

Державна установа
«ІНСТИТУТ СТОМАТОЛОГІЇ
НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ МЕДИЧНИХ НАУК УКРАЇНИ»

ЦИГАНОВА Ірина Валеріївна

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

**ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ ОСТЕОПЛАСТИЧНИХ
АУТОЛОГІЧНИХ БІОМАТЕРІАЛІВ В КОМПЛЕКСНІЙ ТЕРАПІЇ
ХВОРИХ НА ХРОНІЧНИЙ ГЕНЕРАЛІЗОВАНИЙ ПАРОДОНТИТ**

14.01.22 — стоматологія

Автореферат дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Одеса – 2016

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Харківській медичній академії післядипломної освіти МОЗ України.

Науковий керівник:

доктор медичних наук, професор **Куцевляк Валентина Федорівна**,
Харківська медична академія післядипломної освіти МОЗ України,
завідувач кафедри стоматології, терапевтичної стоматології

Офіційні опоненти:

– доктор медичних наук, професор **Чумакова Юлія Геннадіївна**, Одеський медичний інститут Міжнародного гуманітарного університету, професор кафедри загальної стоматології

– доктор медичних наук, професор **Скрипников Петро Миколайович**, Вищий державний навчальний заклад України «Українська медична стоматологічна академія» МОЗ України, м. Полтава, завідувач кафедри післядипломної освіти лікарів-стоматологів

Захист відбудеться «29» лютого 2016 р. о 11.00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 41.563.01 в Державній установі «Інститут стоматології НАМН України» за адресою: 65026, м. Одеса, вул. Рішельєвська, 11.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Державної установи «Інститут стоматології НАМН України» (65026, м. Одеса, вул. Рішельєвська, 11).

Автореферат розісланий «27» січня 2016 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради

Г.О. Бабеня

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Запальні захворювання пародонту займають величезне місце в патології зубощелепної системи. За даними різних статистичних джерел до 85 % дорослого населення страждають хворобами пародонту різних ступенів тяжкості. Сучасна стоматологічна наука припускає комплексний підхід до лікування, в якому найважливішу роль відіграють хірургічні методи. Однак відсоток невдач при використанні традиційної терапії потребує пошуку і розробки нових, більш ефективних методик (Куцевляк В.И., Куцевляк В.Ф., 2004, 2009, Peng L., 2011, Чумакова Ю.Г., 2012).

Успіх відновного хірургічного лікування запальних захворювань пародонту багато в чому визначається процесами репаративної регенерації кісткової тканини пацієнта. Аналіз причин невдалого лікування таких хворих свідчить про те, що шляхи їх подолання складаються як в удосконаленні технології самого хірургічного втручання, так і в створенні оптимальних умов для регенерації кісткової тканини (Zhao L., 2010, Yamaza T., 2010).

Проблема регенерації кісткової тканини є однією з найдавніших в медико-біологічній науці. В останні десятиріччя, під впливом погіршення екологічного становища, потужних стресових чинників на організм людини, відзначено зниження регенераторних можливостей кісткової тканини і інтенсивності репаративних процесів (Скрипников П.М., 2013).

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

Використання методу направленої регенерації кісткової тканини альвеолярного відростка з додаванням аутологічних стовбурових клітин у пародонтальній хірургії при лікуванні генералізованого пародонтиту II та III ступеня тяжкості 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).

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. 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.

Мета дослідження. Підвищення ефективності хірургічного етапу комплексного лікування хворих на генералізований пародонтит шляхом застосування аутологічних стовбурових клітин як стимулятора остеогенезу.

Для досягнення поставленої мети було сформульовано наступні завдання:

1. Дослідити транспортні властивості остеопластичних матеріалів як носіїв культури клітин і вибрати оптимальний носій (*in vitro*).

2. Провести порівняльний аналіз процесу загоєння кісткових дефектів нижньої щелепи кролів при застосуванні скаффолдів з додаванням стовбурових клітин кролика (*in vivo*).

3. Проаналізувати морфологічні зміни в кістковій тканині щелепи кролика при використанні аутологічних стовбурових клітин, отриманих з кісткового мозку та жирової тканини.

4. Визначити в експерименті регенеративні здібності кісткової тканини в залежності від кількості введених аутологічних стовбурових клітин.

5. Удосконалити спосіб хірургічного лікування хворих генералізованим пародонтитом з використанням аутологічних стовбурових клітин та оцінити найближчі і віддалені результати його застосування.

Об'єкт дослідження – хронічний генералізований пародонтит.

Предмет дослідження – процеси репаративної регенерації тканин пародонту при використанні остеопластичних аутологічних біоматеріалів у експериментальних тварин і у хворих на генералізований пародонтит.

Методи дослідження. В роботі використані *експериментальні* методи 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 одержаних результатів. 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 виявилася доза 500 тисяч стовбурових клітин на обсяг дефекту 0,027 см³.

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 отриманих результатів. Вперше в Україні експериментально та клінічно обґрунтований дозозалежний ефект застосування стовбурових клітин з кісткового мозку та жирової тканини.

Проведені експериментальні і клінічні дослідження показали, що аутологічні стовбурові клітин з кісткового мозку та 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 у щелепно-лицьовій хірургії, імплантології, ортопедії і травматології, що дозволяє значно збільшити ефективність лікування.

