

РЕНТГЕНОЛОГИЧЕСКОЕ И МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
АУТОЛОГИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ
В ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ПАРОДОНТА

У.Р. Мирзакулова, В.П. Русанов, Г.Т. Ермуханова, К.С. Бименов, Ж.Б. Ахметов,
М.Р. Рысулы, Б.А. Амантаев

Кафедра хирургической стоматологии,
Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова,
г. Алматы, Республика Казахстан

Резюме. Изучена рентгенологическая и морфологическая картина течения репаративного остеогенеза на полученной модели экспериментального пародонтита у кроликов с пластикой послеоперационной костной полости композитным трансплантатом на основе костного коллагена, гидроксилатапата и аутологичных стволовых клеток

Ключевые слова: экспериментальный пародонтит, костный коллаген, гидроксилатапатит, стволовые клетки, репаративная регенерация.

ROENTGENOLOGIC AND MORPHOLOGICAL PROOF OF APPLICATION
OF AUTOLOGICAL STEM CELLS OF FATTY TISSUE IN SURGICAL TREATMENT
OF EXPERIMENTAL PARODONT

U.R. Mirzakulova, V.P. Rusanov, G.T. Ermukhanova, K.S. Bimenov,
Zh.B. Akmetov, M.R. Rysuly, B.A. Amantaev

Kazakh National Medical University named after S.D. Asfendiyarov,
Almaty, Republic of Kazakhstan

Summary. An X-ray and morphological pattern of the course of reparative osteogenesis was studied in the obtained model of experimental periodontitis in rabbits with plasty of the postoperative bone cavity with a composite graft based on bone collagen, hydroxylapatite and autologous stem cells

Key words: experimental periodontitis, bone collagen, hydroxylapatite, stem cells, reparative regurgitation.

Актуальность

Пластика костных дефектов, возникающих в результате воспалительно-деструктивных процессов в тканях пародонта, остается до сих пор не в полной мере разрешенной проблемой, вследствие большой их распространенности и разнообразия форм патологии. При этих заболеваниях процессы репаративного остеогенеза протекают в большинстве случаев в условиях непрерывно текущего хронического воспалительного процесса на фоне резко нарушенной микроциркуляции крови, а вследствие этого, выраженной тканевой гипоксии, что приводит к значительному снижению остеорепаративной функции костной ткани [1].

Важнейшим условием в комплексном лечении генерализованного пародонтита является обеспечение оптимальных процессов репаративной регенерации костной ткани альвеолярного отростка челюсти, утраченных в результате воспалительной резорбции. Обнадеживающего лечебного эффекта при лечении генерализованного пародонтита можно достичь только лишь при использовании в качестве оптимизаторов репаративной

регенерации различных остеопластических материалов, обладающих выраженными остеоиндуктивными свойствами, слабой антигенностью, пластичностью, быть не токсичными и устойчивыми к инфекции [2].

В современной регенеративной медицине на лидирующие позиции выходят исследования в области клеточной биологии, направленные на изучение стволовых клеток, обладающих способностью к самообновлению путем асимметричного деления и дифференцировке *in vivo* и *in vitro* более чем в 200 различных клеточных типов [3, 4].

Трансплантируемые стволовые клетки, обеспечивающие непосредственное восстановление костной ткани, представляют собой культуру остеогенных клеток-предшественников, которые могут быть получены путем направленной дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга, жировой ткани или других источников, таких, как надкостница, селезенка, тимус, плацента и др. [4]. Одним из перспективных источников ММСК является жировая ткань (ЖТ). Исследования иммунофенотипа ММСК из жировой ткани и

красного костного мозга показали, что они практически идентичны друг другу. Однако жировая ткань обладает значительными преимуществами, важными из которых являются сравнительная доступность, простота и безопасность их получения, в сравнении с методиками забора стволовых клеток из других источников [5].

Цель исследования – Изучить в эксперименте эффективность аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани кролика при пластике краевых дефектов альвеолярного отростка.

