

## ВІДГУК

Офіційного опонента, доктора медичних наук, професора Скрипникова Петра Миколайовича, завідувача кафедри післядипломної освіти лікарів-стоматологів Вищого державного навчального закладу України «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ України, м. Полтава, на дисертаційну роботу Циганової Ірини Валеріївни «Обґрунтування застосування остеопластичних аутологічних біоматеріалів у комплексній терапії хворих хронічним генералізованим пародонтитом», подану на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.00.21 – «Стоматологія» у спеціалізовану раду Д 41.563.01 в Державній установі «Інститут стоматології НАМН України» за адресою: 65026, м. Одеса, вул. Рішельєвська, 11.

### Актуальність теми

Успіх комплексного лікування запальних деструктивних захворювань пародонту багато в чому визначається процесами репаративної регенерації кісткової тканини пацієнта. Причин невдалого лікування таких хворих багато, але деякі з них свідчать про те, що шляхи їх подолання складаються як в удосконаленні технології самого хірургічного втручання, так і в створенні оптимальних умов для регенерації кісткової тканини. Тому необхідні розробки нових, більш ефективних методик, що досліджено низкою авторів (Куцевляк В.И., Куцевляк В.Ф., 2004, 2009, Pong L., 2011, Чумакова Ю.Г., 2012, Скрипников П.М., 2013).

Одним з таких перспективних напрямів корекції процесу регенерації є трансплантація стовбурових клітин різного походження (Деев Р.В., 2007, Петровський Я.Л., 2009).

Актуальним завданням сучасної стоматології є вивчення метода направленої регенерації кісткової тканини альвеолярного відростка з додаванням аутологічних стовбурових клітин на скаффолдах у пародонтальній хірургії при лікуванні генералізованого пародонтиту II та III ступеня тяжкості, що дозволить не тільки усунути запальний процес, але і анатомічно відновити

структурні компоненти пародонту, в першу чергу, альвеолярну кістку (Перова М.Д., 2007, Салютин Р.В., 2011), що й послужило основою даної дисертаційної роботи.

Ступінь обґрунтованості наукових положень висновків і рекомендацій, сформульованих у дисертації, їх достовірність і новизна.

Дисертаційна робота є фрагментом комплексної науково-дослідної роботи кафедри стоматології та терапевтичної стоматології Харківської медичної академії післядипломної освіти: «Клінічний перебіг основних стоматологічних захворювань з урахуванням соматичної патології в умовах екологічно-небезпечних факторів довкілля. Розробка схем профілактики, лікування та реабілітації хворих з використанням вітчизняних матеріалів» (№ ДР 0110U002440). Здобувач була співвиконавцем фрагмента вищевказаної теми.

Дисертаційна робота Циганової І.В. побудована по традиційному плану, складається зі вступу, аналітичного огляду літератури, ; розділів власних досліджень, аналізу та узагальнення отриманих результатів, висновків, практичних рекомендацій, додатків і списку використаних джерел з 270 найменувань, з них 141 кирилицею, 129 латиницею, ілюстрація роботи зроблена за допомогою 6 таблиць, 89 рисунків.

Автором поставлена мета – підвищення ефективності хірургічного етапу комплексного лікування хворих на генералізований пародонтит шляхом застосування аутологічних стовбурових клітин, як стимулятора остеогенезу.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано 5 завдань, для їх рішення були використані: експериментальні методи (на тваринах) для вивчення транспортних властивостей остеопластичних матеріалів як скаффолдів; порівняльного аналізу процесів загоєння кісткових дефектів при використанні стовбурових клітин; морфологічних змін кісткової тканини щелепи кролика, залежно від кількості введених аутологічних стовбурових клітин і способу їх отримання (з кісткового мозку або жирової тканини); клінічні - для оцінки стоматологічного статусу хворих, стану тканин пародонту

за допомогою апаратно-діагностичного комплексу Florida-probe; панорамна рентгенографія; статистичні - для оцінки достовірності отриманих результатів.

