

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ УКРАИНЫ
ХАРЬКОВСКАЯ АКАДЕМИЯ ПОСЛЕДИПЛОМНОГО ОБРАЗОВАНИЯ

На правах рукописи

ЦЫГАНОВА ИРИНА ВАЛЕРЬЕВНА

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

**ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ
АУТОЛОГИЧНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ В КОМПЛЕКСНОЙ ТЕРАПИИ
БОЛЬНЫХ ХРОНИЧЕСКИМ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ
ПАРОДОНТИТОМ**

14 . 00 . 21 – Стоматология

(Экспериментально - клиническое исследование)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Куцевляк Валентина Фёдоровна

Доктор медицинских наук, профессор

Харьков - 2015

СОДЕРЖАНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	5
ВВЕДЕНИЕ.....	6
РАЗДЕЛ 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	12
1.1. Применение клеточной и тканевой терапии в медицине, характеристика стволовых клеток.....	12
1.2. Биотехнологии в стоматологии.....	25
1.3. Направленная регенерация костной ткани и ее коррекция.....	30
1.4. Роль мембран в направленной регенерации.....	34
РАЗДЕЛ 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	39
2.1. Обоснование цели исследования.....	39
2.2. Экспериментальные методы исследования.....	40
2.3. Клинические методы исследования.....	49
2.4. Статистическая обработка данных.....	53
РАЗДЕЛ 3. ОПТИМАЛЬНЫЙ НОСИТЕЛЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК. ЗАЖИВЛЕНИЕ ДЕФЕКТОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ СКАФФОЛДОВ С ВВЕДЕНИЕМ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА КРОЛИКА IN VIVO.....	55
3.1. Изучение свойств остеопластических материалов -носителей стволовых клеток крыс <i>in vitro</i>	55
3.2. Заживление костных дефектов нижней челюсти кролика при применении различных скаффолдов с костномозговыми стволовыми клетками кролика <i>in vivo</i>	56
РАЗДЕЛ 4. МОРФОГЕНЕЗ КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕЛЮСТИ КРОЛИКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДОЗЫ АУТОЛОГИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И СПОСОБА ИХ ПОЛУЧЕНИЯ.....	68
4.1. Регенерация кости при естественном заживлении на 42-е и 90-е сутки.....	68

4.2. Регенерация кости после введения Коллапана на 42-е и 90-е сутки.	70
4.3. Регенерация дефекта кости нижней челюсти кролика после введения Коллапана с аутологичными СКЖТ.....	72
4.3.1. Регенерация кости нижней челюсти после введения 100 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 42-е и 90-е сутки.....	72
4.3.2. Регенерация кости нижней челюсти после введения 500 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 42-е и 90-е сутки.....	76
4.3.3. Регенерация кости нижней челюсти после введения 1 млн. аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 42-е и 90-е сутки.....	79
4.4. Регенерация дефекта кости нижней челюсти кролика в условиях дырчатого и сочетанного действия Коллапана с аутологичными СККМ	85
4.4.1. Регенерация кости нижней челюсти кролика после введения 100 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном на 42-е и 90-е сутки.....	85
4.4.2. Регенерация кости нижней челюсти кролика после введения 500 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном на 42-е и 90-е сутки.....	89
4.4.3. Регенерация кости нижней челюсти кролика после введения 1 миллиона аутологичных СККМ с Коллапаном на 42-е и 90-е сутки....	92
4.5. Сравнительная характеристика остеогенеза костных дефектов нижней челюсти кроликов после введения СКЖТ с Коллапаном в зону дырчатого дефекта в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллиона на 42 сутки.....	96
4.6. Сравнительная характеристика остеогенеза костных дефектов нижней челюсти кроликов после введения СККМ с Коллапаном в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллиона на 42 сутки.....	98
4.7. Сравнительная характеристика остеогенеза костных дефектов нижней челюсти кроликов после введения СКЖТ с Коллапаном в зону дырчатого дефекта в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллиона на 90-е сутки.....	100
4.8. Сравнительная характеристика остеогенеза костных дефектов	

нижней челюсти кроликов после введения СККМ с Коллапаном в зону дырчатого дефекта в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллиона на 90-е сутки.....	101
4.9. Сравнительная характеристика репаративного остеогенеза дырчатого дефекта в зависимости от свойств стволовых клеток различного происхождения на 42-е сутки после введения СК с Коллапаном.....	102
4.10. Сравнительная характеристика остеогенеза дырчатого дефекта в зависимости от свойств стволовых клеток различного происхождения и их количества на 90 сутки.....	105
РАЗДЕЛ 5. РЕЗУЛЬТАТЫ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ II-III СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ.....	109
АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	133
ВЫВОДЫ.....	142
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	144
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ.....	145

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

СК	- стволовые клетки
КМ	- костный мозг
ЖТ	- жировая ткань
СККМ	- стволовые клетки костного мозга
СКЖТ	- стволовые клетки из жировой ткани
МСК	- мезенхимальные стволовые клетки
ТКФ	- 3кальцийфосфат
ГА	гидроксиапатит

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Воспалительные заболевания пародонта занимают огромное место в патологии зубочелюстной системы. По данным различных статистических источников, значительная часть взрослого населения планеты страдает болезнями пародонта различных степеней тяжести. Современная стоматологическая наука предполагает комплексный подход к лечению, в котором важнейшую роль играют хирургические методы. Однако процент неудач при использовании традиционной терапии требует поиска и разработки новых, более эффективных методик [1, 2, 3].

Успех восстановительного хирургического лечения воспалительных заболеваний пародонта во многом определяется процессами репаративной регенерации костной ткани пациента. Анализ причин неудачного лечения таких больных свидетельствует о том, что пути их преодоления состоят как в совершенствовании технологии самого хирургического вмешательства, так и в создании оптимальных условий для регенерации костной ткани [4].

Проблема регенерации костной ткани является одной из древнейших в медико-биологической науке. В последние десятилетия, в связи с ухудшением экологической обстановки, воздействием мощных стрессовых факторов на организм, отмечено снижение регенераторных возможностей костной ткани, и, следовательно, интенсивности репаративных процессов.

Одним из новых перспективных направлений коррекции процесса регенерации является трансплантация стволовых клеток различного происхождения [5].

Использование метода направленной регенерации костной ткани альвеолярного отростка с добавлением аутологичных стволовых клеток в пародонтальной хирургии при лечении генерализованного пародонтита II и III степени тяжести позволит не только купировать воспалительный процесс, но и анатомически восстановить структурные компоненты пародонта, в первую очередь, альвеолярную кость [6, 7].

Связь работы с научными программами, планами, темами.

Диссертационная работа является фрагментом комплексной научно-исследовательской работы кафедры стоматологии и терапевтической стоматологии Харьковской медицинской академии последипломного образования: «Клиническое течение основных стоматологических заболеваний с учетом соматической патологии в условиях экологически опасных факторов окружающей среды. Разработка схем профилактики, лечения и реабилитации больных с использованием отечественных материалов» (№ ДР 0110U002440). Соискатель была соисполнителем фрагмента вышеуказанной темы.

Цель и задачи исследования.

Целью работы является повышение эффективности хирургического этапа комплексного лечения больных генерализованным пародонтитом путем применения аутологичных стволовых клеток, как стимулятора остеогенеза.

Для достижения этой цели были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать транспортные свойства остеопластических материалов, как носителей культуры клеток и выбрать оптимальный носитель (*in vitro*).
2. Провести сравнительный анализ процесса заживления костных дефектов нижней челюсти кроликов при применении скаффолдов с добавлением стволовых клеток кролика (*in vivo*).
3. Проанализировать морфологические изменения в костной ткани челюсти кролика при использовании аутологичных стволовых клеток, полученных из костного мозга и жировой ткани.
4. Определить в эксперименте регенеративные способности костной ткани в зависимости от количества введенных аутологичных стволовых клеток.
5. Усовершенствовать способ хирургического лечения больных генерализованным пародонтитом с использованием аутологичных стволовых клеток. Оценить ближайшие и отдаленные результаты.

Объект исследования - процессы репаративной регенерации тканей пародонта при использовании остеопластических аутологичных биоматериалов у экспериментальных животных и у больных генерализованным пародонтитом.

Предмет исследования – изучение особенностей репаративной регенерации костной ткани при использовании скаффолдов у экспериментальных животных, дозозависимый эффект скорости заживления экспериментального дырчатого дефекта, исследование регенераторных способностей стволовых клеток различного происхождения в эксперименте, особенности репаративной регенерации тканей пародонта при использовании аутологичных стволовых клеток у больных генерализованным пародонтитом.

Методы исследования. Экспериментальные методы - для изучения транспортных свойств остеопластических материалов-скаффолдов, сравнительного анализа процессов заживления костных дефектов при использовании стволовых клеток, морфологических изменений костной ткани челюсти кролика, в зависимости от количества введенных аутологичных стволовых клеток и способа их получения (из костного мозга или жировой ткани);

клинические - для оценки стоматологического статуса больных, состояния тканей пародонта с помощью аппаратно-диагностического комплекса Florida-probe, панорамная рентгенография;

статистические - для оценки достоверности полученных результатов.

Научная новизна полученных результатов.

Впервые в Украине на основании экспериментальных исследований изучены транспортные свойства восьми остеопластических материалов-скаффолдов. Установлено, что лучшими транспортными свойствами обладает Коллапан Л.

Впервые проведен сравнительный анализ процесса заживления костных дефектов челюсти при применении остеопластических материалов с добавлением аутологичных стволовых клеток из костного мозга кролика.

Впервые обосновано и экспериментально подтверждена возможность применения аутологичных стволовых клеток из костного мозга (СККМ) и жировой ткани (СКЖТ) для оптимизации регенерации костной ткани с целью повышения эффективности хирургического лечения больных генерализованным пародонтитом II и III степени.

Впервые установлен дозозависимый репаративный эффект стволовых клеток из костного мозга и жировой ткани. Оптимальной оказалась доза 500000 стволовых клеток на объем дефекта $0,027 \text{ см}^3$ костной ткани нижней челюсти.

Впервые в эксперименте установлено, что стволовые клетки костного мозга обладают более выраженными остеогенными свойствами по сравнению со стволовыми клетками жировой ткани.

Впервые установлено, что введение 500 тыс. стволовых клеток из костного мозга на Коллапане через 90 дней приводит к восстановлению гистологической структуры дефекта нижней челюсти.

Практическое значение полученных результатов.

Впервые в Украине экспериментально и клинически обоснован дозозависимый эффект применения СККМ и СКЖТ. Проведенные экспериментальные и клинические исследования показали, что аутологичные СККМ и СКЖТ на остеопластических скаффолдах обладают репаративной способностью и могут быть применены с целью направленной тканевой регенерации на этапе хирургического лечения больных генерализованным пародонтитом II и III степени, а также в челюстно-лицевой хирургии, имплантологии, ортопедии и травматологии, что позволяет значительно повысить эффективность лечения.

Личный вклад соискателя. Автором совместно с научным руководителем разработан план исследований, определены цели и задачи,

написаны статьи. Автором совместно с научным руководителем выбранные методы исследования и написана диссертационная работа. Экспериментальные и лабораторные методы исследования выполнены автором совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной диагностики ООО «Вирола» (заведующий лабораторией к.б.н. Омельченко Е. А.). Клинические исследования выполнены автором на кафедре стоматологии и терапевтической стоматологии ХМАПО на базе областной стоматологической поликлиники (главный врач Волосов Е. В.) и фирмы «Фортуна» (главный врач д.м.н., проф. Любченко О. В.).

Апробация результатов диссертации. Материалы диссертации представлены и обсуждены на VI международной научно-практической конференции «Стоматология славянских государств», Белгород 2013; на VII Международной научно-практической конференции «Стоматология славянских государств», Белгород, в 2014; доклад на VI (XIII) Съезде Ассоциации стоматологов Украины, на симпозиуме молодых ученых и практических врачей, Одесса, в 2014; на научно-практической конференции с международным участием «Регенеративная пародонтология: современность и будущее», Киев, 2015; на научно-практической конференции с участием международных специалистов, посвященной дню науки «Вклад молодых ученых и специалистов в развитие медицинской науки и практики: новые перспективы», Харьков, 2015 году, на международной научно-практической конференции «Клеточная терапия и тканевая биоинженерия в стоматологии», Одесса, в 2015.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 9 научных работ, из них 8 статей, из которых 4 статьи - в профессиональных изданиях Украины, 1 в профессиональном издании Беларуси, 2 статьи в материалах научных конференций в г. Белгороде, 1 методические рекомендации, 1 тезисы доклад в профессиональном издании Украины.

Объем и структура диссертации.

Работа содержит введение, 5 глав, выводы, практические рекомендации, список использованной литературы. Диссертация изложена на 174 страницах печатного текста, из них 144 занимает основной текст. Наглядная иллюстрация работы сделана с помощью 4 таблиц, 68 рисунков. Список литературы состоит из 242 наименований, из них 118 кириллицей, 124 латиницей.

РАЗДЕЛ 1

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Применение клеточной и тканевой терапии в медицине и стоматологии. Характеристика стволовых клеток

Уже в начале XX века ученые предполагали, что во многих тканях существуют клетки, способствующие регенерации этих тканей и активизирующие деление обычных клеток [8].

Термин "стволовая клетка" был введен в биологию в 1908 году выдающимся русским ученым А. А. Максимовым, одним из создателей унитарной теории кроветворения на съезде гематологического общества в Берлине. Несколько позже профессор московского НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалея А. Я. Фриденштейн подтвердил предположение коллеги и, изучая возможности этих клеток, стал разрабатывать сферу их применения [9, 10].

Первые эксперименты по использованию стволовых клеток были проведены в самом начале 1950-х годов. Было доказано, что с помощью трансплантации костного мозга можно спасти животных, получивших смертельную дозу радиоактивного облучения. Понадобилось почти 20 лет, чтобы трансплантация костного мозга вошла в арсенал практической медицины [11].

В 60-х годах советские ученые А. Я. Фриденштейн и Чайлахян Р.К. заложили основы науки о стволовых клетках костного мозга, доказав, что именно там, главным образом, и находится их депо. В конце 60-х были получены убедительные данные о возможности трансплантации костного мозга при лечении острых лейкозов, рассеянном склерозе. Потом стало известно, что часть стволовых клеток мигрирует в крови, есть они и в различных тканях, в частности кожной и жировой [9, 12, 13].

Первые трансплантации стволовых клеток проводили в 1970 году в виде «прививок молодости» [14].

В 1988 году стволовые клетки костного мозга были впервые успешно использованы для лечения болезней крови[15].

С 1997 года проводятся трансплантации пуповинной крови. В 2001 году опубликованы первые официальные данные о возможности применения трансплантации стволовых клеток пуповинной крови у взрослых пациентов. Из них более 90% с хорошим результатом [16, 17].

В 2003 году журнал Национальной Академии Наук США (PNAS USA) опубликовал сообщение о том, что через 15 лет хранения в жидком азоте стволовые клетки пуповинной крови полностью сохраняют свои биологические свойства. К 2004 году общая мировая коллекция стволовых клеток пуповинной крови приближается к 400 тыс. образцов. В мире произведено более 5 тыс. трансплантаций пуповинной крови. Для сравнения, число трансплантаций костного мозга за тот же период составило около 85 тыс. [18-20].

В этом же году показана способность взрослых гемопоэтических и стромальных клеток костного мозга человека дифференцироваться в кардиомиоциты и гладкомышечные клетки, эта способность используется в регенеративной кардиологии [21-25].

В выпуске The Lancet от 4 января 2004 года опубликовано два сообщения о результатах инъекции аутологичных стволовых клеток костного мозга больным, страдающим тяжелой стенокардией или перенесшим инфаркт миокарда. Источником культивированных моноклеарных клеток служил костный мозг, взятый из гребня подвздошной кости больного. Через несколько месяцев отмечено заметное улучшение перфузии миокарда и функции левого желудочка [26, 27].