Задачи:

1. Получить модель экспериментального локального пародонтита у кроликов.
2. Получить мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) из жировой ткани кролика и использовать их для пластики костной полости при экспериментальном пародонтите.
3. Разработать новый трансплантационный материал на основе ММСК из жировой ткани кролика, костного коллагена и гидроксилапатита.
4. Изучить рентгенологические и морфологические особенности заживления краевого дефекта альвеолярного отростка при его пластике разработанным трансплантатом.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование произведено на 18 кроликах породы «Шиншилла» весом 3500-4500 грамм, которым на первом этапе эксперимента воспроизводился локальный пародонтит. Животные разделены на две равные группы – контрольная и подопытная. У подопытных животных сразу после наложения проволочных лигатур забирался жир из большого сальника, расположенного на передней поверхности поперечно-ободочной кишки брюшной полости кролика, помещался в раствор Хенкса и отправлялся в лабораторию «Антиген» для приготовления мультипотентных мезенхимальных стромальных (стволовых) клеток (ММСК). Спустя две недели после наложения лигатур в области развившегося локального пародонтита формировался костный дефект в межкорневой перегородке центральных резцов нижней челюсти диаметром 2 мм и проводилась операция – остео-гингивопластика. В контрольной группе животных послеоперационная костная полость заполнялась композитным трансплантационным материалом на основе костного коллагена и гидроксилапатита в равных весовых пропорциях, замешанных на аутокрови кролика. В опытной группе животных

костный дефект замещался композитным материалом, отличающимся от биокompозита, применяемого в контрольной группе тем, что в него дополнительно вводилась взвесь культуры аутологичных ММСК жировой ткани, полученная в лаборатории ТОО «Научно-производственное предприятие «Антиген» с концентрацией 1 миллион клеток в 1 см³. Введённый в костный дефект трансплантационный материал в обеих группах животных покрывался коллагеновой мембраной. В послеоперационном периоде проводилось динамическое изучение клинического течения послеоперации – остеогингивопластики.

Кролики выводились из опыта на 15, 30 и 90-е сутки после операции. Выпиленные костные блоки из области операции фиксировались в 10% растворе нейтрального формалина, и проводилось рентгенологическое исследование на цифровом рентгенаппарате Titan 2000-V с записью на диске. Затем блоки декальцинировались в азотной кислоте, обезживались в спиртах, заливались в парафин и проводились серийные срезы толщиной 10-12 микрон. Срезы окрашивались гематоксилин-эозином и по Ван-Гизону.

Результаты и обсуждение

Клинические наблюдения послеоперационного периода в обеих группах животных показали, что спустя сутки после оперативного вмешательства – остеогингивопластики определялся умеренный отек мягких тканей, который постепенно увеличивался и достигал максимальных размеров к третьим суткам. Затем послеоперационный отек мягких тканей постепенно уменьшался и полностью исчезал в контрольной группе к 9 суткам, в подопытной же группе к 6 суткам. Послеоперационные раны в контрольной группе животных зажили первичным натяжением на 11 сутки, а в подопытной группе на 8 сутки после операции. В последующие сроки наблюдения за животными не выявили какого-либо отличия в клиническом течении

Экспериментально-рентгенологическое и морфологическое исследование.

Рентгенологические исследования, проведенные нами в различные сроки после операции, позволили в динамике проследить регенеративные процессы в области образованного дефекта в зоне экспериментально воспроизведенного пародонтита.

Через 15 суток после операции в контрольной группе животных определяются сравнительно четкие контуры посттравматического дефекта округлой формы диаметром 2 мм (рис. 1). Спустя 15 суток после операции в подопытной группе

кроликов отмечалась нечеткость контуров дефекта за счет остеопороза материнской кости в виде узкой полоски, а в дефекте кости определялись хорошо выраженные тени неправильной

формы, характерные для новообразованного регенерата (рис. 2).



Рис. 1. Рентгенограмма макропрепарата фрагмента нижней челюсти кролика.
Контрольная группа – 15 суток после операции



Рис. 2. Рентгенограмма макропрепарата фрагмента нижней челюсти кролика.
Подопытная группа – 15 суток после операции.