Наукова новизна полягає у тому, що автором вперше в Україні на підставі експериментальних досліджень вивчені транспортні властивості восьми остеопластичних матеріалів як скаффолдів. Встановлено, що найкращими транспортними властивостями володіє Коллапан.

Вперше проведено порівняльний аналіз процесу загоєння кісткових дефектів щелепи при застосуванні остеопластичних матеріалів з додаванням аутологічних стовбурових клітин з кісткового мозку кролика.

Вперше обґрунтовано і експериментально підтверджено можливість застосування аутологічних стовбурових клітин з кісткового мозку (СККМ) та жирової тканини (СКЖТ) для оптимізації регенерації кісткової тканини з ціллю підвищення ефективності хірургічного лікування хворих на генералізований пародонтит II і III ступеню.

Вперше визначений дозозалежний репаративний ефект стовбурових клітин з кісткового мозку та жирової тканини. Оптимальною виявилась доза 500 тисяч стовбурових клітин на обсяг дефекту  $0,027 \text{ см}^3$ .

Вперше в експерименті встановлено, що стовбурові клітини кісткового мозку володіють більш вираженими остеогенними властивостями у порівнянні із стовбуровими клітинами жирової тканини.

Вперше встановлено, що введення 500 тис. стовбурових клітин з кісткового мозку на Коллапані через 90 днів призводить до відновлення гістологічної структури дефекту нижньої щелепи.

Практичне значення роботи. Вперше в Україні експериментально та клінічно обґрунтований дозозалежний ефект застосування стовбурових клітин з кісткового мозку і стовбурових клітин жирової тканини. Проведені експериментальні і клінічні дослідження показали, що аутологічні стовбурові клітини з кісткового мозку та стовбурові клітини жирової тканини на остеопластичному скаффолді мають репаративну здатність і можуть бути застосовані з метою спрямованої тканинної регенерації на етапі хірургічного

лікування хворих на генералізований пародонт II і III ступеня, а також можливо в подальших дослідженнях у щелепно-лицьовій хірургії, імплантології, ортопедії і травматології, що дозволяє значно збільшити ефективність лікування и може бути рекомендовано для практичного застосування.

Оцінка змісту роботи, її значення в цілому, зауваження щодо оформлення дисертації.

У вступі дисертант переконливо обґрунтовує актуальність проблеми, її значимість для сучасної стоматології, мету та завдання дослідження; науково-практичну значимість роботи.

Огляд літератури складається з 4-х підрозділів. У підрозділі 1.1 дисертант зупиняється на проблемі й досягненнях застосування клітинної та тканинної терапії у різних галузях медицини, наводить детальну характеристику стовбурових клітин.

У другому підрозділі (1.2) дисертант зупиняється на стані питання біотехнологій в стоматології, перспективах їх розвитку і можливості застосування стовбурових клітин різного походження в сучасних умовах, висвітлює проблему застосування стовбурових клітин, тканинної інженерії для регенерації кісткових дефектів щелеп, тканин зуба і пародонта.

Підрозділ 1.3 огляду літератури присвячений проблемі направленої регенерації кісткової тканини та її корекції. Згідно даних літератури, автор підкреслює, що заміщення дефектних ділянок кісткової тканини з повним відновленням кістки в зоні дефекту — гостра проблема сучасної медицини в цілому і стоматології, зокрема. Стає очевидною необхідність пошуку нових методів, що забезпечують повну репарацію кісткових дефектів. Однією із складних проблем є вибір адекватного скаффолда для культури стовбурових клітин.

У підрозділі 1.4 огляду літератури дисертант розглядає роль мембран у направленої регенерації кісткової тканини, вимоги до них: біосумісність, інтеграцію в навколишню кісткову тканину і щільне прикріплення до шийки імплантату, перешкоджання утворенню фіброзної тканини замість кістки,

проростання епітелію і проникненню бактерій, забезпечення необхідного простору для кісткової регенерації.