За матеріалами дисертаційної роботи надруковано методичні рекомендації «Спосіб направленої регенерації кісткової тканини у стоматології».

Основні наукові та практичні положення дисертаційної роботи запроваджені в лікувальний і навчальний процес кафедри стоматології та терапевтичної стоматології Харківської медичної академії післядипломної освіти, кафедри післядипломної освіти лікарів-стоматологів-стоматологів ВДНЗУ «Українська медична стоматологічна академія». Розроблений спосіб відновлення кісткової тканини щелепи у хворих на хронічний генералізований пародонтит запроваджено в практичну діяльність КЗОЗ Харківської обласної стоматологічної поліклініки, КЗОЗ Харківської міської студентської поліклініки № 20, лікувально-діагностичного центру ТОВ «Фортуна».

Особистий внесок здобувача. Автором спільно з науковим керівником розроблено план досліджень, визначені мета і завдання, написані статті. Автором разом з науковим керівником обрані методи дослідження й написана

дисертаційна робота. Експериментальні та лабораторні методи дослідження виконані автором спільно із співробітниками лабораторії молекулярної діагностики ТОВ «Вірола» (завідувач лабораторією - к.біол.н. Омельченко О. А.). Клінічні дослідження виконані автором на кафедрі стоматології та терапевтичної стоматології ХМАПО, на базі обласної стоматологічної поліклініки (головний лікар – Волосов Є. В.) та фірми «Фортуна» (головний лікар – проф. Любченко О. В.).

Апробація результатів дисертації. Матеріали дисертації представлені та обговорені на VI міжнародній науково-практичній конференції «Стоматологія слов'янських держав» (Білгород, 2013); на VII Міжнародній науково-практичній конференції «Стоматологія слов'янських держав» (Білгород, 2014); на VI (XIII) З'їзді Асоціації стоматологів України (Одеса, 2014); на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Регенеративна пародонтологія: сучасність і майбутнє» (Київ, 2015); на науково-практичній конференції з участю міжнародних спеціалістів, присвячена дню науки «Внесок молодих вчених і спеціалістів у розвиток медичної науки і практики: нові перспективи» (Харків, 2015); на міжнародній науково-практичній конференції «Клітинна терапія і тканинна біоінженерія в стоматології» (Одеса, 2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 8 наукових робіт, з яких 5 статей (4 статті у наукових фахових виданнях України, 1 стаття у фаховому виданні Білорусі), 3 тези доповіді у матеріалах наукових конференцій України та інших держав.

Обсяг і структура дисертації. Робота побудована за класичною схемою, містить вступ, розділ огляду літератури, 3 розділи власних досліджень, розділ аналізу й узагальнення отриманих результатів, висновки, практичні рекомендації, список використаної літератури. Дисертація викладена на 204 сторінках друкованого тексту, з них 155 займає основний текст. Наочна ілюстрація роботи зроблена за допомогою 6 таблиць, 89 рисунків. Список використаних джерел складається з 270 найменувань, з них 141 написано кирилицею, 129 латиницею.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Матеріали і методи дослідження. Для вирішення поставленої мети та завдань дисертаційної роботи проведено комплекс експериментальних та клінічних досліджень.

*Експериментальні дослідження з вивчення властивостей остеопластичних матеріалів-скаффолдів стовбурових клітин щурів *in vitro* проводили на 12 білих щурах-самцях лінії Wistar віком 3 міс.*

Стовбурові клітини кісткового мозку щура наносили на остеопластичні матеріали хімічної та біологічної природи: Біо-Ген (Італія), Биоколаген (Швейцарія), Біо-Осс (Швейцарія), Періоглас (США), Остеоapatит (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 масою $3,0 \pm 0,2$ кг.

Під внутрішньовенним тіопенталовим наркозом створювали дефект кісткової тканини на всю глибину кортикальної пластинки розміром $0,027 \text{ см}^3$, який заповнювали наступним чином: дефект під згустком; дефект та мембрана Нуро-SorbF; дефект та Коллапан Л під згустком; дефект, Коллапан Л, мембрана Нуро-SorbF; дефект, Біо-Ген, мембрана Нуро-SorbF; дефект, Кергап, мембрана Нуро-SorbF. Тварин виводили з експерименту на 30 або 60 добу методом повітряної емболії.

В експериментальних дослідженнях з вивчення впливу аутологічних клітин кролика, отриманих з кісткового мозку та жирової тканини, на загоєння дірчастих дефектів альвеолярного відростка розміром $0,027 \text{ см}^3$, було використано 32 кролика-самця породи Шиншила віком 1 рік масою $3,0 \pm 0,2$ кг, тварини були розподілені на 8 серійних груп по 4 кролика в кожній.

Під тіопенталовим наркозом з розрахунку 20 мг/кг маси тіла, створювали дефект кісткової тканини на глибину кортикальної пластинки розміром $0,027 \text{ см}^3$, який заповнювався наступним чином: дефект під згустком; дефект та Коллапан Л; дефект, 100000 од. СККМ, Коллапан Л; дефект, 500000 од. СККМ, Коллапан Л, дефект, 1 млн. од. СККМ, Коллапан Л; дефект, 100000 од. СКЖТ, Коллапан Л; дефект, 500000 од. СКЖТ, Коллапан Л; дефект, 1 млн. од. СКЖТ, Коллапан Л, після чого рану ушивали. Тварин виводили з експерименту методом повітряної емболії на 42 або 90 добу.