Спустя 30 суток после операции в контрольной группе животных костный дефект прослеживался еще сравнительно четко на всем протяжении и только в периферической зоне послеоперационной костной полости определялась тень новообразованного костного регенерата с низкой плотностью и структурированностью (рис. 3). У под-

опытных же животных к 30 суткам послеоперационный костный дефект значительно уменьшался в размере. Контур костной полости были нечеткими за счет полосы новообразованного регенерата, прорастающего со стороны материнской кости. Плотность тени постепенно снижалась в направлении от периферии к центру (рис. 4).

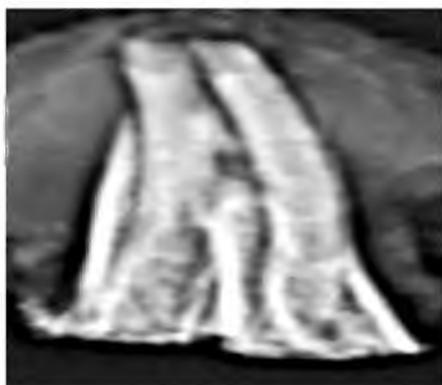


Рис. 3. Рентгенограмма макропрепарата нижней челюсти кролика.
Контрольная группа – 30 суток после операции.

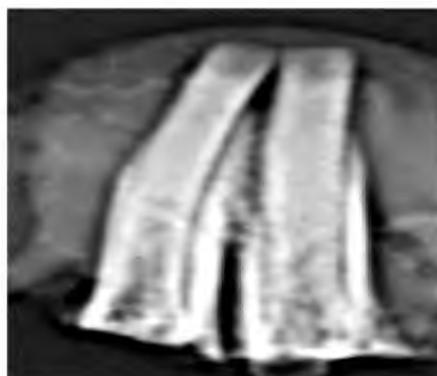


Рис. 4. Рентгенограмма фрагмента нижней челюсти кролика.
Подопытная группа – 30 суток после операции.

Через 3 месяца в контрольной группе кроликов дефект сократился в размере за счет интенсивной тени новообразованной костной ткани в периферических ее отделах. В остальной части бывшей костной полости тень регенерата еще сравнительно низкой плотности (рис. 5). У подопытных

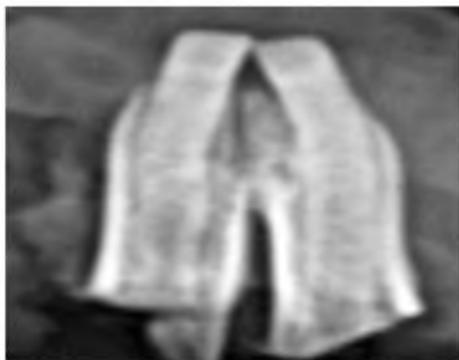


Рис. 5. Рентгенограмма макропрепарата фрагмента нижней челюсти кролика. Контрольная группа – 90 суток после операции.

же животных к 90 суткам определить место бывшего дефекта не представлялось возможным. На протяжении предсуществующего дефекта определялась зрелая костная ткань (рис. 6).

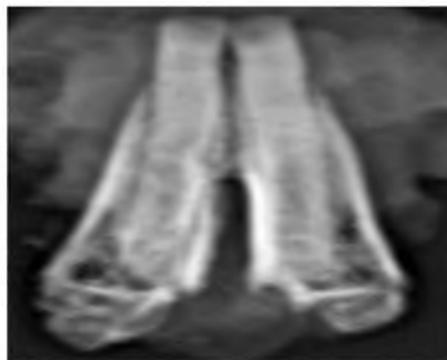


Рис. 6. Рентгенограмма макропрепарата фрагмента нижней челюсти кролика. Подопытная группа – 90 суток после операции.

