, и зоны остеогенеза в глубоких отделах дефекта.

На 90 сутки на гистотопограммах клеточно-волоконная ткань составляла в структуре регенерата 8 %, а сеть остеоидных и новообразованных костных трабекул 92 %, причем 9 % из них крупно-петлистые. По периферии сети костных трабекул обнаруживалось формирование новообразований кортикального слоя, занимающего 7 %.

Микроскопически местами вокруг фрагментов из пластинчатой кости определялась лакунарная резорбция с пластами новообразованной костной ткани по перистальной и эндостальной

поверхности и очаговой лейкоцитарной инфильтрацией грануляционной ткани вокруг них (рис. 4).

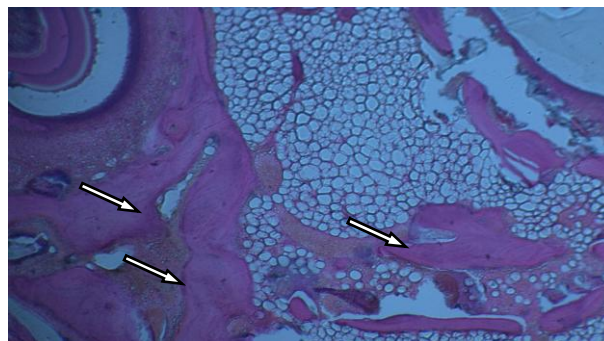


Рис. 4. Введение 500 тыс. СК из жировой ткани с коллапаном на 90 сутки. Участки лакунарной резорбции вокруг фрагментов пластинчатой кости с напластованиями новообразованной костной ткани в зоне регенерата. Окрашивание гематоксилин-эозин x 100.

Таким образом, в период с 42 до 90 суток определялось качественное изменение темпов остеогенеза со значительным увеличением новообразованных костных структур.

После введения 1 млн. аутологичных СКЖТ с коллапаном на 42 сутки на гистотопограммах 3 % составляли беспорядочно расположенные участки некроза и грануляционной ткани – 40 %, местами с интенсивно выраженной инфильтрацией, 8 % – клеточно-волоконная ткань, 10 % – остеоидная и 39 % – новообразованные костные трабекулы. Отмечалось уменьшение площади дефекта, преимущественно в верхних отделах. periosteal reaction по нижнему краю кортикальной пластинки ложа резца умеренная. Определялась резорбция альвеолярного отростка.

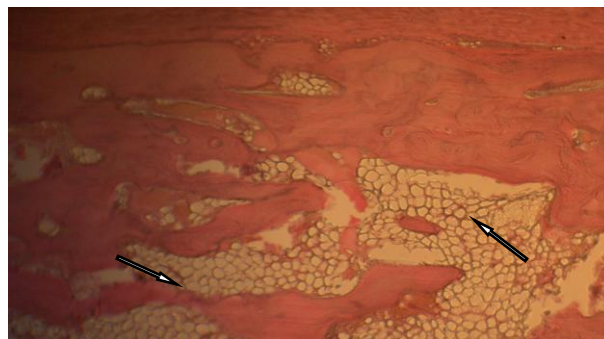


Рис. 5. Введение 1млн. СК из жировой ткани с коллапаном на 42 сутки. Формирование клеточных элементов с интенсивно оксифильной гомогенной цитоплазмой в зоне регенерата. Окрашивание Ван-Гизон x100.

Микроскопически обнаруживалась сформированная грануляционная ткань с узкими полями лейкоцитарной инфильтрации. На отдельных участках определялись фрагменты компактной костной ткани, в которой наряду с четко окрашенными остеócитами обнаруживались пустые

камеры. Поверхность костных фрагментов с большим количеством лакун резорбции во многих участках сращена с новообразованными костными балочками, которые местами формируют поля, либо переходят в участки остеогенной грануляционной ткани. В ней выявлено значительное количество клеток с ассиметрично расположенным ядром и интенсивно оксифильной гомогенной итоплазмой, что позволяет их отнести к преостеобластам (рис. 5).

На 90 сутки на гистотопограммах регенерат состоял из полей грануляционной ткани – 42 % и новообразованной костной ткани – 48 %, 10 % – участки некроза и секвестры, четко ограниченные грануляционной тканью, в отдельных местах инфильтрированной лейкоцитами в виде узких зон. На фоне множества новообразованных костных балочек, чаще спаянных с поверхностью фрагментов, наблюдались участки компактной костной ткани с отдельными безостеоцитными зонами, местами лакунами резорбции (рис. 6).

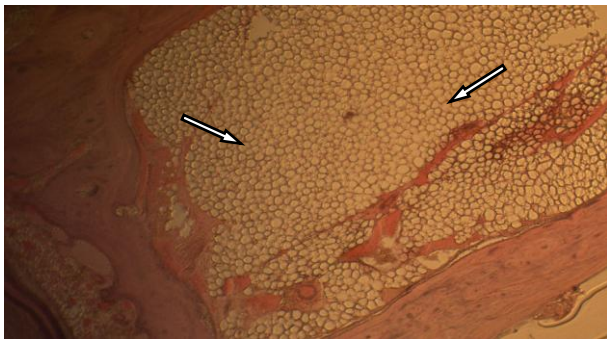


Рис. 6. Введение 1 млн. СК из жировой ткани с коллапаном на 90 сутки. Активная пролиферация клеточных элементов периостальной зоны и дифференцировка их в остеобласты. Окрашивание Ван-Гизон x100.