Исследования эмбриональных стволовых клеток и стволовых клеток взрослого организма ведутся чрезвычайно активно, в мировой научной прессе появляются все новые сообщения о достижениях ученых [28].

Стволовые клетки классифицируются по источнику выделения и по способности к дифференцированию [29, 30].

По способности к дифференцированию [31] выделяют:

- тотипотентные, образующие клетки любых типов. Тотипотентные клетки способны формировать все эмбриональные и экстраэмбриональные типы клеток;
- плюрипотентные, образующие клетки многих типов, но не всех. К ним относятся эмбриональные стволовые клетки, первичные половые клетки и клетки эмбриональных карцином [32];
- мультипотентные, образующие клетки нескольких типов [33, 34];
- унипотентные - образующие только 1 тип клеток [35].

По источнику выделения различают:

- эмбриональные стволовые клетки – внутриклеточная масса раннего эмбриона (на этапе бластоцисты 4-7 недель развития) [36-38];
- фетальные стволовые клетки – клетки зародыша на 9-2 недель развития, выделенные из абортивного материала [39-42];
- клетки пуповинной крови – заготавливаются во время родов [15, 17, 19, 43-50];
- мезенхимальные стволовые клетки – мультипотентные региональные стволовые клетки, содержащиеся во всех мезенхимальных тканях (главным образом, в костном мозге) способные к дифференцированию в различные типы мезенхимальных тканей, а также в клетки других зародышевых слоев [37, 51-55].

Стромальные стволовые клетки – мультипотентные стволовые клетки взрослого организма, образующие строму костного мозга, имеющие мезенхимальное происхождение [52, 56-61].

Мультипотентные стромальные клетки были впервые выделены и описаны в конце 60-х годов в лаборатории А. Я. Фриденштейна при анализе клеточных популяций костного мозга [9].

Гемопоэтические стволовые клетки – мультипотентны, они дают начало всем клеткам крови – эритроцитам, В-лимфоцитам, Т-лимфоцитам, нейтрофилам, базофилам, эозинофилам, моноцитам, макрофагам и тромбоцитам. Кроме костного мозга, гемопоэтические стволовые клетки обнаружены в системном кровотоке и скелетных мышцах [62, 63].

Тканеспецифичные стволовые клетки – располагаются в различных видах тканей и в первую очередь отвечают за обновление их клеточной популяции, первыми активируются при повреждении, обладают более низким потенциалом, чем стромальные клетки костного мозга.

Тканеспецифичные стволовые клетки:

- Нейрональные стволовые клетки в головном мозге – дают начало трем основным типам клеток: нервным клеткам (нейронам) и двум другим группам не нейрональных клеток - астроцитам и олигодендроцитам.

- Стволовые клетки кожи – размещены в базальных пластах эпидермиса и возле основы волосяных фолликулов, которые могут давать начало кератоцитам, которые мигрируют на поверхность кожи и формируют защитный слой кожи [64].

- Стволовые клетки скелетной мускулатуры – выделяют из поперечнополосатой мускулатуры, они способны к дифференцировке в клетки нервной, хрящевой, жировой и костной ткани, поперечнополосатой мускулатуры. Однако последние исследования показывают, что клетки скелетной мускулатуры - не что иное, как мезенхимные стволовые клетки, локализованные в мышечной ткани [65-67].

- Стволовые клетки миокарда – способны дифференцироваться в кардиомиоциты и эндотелий сосудов [68, 69].

- Стволовые клетки жировой ткани – обнаружены в 2001 году, проведенные с тех пор дополнительные исследования показали, что эти клетки могут превращаться в другие типы тканей, из них можно выращивать клетки нервов, мышц, костей, кровеносных сосудов или, по крайней мере, клетки, имеющие свойства вышеперечисленных. СК жировой

ткани получают при липэктомии в разных участках тела. СКЖТ способны дифференцироваться в клетки костной, хрящевой, жировой, мышечной и нервной ткани [70-72].

- Стромальные клетки спинного мозга (мезенхимальные стволовые клетки) дают начало разным типам клеток [42, 57].

Актуальность проблемы стволовых клеток не вызывает сомнений, ведь их потенциал только начинает использоваться наукой. Несомненно, преимущество аутологичных стволовых клеток в том, что их можно вырастить из клеток самого пациента, и они не будут вызывать отторжения. Потребности медицины в таком материале практически не ограничены [73].

Изучение эмбриональных стволовых клеток началось в 1963 году, первоначально с использованием дезагрегированных эмбрионов кроликов и мышей [32, 35]. Входящие в их состав клетки широко дифференцировались, в зависимости от их подверженности влиянию различных цитокинов или субстратов. Были установлены маркеры для дифференциации или плюрипотентности, что выявило, как нервные, кардиальные, гематологические и другие линии эмбриональных стволовых клеток могут быть определены *in vitro*. Это оказалось полезным в изучении ранней дифференциации и использовании этих клеток при пересадке больным. Демонстрирующие сходные свойства человеческие эмбриональные стволовые клетки обнаружены в конце 1990х.

Модели для клинического использования эмбриональных стволовых клеток показали, как они быстро двигаются к тканям-мишеням по эмбриональным путям, дифференцируются и колонизируют орган-мишень. Никаких признаков воспаления или повреждения тканей не было обнаружено; поврежденные ткани могли быть восстановлены, включая ремиелинацию, и не образовывалось никаких опухолей. Эмбриональные стволовые клетки имеют широкий терапевтический потенциал для человека, хотя обширные клинические исследования все еще ждут своего выполнения [74].

Эмбриональные стволовые клетки, выделенные из внутренней массы ранних мышинных эмбрионов, характеризуются почти неограниченной пролиферацией и способностью дифференцироваться в дериваты, по существу, всех линий [75, 76].

Было проведено исследование *in vitro* и *in vivo* человеческих эмбриональных клеток из костного мозга, полученных в результате прерывания беременности 16-20 недель, а также, сравнение функциональных характеристик эмбрионального костного мозга, взрослого костного мозга, пуповинной крови и периферической крови – источников наиболее примитивных стволовых клеток (прогениторных клеток).

Наблюдения показывают, что каждый источник гемопоэтических стволовых клеток имеет различные внутренние свойства, тесно коррелирующие с онтогенетическим возрастом, определения линии дифференцировки, иммуногенности и пролиферативного потенциала. Эти данные показывают, что эмбриональные стволовые клетки являются лучшим источником стволовых клеток для трансплантации и терапевтической реконституции из-за очень высокой пролиферативной способности, низкой иммуногенности и наиболее высокого числа прогениторных клеток [77].

Эмбриональные ткани являются богатейшим источником изначальных стволовых клеток и имеют несколько свойств, которые делают их особенно полезными при пересадке. Они являются превосходящими взрослые (зрелые) ткани в определенных отношениях. Эмбриональные клетки способны пролиферировать быстрее, чем зрелые, в полностью дифференцированные клетки [78].

Поскольку в ранних эмбриональных гемопоэтических тканях отсутствуют лимфоциты, реакции «трансплантат против хозяина» минимизированы. Эмбриональные ткани могут быть использованы по различным показаниям: трансплантаты эмбриональной печени быть использованы для борьбы с апластической анемией; кровь пуповины может служить альтернативой трансфузии цельной крови взрослых.

Эмбриональный трансплантат надпочечников был испытан для борьбы с хронической болью при артритах; эмбриональный трансплантат тимуса использовался для лечения различных иммунодефицитных состояний. Существуют потенциальные возможности использования эмбриональных тканей в биоинженерии [79].

Таким образом, эмбриональные стволовые клетки обладают большей способностью к пролиферации и большей пластичностью (способностью к более разнообразной дифференцировке), чем взрослые стволовые клетки, а также низкой иммуногенностью.

Однако, манипуляции над яйцеклеткой и бластоцистой нарушают этические нормы, поэтому во многих странах применение эмбриональных клеток законодательно запрещено.

Использование стволовых клеток взрослого организма в экспериментальных исследованиях и в клинической медицине не связано с существенными биоэтическими ограничениями [80].

Гемопозитические стволовые клетки имеют наибольшее значение в регенеративной медицине и являются важнейшим источником получения собственных стволовых клеток, они способны образовывать не только клетки крови, но и другие типы клеток, хотя до недавнего времени стволовые клетки в костном мозге считали специфичными для гемопоэза [45, 81, 82].

Гемопозитические стволовые клетки определяются по их способности давать все гемопоэтические линии *in vivo* и поддерживать образование этих клеток в течение всей жизни человека. Поэтому они являются привлекательной мишенью для генной терапии генетических болезней иммунной и гемопоэтической систем. Стволовые клетки относительно легко получить пункцией костного мозга. В настоящее время создаются способы, увеличивающие выход гемопоэтических стволовых клеток из костного мозга [83-85].

Мезенхимальные стволовые клетки являются предшественниками всех клеток соединительной ткани [86-96].

Они могут выделяться из костного мозга [38], надкостницы, трабекулярной кости, хряща [97, 98] жировой ткани [99-102], синовиальной оболочки [103], скелетной мускулатуры [79, 104], кожи, пуповины [50, 60], молочных зубов и других тканей у взрослых особей множества видов позвоночных.

Мезенхимальные стволовые клетки размножаются в культуре и под действием специфических факторов дифференцируются в несколько видов тканеобразующих клеток, таких, как кость, хрящ, жир, мускулатура, сухожилие, печень, почки, сердце, клетки мозга, эндотелиоциты, инсулинпродуцирующие и даже гемопоэтические клетки [89, 105, 106].

Мезенхимальные стволовые клетки взрослого человека из костного мозга представляют собой легкодоступную и относительно хорошо охарактеризованную популяцию стромальных клеток-предшественников. При необходимости они выходят в кровь, поступают в поврежденный орган или ткань и превращаются в специализированные клетки для их восстановления.

Эффективность применения МСК отмечена для лечения и профилактики реакции трансплантат против хозяина [91, 107, 108], ожоговых поражений [109], переломов [42, 110-112], хрящевой ткани [113-115], нейродегенеративных заболеваний [116-118], инфаркта миокарда [30, 119], инсульта [120], сахарного диабета первого типа [121-123], множественной системной атрофии, язвы желудка [124], цирроза, печеночной недостаточности [125, 126], гепатита В [127], бокового амиотрофического склероза [128-131] и т.д.

Ряд исследований наглядно демонстрирует кооперативные взаимодействия между клеточными популяциями. Так, изолированные из костного мозга клетки, являющиеся клетками-предшественниками фибробластов, способны при культивировании формировать остеобласто- и хондробластоподобные колонии [29].

Некоторые разительные примеры терапевтического использования мезенхимальных стволовых клеток были недавно описаны для таких случаев, как коронарная болезнь артерий [132, 133], повреждение спинного мозга, болезнь Паркинсона и регенерация печени [129, 134, 135].

В ортопедической медицине мезенхимальные стволовые клетки применяли для восстановления костей и хряща, а так же при лечении остеоартрита [136].

Мезенхимальные стволовые клетки обладают отличной способностью к миграции и оказывают ингибиторный эффект на клетки глиомы [137].

Таким образом, мезенхимальные клетки являются универсальным источником стволовых клеток для генной инженерии [81, 138].

Методы идентификации, культивирования, накопления клеточной массы и пересадки стволовых клеток описаны, включая выделение линий гемопоэтических и мезенхимальных линий стволовых клеток и детальный анализ, использующий многочисленные CD и другие маркеры для идентификации малых субпопуляций стволовых клеток [139-141].

До недавнего времени в центре внимания исследователей, занимающихся тканевой инженерией, находились стромальные клетки костного мозга. Сейчас внимание привлекает жировая ткань, которая подобно костному мозгу, имеет мезодермальное происхождение и содержит хорошо развитую строму [34, 142, 143].

По мнению Д. О. Трактюева с соавторами (2006) [144-146], по сравнению с стромальными клетками костного мозга стромальные клетки жировой ткани имеют ряд преимуществ - они более доступны, выделяются в большем количестве, их способность дифференцироваться в остеогенном направлении меньше зависит от возраста донора.

СКЖТ обладают высокой пластичностью и способны дифференцироваться *in vitro* и *in vivo* не только в ортодоксальном направлении (в клетки кости, хряща, и жира), но и в миоциты,

кардиомиоциты, нейроны, эндотелиоциты, гепатоциты и даже гемопоэтические клетки [12, 141, 145].

Noel D. et al. [80], исследуя СКЖТ и КМ, в одинаковых условиях *in vitro*, показали, что клетки проявляют одинаковую способность к дифференцировке в остеогенном и хондрогенном направлениях. Однако по данным Vochev et al. [147] СКЖТ обладают меньшим потенциалом к дифференцировке в остеогенном направлении, чем СККМ. Экспериментальные данные дают основания предполагать, что мезенхимальные стволовые клетки КМ и ЖТ обладают сравнимым потенциалом в отношении формирования кости *in vivo*.

Интерес биологов и врачей к стромальным клеткам, получаемым из жировой ткани, обусловлен, в первую очередь, доступностью материала для выделения клеток, поскольку одним из способов их получения является косметическая липосакция [12, 77, 144, 148].

Как свидетельствуют исследования Савченкова И.П. с соавторами (2008) [141], популяция свежевыделенных клеток жировой ткани гетерогенна и характеризуется высоким содержанием клеток, экспрессирующих антиген CD34. В процессе культивирования наблюдается обогащение популяции клетками, несущими маркеры, идентичные мезенхимальным стромальным клеткам КМ [93, 100, 141, 145, 149].

Поэтому в ряде случаев стромальные клетки ЖТ могут представлять собой альтернативу мезенхимальным стромальным клеткам из КМ, получение которых связано с определенными техническими и медицинскими проблемами [77, 144, 149].

Стромальные клетки ЖТ способны дифференцироваться в клетки костной, хрящевой, жировой, мышечной, нервной ткани, а также в клетки сосудистой стенки (эндотелиальные и перициты) [102, 103, 147, 150-152].

В исследованиях последних лет [96, 140, 153] доказано, что стромальные клетки ЖТ обладают выраженной ангиогенной активностью, в основном за счет секреции ряда ключевых ангиогенных факторов роста: фактора роста

эндотелия сосудов (VEGF), фактора роста гепатоцитов (HGF), фактора роста фибробластов 2-го типа (FGF2) и др.

В последнее время были идентифицированы взрослые стволовые клетки с не очень широким потенциалом дифференциации [66].

Соматические стволовые клетки представляют собой относительно недифференцированные клетки, которые способны трансформироваться в ограниченное число клеточных типов, образующих ткани взрослого организма, например - головной мозг, КМ.

Majumdar M. K. (2000) [54] доказано, что источниками соматических стволовых клеток являются КМ, периферическая кровь, глаз, головной мозг, скелетная мускулатура, пульпа зуба, печень, кожа, слизистые оболочки желудочно-кишечного тракта, поджелудочная железа. Данный вид клеток поддерживает дифференциацию клеток в тканях на протяжении всей жизни взрослого организма, обладая потенциалом мульти - и унипотентного созревания.

Данный вид стволовых клеток может дифференцироваться в дентинформирующие одонтобласты, что обосновывает их применение для восстановления тканей зуба [9]. Основное морфогенетическое звено, регулирующее эти процессы, окружающий дентин межклеточный матрикс, в частности костные морфогенетические белки.

Таким образом, тканеспецифичные стволовые клетки способны дифференцироваться в другие типы клеток, но *in vivo* этот процесс малоэффективен. Тем не менее, сейчас разрабатываются подходы, делающие возможным использование и этого источника стволовых клеток [154-156].

В последние годы ускоренными темпами развивается новое направление медицинской отрасли - клеточная трансплантация. В настоящее время научно-исследовательские разработки выходят за границы лабораторий и внедряются в клиническую практику [6, 138].