Морфометричні дослідження. Фрагменти щелеп із зоною регенерату фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну, проводили декальцинацію в спиртовому розчині мурашиної кислоти, знежирювали і зневоднювали в ацетонах і спиртах зростаючої міцності (60-96%) і в розчині суміші спиртів та заливали в целлоїдин. Гістологічні зрізи в сагітальній площині (6-10 мкм) виготовляли на санному мікроскопі «Reichert», фарбували гематоксиліном Вейгерта та еозином, пікрофуксином за Ван-Гізона (Саркісов Д. С., 1996).

Мікроскопічні дослідження проводили на світловому мікроскопі «АХІО Star Plus» (Zeiss, НІМЕЧЧИНА). На комп'ютерних зображеннях мікропрепаратів підраховували клітинні і тканинні компоненти кісткового дефекту на відрізку 165 мкм і вимірювали їх площі. Для морфометричних

показників використовували окуляр і мікрометр «Reichert» (Лилли Р., 1969, Волкова О. В., 1982).

Для аналізу отриманих даних застосовували статистичний аналіз за допомогою комп'ютерних програм "Microsoft Excel" і "Statistica 8" з використанням непараметричних критеріїв. Критичне значення рівня значимості приймалося рівним 0,05 (Лапач С. Н., 2000).

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 (Петренко А. Ю., 2009).

Клітини виділяли подвійним вимиванням з кістки розчином Хенкса і центрифугуванням отриманої суспензії при 1000 обертів/хвилину протягом 10 хвилин і ресуспензуванням осаду в живильному середовищі. Проводили кількісну оцінку ядромісних клітин в камері Горяєва у 3% розчині оцтової кислоти та оцінку життєздатності клітин суправітальним забарвленням трипановим синім, після чого клітини висівали в культуральні пластикові флакони площею 75см² (РАА, Австрія). Посівна концентрація становила 1x10³ життєздатних клітин/см² культурального флакона. Живильне середовище культивування складалося з середовища IMDM (Sigma, США), 10% ембріональної сироватки великої рогатої худоби (ЕС) (HyClone, США), 150 мкг/мл гентаміцину (Фармак, Україна) та 10 мкг/мл амфотеріцину Б (Sigma, США).

Після 24-годинної інкубації при температурі 37°C з 5% CO² в CO² інкубаторі (Sanyo, Японія) клітини, які не прикріпились до субстрату, видаляли, а прикріплені двічі відмивали фосфатно-сольовим буфером і культивували. Першу заміну середовища виконували через 48 годин культивування, а далі - кожну третю добу. Дослідження адгезії і проліферації культур клітин проводили щоденно з допомогою інвертованого світлового мікроскопа (Ulab, Китай). Кістковомозкові клітини кроликів розсіювали в лунки 24-х секційного культурального планшета 40000 клітин на лунку. Через 24 години в лунки з прикріпленими клітинами переносили досліджувані субстрати і культивували клітини з ними протягом 3-х діб. Клітини знімали з пластини планшета після короткочасної інкубації в 0,25 % розчині трипсину і осаджували центрифугуванням при 1000 об\хв. Концентрацію клітин підраховували в камері Горяєва.

Підшкірний жир виділяли з надрізу в паховій області в шприц. Кубик жиру поміщали в пробірку, в розчин Хенкса. Фрагмент в стерильних умовах подрібнювали, потім інкубували в 0,05% розчині колагенази (collagenase type I, Worthington Biochemical Corporation, USA) протягом 30 хв. Після чого додавали

повне культуральне середовище і центрифугували протягом 10 хв. при 300g. Отриманий осад ресуспензовали і пропускали через 100-мкм клітинний фільтр (CBD Biosciences, Bedford, MA). Проводили підрахунок клітин в суспензії. Клітини розсіювали в посуд і поміщали в CO²-інкубатор (BNR-110, Tabai ESPEC, Osaka) при 37°C і 5% CO². На наступний день в чашках змінювали середовище.

Через 24 години культивування, середу з клітинами, які не прикріпились до субстрату, видаляли. Прикріплені фібробластоподібні клітини культивували в CO²-інкубаторі при 37°C, 5% CO² і 100% вологості 7-12 днів, змінюючи середовище кожні три доби. Клітини знімали з дна флакона шляхом короткочасної (5-10 хвилин) інкубації їх у розчині трипсину/ЕДТА, ресуспендували в культуральному середовищі і осаджували центрифугуванням при 300g протягом 10 хвилин. при 300g та пропускали через 100-мкм клітинний фільтр (CBD Biosciences, Bedford, MA). Проводили підрахунок клітин в суспензії. Клітини розсіювали в культуральні флакони і поміщали в CO²-інкубатор (BNR-110, Tabai ESPEC, Osaka) при 37°C і 5% CO². На наступний день в чашках змінювали середовище.