Таким образом, на 90 сутки продолжает сохраняться картина остеогенеза, описанная выше (на 42 сутки). В данной группе животных регенерация поврежденной нижней челюсти характеризовалась незначительными процессами некроза и инфильтрации тканей, некротические изменения составляли до 10 % на 90 сутки после введения 1 млн. СК ЖТ в сочетании с коллапаном.

Выводы. Следует отметить, что после введения 500 тысяч СК с коллапаном, объем некротических изменений уменьшился до 1 %, а на 90 сутки практически в структуре регенерата не определялся, при этом превалировала остеонидная и новообразованная костная ткань, которая составила 85 %. Введение СК в количестве 100 тысяч с коллапаном также стимулировало увеличение клеточно-волоконистой ткани и остеогенеза, однако к 90

суткам в зоне дефекта гематома и некротические ткани занимали 4 %, что подтверждается морфометрическими данными.

Анализ гистотопограмм показывает, что при введении СК ЖТ в сочетании с коллапаном в количестве 500 тысяч, определялись значительные сдвиги в остеогенном компоненте между 42 и 90 сутками, однако грануляционная ткань являлась наиболее активным компонентом регенерата во все сроки его формирования и ограничивала поля лейкоцитарной инфильтрации. При этом остеогенный компонент получил преобладающее развитие, однако восстановления целостности кости нижней челюсти на 90 сутки не произошло.

Таким образом, направленная регенерация костных дефектов нижней челюсти экспериментальных животных с введением 500 тысяч СК ЖТ 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 объемом целесообразно использовать не более 500 тысяч СК ЖТ.

### *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 / Волков А. В., Кулаков А.А., Григорьян А.С.[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 / 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 подкожножировой клетчатки, в клетки костной ткани / Ростовская М.С., Чуликова Н.И., Шарифуллина С.З., Тепляшин А. С. // Цитология. – 2008. – №5: – разд.10. – С. 855-860.
6. **Сергеев В. С.** Иммунологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток / В.С. Сергеев // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2005 – №. 3 – С. 39-42.
7. **Тракуев Д.О.** Стромальные клетки жировой ткани – пластический тип клеток, обладающих высоким терапев-

тическим потенциалом / Д.О. Трактуев, Е.В. Парфенова, В.А. Ткачук, К.Л. Марч // Цитология 2006 – №.2 – С. 83-94.

7. **Сао У.** Zhao human adipose tissue- derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo/ Sun Z, Iiao I., Meng Y., Han G // Biochem biophys res commun. – № 2005. – P. 370-379.

8. **Gimble J.M.** Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine / KatzAJ., Bunnell B.A. // Circulation Research/-№ 2007. – S. 100. – P.1249-1260.

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

Поступила 01.08.14



УДК.616.31:616.716.4-018.4-092.9-099:546.815

**В. Ф. Куцевляк, д. мед. н., Н. П. Бобровская**

Харьковская медицинская академия последипломного образования

### **ИЗМЕНЕНИЯ ЛАБОРАТОРНЫХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ В КРОВИ, МОЧЕ, ГОМОГЕНАТАХ КОСТНОЙ ТКАНИ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ И ЗУБАХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ПОВЫШЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ СВИНЦА**

*В работе экспериментальным методом атомно-абсорбционного анализа определена концентрация ацетата свинца в крови, моче, гомогенатах костной ткани нижней челюсти и зубах лабораторных животных. Установлено, что в течение месяца затравки 1 % раствором ацетата свинца значительно достоверно увеличивается концентрация его в опытной группе животных по сравнению с контролем.*

**Ключевые слова:** хроническая свинцовая интоксикация, ацетат свинца, гомогенат костей нижней челюсти и тканей зубов, кровь, моча.

**В. Ф. Куцевляк, Н. П. Бобровська**

Харківська медична академія післядипломної освіти

### **ЗМІНИ ЛАБОРАТОРНИХ ПОКАЗНИКІВ У КРОВІ, СЕЧІ, ГОМОГЕНАТАХ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ НИЖНЬОЇ ЩЕЛЕПИ ТА ЗУБАХ ЩУРІВ В УМОВАХ ПІДВИЩЕНОГО ВМІСТУ СВИНЦЮ**

*У роботі експериментальним методом атомно-абсорбційного аналізу визначена концентрація ацетату свинцю в крові, сечі, гомогенатах кісткової тканини нижньої щелепи та зубах лабораторних тварин. Встановлено, що на протязі місяця згодовування 1 % розчину ацетату свинцю значно достовірно збільшується концентрація його в піддослідній групі тварин порівняно з контролем.*

**Ключові слова:** хронічна свинцева інтоксикація, ацетат свинцю, гомогенат кісток нижньої щелепи та тканин зубів, кров, сеча.

**V. F. Kutsevlyak, N. P. Bobrovska**

Kharkiv Medical Academy of Post-graduate Education

### **CHANGES IN LABORATORY PARAMETERS IN BLOOD, URINE, HOMOGENATES OF BONE OF THE LOWER JAW AND TEETH OF RATS IN HIGH LEAD CONTENT**

*The ability to accumulate in biological objects and included in the food chain, the toxic effect of even small doses of lead on human and animal necessitate in-depth evaluation of lead dangers to human health and the study of its action on the organs and tissues. The aim of this study was experimental research of degree of accumulation of lead in the hard tissue of teeth and mandible laboratory animals during the month of chronic lead intoxication and their effects on laboratory parameters of blood and urine.*

**Material and methods.** Experiments were conducted on 20 white rats. It has been experimentally established by atomic absorption analysis, the concentration of acetate of lead in blood, urine, homogenates of bone of the lower jaw