В 2001 г была предложена концепция, что клетки костного мозга могут дать начало новым кардиомиоцитам, что дало начало клиническим

исследованиям. В исследовании 2004 г. высказывается предположение о том, что клетки не трансдифференцируются в кардиомиоциты, а сливаются с существующими зрелыми кардиомиоцитами и передают свои маркеры миоцитам [157].

Десяти пациентам с ишемической кардиомиопатией и дисфункцией левого желудочка выполнялось аортокоронарное шунтирование и имплантации миобластов интрамиокардиально [158, 159]. Исследования показали сохранение клеточной массы на уровне 30 - 35% в миокарде даже через сутки. Поэтому оптимальной является доставка терапевтических клеток непосредственно в ишемизированный орган [160].

Мононуклеары костного мозга не восстанавливают миокард, однако они способны стимулировать процесс образования новых сосудов, тем самым улучшая оксигенацию миокарда, не устраняя рубцовую ткань. Если другие концепции оспариваются по механизмам эффективности, то ангиогенез, вследствие трансплантации клеток, не вызывает сомнений [23, 161].

Пути индукции формирования новых сосудов полностью еще не изучены, но имеют в своей основе паракринный механизм.

Выявлено улучшение сократительной способности в сегментах, где выполнялась инъекция клеток костного мозга и аортокоронарное шунтирование, процедура безопасна и не вызвала осложнений [69, 162, 163].

Среди множества клеток, используемых для стимуляции ангиогенеза, чаще всего применяют мезенхимальные культивированные стволовые клетки или мононуклеарную фракцию клеток аутологичного костного мозга [164]. Изучаются также наиболее эффективные пути их доставки к поврежденному миокарду: прямая интрамиокардиальная (чрезэпикардальная или чрезэндокардиальная) инъекция, интракоронарное или системное введение [159, 160, 165].

На современном этапе развития офтальмологии авторы большинства работ сосредоточились на замещении ганглиозных клеток сетчатки, потому что

их гибель - это окончательный этап патогенеза различных нейроретинопатий. Обнаружение способа дифференцирования стволовых клеток в ганглионарные клетки сетчатки будет главным шагом в репопуляции нейронов при их гибели [166, 167]. Главные проблемы - выживание и дифференцирование стволовых клеток, обеспечение оптимального состояния микроокружения, прорастание аксонов в зрительный нерв, образование функциональных связей в латеральном колленчатом ядре, и соответствующая активация транссинаптических связей в корковых отделах [158, 168].

Другой легкодоступный и многообещающий источник нейрональных клеток-предшественников для аутогенной терапии стволовыми клетками - взрослый лимбальный эпителий [146, 169-171]. Несмотря на свое «неневральное» происхождение, клетки-предшественники из лимбального эпителия могут образовывать нейроны и глию.

С развитием тканевой инженерии ретинальные стволовые клетки, импрегнированные в полимеры, будут трансплантированы в субретинальное пространство.

Целый ряд зарубежных авторов [58, 168] считают, что для восстановления поврежденной сетчатки могут быть использованы стволовые клетки, полученные из центральной нервной системы и тканей глаза. Стволовым клеткам из тканей глаза уделяется большое внимание, поскольку возможно их аутологичное получение и применение.

В 2005 году перечень заболеваний, при лечении которых может быть успешно применена трансплантация стволовых клеток, достигает нескольких десятков.

Разработаны международные протоколы лечения рассеянного склероза. Проводятся многоцентровые исследования при лечении инфаркта миокарда и сердечной недостаточности. Ведётся поиск методов лечения инсульта, болезни Паркинсона и Альцгеймера [43, 81, 83].

Таким образом, применение стволовых клеток открывает всё новые перспективы в таких отраслях медицинской науки, как кардиология,

травматология, неврология, офтальмология. Регенеративная клеточная терапия является активно развивающимся направлением медицинских биотехнологий, безусловно, применимых в лечении пациентов с тяжелой соматической патологией, поскольку является патогенетическим методом. Интерес отечественных и зарубежных ученых к уникальным свойствам тканевой терапии не ослабевает [5].

1.2 Биотехнологии в стоматологии

Изучение стволовых клеток и успехи в области клеточной и молекулярной биологии создают условия для развития новой стратегии терапии - регенерации тканей, поврежденных в результате травмы или заболеваний и формирования нового раздела медицины - регенеративной стоматологии. Тканевая инженерия основана на принципах идентификации клеток с последующим культивированием, результатах изучения механизмов, инициирующих дифференцировку клеток. В последние годы рассматривается применение СК, тканевой инженерии для регенерации костных дефектов челюстей, тканей зуба и пародонта [172, 173].

Ведущими странами в разработке проблемы тканевой и клеточной терапии в стоматологии являются США, Япония, Китай и Германия. Большинство исследователей работают на лабораторных моделях, при преобладании исследований *in vitro* [8].

Принято считать, что основной функцией стволовых клеток во взрослом организме является замена отслуживших дифференцированных клеток и восстановление клеточного состава поврежденных тканей, что актуально для комплексного лечения заболеваний пародонта [173].

Стволовые клетки из периодонтальной связки впервые выделены в 2004 г. Seo В.М., Miura М [174]. Установлены их мультипотентные свойства и способность к дифференцированию в адипоциты, остеобласто- и цементобластоподобные клетки *in vitro* и формированию цемента и тканей периодонтальной связки *in vivo* [36].

М. Tobita и соавт. (2008) показали, что стволовые клетки жировой ткани с обогащенной тромбоцитами плазмой поддерживают регенерацию пародонта, включая альвеолярную кость и структуры периодонтальной связки на дефектах пародонта крыс *in vivo* [175].

In vivo, в модель костного дефекта, в состав имплантата, вводили обогащенную тромбоцитами плазму и стволовые клетки, полученные из пульпы молочных зубов или костного мозга. Через 8 и 16 недель после имплантации проводили гистологическое и гистометрическое исследование препаратов челюсти. Установлено, что регенерация костной ткани значительно ускорилась. В зоне дефекта образовывалась зрелая костная ткань и восстанавливалась сеть кровеносных сосудов [176].

Потенциальным источником СК с высокой клоногенной и пролиферативной активностью является пульпа зуба. СК пульпы способны формировать минерализованные ткани как *in vitro*, так и *in vivo* [177]. СК изолируют из пульпы третьего моляра путем ферментативного расщепления тканей пульпы или при пульпэктомии [175].

СК пульпы способны к дифференцировке в остеогенные, одонтогенные, нейрогенные, липогенные линии *in vitro*. Эти клетки характеризуются высоким содержанием щелочной фосфатазы, они экспрессируют маркеры к остеоонектину, остеокальцину, секреторному фосфопротеину [174], способны дифференцироваться в остеоциты и формировать компактную кость *in vivo*. Скорость пролиферации DPSC выше, чем у BMSC. [175].

В исследовании S. Otaki (2007) была описана способность стволовых клеток пульпы зубов человека к самовосстановлению, дифференцированию в разных направлениях и клонообразованию [178].

Chang S.H. (2010) [179] на лабораторной модели (мыши с ослабленным иммунитетом) оценил возможность регенерации васкуляризованной пульпы зуба и продукции нового дентина на сохранившихся дентинных стенках в канале зуба, после проведенной обработки канала. Стволовые клетки

апикальной части сосочка и пульпы были изолированы и помещены на подложку из D, L-лактид/гликолиза, введенного во фрагменты зубов, после чего трансплантированы в каналы зубов. Полость канала быстро наполнялась пульпоподобной тканью с хорошо развитыми кровеносными сосудами. На стенках образовывались отложения дентиноподобной ткани с сиалопротеидами дентина и костной ткани. Таким образом, регенерация пульпы *de novo*, посредством стволовых клеток, способных дифференцироваться в одонтобластоподобные клетки, вполне возможна [176, 178].

Стволовые клетки пульпы зуба демонстрировали способность образовывать гетерогенные дентинные комплексы в тканях мышей с ослабленным иммунитетом после трансплантации.

Эти комплексы содержали смесь энамелобластов, мезенхимальных клеток пульпы и механического носителя, что позволило использовать стволовые клетки для замещения дефектов дентина, эмали, пульпы, реконструкции денто-альвеолярных и кранио-фасциальных костных дефектов, а в перспективе - рассчитывать даже на замещение всего зуба. [98, 172, 177, 180-183].

Одним из перспективных направлений регенеративной стоматологии является культивирование целого зуба. М. Oshima и соавт. в 2011 г. культивировали СК зуба, которые позже пересадили мышам. Выращенные в ходе эксперимента однокорневые зубы по строению не отличались от нормальных, кроме расположения зубов относительно друг друга, небольших отклонений в геометрии апекса корня, положения бугорков, общего размера зуба.

В периодических источниках встречаются публикации по проблеме применения мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, полученных из удаленных молочных зубов, пульпы зубов, стволовых клеток с апикальной части сосочка, зубного фолликула, периодонтальной связки или костного мозга. Авторы рассматривают эти клетки, как перспективные для дальнейшего

применения в регенерационной стоматологии и в эндодонтической практике [184-188].

В пульпе молочного зуба обнаружили СК с высокой пролиферативной способностью. Они относятся к мультипотентным клеткам, способным к самовосстановлению. Молочные зубы могут быть идеальным источником аутологичных СК [178].

В эксперименте изучены процессы регенерации участка повреждения кости нижней челюсти крыс в разные сроки после введения суспензии аутологичных мезенхимальных СККМ в культуральной среде. В костной мозоли значительно раньше формировались структуры красного костного мозга, чем при естественном ходе регенерации. Образование полостей с костным мозгом приводила к тому, что на 4-й и 5-й неделях наблюдения плотность костной ткани на участке повреждения после применения СККМ меньше, чем при спонтанном заживлении, что свидетельствует об ускоренном развитии репаративных процессов. Однако возможно снижение прочностных свойств восстановленной кости из-за присутствия больших полостей, заполненных костным мозгом [189].

М. Д. Перовой и соавт. (2007) проведено клиническое исследование роста нового зубодесневого прикрепления после аутотрансплантации стволовых клеток жировой ткани при пародонтите. Это расширяет возможности замещения глубоких пародонтальных дефектов, когда наблюдается критический дефицит собственного костного субстрата [191, 192].

Пожарицкая М. М. (2004), Смолянинов А. Б и соавт. (2006), Иорданишвили А. К. (2006), Н. А. Боброва и соавт. (2010) описывают применение аутологичных мезенхимальных стромальных клеток крови в хирургическом лечении хронического генерализованного пародонтита, с целью стимуляции репаративных процессов в тканях пародонта.

Рентгенологически подтверждено восстановление костной ткани (в среднем на 30 - 35%) через 6 месяцев лечения [2, 192-194].

При резорбции до $\frac{1}{3}$ длины корня, восстановление костной ткани было полным у 48% пациентов, при резорбции на $\frac{1}{2}$ - у 34,3% пациентов восстановление до $\frac{1}{3}$, а при резорбции на $\frac{2}{3}$ длины корня восстановление произошло до $\frac{1}{2}$ у 17,1% пациентов. Денситометрия участка альвеолы после операции показала уплотнение костной ткани в среднем на 11,63% [195, 196].

М.Р. Кауламбаева (2009) вводила экспериментальным животным инъекции предкультивированных аутологичных клеток костного мозга в сочетании с костным коллагеном в область костного дефекта. На 40-е сутки эксперимента прирост костной ткани в этой группе составил 78,57%, что в 2 раза больше, чем в контроле [197].

И.Ю. Чаусская и соавт. (2010) успешно использовали клеточную культуру стволовых клеток, полученных из жировой ткани у 15 больных: при деформации альвеолярного отростка верхней челюсти в области 1 зуба - у 5 больных; при синус-лифтинге - у 4 больных, при деформации альвеолярного отростка нижней челюсти в дистальных отделах - у 6 больных [198, 199].

В течение ряда лет использовали щечные жировые подушки для реконструкции мягкого неба, дефектов нижней челюсти и расщелин неба, но публикации об использовании СКЖТ для восстановления черепно-лицевых дефектов единичны [200, 201].

Для успешной стимуляции регенеративного процесса необходима предварительная дифференциация стволовых клеток из жировой ткани, культивирование стволовых клеток в трехмерных конструкциях усиливает остеогенную дифференцировку клеток [199, 202].

Трансплантация мезенхимальных стволовых клеток может применяться для восстановления целостности костей краниофациальной области или регенерации тканей зуба. Наиболее часто необходимость в таком лечении возникает после хирургического вмешательства по поводу злокачественного опухолевого роста, при различных инфекционных, травматических, врожденных заболеваниях приводящих к нарушению формирования костной

ткани, а также при системных прогрессирующих заболеваниях костной ткани [200, 203].

Хотя применение стволовых клеток в стоматологии ограничивается проведением поисковых лабораторных исследований, накопленный опыт свидетельствует о значительных перспективах применения нового метода [204].

Таким образом, создание тканеинженерных конструкций, содержащих стволовые клетки, является перспективным высокотехнологичным методом. Разные способности СК к дифференцировке, разнообразие скаффолдов и факторов микроокружения определяют возможность использования этих клеток для регенерации тканей челюстно-лицевой области. Несомненно, имеющиеся в настоящее время данные позволяют использовать СК для регенерации как тканей зуба, пародонта, так и для замещения костных дефектов костей черепа и челюстей. Относительная доступность СК и способность к направленной дифференцировке значительно повышают их роль в замещении дефектов и открывают перспективы для развития регенеративной стоматологии [25, 205, 206].

1.3 Направленная регенерация костной ткани и ее коррекция

Замещение дефектных участков костной ткани с полным восстановлением нативной кости в зоне дефекта - острейшая проблема современной медицины в целом и стоматологии, в частности. Становится очевидной необходимость изыскания новых методов, обеспечивающих полную репарацию костных дефектов [207, 208].

Одной из сложных проблем является выбор адекватного скаффолда для культуры стволовых клеток. Поскольку простое инъекционное введение взвеси СК не даёт ожидаемого образования костной ткани, параллельно разработке методов культивирования, идут поиски оптимального скаффолда [209-210]. Скаффолд - физико-химическая и биологическая среда, необходимая для усиления пролиферации и дифференцировки клеток *in vitro* и увеличения поверхности новой ткани *in vivo*. В качестве скаффолдов могут быть

использованы биоматериалы (коллаген, минерализованный гидроксиапатит, гидроксилцеллюлоза [211], трикальцийфосфат, фибрин), синтетические полимерные материалы (PLGA, polyethylene glycol, PCL, alumina, производные углеродных соединений, композиты), металлы и их сплавы, керамика. В качестве носителя применяют имплантаты из биоинертных материалов, чаще всего из титана. СК придают остеоиндуктивные свойства материалам, которые в обычных условиях ими не обладают [182].

Данная проблема является и биологической, и технологической, и материаловедческой. Для реализации своего остеогенного потенциала культивированные клетки должны определённое время находиться в фиксированном к скаффолду состоянии, что может быть связано с гистогенетической способностью данных клеток проявлять свои остеогенные свойства. Остеозамещающие имплантаты должны иметь пролонгированный срок биодеградации, т.к. быстрая деградация скаффолда способствует вымыванию клеток из раны вместе с трансудатом. Для успешной пересадки культуры клеток следует наделять скаффолд минеральными компонентами [2, 212].

По современным представлениям «идеальный» костно-замещающий материал характеризуется рядом свойств: остеогенностью – содержит клеточные источники для остеогенеза; остеоиндукцией – запускает остеогенез; остеокондукцией – служит матрицей для образования новой кости в ходе репаративного остеогенеза, обладает способностью направлять её рост; остеопротекцией – заменяет кость по механическим свойствам. В зависимости от стимуляции регенерации материалы можно разделить на остеокондуктивные и остеоиндуктивные.