Наприкінці огляду літератури дисертант робить коротке резюме й обґрунтовує доцільність розпочатого дослідження, однак доцільно робити узагальнення і в підрозділах як в 1.3.

В цілому, огляд літератури читається з інтересом, усі наведені дані свідчать про компетентність дисертанта щодо проблеми.

Другий розділ роботи присвячений опису матеріалів та методів дослідження.

Дисертаційна робота носить експериментально-клінічний характер.

Для вирішення поставленої мети та завдань дисертаційної роботи проведено комплекс експериментальних та клінічних досліджень.

З метою вивчення властивостей остеопластичних матеріалів-скаффолдів стовбурових клітин щурів *in vitro* проводили на 12 білих щурах лінії Wistar.

Стовбурові клітини кісткового мозку щура наносили на остеопластичні матеріали: Біо-Ген (Італія), Биоколаген (Швейцарія), Біо-Осс (Швейцарія), Періюглас (США), Остеоопатит (США), Кергап (Україна), Коллапан Л (Росія), Стимул-Осс (Росія).

Порівняльний аналіз процесу загоєння кісткових дефектів нижньої щелепи кролика при застосуванні матеріалів-скаффолдів з додаванням стовбурових клітин кролика *in vivo* вивчали на 13 кроликах-самцях породи Шиншила.

В експериментальних дослідженнях з вивчення впливу аутологічних клітин кролика, отриманих з кісткового мозку та жирової тканини, на загоєння дірчастих дефектів альвеолярного відростка розміром 0,027 см<sup>3</sup>, було використано 32 кролика породи Шиншила, яких виводили з експерименту методом повітряної емболії на 42-у і 90-у добу.

Джерелом первинної культури кісткомозкових стовбурових клітин був кістковий мозок зі стегнових кісток щурів і клубових кісток кроликів. Підшкірний жир виділяли з невеликого розрізу пахової області кроликів.

Дисертант докладно описує способи отримання і культивуації стовбурових клітин кісткового мозку та жирової тканини.

Морфометричні та мікробіологічні дослідження. На комп'ютерних зображеннях мікропрепаратів підраховували клітинні і тканинні компоненти кісткового дефекту на відрізьку 165 мкм і вимірювали їх площі. Для морфометричних показників використовували окуляр і мікрометр «Reichert». Оцінку ступеня вірогідності отриманих результатів дослідження використовували варіаційно-статистичний метод аналізу за допомогою "Microsoft Excel" і "Statistica 8" з використанням непараметричних критеріїв.

Групу клінічних спостережень склали 20 хворих генералізованим пародонтитом II-III ступеня, обстеженим по традиційній схемі та за допомогою системи «Florida Probe», яким проведено комплексне лікування, що полягало в професійній гігієні порожнини рота, усуненні травматичної оклюзії, фармакотерапії, що складалася з прийому антимікробних, остеопротекторних, гіпосенсибілізуючих препаратів, вітамінних комплексів.

Основній групі з 10 добровольців, які дали згоду на забір кісткового мозку, культивування стовбурових клітин і пародонтальні операції з його використанням. Контрольній групі з 10 хворих проводили аналогічні операції без застосування аутологічних стовбурових клітин кісткового мозку.

Хворим робили клаптеві операції з використанням аутологічних стовбурових клітин з урахуванням обсягу дефекту, що склало 2 млн. стовбурових клітин.

Досліджували динаміку через 6 місяців, 12 місяців.

Отримані цифрові результати обробляли методом математичної статистики за допомогою коефіцієнта Ст'юдента.

По розділу виникли зауваження:

Не потрібно докладно описувати загальновідомі індекси як гігієнічні так і пародонтологічні, можна було вказати посилання на авторів.

Третій й четвертий розділ роботи присвячений трьом етапам експериментальних досліджень:

Встановлена цитотоксичність для стовбурових клітин двох носіїв - Періо-Гласса і Стимул-Осса. Після додавання їх до культури клітини швидко деградували. Коллапан, Біо-Ген, Биоколаген, Біо-Осс, Остеопатит, Кергап - не чинили негативного впливу на СК, що обґрунтовує можливість їх використання в якості клітинних носіїв в регенеративної терапії, найкращий результат показав Коллапан.