При субкультуванні клітини розсіювали в культуральні флакони (Greiner Bio-One GmbH, Germany) в концентрації 2-5x10³ клітин/см² і культивували 5-7 днів до досягнення 80% конфлюентності. Стромальні клітини утворювали колонії фібробластоподібних клітин на дні флакона. Таким чином, отримували первинну культуру клітин стромы кісткового мозку і жирової тканини.

Клінічні методи дослідження. Групу клінічних спостережень склали 20 хворих генералізованим пародонтитом II-III ступеня, яким проведено комплексне лікування, що полягало в професійній гігієні порожнини рота, усуненні травматичної оклюзії, фармакотерапії, що складалася з прийому антимікробних, остеопротекторних, десенсибілізуючих препаратів, вітамінних комплексів.

Основній групі з 10 хворих-добровольців з діагнозом генералізований пародонтит II-III ступеня на хірургічному етапі лікування при проведенні клаптевих операцій для стимуляції остеогенезу використовували стовбурові клітини, 10 пацієнтам групи контролю проводили аналогічні клаптеві операції без застосування стовбурових клітин.

Обстеження хворих з захворюваннями пародонту проводили за традиційною схемою. Індексну оцінку стану тканин пародонта проводили на підставі класифікації Н.Ф. Данилевського (1994), проба Шиллера-Писарева, ГІ за Федоровим-Володкіною, індекс кровоточивості за Muhlermann (РВІ), кістковий індекс Фукса, рухомість зубів за шкалою Міллера. З використанням системи «Florida Probe» досліджували рецесію ясен, глибину пародонтальних

кишень, кровоточивість, виділення з пародонтальних кишень, фуркацію, зубний наліт, рухливість, проходили рентгенологічне обстеження.

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

Статистична обробка даних. Отримані цифрові результати обробляли методом математичної статистики. Для параметричних значень проводили розрахунок середньої величини ознаки (M) з обчисленням середньої помилки (m), коефіцієнта Ст'юдента для малої вибірки даних (T) і вірогідності розходжень (P). Статистично достовірною вважали різницю при значенні $P < 0,05$.

Результати дослідження та їх обговорення. Встановлена цитотоксичність для стовбурових клітин (СК) двох носіїв - Періо-Гласса і Стимул-Осса. Після додавання їх до культури клітини швидко деградували. Коллапан, Біо-Ген, Биокولاген, Біо-Осс, Остеопатит, Кергап - не чинили негативного впливу на СК, що обґрунтовує можливість їх використання в якості клітинних носіїв в регенеративній 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*.

Дефект+мембрана. На 30 добу був дефект округлої форми, заповнений фібро-ретикулярною тканиною - 51%, остеоидом - 23% і губчастою кістковою тканиною - 14%, некроз становив 12%. На 60 добу ділянки некрозу і секвестрів - 10%, крупнопетлиста губчаста кісткова тканина - 50%. Щільність клітин низька. У міжтрабекулярних просторах - пухка сполучна тканина з фібробластами і лімфоцитами складала 40%.

Коллапан+мембрана. На 30 добу в області дефекту некротичні тканини становили 14%, губчаста кісткова тканина - 45%, сполучна тканина з високою щільністю остеобластів складала 28%, ділянки коллапану в товщі кісткової тканини - 13%. На 60 добу в області дефекту компактна і губчаста кісткова тканина становила 78%, некроз - 10%, стрічкоподібні острівці фібро-ретикулярної тканини склали 13% з великими вогнищами остеоїду. Коллапан у вигляді поодиноких невеликих фрагментів, замуrowаних у кісткову тканину становив - 9%.

Коллапан+мембрана+стромальні клітини. На 30 добу некротичні ділянки становили - 8%, губчаста дрібнопетляста кісткова тканина - 56%. Кісткові трабекули з високою щільністю остеоцитів, по периферії яких містяться остеобласти, дрібні фрагменти залишків Коллапана, замуrowані в

кісткову тканину становили 6%. Фібро-ретикулярна тканина з клітинами остеобластичного напрямку - 30%. На 60-ту добу компактна і губчаста кістка становила 84%, зона некрозу - 4%, дрібні фрагменти Коллапану, замуrowані в кісткову тканину без сполучнотканинної капсули становили - 3%, невеликі ділянки грубоволокнистої сполучної тканини між генераціями компактної кістки - 9%.

Био-Ген+мембрана+стромальні клітини. На 30 добу некроз, секвестрація і інфільтрація лейкоцитами становили 20%, фрагменти матеріалу Біо-Ген - 7%, губчаста кісткова тканина з низькою щільністю остеоцитів і остеобластів - 33%, грануляційна тканина з високою щільністю фібробластів - 30%. На 60 добу некроз і секвестрація - 14%, фібро-ретикулярна - 20%, губчаста кісткова тканина з низькою щільністю остеоцитів становила 54%. Пухка сполучна тканина у міжтрабекулярних просторах – 6%, і фрагменти Біо-Ген - 6%.

Кергап+мембрана+стромальні клітини. На 30 добу некроз становив 9%, остеогенна фібро-ретикулярна тканина - 42%, губчаста кісткова тканина - 41%, фрагменти кергапа - 8%. На 60 добу некроз - 6%, губчаста тканина - 65%, фібро-ретикулярна тканина з остеогенними потенціями - 22%, фрагменти Кергапа - 7%.