Из-за ограниченности, наличия иммунного отторжения и других проблем, связанных с использованием ауто-, алло- и ксенотрансплантатов, всё чаще применяется биокерамика. Подложки для регенерации из биокерамики должны иметь пористую структуру, обеспечивать прикрепление клеток, их

пролиферацию и дифференцировку и быть проницаемыми для биологических жидкостей [180, 209].

В настоящее время существует ряд кандидатов на эту роль, применимых для тканевой инженерии челюстно-лицевых структур; в их число входят природные биополимеры (альгинат и коллаген), синтетические полимеры (поликапролактон, полимеры молочной и гликолевой кислот), неорганические полимеры, такие как керамические материалы из трикальций фосфата (ТКФ) - биокерамика (трикальцийфосфат, гидроксиапатит, алюмооксидная керамика, комбинированные препараты коллагена с трикальцийфосфатом или гидроксиапатитом, оксид алюминия, двуокись циркония, окись титана, биоактивные стёкла и стеклокерамика) [186, 204, 213-216].

Сотрудниками МГМСУ разработаны методы культивирования клеток стромы КМ человека, способы оценки количества клеток в слое, формирующемся на поверхности композитов, определения цитотоксичности образцов композитов и эффективности прикрепления клеток к их поверхности. Приводятся данные об успешном применении биокомпозиционного материала «Алломатрикс-имплант» в сочетании со стромальными остеогенными клетками-предшественниками при реконструктивных операциях на альвеолярных отростках челюстей [216].

Доказано ускорение репаративного процесса в нижней челюсти кролика при использовании остеопластического материала ИНДОСТ пластины с мезенхимальными стромальными клетками [217].

В исследовании Э. В. Фионовой (2008) установлено, что в клеточной культуре КМ на образцах остеопластического материала «Гапкол» формируется значительно больше стромальных, чем кроветворных клеток. Заселение МСК поверхности материала «Гапкол», содержащего неколлагеновые белки кости, и внесение этой конструкции в костную рану ветви нижней челюсти кролика уменьшает проявления воспалительно-деструктивных реакций, повышает активность

остеогенетических процессов и усиливает процессы созревания новообразованной костной ткани [218].

А.С. Григорьян и соавт. (2002) в экспериментах на кроликах с применением гистоморфометрического метода показали, что при использовании титановой пластины с культурой СККМ за 4 месяца эксперимента происходит полное заполнение костного дефекта челюсти пластинчатой костной тканью. Нанесение СКЖТ на поверхность титанового имплантата ускоряет процессы остеоинтеграции, по сравнению с таковыми у имплантатов без СК или с нежизнеспособными СК при отсроченной имплантации [219].

В последнее время в стоматологии используется композитный материал, состоящий из гидроксиапатита и коллагена - Коллапан. Такая композиция обладает пластичностью, удобством применения, оказывает гемостатическое и ранозаживляющее действие. Считается, что коллаген обладает способностью привлекать остеогенные клетки и способствует их прикреплению к поверхности гидроксиапатита [4, 220]. Являясь поверхностно-активным веществом, гидроксиапатит способен взаимодействовать с тканевым коллагеном и, следовательно, с остеогенными клетками, влиять на биологическую регуляцию восстановления костной ткани. Полностью замещается костной тканью, в течение 20 суток происходит равномерное выделение антибиотика в костной полости [221, 222].

Клинические исследования показали, что применение аутологических СКЖТ в сочетании с гидроксиапатитом исключает риск развития аллергических и побочных реакций, обеспечивает длительный клинический эффект, приводит к сокращению сроков реабилитации пациентов с деформацией альвеолярных отростков верхней и нижней челюстей [198].

Наиболее существенные результаты достигнуты в использовании стволовых клеток пульпы зуба с подложкой из коллагеновой губки для лечения дефектов костной ткани [223].

Доказано, что комбинация СККМ и подложки из ГА/ТКФ, поликапролактона, полимера гиалуроновой кислоты, желатиновой губки стимулировала восстановление черепных и альвеолярной костей на модели у собак, мышей, кроликов, свиней и овец [224].

В эксперименте на крысах изучен репаративный процесс в зоне имплантации гидроксиапатитной керамики, обогащенной культивированными мезенхимальными клетками, выделенными из зачатков конечностей эмбрионов крыс. Установлено, что гидроксиапатитная керамика с культивированными на ней клетками, при имплантации в стандартный костный дефект тел позвонков крыс, стимулирует остеорепаративный процесс [225].

Сотрудниками ЦНИИС совместно с ЗАО «РеМеТэкс» 7 пациентам с выраженной атрофией костной ткани в области утраченных зубов были трансплантированы биоинженерные конструкции из частично деминерализованного костного блока с аутологичными МСК из жировой ткани, преддифференцированными в остеогенном направлении [182].

Клиническое применение коллаген-апатитовых имплантатов при различных стоматологических заболеваниях показало их высокую эффективность: быструю и полную биодеградацию, надёжное формирование органотипичной костной ткани без образования гранулятов, полное отсутствие послеоперационных осложнений [226, 227].

1.4 Роль мембран в направленной регенерации

Интерес к проблеме вызван низкой эффективностью стандартных лоскутных операций в силу отсутствия гарантированной регенерации тканей пародонта после проводимого хирургического лечения [219, 228, 229].

Особое внимание заслуживает метод направленной тканевой регенерации (от англ. Guided Tissue Regeneration), преимуществом которого является использование мембранной техники для создания благоприятных условий образования нового зубодесневого соединения. Для проведения НТР

необходимы барьеры, называемые пародонтологическими мембранами [223, 230].

Мембраны должны соответствовать следующим требованиям: быть биосовместимыми, интегрировать в окружающую костную ткань и плотно прикрепляться к шейке имплантата, препятствовать образованию фиброзной ткани вместо кости, препятствовать прорастанию эпителия и проникновению бактерий, образовывать "замок" при плотном прикреплении к шейке имплантата, обеспечивать необходимое пространство для костной регенерации.

Важным условием является создание под мембраной свободного пространства, в которое с краев кости начинается рост ткани и от которого зависит количество регенерируемой кости. Пространство под мембраной необходимо также для сохранения в нем кровяного сгустка, который создает благоприятную среду для костеобразования.

Принципы направленной тканевой регенерации (НТР), разработанные несколько десятилетий назад, получили значительное распространение и все чаще используются для эффективной регенерации костной и соединительной тканей, потерянных в результате заболеваний пародонта [7, 212, 231].

На современном этапе все мембраны, используемые в хирургической стоматологии, делятся на две большие группы: нерезорбируемые и резорбируемые.

Нерезорбируемые мембраны. Снижение положительных результатов при применении нерезорбируемых мембран связывают с необходимостью повторного вмешательства для удаления мембран (повторная травма тканей).

Кроме того, нерезорбируемые мембраны чаще всего не способны интегрироваться с окружающими тканями, что вызывает развитие рецессии краев лоскутов по поверхности мембраны. А эффективность резорбируемых мембран во многом определяется именно тем, насколько этот ответ является минимальным и обратимым [232].

Первая мембрана из политетрафторэтилена была одобрена в США в 1986 году (Gore-Tex Regenerative Material). Клинические результаты применения Gore-Tex мембран считаются «золотым стандартом». Мембрана отграничивает соединительную ткань и эпителий от кости и поверхности корней, позволяя регенерировать связке и альвеолярной кости. Основными принципами имплантации барьерных мембран являются: сохранение межзубных сосочков; качественное удаление зубных отложений, грануляционных патологических тканей, плотная фиксация мембраны нитью вокруг поверхности зуба; мобилизация и полное перекрытие лоскутом мембраны[233].

Краснодарским центром пародонтологии и дентальной имплантации совместно с Российским химико-технологическим университетом им. Д. И. Менделеева была разработана и апробирована новая барьерная мембрана из полипропилена. На поверхности материала, обращенной к регенерируемому дефекту, нанесено биополимерное гидрофильное покрытие. Проведенное токсикологическое тестирование *in vitro* и *in vivo* подтвердили безвредность, наличие биосовместимости, отсутствие токсичности материала и бластогенных эффектов Перова М. Д. (2006).

В среднем зубодесневое прикрепление восстанавливалось до 3,7 мм, притом, что происходила ликвидация пародонтальных карманов на 62% от исходного клинического параметра - потери зубодесневого прикрепления [190].

А. И. Грудянов и П. В. Чупахин сообщают об успешном применении с 2001 г. нерезорбируемых силиконовых мембран (МЕДСИЛ), которые сохраняют стабильность структуры на протяжении длительного периода наблюдения при лечении заболеваний пародонта [6].

Резорбируемые мембраны. Для направленной регенерации тканей широко используют резорбируемые мембраны, изготовленные из биодеградируемых материалов [223].

Первым полимерным материалом, который стали использовать для изготовления тканевых барьеров, был викрил - синтетический полиэфир из

сополимера гликолида и лактида в соотношении 9:1. В то же время M. Christgau и соавт. (1995) отмечали более выраженную рецессию десны в присутствии барьеров из политетрафторэтилена по сравнению с викриловыми, что, по-видимому, объясняется дополнительной травмой тканей пародонта при повторном оперативном вмешательстве.

В последние годы на медицинском рынке появились резорбируемые полимерные мембраны, у которых увеличен срок нахождения в тканях. Например, Osseoquest (фирм Gore и Nobel Biocare), представляет собой композицию полигликолевой, полилактидной кислот и карбоната триметилена. Выпускается в виде трехслойной мембраны, имеющей пористый наружный и внутренний слои, состоящие из полигликолидов и карбоната триметилена в соотношении 1:1. Средний слой выполняет функцию ограничивающей пленки, в него входят 50% полимеров молочной и 15% гликолевой кислот.

Барьерные функции материала сохраняются до 6 мес., что сочетается с достаточно хорошей тканевой интеграцией. Полная его резорбция происходит на протяжении 12-14 мес.

В опыте на крысах доказано ускорение направленной регенерации кости под влиянием ультразвуковой обработки и обогащения мембран костным морфогенетическим белком (BMP) регенерацию с применением асимметрично пористой мембраны из поликапролактона (PCL). Верхняя поверхность мембраны с порами наноразмера (~10 нм), эффективно предотвращает вторжение волокнистой соединительной ткани, но способствуют проникновению питательных веществ, нижняя поверхность с микропорами (~200 мкм), повышающими адгезию с костной тканью. [223, 228].

Большой интерес представляют полимеры и сополимеры полиоксибутирата, которые являются биосовместимыми, обладают регулируемыми сроками резорбции. В состав мембран возможно включение таких факторов роста и морфогенов, как фактор роста эндотелия сосудов и костные морфогенетические белки, которые уже используются при создании

остеоиндуктивных остеопластических материалов. Мембраны из коллагена обладают лучшей тканевой интеграцией, чем полимерные материалы, однако продолжительность барьерного периода может сильно варьировать, вследствие чего управление процессом регенерации бывает затруднено [234].

При использовании коллагеновых мембран расхождение мягких тканей происходит гораздо реже, чем при использовании нерезорбируемых мембран, минимизирована опасность возникновения воспалительных реакций. Кроме того, благодаря высокой гибкости и гидрофильности они гораздо легче устанавливаются и плотно прилегают к дефекту [204, 228, 235].

Заключение к обзору литературы

Таким образом, разные способности СК к дифференцировке, разнообразие носителей и факторов микроокружения определяют возможность использования этих клеток для регенерации тканей челюстно-лицевой области. Несомненно, имеющиеся в настоящее время данные позволяют использовать СК для регенерации как тканей зуба и пародонта, так и для замещения костных дефектов костей черепа и челюстей. Относительная доступность СК, высокая плотность популяции и способность к направленной дифференцировке значительно повышают их роль в замещении дефектов и открывают перспективы для развития регенеративной стоматологии.

Результаты, полученные за последнее десятилетие, требуют систематизации и уточнения. Необходимо уточнить данные о качественном и количественном составе аутологичных стволовых клеток для использования в комплексном лечении стоматологических заболеваний, усовершенствовать способы их получения и культивирования, глубже изучить свойства стволовых клеток, полученных из разных источников. И все же, приведенные данные позволяют предположить, что применение аутологичных стволовых клеток различного происхождения в стоматологии открывает широкие возможности для использования клеточных технологий в челюстно-лицевой хирургии, пародонтологии и имплантологии.

РАЗДЕЛ 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Обоснование цели исследования

Обоснованием для выбора цели работы являлась широкая распространенность генерализованного пародонтита, занимающего одно из ведущих мест среди стоматологических заболеваний, как в Украине, так и во всем мире. Это является не только медицинской, но и социальной проблемой, значимость которой определяется высокой распространенностью, тяжестью течения, отрицательным влиянием на организм в целом, и ухудшением качества жизни человека [4].

По данным различных статистических источников, до 85 % взрослого населения страдают болезнями пародонта различных степеней тяжести. Терапия воспалительных заболеваний пародонта должна быть комплексной, с превалированием хирургических методов. Поиск и использование новых эффективных подходов к лечению остается актуальной проблемой стоматологии [210].

Направленная регенерация костной ткани альвеолярного отростка с добавлением аутологичных стволовых клеток в пародонтальной хирургии при лечении генерализованного пародонтита II и III степени тяжести – метод, позволяющий купировать воспалительный процесс, анатомически восстановить структурные компоненты пародонта, является одним из наиболее перспективных на современном этапе [7].

С этой целью были изучены транспортные свойства остеопластических материалов в качестве скаффолдов для культуры стволовых клеток костного мозга кролика, и выбран оптимальный *in vitro*. А также проведён сравнительный анализ процесса заживления костных дефектов нижней челюсти кролика при применении различных остеопластических материалов с добавлением аутологичных стволовых клеток *in vivo*.

Для экспериментального подтверждения возможности использования метода тканевой терапии было проведено исследование влияния аутологичных

клеток кролика, полученных из костного мозга и жировой ткани на заживление дырчатых дефектов альвеолярного отростка.

Экспериментальные исследования проводили на базе вивария Харьковской медицинской академии последипломного образования, лаборатории молекулярной диагностики ТОВ фирмы «Вирола».

Клинические исследования проводили на кафедре стоматологии и терапевтической стоматологии ХМАПО на базе областной стоматологической поликлиники г. Харькова и стоматологической клиники «Фортуна».

В экспериментальных исследованиях использовали 12 белых лабораторных крыс линии Wistar; 45 кроликов (13+32) породы Шиншилла.

В клинических исследованиях принимали участие 20 больных-добровольцев с диагнозом генерализованный пародонтит II-III степени, хроническое течение. Пациенты были поделены на две группы по 10 человек, основную и контрольную. Основной группе на хирургическом этапе лечения при проведении лоскутных операций для стимуляции остеогенеза применяли аутологичные стволовые клетки костного мозга, контрольной группе проводились аналогичные операции без применения стволовых клеток.

Исследования комплексировали с Институтом проблем криобиологии и криомедицины НАНУ им. Ак. Грищенко В.И. и лабораторией молекулярной диагностики ТОВ фирмой «Вирола», с Центром ожогов, реконструктивной и пластической хирургии на базе Харьковской городской клинической больницы № 4 скорой неотложной помощи им. О. И. Мещанинова.

2.2 Экспериментальные методы исследования

На первом этапе экспериментальных исследований по изучению свойств остеопластических материалов-носителей костномозговых стволовых клеток крыс *in vitro* было использовано 12 белых лабораторных крыс-самцов линии Wistar в возрасте 3 месяцев, массой 200 – 220г.

Животные были разведены специально для данного эксперимента и ранее не участвовали в исследованиях. Крысы до начала исследования были помещены в отдельную комнату на период адаптации при групповом

содержании в клетках. Во время этого периода у животных контролировали проявление признаков отклонения в состоянии здоровья.

Костномозговые клетки крысы наносили на остеопластические скаффолды химической и биологической природы для изучения особенностей и качества их приживления и размножения для определения оптимального носителя СК: В качестве скаффолдов были выбраны:

1. Био-Ген (Италия) - остеопластический минеральный матрикс из гидроксипатита конского происхождения.