Досліджено процес загоєння кісткових дефектів нижньої щелепи кролика при застосуванні остеопластичних матеріалів - скаффолдів з додаванням кісткових клітин кролика *in vivo*.

В ході експериментальних досліджень вивчено транспортні властивості остеопластичного матеріалу як скаффолда для культури клітин, проведено порівняльний аналіз процесу загоєння кісткових дефектів щелепи кролика при застосуванні остеопластичних матеріалів з додаванням аутологічних стовбурових клітин з кісткового мозку.

Найкращий результат отриман при застосуванні комбінації «коллапан+мембрана+стромальні клітини».

В експериментальних дослідженнях вивчено вплив аутологічних клітин кролика в кількості 100 тисяч, 500 тисяч, 1 мільйон, отриманих з кісткового мозку та жирової тканини, на загоєння дірчастих дефектів альвеолярного відростку, об'ємом  $0,027 \text{ см}^3$ .

В розділі 3.2 можливе виключення мал. 3.1- етап операції.

Розділ 3. немає висновку.

Розділ 4. описаний в повному обсязі, зауважень немає. Він міг би бути самостійним науковим дослідженням по даній темі.

Було проведено порівняльну характеристику репаративного остеогенезу при застосуванні стовбурових клітин кісткового мозку та жирової тканини. У всіх дослідних групах при введенні стовбурових клітин, отриманих як з жирової тканини, так і з кісткового мозку, на носії Коллапан, відмічається стимуляція остеогенезу. Однак, згідно морфометричним даним, виявлено, що на 42 добу утворення остеогенних тканин у групах з введенням СККМ було

на 14% більше, порівняно з СКЖТ. На 90 добу утворення остеогенних тканин у групах тварин, яким вводили СККМ, було в 3 рази більше, ніж у групах з введенням СКЖТ. Якщо порівняти структуру тканин регенерату, залежно від кількості клітин, більш оптимальною та інтенсивною була стимуляція остеогенезу при введенні 500 тис. СККМ для дефекту об'ємом  $0,027 \text{ см}^3$ .

Обґрунтовано і експериментально підтверджено можливість застосування аутологічних стовбурових клітин з кісткового мозку та жирової тканини для оптимізації регенерації кісткової тканини.

Встановлений дозозалежний ефект стовбурових клітин з кісткового мозку та жирової тканини на відновні процеси кісткової тканини нижньої щелепи.

Вперше встановлено, що введення 500 тис. стовбурових клітин з кісткового мозку на Коллапані через 90 днів призводить до відновленню гістологічної структури дефекту нижньої щелепи.

Зауваження до розділів 3 і 4: Не вважаючи на то, що матеріал викладено повно, сприймається з інтересом, на наш погляд є зауваження:

Розділ 3.1 є лиш переліком остеопластичних матеріалів та їх властивостей, а не результатом досліджень, об'єм 1,25 сторінки текста можливо було б об'єднати з іншими розділами.

*Результати клінічних досліджень.* Наведені дані свідчать про те, що застосування аутологічних стовбурових клітин на хірургічному етапі комплексного лікування хвороб пародонту має явні переваги над традиційними хірургічними методами лікування цих захворювань, оскільки відбувається відновлення структури пародонту, усуваються пародонтальні кишені, встановлюється тривала ремісія, що підтверджується покращенням рівня гігієни порожнини рота, нормалізацією індексної оцінки стану пародонту, процесами регенерації кісткової тканини альвеолярного відростка.

Через 6 місяців після закінчення хірургічного етапу комплексного лікування пацієнти контрольної групи відзначали випадки кровоточивості при чищенні зубів і при прийомі твердої їжі. У них з'явився м'який наліт на зубах у фронтальній ділянці нижньої щелепи. Проба Шиллера–Писарєва 1,8; ГІ за

Федоровим–Володкіною 1,3; індекс кровоточивості за Muhlermann(PBI) 1,0, кістковий індекс Фукса - 0,7, рухомість зубів відсутня.