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 см³.

На 42 добу після введення 100 тисяч аутологічних СКЖТ з коллапаном (табл.1) некротичні ділянки займали 6%, гематома - 8%, грануляційна тканина - 54%, остеїд - 20%, дрібнопетляста мережа кісткових трабекул 12%.

На 90 добу гематома і некротичні ділянки становили 4%, клітинно-волокниста тканина - 66%, дрібно-і крупнопетляста мережа кісткових трабекул 20% і 10% відповідно.

На 42 добу після введення 500 тисяч аутологічних СКЖТ в структурі регенерату 1% складала гематома, 55% - клітинно-волокниста тканина, 12% - остеїд, 32% - новоутворені кісткові трабекули. На 90 добу клітинно-волокниста тканина становила 8%, мережа остеїдних і дрібних кісткових трабекул - 55%, крупнопетлястих - 9%. В периферичних ділянках формувалася кортикальний шар - 7%.

На 42 добу після введення 1 млн. аутологічних СКЖТ 3% складала ділянки некрозу, 39% - грануляційна тканина, 8% - клітинно-волокниста тканина, 10% - остеїд, 40% - новоутворені кісткові трабекули.

На 90 добу після введення 1 млн. аутологічних СКЖТ грануляційна тканина становила 48 %, дрібні і крупні трабекули -27% 23% відповідно, остеїдна тканина – 7%, ділянки некрозу і секвестри – 3%.

Таблиця 1

Характеристика морфологічних змін структури регенерату кістки на 42 і 90 добу (СКЖТ)

Показники в %	100 тис. СКЖТ		500 тис. СКЖТ		1 млн. СКЖТ	
	42 доба	90 доба	42 доба	90 доба	42 доба	90 доба
зона некрозу	6	4	0	0	3	3
гематома	8	0	1	0	0	0
грануляційна тканина	54	66	0	8	39	38
клітинно- волокниста тканина	0	0	55	0	8	0
остеїдна тканина	20	0	12	0	10	7
дрібні кісткові трабекули	12	20	32	55	40	27
великі кісткові трабекули	0	10	0	30	0	23
кортикальний шар	0	0	0	7	0	0

На 42 добу після введення 100 тисяч аутологічних СКЖТ (табл. 2) 5% регенерату займали некротичні тканини, 35% - грануляційна тканина, 28% - остеїдна тканина, дрібнопетляста мережа кісткових трабекул – 32%.

На 90 добу некроз займав 3%, 32% - остеїд, 32% - дрібнопетляста, 21% - крупнопетляста мережа кісткових балочок, 12% - грануляційна тканина.

На 42 добу після введення 500 тисяч аутологічних СКЖТ 1% займав некроз, клітинно-волокниста тканина складала 13%, 4% - остеїд, 36% - дрібнопетляста кісткова тканина, 46% - крупнопетляста кісткова тканина.

На 90 добу виявлялася цілісна структура з новоутвореної кісткової тканини, в якій 38% займала дрібнопетляста мережа кісткових трабекул, 46% - крупнопетляста мережа кісткових трабекул, 16% - кортикальний шар.

На 42 добу після введення 1 млн аутологічних СКЖТ 6% займали некроз, 4% - грануляційна тканина, 40% - крупнопетляста мережа кісткових трабекул, 30% - остеїд, 20% - безкліткове поле, заповнене гомогенними еозинофільними масами. На 90 добу некроз займав 1%, клітинно-волокниста тканина - 15%, остеїд – 33%, дрібно- і крупнопетляста мережа кісткових трабекул 35% і 16% відповідно.

Таблиця 2

Характеристика морфологічних змін структури регенерату кістки на 42 і 90 добу (СККМ)

Показники в % %	100 тис. СККМ		500 тис. СККМ		1 млн. СККМ	
	42 доба	90 доба	42 доба	90 доба	42 доба	90 доба
зона некрозу	5	3	1	0	6	1
гематома	0	0	0	0	0	0
грануляційна тканина	35	12	0	0	4	0
клітинно-волокниста тканина	0	0	13	0	0	15
остеоїдна тканина	28	32	4	0	30	33
дрібні кісткові трабекули	32	32	36	38	0	35
крупні кісткові трабекули	0	21	46	46	40	16
кортикальний шар	0	0	0	16	0	0
безкліткове поле	0	0	0	0	20	0

Було проведено порівняльну характеристику репаративного остеогенезу при застосуванні стовбурових клітин кісткового мозку та жирової тканини. У всіх дослідних групах при введенні СК, 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 см³.

Результати клінічних досліджень. При первинному обстеженні середні показники індексної оцінки стану пародонта у хворих обох груп були рівнозначними. Проба Шиллера–Писарєва 5,15 ±0,05, ГІ за Федоровим–Володкіною 3,0 ±0,5, індекс кровоточивості за Muhlermann (РВІ) - 3,0±0,05, кістковий індекс Фукса - 0,48±0,05, рухомість зубів за шкалою Міллера - 1-2 (табл. 3).