2. Биоколаген (Biocollagen) (Швейцария) - лиофилизированная коллагеновая мембрана конского происхождения для прямой тканевой регенерации.

3. Био-Осс (Bio-Oss) (Швейцария) - неорганический костный матрикс из бычьей кости.

4. ПериоГлас (PerioGlass) (США) - нерассасывающиеся гранулы биоактивного стекла (биоситала) и гидроксипатита.

5. Остеопатит (США) - порошок керамического гидроксипатита.

6. Кергап (Украина) - синтетический остеотропный керамический препарат из гидроксипатита и трикальцийфосфата (исследовался в форме порошка).

7. Коллапан Л (Россия) - композиционный материал на основе гидроксипатита и коллагена.

8. Стимул-Осс (Россия) - стоматологическая губка на основе гидроксипатита и коллагена.

Экспериментальные исследования по сравнительному анализу процесса заживления костных дефектов тела нижней челюсти проводили на 13 кроликах-самцах породы Шиншилла массой $3 \pm 0,2$ кг.

Под внутривенным тиопенталовым наркозом полый фрезой производили дефект костной ткани на всю глубину кортикальной пластинки, размером 3x4 мм, который, в зависимости от серии эксперимента, заполняли следующим образом (табл. 2.1.):

**Серии эксперимента сравнительного анализа процесса заживления
костных дефектов тела нижней челюсти кролика**

№ п/п	Вариант заполнения дефекта	Сроки
1.	Дефект + кровяной сгусток + мембрана	30 суток
2.	Дефект + кровяной сгусток + мембрана	60 суток
3.	Дефект + Коллапан Л + мембрана	30 суток
4.	Дефект + Коллапан Л + мембрана	60 суток
5.	Дефект + коллапан Л + 150 т. стволовых клеток + мембрана	30 суток
6.	Дефект + коллапан Л + 150 т. стволовых клеток + мембрана	60 суток
7.	Дефект + Био-Ген + 150 т. стволовых клеток + мембрана	30 суток
8.	Дефект + Био-Ген + 150 т. стволовых клеток + мембрана	60 суток
9.	Дефект + Кергап + 150 т. стволовых клеток + мембрана	30 суток
10.	Дефект + Кергап + 150 т. стволовых клеток + мембрана	60 суток

Животных выводили из эксперимента на 30-е и 60-е сутки методом воздушной эмболии.

В экспериментальных исследованиях по изучению влияния аутологичных стволовых клеток кролика, полученных их костного мозга и жировой ткани, на заживление дырчатых дефектов альвеолярного отростка размером $0,027 \text{ см}^3$ было использовано 32 кролика-самца породы Шиншилла, возрастом 1 год массой $3 \pm 0,2 \text{ кг}$.

Все животные содержались в стандартных условиях вивария Харьковской медицинской академии последипломного обучения при соответствующем освещении, на стандартном рационе питания.

Исследования проводили в соответствии с требованиями Закона Украины «Про захист тварин від жорсткого поводження» №27, ст. 230, від

2006 р., с изменениями, внесенными в соответствии с Законом N 759-УІ(1759-17) от 12.12.2009, ВВР, 2010, N9, ст.76, а также одобренными II Национальным конгрессом по биоэтике (Киев, 2004г.) и Этического кодекса вченого України (Національна академія наук України, 2009 р.), соответствующих положениям «Европейской конвенции по защите позвоночных животных, которых используют для экспериментальных и других научных целей» (Страсбург, 1986 г).

В соответствии с целью и задачами исследования, экспериментальные животные были распределены на 8 серийных групп по 4 кролика в каждой.

Для получения костного дефекта кроликам, под тиопенталовым наркозом из расчета 20 мг/кг массы тела, производили слизисто-надкостничный разрез в области угла нижней челюсти, и шаровидным бором №1 производился дефект костной ткани, на всю глубину кортикальной пластинки, размером 0,027 см³, который, в зависимости от серии эксперимента, заполнялся следующим образом:

Серия 1 - дефект под сгустком, без остеопластического материала (4 кроля породы Шиншилла).

Серия 2 - дефект плюс Коллапан Л (4 кроля породы Шиншилла).

Серия 3 - дефект плюс 100 000 ед. СККМ плюс Коллапан Л (4 кроля породы Шиншилла).

Серия 4 - дефект плюс 500 000 ед. СККМ плюс Коллапан Л (4 кроля породы Шиншилла).

Серия 5 - дефект плюс 1 млн. ед. СККМ плюс Коллапан Л (4 кроля породы Шиншилла).

Серия 6 - дефект плюс 100 000 ед. СКЖТ плюс Коллапан Л (4 кроля породы Шиншилла).

Серия 7 - дефект плюс 500 000 ед. СКЖТ плюс Коллапан Л (4 кроля породы Шиншилла).

Серия 8 - дефект плюс 1 млн. ед. СКЖТ плюс Коллапан Л (4 кроля породы Шиншилла).

Стволовые клетки костного мозга и жировой ткани, в сочетании с Коллапаном, вводили в зону дырчатого дефекта нижней челюсти кроликов основной группы в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллиона.

В образовавшийся костный дефект имплантировали исследуемую композицию, после чего рану ушивали наглухо. После оперативного вмешательства по созданию костного дефекта и восполнению его остеопластической композицией уже через 2 – 3 суток животные могли полноценно принимать корм. У всех животных происходило заживление послеоперационной раны в области нижней челюсти первичным натяжением в течение 7 – 10 дней. Осложнений мягких тканей и кости не наблюдалось как в раннем (до двух недель), так и в позднем (спустя месяц - полтора) послеоперационном периоде.

По окончании исследований животных выводили из эксперимента методом воздушной эмболии на 42-е и 90-е сутки.

Выделяли фрагменты челюстей с зоной регенерата. Препараты фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, проводили декальцинацию в разбавленной в 70% этиловом спирте муравьиной кислоте, обезжировали и обезвоживали в ацетонах и спиртах нарастающей крепости (от 60 до 96°) и в растворе смеси этилового спирта с диэтиловым эфиром (1:1), и заливали в целлоидин. Гистологические срезы в сагиттальной плоскости (6-10 мкм) изготавливали на санном микротоме «Reichert» окрашивали гематоксилином Вейгерта и эозином, пикрофуксином по Ван-Гизон (Саркисов Д.С.,1996) [237].

Микроскопические исследования проводили на световом микроскопе «АХЮ Star Plus» (Zeiss, ФРГ). На компьютерных изображениях микропрепаратов подсчитывали клеточные и тканевые компоненты костного дефекта на отрезке 165 мкм и измеряли их площади. Для морфометрических показателей использовали окуляр и микрометр «Reichert» (Лилли Р.,1969, Волкова О.В.,1982) [238].

Для анализа полученных данных и выявления возможных изменений показателей, полученных при применении вышеуказанных методов, применяли статистический анализ с помощью компьютерных программ "Microsoft Excel" и "Statistica 8" с использованием непараметрических критериев. Критическое значение уровня значимости принималось равным 0,05. Результаты представлены в виде средних и их ошибок ($M \pm t$) (Лапач С.Н., 2000) [239].

Стволовые клетки костного мозга и жировой ткани кроликов изготавливали по технологии, разработанной в институте криобиологии и криомедицины НАНУ им. ак. Грищенко В. И.

Выбор биосовместимых остеопластических материалов в качестве носителей СК

СК выделяли из костного мозга или жировой ткани (Петренко А.Ю. и соавт., 2008) [70] и размножали в селективных средах при 37° С и 95% влажности в атмосфере 5% CO₂ течение 2-4 пассажей. Клетки из этих источников, культивируемые таким образом, имели свой иммунофенотип - был позитивный ответ на маркеры ВБ 105, С029, СБ90, С073, СБ44. Отрицательный ответ был на СВ34, СБЗВ и С045, а также клетки были способны к мультилинейной дифференцировке в адипогенном, остеогенном и хондрогенном направлениях, что свидетельствовало об их соответствии международным критериям СК. При необходимости СК криоконсервировали по двухэтапной программе замораживания под защитой криопротектора димексилсульфоксида (ДМСО) и хранили при температуре - 196°С до востребования. [34].

После отогрева и удаления криопротектора, при необходимости, проводили прекультивирование СК в монослое. Жизнеспособность клеточной суспензии, предназначенной для использования, должна составлять не менее 90% [241].

Для заселения исследуемых порошков и гранул суспензии СК вносили в пробирки с биоматериалами, инкубировали 90 мин. при 37°С с постоянным

перемешиванием на вертекс-шейкере и переносили в условия CO₂-инкубатора на 24 часа.

Получение первичной культуры костномозговых стромальных клеток экспериментальных животных

При получении первичной культуры костномозговых стволовых клеток источником был костный мозг из бедренных костей крыс и подвздошных костей кроликов. Клетки выделяли механическим путем двойным вымыванием из кости с помощью раствора Хэнкса, центрифугированием полученной суспензии при 1000 об/мин в течение 10 минут с последующим удалением супернатанта и ресуспензированием осадка в питательной среде.

После выделения проводили количественную оценку ядродержащих клеток в камере Горяева с использованием 3% раствора уксусной кислоты и оценку жизнеспособности клеток с помощью суправитальной покраски трипановым синим, после чего клетки высевали в культуральные пластиковые флаконы площадью 25 или 75см² (РАА, Австрия).

Посевная концентрация составляла 1×10^3 жизнеспособных клеток/см² культурального сосуда. Питательная среда культивирования состояла из среды IMDM (Sigma, США), 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (ЕС) (HyClone, США), 150 мкг/мл гентамицина (Фармак, Украина) и 10 мкг/мл амфотерицина Б (Sigma, США).

После 24-часовой инкубации при температуре 37°C с 5% CO₂ в CO₂ инкубаторе (Sanyo, Япония) неприкрепленные клетки удаляли, а прикреплённые дважды отмывали фосфатно-солевым буфером и культивировали далее. Первую замену среды выполняли через 48 часов культивирования, а дальше - каждые третьи сутки. Исследование адгезии и пролиферации культур клеток проводили ежедневно с помощью инвертированного светового микроскопа (Ulab, Китай).

Костномозговые стволовые клетки кроликов рассеивали в лунки 24-х ячеечного культурального планшета по 40000 клеток на лунку. Через 24 часа в лунки с прикрепившимися клетками переносили исследуемые субстраты, и

культивировали в течение 3-х суток. Клетки снимали с пластины планшета после кратковременной инкубации в 0,25% растворе трипсина и осаждали центрифугированием при 1000 об/мин. Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева.

Подкожный жир выделяли из паховой области кролика из небольшого надреза в шприц. Кубик жира помещали в пробирку, в раствор Хэнкса с 50µg/ml гентамицина. Полученный фрагмент ткани в стерильных условиях измельчали. Мелкие фрагменты инкубировали в 0,05% растворе коллагеназы (collagenase type I, Worthington Biochemical Corporation, USA) в течение 30 мин. После окончания инкубации добавляли полную культуральную среду и центрифугировали в течение 10 мин. при 300g. Затем, удалив супернатант, полученный осадок ресуспендировали в полной среде и пропускали через 100-мкм клеточный фильтр (CBD Biosciences, Bedford, MA). Проводили подсчет клеток в суспензии. Клетки рассеивали в культуральные сосуды и помещали в CO₂-инкубатор (BNR-110, Tabai ESPEC, Osaka) при 37°C и 5% CO₂. На следующий день в чашках меняли среду.

Культивирование СККМ и СКЖТ

Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ в CO₂-инкубаторе. Через 24 часа культивирования, после эксплантации, среду с не прикрепившимися к субстрату клетками удаляли, и трижды промывали культуральный флакон раствором Хэнкса. Оставшиеся прикрепленными фибробластоподобные клетки культивировали в CO₂-инкубаторе при 37°C, 5% CO₂ и 100% влажности 7-12 дней, меняя среду каждые трое суток. Клетки снимали со дна флакона путем кратковременной (5-10 минут) инкубации их в растворе трипсина/ЭДТА, ресуспендировали в культуральной среде и осаждали центрифугированием при 300g в течение 10 минут.

При субкультивировании клетки рассеивали в культуральные флаконы (Greiner Bio-One GmbH, Germany) в концентрации $2-5 \times 10^3$ клеток/см² и культивировали 5-7 дней до достижения 80% конфлюентности.

Стволовые клетки образовывали колонии фибробластоподобных клеток на дне флакона. Таким образом, получали первичную культуру клеток стромы костного мозга и жировой ткани, которую затем подвергали индукционным воздействиям и трансплантации.

Морфологическая характеристика СККМ

Клетки стромы костного мозга крыс и кролика имеют низкую пролиферативную активность, обладают выраженной адгезией к пластику и образуют на дне культурального флакона колонии фибробластоподобных клеток. Из одного культурального флакона можно получить $2 - 3 \times 10^6$ клеток стромы костного мозга.

Рост, деление и дифференцировку клеток стромы костного мозга оценивали визуально в живой культуре с помощью инвертированного микроскопа.

Для цитологического анализа клетки фиксировали с помощью метилового спирта, либо 4% параформальдегида и окрашивали 1% метиловым фиолетовым, по Романовскому.

Определение жизнеспособности клеточной суспензии

Из каждого флакона отбирали две параллельные пробы, ресуспендировали клетки в фосфатном буфере (рН 7.2, 104 кл./см^3). Окрашивали их раствором метиленового синего (0.2 %), и этидиума бромидом (1 %) (1:1) в течение 10 мин. Среди 100 клеток под световым микроскопом подсчитывали долю мертвых с относительными погрешностями не более 8 и 12 %. Подсчитывали долю живых, некротических и апоптотических клеток с относительными погрешностями не более 10, 10 и 17% соответственно. Живыми считали не округлившиеся клетки, неокрашенные; некротическими - большие округлые клетки, окрашенные; апоптотическими - округлые или сохраняющие нативную форму клетки с фрагментированными ядрами, окрашенные. В наших исследованиях насчитывали 75% живых клеток.

2.3. Клинические методы исследования

Под нашим наблюдением находилось 20 пациентов с диагнозом: генерализованный пародонтит II-III степени. Возраст пациентов составлял от 43 до 60 лет.

Больные были поделены на 2 группы, основную и контрольную. Основную группу составили 10 добровольцев, давших согласие на забор костного мозга, культивирование стволовых клеток и пародонтальные операции с его использованием.

Контрольная группа состояла из 10 больных, которым проводили аналогичные операции без применения аутологичных стволовых клеток костного мозга.

Динамику исследовали через 6 месяцев, 12 месяцев.

Обследование больных с заболеваниями пародонта проводили по традиционной схеме. У пациентов выясняли жалобы, уточняли продолжительность заболевания, предыдущие обращения, эффективность проведенного лечения, анализировали условия жизни, перенесенные заболевания, аллергологический статус и вредные привычки.

При осмотре оценивали общее состояние больного, состояние кожи, красной каймы губ, регионарные лимфатические узлы челюстно-лицевой области. Детально изучали состояние прикуса, зубных рядов, твердых тканей зубов. Выявляли возможные местные пародонтопатогенные факторы (некачественные пломбы на контактных поверхностях, кариозные полости, острые края зубов, аномалии прикуса, мелкое преддверие полости рта, уздечки и т.д.). Супраконтакты определяли при помощи копировальной бумаги (Иванов В.С., 1998). Некариозные дефекты (патологическая стираемость зубов, клиновидные дефекты, гиперестезия твердых тканей зубов и т.д.) диагностировали по существующим классификациям. (Леус П. А., 2008) [242].

Состояние тканей пародонта оценивали на основании классификации Данилевского Н.Ф. (1994), а также с использованием основных пародонтальных индексов (пробы Шиллера – Писарева, гигиенического

индекса Федорова – Володкиной, индекса кровоточивости по Muhlermann (PBI) костного индекса Фукса, подвижности зубов), проводили рентгенологическое обследование (ортопантомографию).