Пацієнти основної групи скарг не пред'являли. Проба Шиллера–Писарева 1,3, ГІ за Федоровим–Володкіною 1,1, індекс кровоточивості за Muhlermann (PBI) – 0, кістковий індекс Фукса - 0,73, рухомість зубів відсутня.

Через 12 місяців результати об'єктивного дослідження мали ще більші відмінності. Хворі контрольної групи пред'являли скарги на наявність запалення пародонту, окремі ясенні сосочки в найбільш важких ділянках мали синюшний відтінок, були пастозні, кровоточили при зондуванні. Проба Шиллера–Писарева 2,0, ГІ за Федоровим–Володкіною 1,3. Індекс кровоточивості за Muhlermann (PBI) – 2, кістковий індекс Фукса 0,64.

У хворих дослідної групи скарг практично не було. Проба Шиллера–Писарева 1,3, ГІ за Федоровим–Володкіною 1,1. Індекс кровоточивості за Muhlermann (PBI) – 0, кістковий індекс Фукса 0,74, рухомість зубів відсутня.

У хворих контрольної групи на ортопантомограмах зазначалося ущільнення, посилення кісткового малюнка, в порівнянні з вихідними.

Рентгенологічно у хворих дослідної групи визначалося збільшення висоти міжальвеолярних перегородок на 1-1,5мм, порівняно з доопераційними ортопантомограмами. Відзначалося збільшення щільності малюнка губчастої кістки міжзубних перегородок, збільшення його рентгенконтрастності.

По закінченні усіх розділів надається висновок і літературні джерела, в яких висвітлені матеріали розділів.

Далі дисертант зупиняється на аналізі та узагальненні отриманих результатів проведених експериментальних та клінічних досліджень. Висновки відповідають складу отриманих дисертантом результатів. За планом дискусії прошу відповісти на деякі запитання:

1. Чи був проведений порівняльний аналіз результатів безпосереднього ефекту СК без коллапана при їх введенні в зону дефекту кістки?
2. Чим обґрунтований вибір досліджень СКЖТ і СККМ як потенційних стимуляторів остеогенезу при кісткових дефектах?

3. Чим відрізняється ефект стовбурових клітин від дії скаффолда Коллапана?

4. За якими основними критеріями ви оцінювали у хворих метод направленої регенерації?

5. Тривалість ремісії залежала тільки від виду операції ( із стовбуровими клітинами або без них) або на неї впливав також і гігієнічний стан порожнини рота хворих?

За матеріалами дисертаційної роботи надруковано 9 наукових праць, із яких 5 статей у фахових виданнях, рекомендованих МОН України, 1 у іноземних виданнях, 2 у збірниках матеріалів наукових конференцій, 1 методичні рекомендації.

Принципових зауважень щодо оформлення дисертації немає, зауваження не носять принципового характеру, не впливають на суть і позитивну оцінку роботи.

### Заключення.

Дисертаційна робота Циганової Ірини Валеріївни «Обґрунтування застосування остеопластичних аутологічних біоматеріалів у комплексній терапії хворих хронічним генералізованим пародонтитом» Є завершеним науковим дослідженням, присвяченим теоретичному узагальненню, новому рішенню наукового завдання, що полягає в удосконаленню хірургічного етапу лікування хворих на генералізований пародонтит II та III ступеню методом направленої регенерації кісткової тканини з використанням аутологічних стовбурових клітин з кісткового мозку та жирової тканини з Коллапаном в якості скаффолда.

За своєю актуальністю, науковим та практичним значенням отриманих результатів, їх достовірністю й новизною, обґрунтованістю та об'активністю висновків і практичному значенню повністю відповідає вимогам п. 11 «Порядку присудження наукових ступенів та присвоєння вченого звання