Результаты морфологического исследования

На 15 сутки от начала эксперимента большая часть послеоперационного дефекта заполнена грануляционной тканью, содержащей в своем составе многочисленные кровеносные сосуды и волокнистые структуры молодой волокнистой соединительной ткани с дифференцирующимися клеточными элементами. Вокруг костного дефекта отмечается декомпозиция остеонов с утратой обычных тинкториальных свойств, в остеоцитах обнаруживаются признаки дистрофии с кариолизом и кариопикнозом. Среди клеток появляются тонкие коллагеновые волокна, слабо окрашивающиеся по методу Ван-Гизона. По периферии грануляционной ткани появляются

слабо выраженные хондройдные структуры. В этой зоне гаверсовы каналы расширены, сосуды полнокровны, местами в виде полостей неопределенной формы. Резорбтивные процессы со стороны материнской кости слабо выражены, здесь появляются группы остеокластов, с очагами пазушного и лакунарного рассасывания стенок полостей и лакун. Последние начинают заполняться молодым окрашенным гематоксилином в розовый цвет хондройдным и костным веществом. Остаточные микрофрагменты биокомпозита темно-синего цвета располагаются в основном в центральных отделах дефекта небольшими скоплениями (рис. 7, 8).

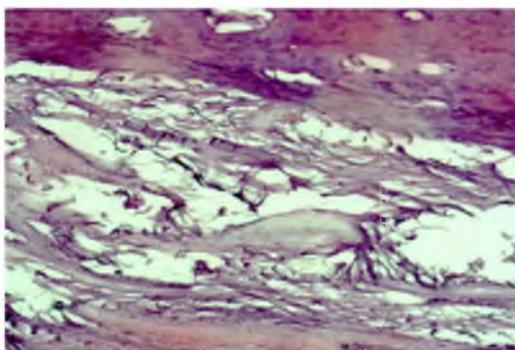


Рис. 7. Вновь образованные клеточно-волоконные структуры и остатки биокомпозита, заполняющие костный дефект. Контрольная группа животных, 15 сутки. Окраска гематоксилин-эозин x100.

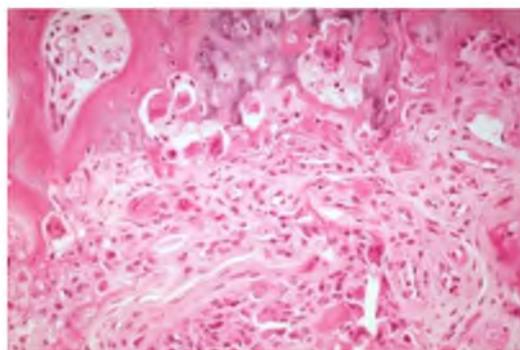


Рис. 8. Преобладание рыхлой соединительной ткани в центре костного дефекта на фоне многочисленных тонкостенных кровеносных капилляров. Контрольная группа животных, 15 сутки. Окраска гематоксилин-эозин x100.

Через 30 суток от момента операции по центральной части костного дефекта выявляется крупные очаги разрастания грубой клеточно-волокнутой соединительной ткани с волокнистыми структурами, которые окрашиваются пикрофуксином по Ван-Гизону в насыщенно красные тона препаратов. Среди клеточно-фиброзной волокнистой ткани в периферических частях костного дефекта появляются хондроидные структуры. В центре костного регенерата формируются костные балочные структуры без четкой остеонной ориентации, которые, соединяясь друг с другом, образуют молодые

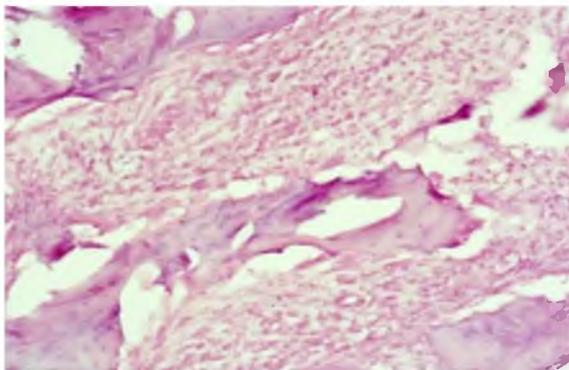


Рис. 9. Несформированная фибро-остеоидная ткань в полости дефекта. Контрольная группа, 30 суток. Окраска гематоксилин-эозин x100.