С использованием аппаратно-диагностического комплекса «Florida Probe» (Рис. 2.1) пациентам исследовали рецессию десны, глубину пародонтальных карманов, кровоточивость, отделяемое из пародонтальных карманов, фуркацию, зубной налет, подвижность зубов.



Рис. 2.1 Система «Florida Probe».

Система «Florida Probe» представляет собой программно-аппаратный комплекс состоящий из оптического кодирующего устройства (давление 15г), трех зондирующих устройств, ножного переключателя, компьютерного интерфейса, программного обеспечения FP 32 Windows, позволяющий безболезненно и быстро проводить обследование тканей пародонта, заносить все данные в компьютер сравнивать результаты обследований пациента. Титановый зонд диаметром 0,4-0,5 мм погружали в пародонтальный карман или зубодесневой желобок, и каждый зуб обследовали в 6 точках с автоматической фиксацией на мониторе глубины кармана и рецессии в области обследуемого зуба (точность измерения составляет до 0,2 мм). Результаты регистрировали в таблицах.

Все пациенты, непосредственно перед хирургическим вмешательством, делали клинический анализ крови, обследовали иммунологический статус. Забор костного мозга производили в Центре ожогов, реконструктивной и пластической хирургии на базе Харьковской городской клинической больницы № 4 скорой неотложной помощи им. О.И. Мещанинова.

Костный мозг, полученный в операционной при пункции грудины или подвздошной кости в объеме 140 мл, стабилизированный с помощью раствора гепарина (30 единиц на 1 мл костного мозга), в стерильных условиях вводился в основной пластиковый гематологический контейнер, соединенный трубками с двумя контейнерами № 1 и № 2; в него добавляется гидроксипропилоккрахмал в объеме 1:2.

Система герметизировалась в операционной. На первом этапе проводилось центрифугирование взвеси с ускорением 700g в течение 15 мин, после чего с помощью медицинского фракционатора компонентов крови проводили удаление примесей жира и плазмы в контейнер №1, а МФКМ, часть супернатанта и эритроцитов, примыкающих к линии разделения 2-х сред, переводилось в контейнер-спутник №2. При этом в основном контейнере остаются сладжированные эритроциты и костные фрагменты. На втором этапе для редукции полученного объема проводили второе центрифугирование клеточной взвеси в режиме 900g в течение 15 мин для получения окончательного объема суспензии (60 мл), для этого после центрифугирования удаляли часть супернатанта в контейнер №1. Таким образом, от момента эксфузии костного мозга и герметизации его в операционной до момента введения клеточного материала в костный дефект на коллапановой подложке пациента, сохранялась стерильность полученного образца.

Техника введения СК больным с поражением пародонта

Больным проводили операцию направленной регенерации костной ткани с применением аутологичных стволовых клеток.

Под инфильтрационной анестезией раствора Септанеста 1:100000- 3,8 мл производили разрез по гребню альвеолярного отростка, продолжающийся по фестончатым краям десны с вестибулярной и язычной поверхности.

Отслаивали слизисто-надкостничный лоскут до подвижной слизистой оболочки. Надсекали надкостницу по всей длине лоскута, чтобы лоскут без натяжения закрыл зубы выше эмалево-цементной границы.

Обработку коронок, корней зубов до эмалево-цементной границы, кость альвеолярного отростка, полости, дефекты, карманы проводили алмазными борами, скаллером, удаляли грануляции (Рис. 2.2). Освежали кортикальный слой, производили отверстия в губчатом слое.

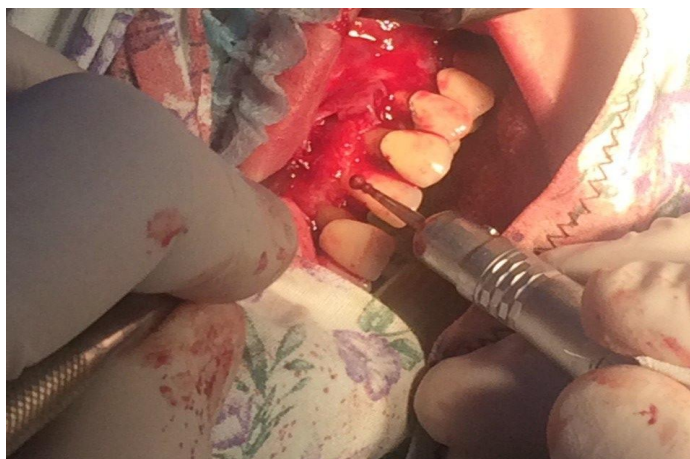


Рис. 2.2 Обработка зубов и костной ткани алмазным бором

Корни зубов до эмалево-цементной границы обрабатывали 1Н раствором лимонной кислоты. Следуя результатам эксперимента, количество СК рассчитывали, в соответствии с объемом дефекта.

Коллапан Л смешивали с 2 миллионами аутологичных стволовых клеток костного мозга (Рис. 2.3). Полученной смесью клеток и носителя непосредственно заполняли все полости и дефект.



Рис. 2.3 Коллапан Л с 2 миллионами аутологичных стромальных клеток

Весь подсаженный материал закрывали рассасывающейся мембраной Hypro-Sorb F, покрывали слизисто-надкостничным лоскутом, ушивали в 2 слоя. Сверху рану закрывали самоклеющейся пленкой. (Рис. 2.4).



Рис. 2.4 Рана после проведения лоскутной операции ушита наглухо без натяжения.

2.4. Статистическая обработка данных

Полученные цифровые результаты обрабатывались методом математической статистики. Для параметрических значений проводили расчет средней величины признака (M) с вычислением средней ошибки (m), коэффициента Стьюдента для малой выборки данных (T) и вероятности различий (P). Статистически достоверной считали разницу при значении $P < 0,05$.

Доверительный интервал случайной погрешности (величина, приближающаяся к абсолютной ошибке измерения), при прямых измерениях определялась как среднеквадратическая ошибка среднеарифметического, умноженная на коэффициент Стьюдента для соответствующего числа измерений n и заданной доверительной вероятности α :

$$m = t_{\alpha, n} \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\Delta x_i)^2}{n(n-1)}}$$

где Δx_i – отклонение значения i -го измерения от среднеарифметического значения. Доверительная вероятность (надежность) выбиралась 0,95, согласно ГОСТа для прямых измерений с многократным наблюдением.

Достоверность различий полученных величин измерений в опытных и контрольных группах, рассчитывалась по методу Монцевичюте - Эрингене, в котором определяются различия средних значений величин $D = M_1 - M_2$, среднеквадратическая ошибка этого различия

$$m(D) = \pm \sqrt{(\Delta m_1)^2 + (\Delta m_2)^2},$$

коэффициент достоверности

$$t = \frac{D}{m(D)},$$

и по значению t для определенного количества наблюдений n определяется величина p (Гмурман В. - 1972) [240].

РАЗДЕЛ 3
ОПТИМАЛЬНЫЙ НОСИТЕЛЬ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК.
ЗАЖИВЛЕНИЕ ДЕФЕКТОВ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ СКАФФОЛДОВ
С ВВЕДЕНИЕМ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОГО МОЗГА
КРОЛИКА IN VIVO

3.1. Изучение свойств остеопластических материалов-носителей стволовых клеток крыс *in vitro*

На начальном этапе были проведены исследования *in vitro* биосовместимости СККМ с остеопластическими материалами природного и искусственного происхождения. В качестве скаффолдов были изучены:

1. Био-Ген (Bio-Gen, Италия) - остеопластический природный гидроксиапатит конского происхождения.

2. Биоколаген (Biocollagen, Швейцария) - лиофилизированная коллагеновая мембрана конского происхождения для прямой тканевой регенерации.

3. Био-Осс (Bio-Oss, Швейцария) - неорганический костный матрикс, полученный из бычьей кости.

4. ПериоГлас (PerioGlass, США) – нерассасывающиеся гранулы биоактивного стекла (биоситала) и гидроксиапатита.

5. Остеоапатит (Osteoapathyt, США) - порошок керамического гидроксиапатита.

6. Кергап (Украина) - синтетический остеотропный керамический препарат из гидроксиапатита и трикальцийфосфата.

7. Коллапан Л (Россия) - композиционный материал на основе гидроксиапатита и коллагена.

8. Стимул-Осс (Россия) - стоматологическая губка на основе гидроксиапатита и коллагена.

В результате исследования нами выявлена цитотоксичность двух материалов - Перио-Гласса и Стимул-Осса. После добавления этих носителей к

культуре, стволовые клетки быстро дегенерировали и всплывали, а pH среды возрастала и становилась щелочной.

В присутствии других исследуемых субстратов клетки нормально делились и по количеству не отличались от контроля.

Таким образом, из восьми исследованных скаффолдов шесть, Био-Ген, Остеопатит, Биоколаген, Кергап, Коллапан Л, Био-Осс, не оказывали цитотоксического действия на костномозговые стромальные клетки, и могут быть использованы в качестве носителя в клеточной терапии.

3.2. Заживление костных дефектов нижней челюсти кролика при применении различных скаффолдов с костномозговыми стволовыми клетками кролика *in vivo*

Экспериментальные исследования по сравнительному анализу процесса заживления костных дефектов тела нижней челюсти проводили на 13 кроликах породы Шиншилла весом $3 \pm 0,2$ кг.

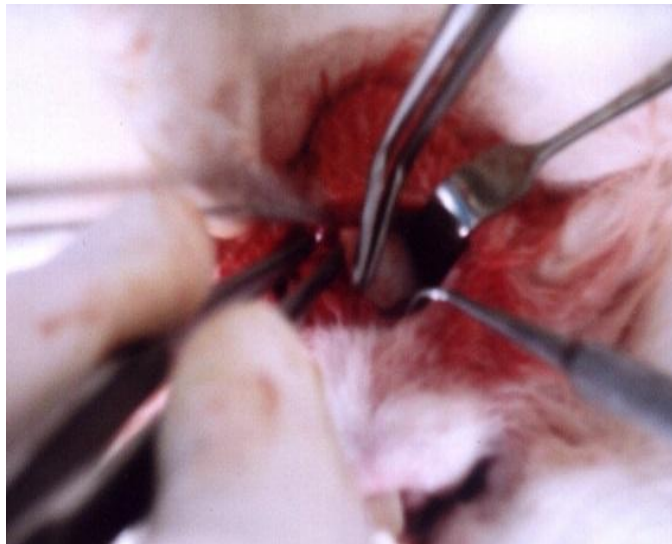


Рис 3.1. Этап операции. Формирование дырчатого дефекта в теле нижней челюсти кролика

Под внутривенным тиопенталовым наркозом скелетировали тело нижней челюсти, полый фрезой создавали дефект кортикальной пластинки округлой формы (рис. 3.1.), на всю её толщину – 3-4 мм, диаметром 10 мм. Животных выводили из эксперимента через 30 либо 60 суток.

Дефект + мембрана

Микроскопически на 30 сутки (рис. 3.2.) в теле челюсти обнаруживается дефект округлой формы, заполненный фиброретикулярной тканью - 51%, остеоидом - 23% и губчатой костной тканью - 14%.

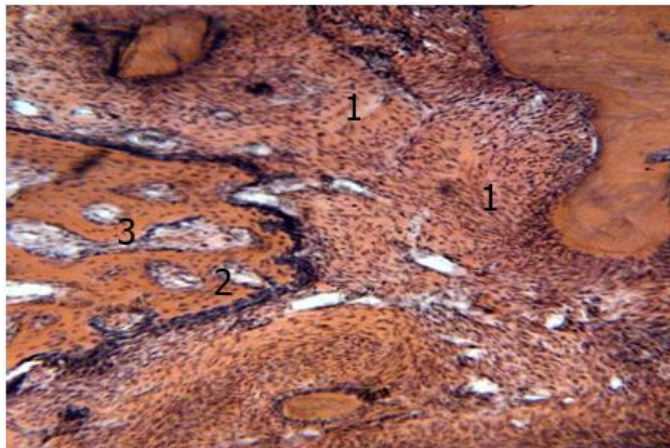


Рис.3.2. 30 сутки. Область дефекта заполнена фиброретикулярной тканью (1), остеоидом (2) и губчатой костной тканью (3). Окраска по Ван-Гизон

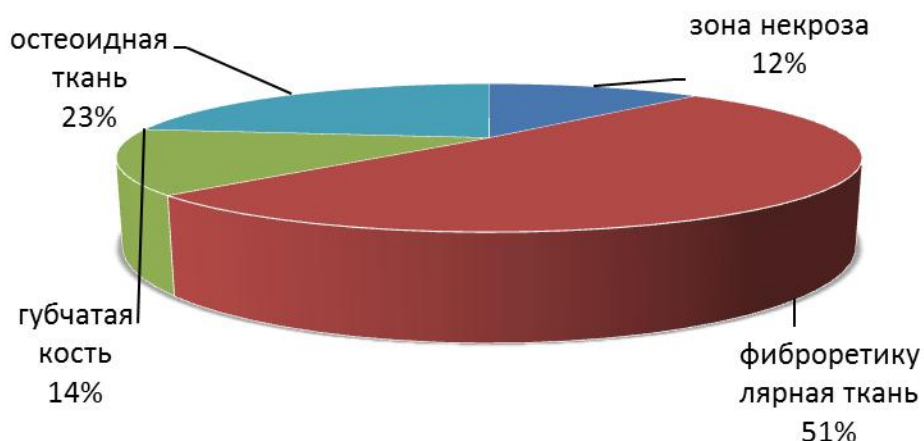


Рис.3.3. Дефект + мембрана. 30 сутки. Слабая остеогенная тенденция

Интенсивность некротических изменений составляла 12% (рис. 3.3.). Среди тканей регенерата преобладала фиброретикулярная ткань с высокой плотностью клеток фибробластического и остеобластического дифферендов.

На 60 сутки интенсивность некротических изменений с ограничением участков некроза и секвестров составляла 10%. Область дефекта была заполнена (рис. 3.4.) крупнопетливой губчатой костной тканью, с тонкими, редко расположенными костными трабекулами - 50%. Плотность клеток низкая.

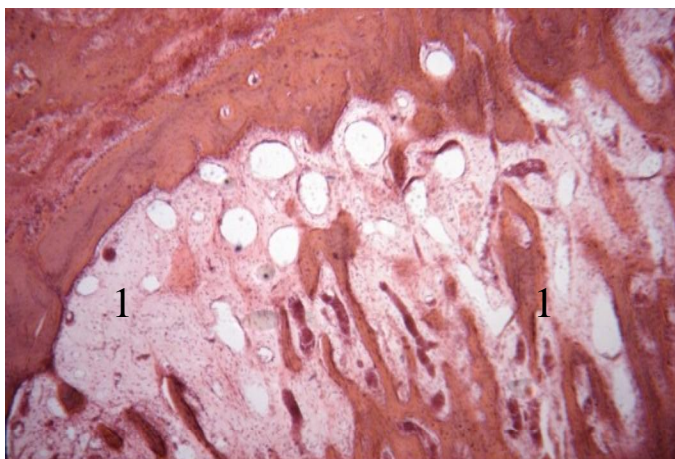


Рис.3.4. 60 сутки. Губчатая костная ткань (1) в области дефекта. Ув. 80.
Окраска по Ван-Гизон

Клетки остеобластического дифферона были локализованы лишь на небольших территориях по периметру костных трабекул. В межтрабекулярных пространствах обнаруживалась рыхлая соединительная ткань, которая по клеточному составу была представлена фибробластами и лимфоцитами - 40% (рис. 3.5.).