Таблиця 3

Індексна оцінка стану пародонту до і після комплексного лікування

Показники	первинне дослідження		Через 6 місяців		Через 12 місяців	
	I	II	I	II	I	II

Проба Шиллера - Писарева	5,15±0,05 p ₁ > 0,05	5,15±0,05	1,3±0,1 p<0,05 p ₁ < 0,05	1,8±0,05 p<0,05	1,3 ± 0,1 p<0,05 p ₁ > 0,05	2,0 ± 0,5 p<0,05
ГІ по Федорову – Володкіною	3,0 ± 0,5 p ₁ > 0,05	3,0 ± 0,5	1,1±0,1 p<0,05 p ₁ > 0,05	1,3±0,03 p<0,05	1,1 ± 0,1 p<0,05 p ₁ > 0,05	1,3 ± 0,5 p<0,05
Індекс кровотоковості по Muhlermann (PBI)	3,0 ± 0,05 p ₁ > 0,05	3,0 ± 0,05	0	1,0±0,02 p<0,05	0	2,0 ± 0,3 p<0,05
Кістковий індекс Фукса	0,48±0,05 p ₁ > 0,05	0,48±0,05	0,73±0,5 p<0,05 p ₁ > 0,05	0,70±0,5 p<0,05	0,74±0,5 p<0,05 p ₁ < 0,05	0,64±0,3 p<0,05
Рухомість зубів за шкалою Міллера	1-2 p ₁ > 0,05	1-2	0	0	0	0

Примітка. p – достовірність розрахована по відношенню до показників первинного обстеження, p₁ – по відношенню до групи порівняння.

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–Писарева 1,8±0,5; ГІ за Федоровим–Володкіною 1,3±0,3; індекс кровотоковості за Muhlermann(PBI) 1,0±0,07, кістковий індекс Фукса - 0,70±0,05, рухомість зубів відсутня.

Пацієнти основної групи скарг не пред'являли. Проба Шиллера–Писарева 1,3±0,1, ГІ за Федоровим–Володкіною 1,1±0,1, індекс кровотоковості за Muhlermann (PBI) – 0, кістковий індекс Фукса - 0,73±0,05, 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±0,5, ГІ за Федоровим–Володкіною 1,3±0,5. Індекс кровотоковості за Muhlermann (PBI) – 2±0,3, кістковий індекс Фукса 0,64±0,05.

У хворих дослідної групи скарг практично не було. Проба Шиллера–Писарева 1,3±0,1, ГІ за Федоровим–Володкіною 1,1±0,1. Індекс кровотоковості за Muhlermann (PBI) – 0, кістковий індекс Фукса 0,74±0,05, 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.

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.

ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі представлено експериментально й клінічно обґрунтоване нове рішення актуального для сучасної стоматології завдання – підвищення ефективності хірургічного етапу комплексного лікування генералізованого пародонтиту методом направленої регенерації кісткової тканини з використанням аутологічних стовбурових клітин з кісткового мозку та жирової тканини з Коллапаном в якості скаффолда.

1. За результатами дослідження остеопластичних матеріалів штучного і природного походження в якості скаффолдів для стовбурових клітин встановлено, що Біо-Осс, ОссаБейс, Остеопатит, Кергап, Коллапан Л забезпечують адгезію, проліферацію і не мають цитотоксичної дії на СККМ, придатні для використання в якості носія в клітинній терапії, найкращий результат одержано у разі використання Коллапану.

2. Встановлено, що аутологічні стовбурові клітини, введені в область дефекту з Коллапаном, забезпечують повноцінну регенерацію кісткової тканини. На 30 добу сформована мережа кісткових трабекул з високою щільністю остеоцитів на їх поверхні з вираженим остеобластичним диференціюванням клітин. На 60 добу в тканинах регенерату превалює кісткова тканина.

3. Доведено, що на 42 добу остеогенних тканин в групах з введенням СККМ було на 14% більше, а на 90 добу в 3 рази більше, ніж у групах з СКЖТ.

4. Визначено, що після введення 500 тисяч аутологічних СКЖТ з Коллапаном в дефект розміром $0,027 \text{ см}^3$ в період з 42 до 90 діб визначалася істотна якісна зміна темпів остеогенезу в структурі регенерату, що призвело до значного збільшення новоутворених кісткових структур (з 44% до 85%). Введення 500 тисяч аутологічних СККМ з Коллапаном за 90 діб призвело до відновлення гістологічної структури нижньої щелепи кролика.

5. Доведено, що застосування аутологічних стовбурових клітин на хірургічному етапі комплексного лікування хвороб пародонту має явні переваги перед традиційними хірургічними методами лікування цих захворювань, оскільки відбувається відновлення структури пародонту, усуваються пародонтальні кишень, встановлюється тривала ремісія.

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

Виходячи з отриманих результатів даного дослідження пропонуємо наступний план лікування хворих с запальними захворюваннями пародонту:

1. Обов'язкове клінічне обстеження лікарем-стоматологом і суміжними фахівцями. Для об'єктивної оцінки перебігу пародонтиту необхідно проводити індексну оцінку стану пародонту, рентгенологічне дослідження. На етапі планування і в процесі комплексного лікування оцінювати рівень стоматологічного здоров'я пацієнта: стан твердих тканин зубів, індексну оцінку стану тканин пародонту, рівень гігієни порожнини рота.