трабекулярные структуры. Резорбтивные процессы с участием остеокластов со стороны материнской кости становятся менее выраженными. В стенке полостей и лакун появляются очаги молодого костного вещества. В межбалочном пространстве формируются очаги фиброзной ткани с малочисленными клеточными элементами. Процессы репаративного остеогенеза выражены слабо. Остеобласты слабо дифференцированы и имеют мозаичное расположение в формирующихся участках молодой костной ткани (рис. 9, 10).

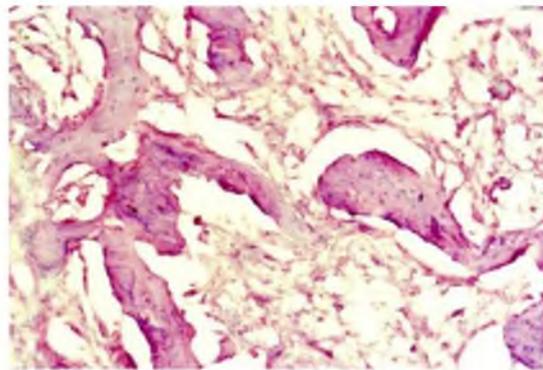


Рис. 10. Широкие межтрабекулярные пространства заполнены клеточно-волокнутой соединительной тканью с наложениями остеоида. Контрольная группа, 30 суток. Окраска гематоксилин-эозин x100.

На 90 сутки костный дефект полностью заполнен грубой костной тканью в периферической части дефекта. Пласты костного регенерата представлены толстыми трабекулами. В центральных отделах костного дефекта еще определяются участки остеоидной ткани, без процессов минерализации, остеонные системы слабо развиты, костные трабекулы расположены

хаотично. Костный регенерат, заполняющий послеоперационный дефект, продолжает претерпевать дальнейшую перестройку, отмечается частичная компактизация новообразованного костного вещества, костный матрикс грубоволокнистый. В центральной части регенерата костный матрикс приобретает пластинчатое строение (рис. 11).

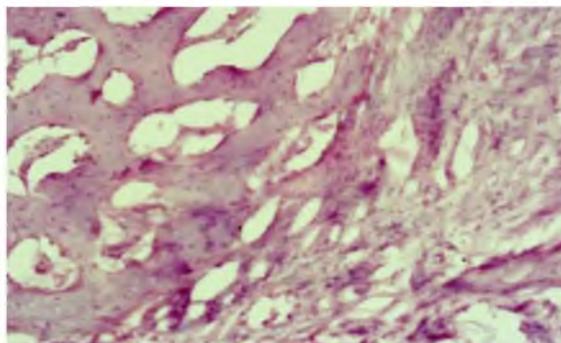


Рис. 11. Костный дефект заполнен толстыми трабекулярными структурами и грубой волокнутой соединительной тканью с хаотично расположенными кровеносными сосудами. Контрольная группа животных, 90 суток. Окраска гематоксилин-эозин x200.

Через 15 суток в подопытной группе кроликов центральная часть костного дефекта заполнена зрелой клеточно-волокнутой соединительной тканью, которая окрашивается в ярко-красный цвет по методу Ван-Гизона, в составе которой еще много мелких сосудов и клеточных элементов типа макрофагов, лимфоцитов и фибробластов. Отдельные микрофрагменты биокомпозита обнаруживаются в краевых отделах дефекта. На периферии этих очагов появляются фокусы созревания грануляций с формированием зрелой соединительной ткани, растущей из периферических зон со стороны костной ткани, окружающей костный дефект. В материнской кости на границе с дефектом кости новообразованные костные структуры находились на различных стадиях дифференцировки с образованием хондроидных

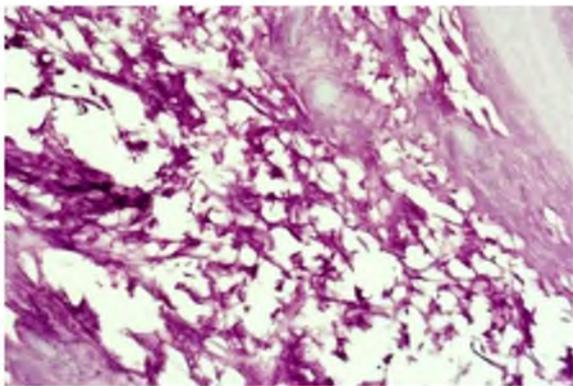


Рис. 12. Фиброзные и остеоидные структуры по краю костного дефекта.
Опытная группа животных, 15 сутки.
Окраска гематоксилин-эозин x100.