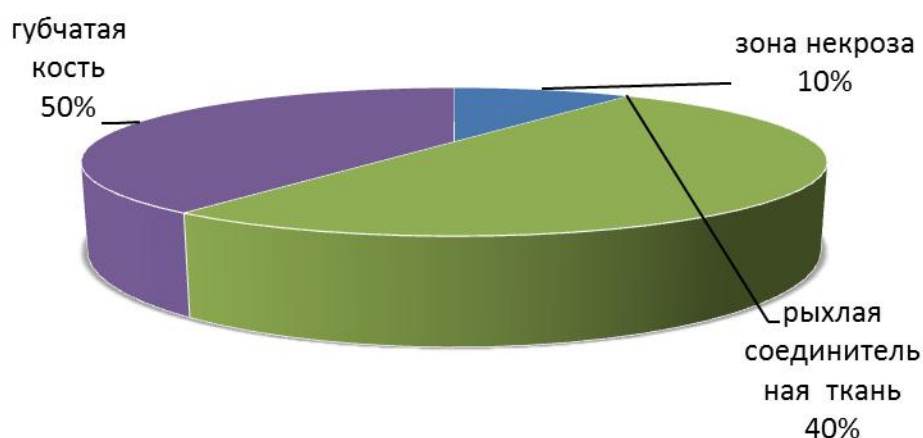


Рис. 3.5. Дефект + мембрана. 60 сутки. Слабая остеогенная тенденция

В рыхлой соединительной ткани обнаруживалось большое количество тонкостенных кровеносных сосудов с расширенными просветами.

Итак, особенности организации костной ткани в области дефекта позволяют предположить о низких прочностных качествах структуры регенерата. Положительным качеством использования мембраны для закрытия дефекта является отсутствие интерпозиции мягких тканей в области травматического повреждения.

Коллапан Л + мембрана

На 30 сутки в области дефекта в челюсти кролика, согласно морфометрическим данным, определялась значительно меньшая, чем в контрольной серии, интенсивность некротических изменений, которая составляла 14%.

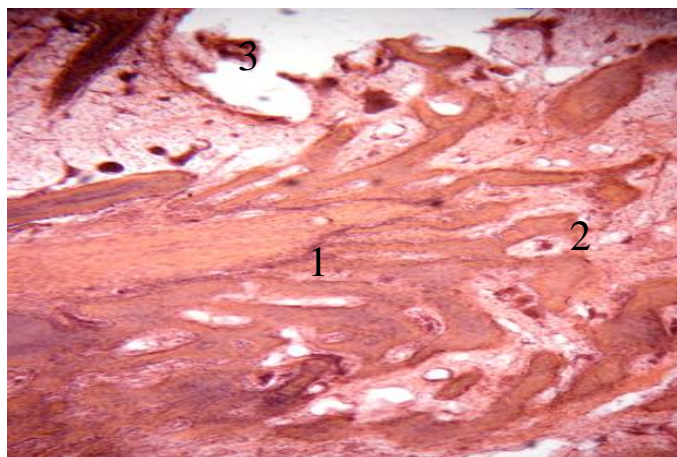


Рис. 3.6. 30 сутки. Губчатая костная ткань (1), соединительная ткань (2), участки Коллапана (3) в области дефекта. Окраска по Ван-Гизон. Ув. 120

Дефект был заполнен, в основном, губчатой костной тканью - 45% (рис. 3.6.), с небольшими участками рыхлой соединительной ткани с высокой плотностью остеобластов - 28%. В регенерате присутствовали участки Коллапана, расположенные в толще костной ткани -13% (рис. 3.7.).

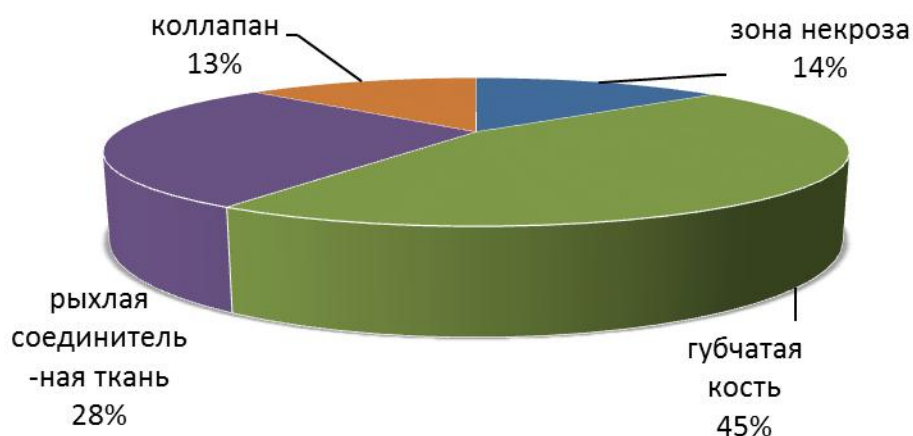


Рис. 3.7. Коллапан Л + мембрана. 30 сутки. Преобладает остеогенный компонент

На 60 сутки в области дефекта (рис. 3.8.) обнаруживалась, в основном, компактная и губчатая костная ткань - 78%. Определялись некротические

участки, которые составляли 10%. Выявлялись небольшие лентовидные островки фиброретикулярной ткани - 13%, с обширными очагами остеоида. Коллапан в регенерате присутствовал в виде небольших единичных фрагментов, замурованных в костную ткань - 9% (рис. 3.9.).

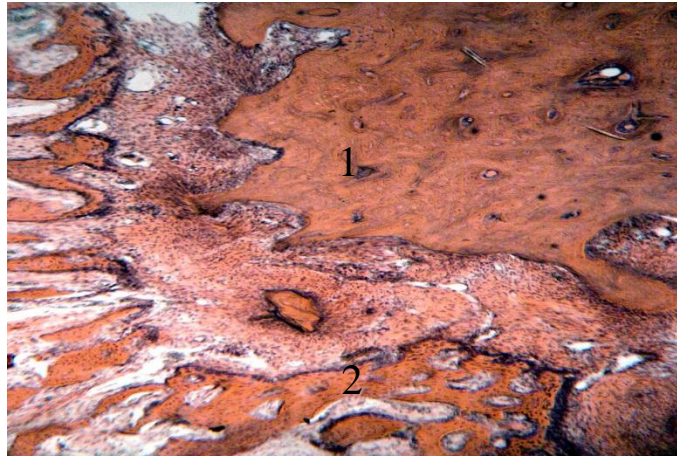


Рис. 3.8. 60 сутки. Компактная (1) и губчатая (2) костная ткань в области дефекта. Окраска по Ван-Гизон. Ув. 120

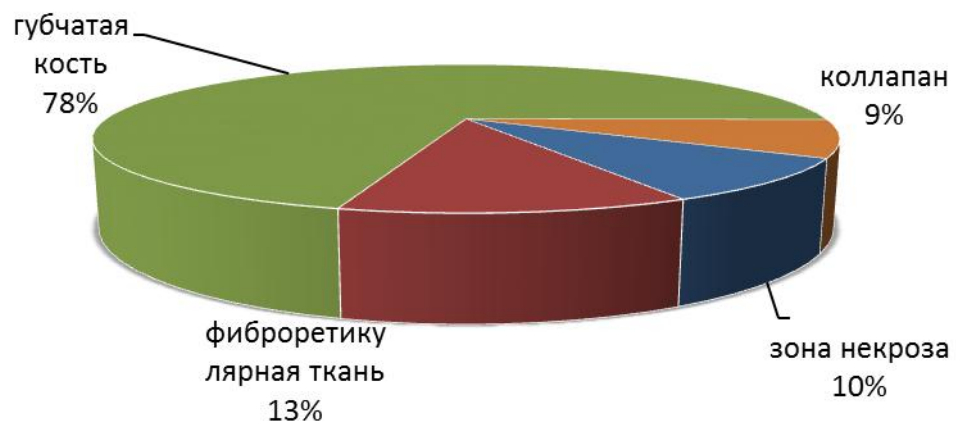


Рис 3.9. Коллапан Л + мембрана. 60 сутки. Превалирует остеогенный компонент

Итак, при заполнении дефекта Коллапаном Л и закрытии дефекта мембраной, в травмированной области на 30 сутки формировалась костная ткань, мелкопетлистая по организации, а на 60 сутки область повреждения была заполнена, в основном, компактной и губчатой тканью.

Присутствие фрагментов Коллапана в толще костной ткани свидетельствовало о его высоких прочностных качествах.

Коллапан + мембрана + стромальные клетки

На 30 сутки, согласно морфометрическим данным (рис. 3.10.), некротические участки занимали 8%, область дефекта заполнена, в основном, губчатой костной тканью мелкопетлистой по организации – 56% (рис. 3.11.).

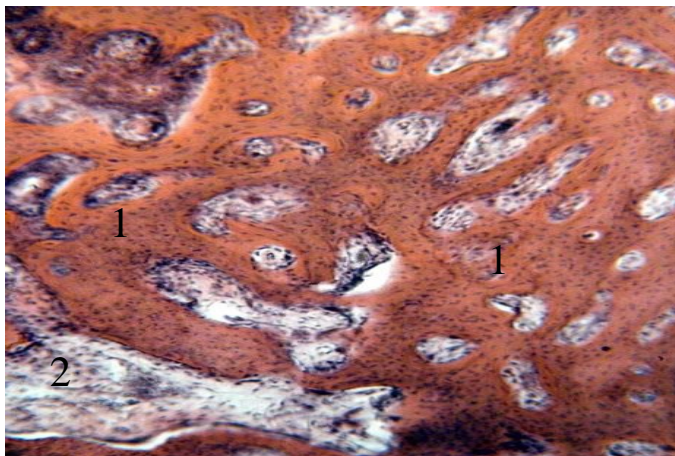


Рис. 3.10. 30 сутки. Губчатая (1) костная ткань и участки Коллапана (2) в области дефекта. Окраска по Ван-Гизон. Ув. 120

Костные трабекулы характеризовались высокой плотностью остеоцитов на поверхности. По периферии костных трабекул в виде частокола располагались остеобласты.

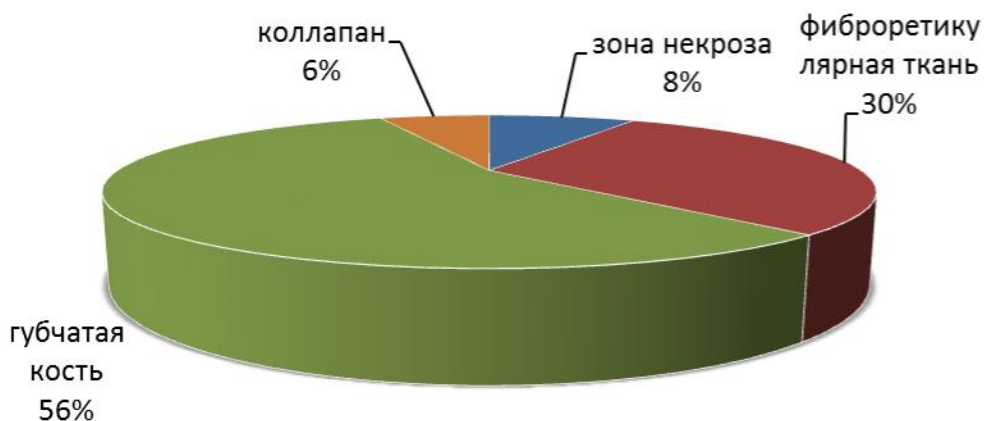


Рис 3.11. Коллапан + мембрана + стромальные клетки. 30 сутки. Выраженный остеогенный потенциал

Определялись мелкие фрагменты остатков Коллапана Л, замурованные в костную ткань без формирования соединительнотканной капсулы - 6%. Межтрабекулярные пространства выполнены фиброретикулярной тканью с преобладанием клеток остеобластического дифферона - 30%.

На 60-е сутки в области дефекта обнаруживалась, в основном, компактная и губчатая кость - 84%, зона некроза уменьшилась до 4% (рис. 3.12.).

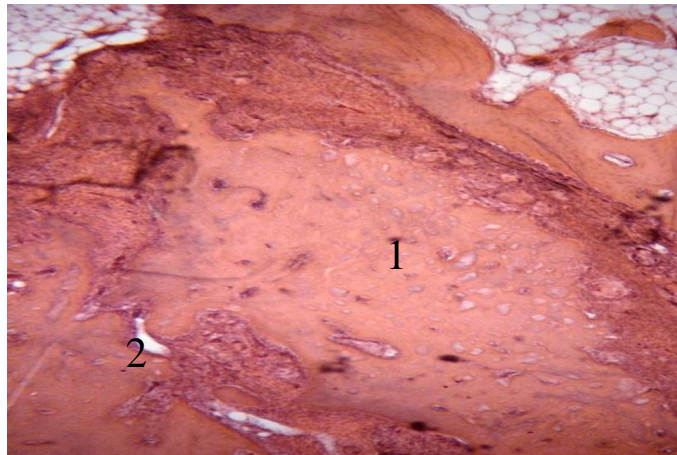


Рис. 3.12. 60 сутки. Компактная (1) костная ткань и остатки Коллапана (2) в области дефекта. Окраска по Ван-Гизон. Ув. 80

В области расположения компактной кости определялись мелкие фрагменты остатков Коллапана Л, замурованные в костную ткань без формирования соединительнотканной капсулы - 3%.

Обнаруживались небольшие участки грубоволокнистой соединительной ткани - 9%, располагавшиеся между генерациями компактной кости (рис. 3.13.).

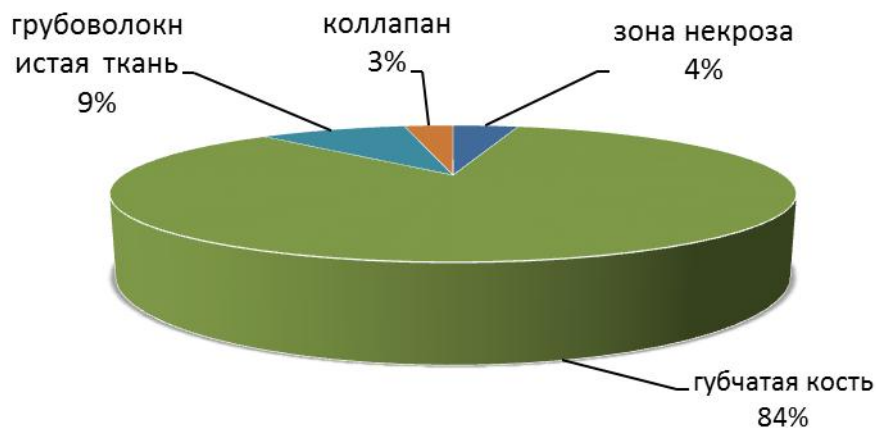


Рис 3.13. Коллапан + мембрана + стромальные клетки. 60 сутки

Выраженная остеобластическая дифференцировка клеток.

Итак, отличительной особенностью от предыдущей серии эксперимента (Коллапан Л + мембрана) на 30 сутки явилось формирование плотной сети костных трабекул с высокой плотностью остеоцитов на их поверхности и

выраженная остеобластическая дифференцировка клеток. На 60 сутки в тканях регенерата превалировала компактная кость.

Био-Ген + мембрана + стромальные клетки

На 30-е сутки в области дефекта объем некротических изменений, секвестрации и инфильтрации лейкоцитами занимал 20% (рис. 3.14.).