2. Пропонуємо при необхідності хірургічного лікування генералізованого пародонтиту проводити клаптеві операції з використанням метода направленої регенерації кісткової тканини з застосуванням аутологічних стовбурових клітин з кісткового мозку на скаффолді з Коллапана. Забір, культивуацію та, в разі необхідності, кріоконсервування стовбурових клітин кісткового мозку здійснювати в Центрі опіків, реконструктивної і пластичної хірургії на базі Харківської міської клінічної лікарні № 4 швидкої невідкладної допомоги ім. О. В. Мещанінова.

3. При застосуванні в клінічній практиці аутологічних стовбурових клітин кісткового мозку та жирової тканини для прискорення процесу остеогенезу потрібно проводити підрахунок їх оптимальної кількості в залежності від обсягу оперативного втручання.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

1. Цыганова И. В. Комплексное лечение больных генерализованным пародонтитом с применением метода направленной регенерации альвеолярного отростка / И. В. Цыганова, В. Ф. Куцевляк, В. И. Куцевляк, // Вісник стоматології. –2015. – № 3. – С. 37-40. Автор проводила клінічні обстеження, аналізувала результати, проводила статистичну обробку та брала участь у написанні статті.

2. Куцевляк В. Ф. Особенности заживления дырчатых дефектов угла челюсти кролика при введении 100 тыс. аутологических СК костного мозга и

жировой ткани / В. Ф. Куцевляк, В. И. Куцевляк, И. В. Цыганова // Інновації в стоматології. – 2015. – № 3. – С. 18-22. *Автору належить участь у проведенні експериментальних досліджень, статистична обробка даних, написання статті.*

3. Куцевляк В. Ф. Изучение динамики регенерации костных дефектов альвеолярного отростка с использованием аутологичных стволовых клеток костного мозга животных / В. Ф. Куцевляк, В. И. Куцевляк, Е. А. Омельченко, А. С. Забирник, И. В. Цыганова // Проблеми безперервної медичної освіти та науки. – 2015. – № 2 (18). - С. 47-51. *Автор брала участь у експерименті, аналізі результатів, статистичної обробці даних і написанні статті.*

4. Куцевляк В. Ф. Направленная регенерация костных дефектов альвеолярного отростка с использованием аутологичных стволовых клеток / В. Ф. Куцевляк, В. И. Куцевляк, И. В. Цыганова, Е. А. Омельченко, А. С. Забирник // Стоматологический журнал (Беларусь). – 2015. – № 2. – С. 120-123. *Автору належить участь у проведенні експериментальних досліджень, статистична обробка даних, написання статті.*

5. Куцевляк В. Ф. Направленная регенерация костных дефектов альвеолярного отростка с использованием стволовых клеток жировой ткани на коллапановой подложке у экспериментальных животных / В. Ф. Куцевляк, В. И. Куцевляк, Е. А. Омельченко, А. С. Забирник, И. В. Цыганова // Інновації в стоматології. – 2014. – № 3. – С. 21-25. *Автору належить участь у проведенні експериментальних досліджень, статистична обробка даних, написання статті.*

6. Куцевляк В. Ф. Репаративный остеогенез дефектов нижней челюсти с использованием стволовых клеток жировой ткани (СКЖТ) на коллапановой подложке у экспериментальных животных / В. Ф. Куцевляк, В. И. Куцевляк, Е. А. Омельченко, И. В. Цыганова, А. С. Забирник // Стоматология славянских государств : междунар. науч.-практ. конф., г. Белгород : тезисы допов. – Белгород: ИД «Белгород», 2014. – С. 206-209. *Автору належить участь у проведенні експериментальних досліджень, статистична обробка даних, написання тез.*

7. Куцевляк В. Ф. Транспортные свойства костнопластических материалов как носителей культуры клеток / В. Ф. Куцевляк, В. И. Куцевляк, И. В. Цыганова // Стоматология славянских государств : междунар. науч.-практ. конф., г. Белгород : тезисы допов. – Белгород: ИД «Белгород», 2013. – С. 220-222. *Автор брала участь у експерименті, аналізі результатів, статистичної обробці даних і написанні тез.*

8. Куцевляк В. Ф. Репаративный остеогенез дефектов нижней челюсти с использованием стволовых клеток жировой ткани (СКЖТ) на коллапановой

подложке у экспериментальных / В. Ф. Куцевляк, В. И. Куцевляк, Е. А. Омельченко, И. В. Цыганова // *Інновації в стоматології*. – 2014. – № 3. – С. 164. *Автор брала участь у експерименті, аналізі результатів, статистичної обробці даних і написанні тез.*

АНОТАЦІЯ

Цыганова І. В. Обґрунтування застосування остеопластичних аутологічних біоматеріалів у комплексній терапії хворих на хронічний генералізований пародонтит. – Рукопис.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.01.22 – стоматологія. Державна установа «Інститут стоматології НАМН України», Одеса, 2016.

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.

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, оптимальною виявилася доза 500 тис. стовбурових клітин на обсяг дефекту 0,027 см³.