К 30 суткам костный дефект полностью замещен новообразованными костными структурами, преимущественно представленными вновь образованными молодыми трабекулами. Матрикс костной ткани приобретал фиброзный характер. В центральной части формируется тонковолокнистый пластичный костный матрикс, костные пластинки имели незрелый характер, беспорядочно ориентированные, местами с образованием концентрических структур вокруг капилляров.

В структуре костной ткани идут процессы дальнейшей перестройки за счет значительного снижения доли фиброзного матрикса. На периферии костного регенерата появлялись трабекулярные структуры, вследствие чего регенерат становится более мощным и зрелым. На границе с костью альвеолярного отростка (край дефекта) нередко обнаруживались компактно расположенные вновь сформированные остеоны. Ближе к стенке дефекта костный регенерат проявлял тенденцию

участков и сети новообразованных костных балочек. Костные края дефекта неровные и заполнены новообразованным костным веществом. Перестройка в зоне костного дефекта сопровождается образованием широкопетлистых костных трабекул в пристеночной области послеоперационной полости. В зонах, прилегающих материнской кости, отмечалось расширение сосудистых и нутритивных каналов, а также определялось наличие расширенных костно-мозговых пространств. В этих зонах появлялись новообразованные костные вещества, возникшие вследствие процессов репаративного остеогенеза. Широкие межтрабекулярные пространства были заполнены рыхлой соединительной тканью с большим числом костных элементов (рис. 12, 13).

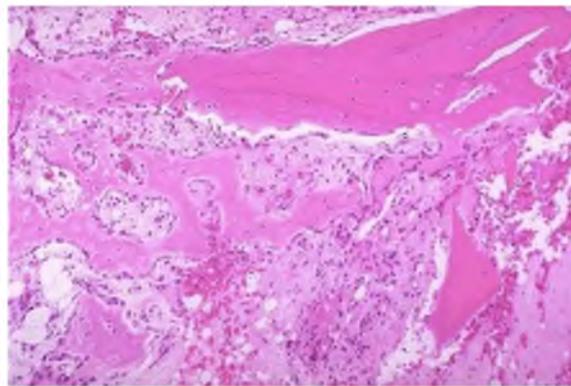


Рис. 13. Заполнение костного дефекта фиброзно-хондроидной тканью.
Опытная группа животных, 15 сутки.
Окраска гематоксилин-эозин x100.

к компактизации, появлялись трабекулярные структуры с толстыми костными балками и неравномерным расположением остеонов. В межбалочном пространстве нередко обнаруживались участки жирового костного мозга. Процессы костеобразования перемещались от края полости к ее центру. В процессе созревания костных структур появлялись хорошо минерализованные костные пластинки с многочисленными линиями склеивания, ориентированные в одном направлении с сосудистыми каналами, вследствие чего границы регенерата и материнской кости становились малозаметными (рис. 14, 15).

Спустя 90 суток в опытной группе кроликов гистологически определить место костного дефекта в альвеолярном отростке нижней челюсти

становится невозможным, так как структуры костного регенерата и материнской кости составляют единое целое (рис. 16).

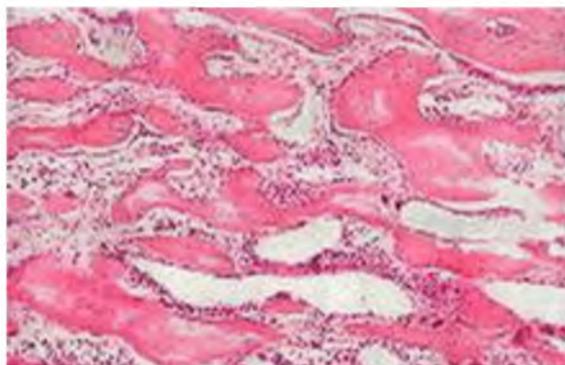


Рис. 14. Костные пластинки беспорядочно ориентированы, уменьшение площади фиброзного матрикса.