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

Групу клінічних спостережень склали 20 хворих генералізованим пародонтитом II і III ступеня, яким проведено комплексне лікування. В основній групі з 10 хворих на хірургічному етапі лікування при проведенні клаптевих операцій для стимуляції остеогенезу використовували стовбурові клітини, 10 пацієнтам групи контролю проводили аналогічні клаптеві операції без застосування стовбурових клітин.

Встановлені 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 кишень, встановлюється тривала ремісія.

Ключові слова: аутологічні стовбурові клітини, хронічний генералізований пародонтит, остеопластичний матеріал, регенерація кісткової тканини.

АННОТАЦІЯ

Цыганова И. В. Обоснование применения остеопластических аутологических биоматериалов в комплексной терапии больных хроническим генерализованным пародонтитом. – Рукопись.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 14.01.22 – стоматология. Государственное учреждение «Институт стоматологии НАМН Украины», Одесса, 2016.

В диссертационной работе представлено экспериментально и клинически обоснованное решение актуальной для современной стоматологии задачи - повышение эффективности хирургического этапа комплексного лечения генерализованного пародонтита методом направленной регенерации костной ткани с использованием аутологических стволовых клеток из костного мозга и жировой ткани с Коллапаном в качестве скаффолда.

Изучены транспортные свойства остеопластических материалов *in vitro*. Установлена цитотоксичность двух носителей - Перио-Гласса и Стимул-Осса. Коллапан Л, Био-Ген, Биоколаген, Био-Осс, ОссаБейс, Остеопатит, Кергап-порошок и Кергап-блок - не оказывали негативного влияния на СК, лучший остеогенный результат показал Коллапан Л.

В экспериментальных исследованиях изучено влияние аутологических стволовых клеток кролика в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллион, полученных из костного мозга и жировой ткани, на заживление дырчатых дефектов альвеолярного отростка объемом 0,027 см³. Во всех опытных группах при введении СК, полученных как из жировой ткани, так и из костного мозга, на скаффолде из Коллапана отмечается стимуляция остеогенеза. Согласно морфометрическим данным, выявлено, что на 42 сутки образование остеогенных тканей в группах с введением СККМ было на 14% больше по сравнению с группами с введением СКЖТ. На 90 сутки образование остеогенных тканей в группах животных с введением СККМ было в 3 раза больше, чем в группах с введением СКЖТ. Наиболее оптимальной, интенсивной была стимуляция остеогенеза при введении 500 тыс. СККМ для дефекта объемом 0,027 см³.

В клинических исследованиях участвовало 20 больных генерализованным пародонтитом II и III степени, распределенных в две группы, которым проведено комплексное лечение. На хирургическом этапе комплексного лечения больным контрольной группы проводили лоскутные операции с

направленной регенерацией костной ткани с подсадкой коллапана и 2 млн. аутогенных стволовых клеток и резорбируемой мембраной. Больным контрольной группы были проведены аналогичные операции без применения стволовых клеток. Полученные данные свидетельствуют о том, что применение аутологичных стволовых клеток на хирургическом этапе комплексного лечения болезней пародонта имеет явные преимущества, так как происходит восстановление структуры пародонта, устраняются пародонтальные карманы, устанавливается длительная ремиссия, что подтверждается нормализацией индексной оценки состояния пародонта, процессами регенерации костной ткани альвеолярного отростка.

Ключевые слова: аутологичные стволовые клетки, хронический генерализованный пародонтит, остеопластические материалы, регенерация костной ткани.

ANNOTATION

Tsyganova I.V. Rationale for autologous osteoplastic biomaterials in the treatment of patients with chronic generalized periodontitis. - Manuscript.

The thesis for the degree of candidate of medical sciences in specialty 14.01.22 - stomatology. State Establishment "Institute of Stomatology of Medical Sciences of Ukraine", Odessa, 2016.

During experimental studies investigated transport properties osteoplastic material as scaffold for cell culture, a comparative analysis of the process of healing bone defects of the rabbit jaw in the application of osteoplastic materials with the addition of autologous stem cells from bone marrow.

Proved and experimentally confirmed the possibility of using autologous stem cells from bone marrow and adipose tissue to optimize the regeneration of bone tissue.

Standing dose-dependent effect of stem cells from bone marrow and adipose tissue reduction processes in bone of the lower jaw, the optimal dose was 500 thousand. Stem cells per volume of 0.027 cm³ defect.

It has been shown that administration of 500 thousand. stem cells from bone marrow to Collapan 90 days results in histological structure defect restoration of mandibular.

Clinical observation group consisted of 20 patients with generalized periodontitis II and III, which conducted a comprehensive treatment. In the study group of 10 patients with stage surgical treatment during the scrappy operations to stimulate bone formation using stem cells, 10 patients of the control group performed a similar patchwork operation without the use of stem cells.

The established evidence suggests that the use of autologous stem cells in the surgical phase of complex treatment of periodontal disease has clear advantages over traditional surgical methods of treatment of these diseases, as there is restoration of the structure periodontal pocket removed, installed prolonged remission.

Keywords: autologous stem cell, chronic generalized periodontitis, osteoplastic material, bone regeneration.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

СК – стовбурові клітини

СККМ – стовбурові клітини кісткового мозку

СКЖТ – стовбурові клітини жирової тканини