Опытная группа животных, 30 сутки.

Окраска гематоксилин-эозин x100.

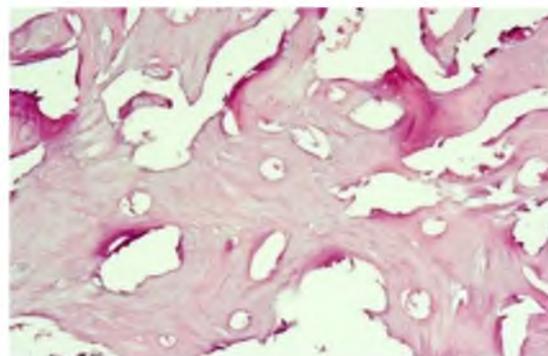


Рис. 15. Плотность бывшего костного дефекта заполнена незрелой костной тканью с пластинчатым строением, с участками фиброзного матрикса.

Опытная группа, 30 сутки,

окраска гематоксилин-эозин x100.

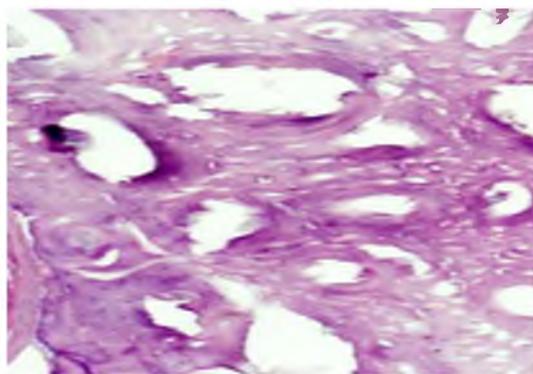


Рис. 16. Зрелая новообразованная костная ткань с участками оссификации, сливающимися с материнской костной тканью по краю дефекта.

Опытная группа животных, 90 сутки, Окраска гематоксилин-эозин x100.

Таким образом, результаты рентгенологического исследования показали, что более интенсивная репаративная регенерация в послеоперационной костной полости наблюдалась в подопытной группе животных, где костный дефект заполнялся композитом на основе аутологичных мультипотентных мезинхимальных стромальных клеток жировой ткани, костного коллагена и гидроксилапатита. В этом случае зрелая костная ткань была сформирована к 90 суткам от начала эксперимента. В контрольной же группе кроликов, спустя 90 суток после создания костной полости и пластики ее биокompозитом на основе костного коллагена и гидроксилапатита, регенераторный процесс к этому сроку еще далек от завершенности.

Результаты морфологического исследования свидетельствуют, что введение в состав биокompозита стволовых клеток из аутологической жировой ткани в опытной группе животных интенсифицирует все этапы репаративной регенерации костной ткани в области костного дефекта, начиная с формирования фиброзно-волокнистой, хрящевой и остеонной ткани, заканчивая образованием полноценной костной ткани.

Литература

1. Комплексный подход к планированию лечения заболеваний пародонта фактором роста / [А.И. Мусиенко, С.И. Мусиенко, Д.В. Кушнир и др.] // *Стоматология Казахстана*. - 2014. - №3-4. - С. 67-68.
2. Комплексное лечение пациентов с генерализованным пародонтитом / [Т.Н. Модина, Ю.Ю. Вольвач, Б.В. Кащеев и др.] // *Клиническая стоматология*. - 2015. - №2. - С. 14-17.
3. Клинико-экспериментальное обоснование использования комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани у пациентов с выраженным дефицитом костной ткани челюстей / [И.С. Алексеева, А.В. Волков, А.А. Кулаков и др.] // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. - 2012. - №1. - С. 97-105.
4. Francis J. Hughes. *Mesenchymal Stem Cells and Periodontal Regeneration* // *Hughes Curr Oral Health Rep.* - 2014. - №1. - P. 1-8.
5. Ткане-инженерная конструкция на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани и материала «Остеоматрикс» для регенерации костной ткани / [Т.Б. Бухарова и др.] // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. - 2011. - №3. - С. 167-170.