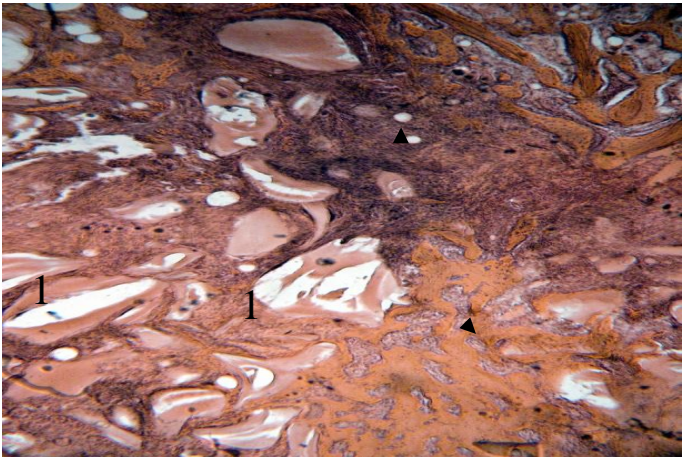


Рис. 3.14. 30 сутки. Фрагменты материала Био-ген (1), окруженные губчатой костной тканью. Окраска по Ван-Гизон. Ув. 80

Обнаруживались фрагменты Био-Гена - 7%, окруженные новообразованной губчатой костной тканью с низкой плотностью остеоцитов и остеобластов – 33%, и грануляционной тканью с высокой плотностью фибробластов и малодифференцированных клеток – 30% с мелкими кровеносными сосудами с тонкими стенками. Вокруг фрагментов Био-Гена располагались тонкие соединительнотканые капсулы – 10% (рис. 3.15.).

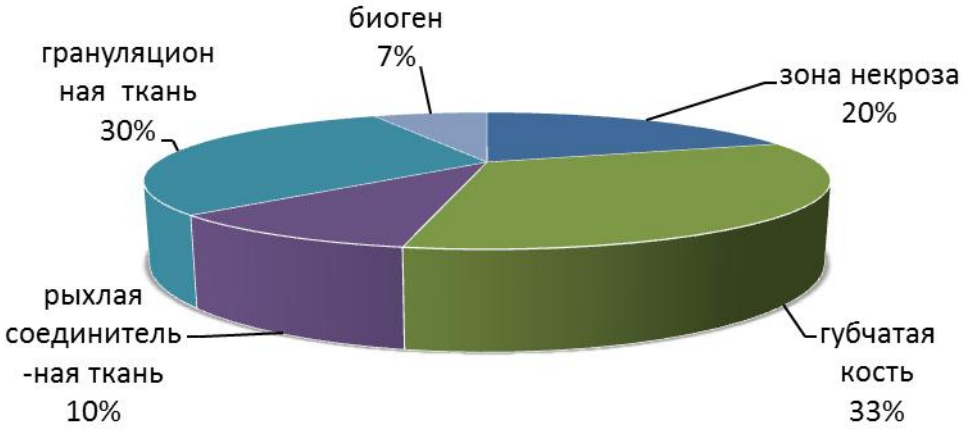


Рис. 3.15. Био-Ген + мембрана + стромальные клетки. 30 сутки. Отсутствие остеогенной дифференцировки

На 60-е сутки объем некротических изменений и секвестрации уменьшился и составил 14%, область дефекта была заполнена фиброретикулярной - 20%, и губчатой костной тканью с низкой плотностью остеоцитов – 54% (рис. 3.16.).

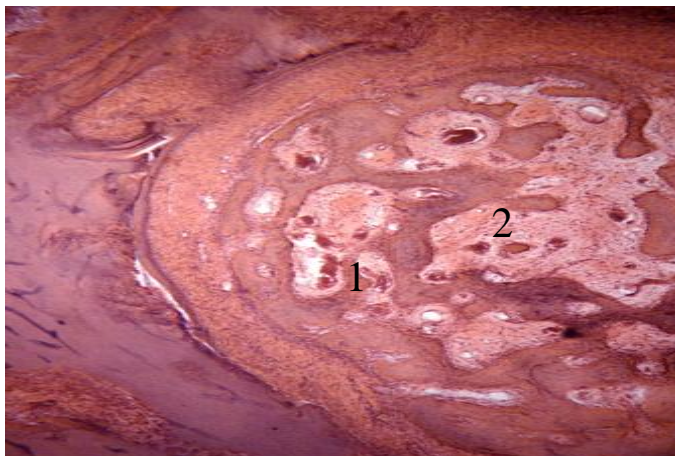


Рис. 3.16. 60-е сутки. Губчатая (1) костная ткань и соединительная ткань (2) в межтрабекулярных пространствах в области дефекта. Окраска по Ван-Гизон. Ув. 80

В межтрабекулярных пространствах располагалась рыхлая соединительная ткань – 6%, и не рассосавшиеся фрагменты имплантируемого материала - 6% (рис. 3.17.). Костная ткань, прилежащая к области дефекта, на значительных территориях секвестрирована.

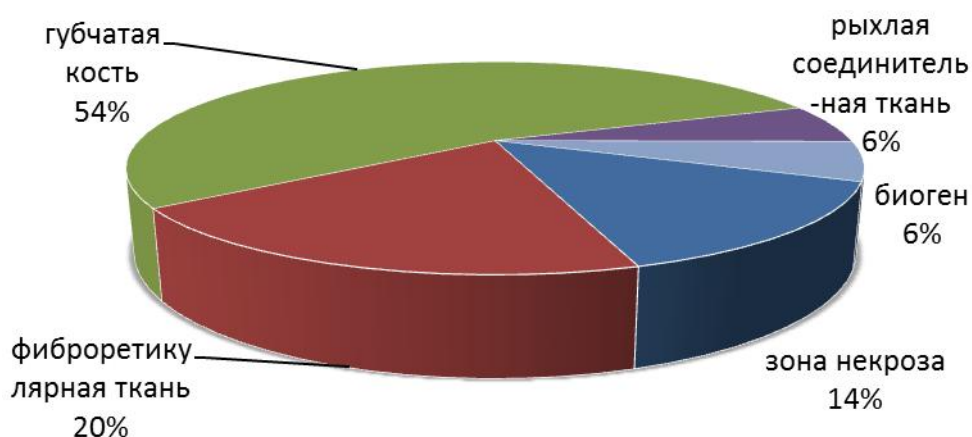


Рис. 3.17. Био-Ген + мембрана + стромальные клетки. 60-е сутки. Отсутствие остеогенной дифференцировки

Итак, применение материала Био-Ген для пластики дефектов кости не эффективно, т.к. на ранние сроки за счет наличия фрагментов имплантата в

области дефекта нарушается остеогенная дифференцировка, на поздние сроки, наряду с неполноценным регенератом в области дефекта, имела место деструкция прилежащей к дефекту ткани.

Кергап + мембрана + стромальные клетки

На 30-е сутки на гистотопограммах нижней челюсти, согласно морфометрическим данным (рис. 3.18.), некротические участки занимали 9%, область дефекта была заполнена в краевых отделах остеогенной фиброретикулярной тканью - 42%. В центральных отделах фрагменты кальция - 8%, окруженные губчатой костной тканью – 41% (рис. 3.19.).

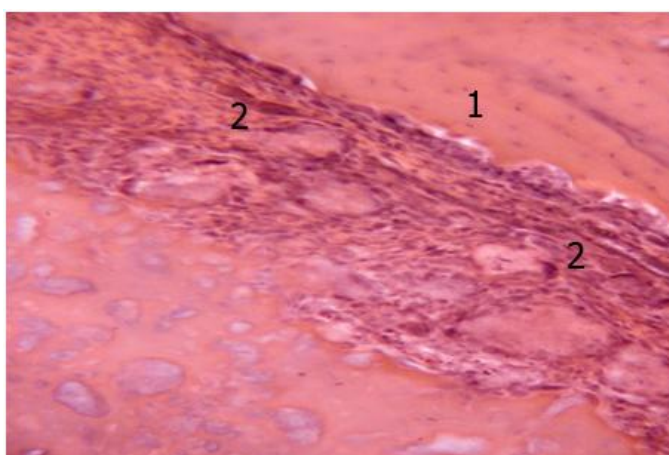


Рис. 3.18. 30-е сутки. Область дефекта заполнена в краевых отделах остеогенной фиброретикулярной тканью (1). Центральная область – Кергап (2), окруженный костной тканью. Окраска по Ван-Гизон. Ув. 80

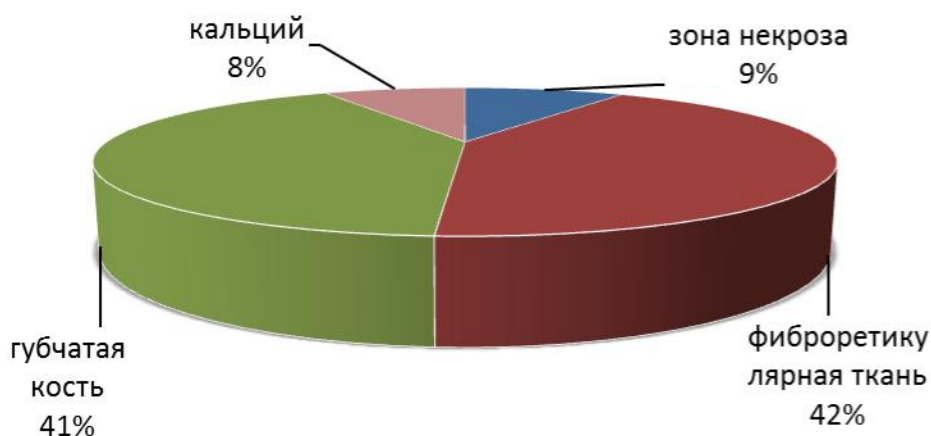


Рис. 3.19. Кергап + мембрана + стромальные клетки

В регенерате превалирует остеогенная фиброретикулярная ткань.

На 60 сутки, (рис. 3.20.), некротические участки уменьшились до 6%, дефект заполнен молодой губчатой тканью - 65%, местами обнаруживается фиброретикулярная ткань с остеогенными потенциями - 22%. Кергап еще сохраняет свою структуру - 7% (рис. 3.21.).

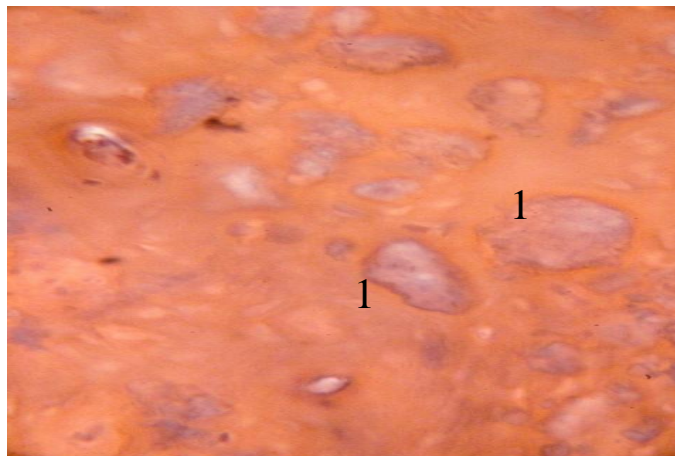


Рис. 3.20. 60-е сутки. Кергап в центральной области дефекта. Окраска по Ван-Гизон. Ув. 120

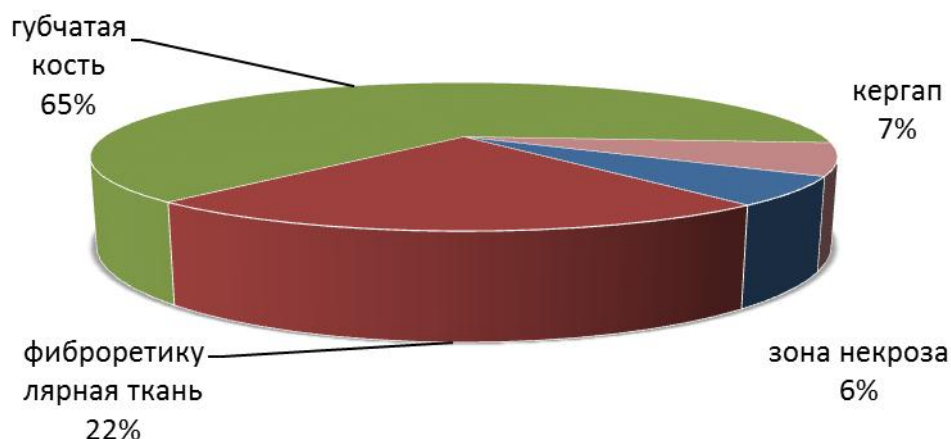


Рис 3.21. Кергап + мембрана + стромальные клетки. В регенерате превалирует остеоидный компонент

После обработки морфологического материала и получения микрофотографий по каждой серии эксперимента, нами установлено, что наилучший результат получен в случае использования Коллапана Л как носителя стромальных клеток в сочетании с мембраной и СК.

Регенерация костной ткани в области дефекта произошла как в губчатой, так и в компактной кости. Следовательно, СК введенные в область дефекта на носителе, обеспечивают качественную полноценную регенерацию костной

ткани, и данный способ может быть рекомендован к клиническому применению.

Результаты данного исследования опубликованы в статьях:

Спосіб направленої регенерації кісткової тканини у стоматології / В. І. Грищенко, В. Ф. Куцевляк, В. І. Куцевляк, О. Ю. Петренко, Ю. Ю. Мікулінський, Ю. О. Петренко, І. В. Циганова // Методичні рекомендації. – Харків, 2012. – 12 с.

Транспортные свойства костнопластических материалов как носителей культуры клеток / В. Ф. Куцевляк, В. І. Куцевляк, І. В. Циганова // Матеріали VI Міжнародної научно-практичної конференції «Стоматологія славянських держав». - Білгород, 2013. - С. 220-222.

РАЗДЕЛ 4

МОРФОГЕНЕЗ КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕЛЮСТИ КРОЛИКА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ДОЗЫ АУТОЛОГИЧНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И СПОСОБА ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

Проведен сравнительный анализ процессов регенерации костных дефектов тела челюсти у экспериментальных животных при разных условиях заживления: при естественном заживлении; при введении в костный дефект Коллапана Л; при введении в костный дефект 100 тысяч, 500 тысяч, 1 млн. аутологичных СК, полученных из костного мозга и жировой ткани.

4.1. Регенерация кости при естественном заживлении на 42-е и 90-е сутки

В данной серии представлены результаты исследования морфогенеза регенерата у животных с моделью дырчатого дефекта без какого-либо последующего воздействия.

На 42 сутки на гистотопограммах нижней челюсти, согласно морфометрическим данным, объем некротических изменений, секвестрации и инфильтрации лейкоцитами занимал 26,7%.

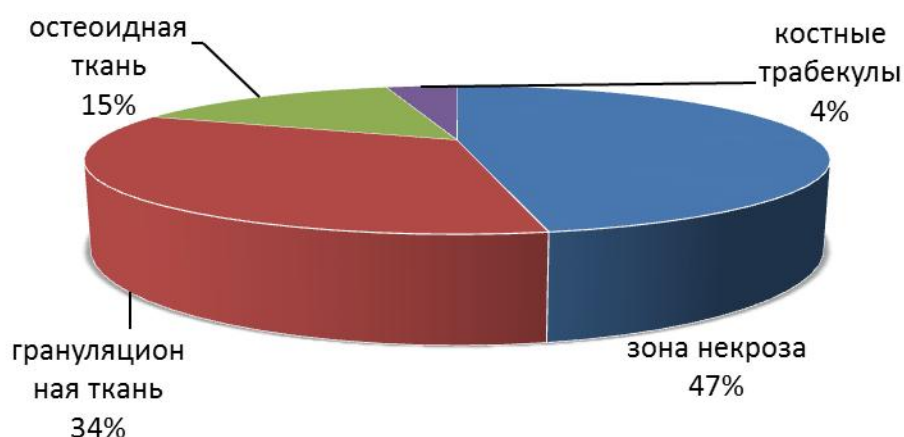


Рис. 4.1. Графическое изображение структуры регенерата кости при естественном заживлении на 42 сутки

Наряду с первичным некрозом наблюдались явления вторичного некроза, в результате чего этот компонент зоны повреждения составил 46,8%,

грануляционная ткань - 34%, остеоидная - 15,3%, мелкопетлистая сеть костных трабекул - 3,9% (рис. 4.1.).

Микроскопически на 42 сутки обнаружались обширные участки некроза и секвестрации фрагментов кости с узкими зонами грануляционной ткани, интенсивно инфильтрированной лейкоцитами на границе с мягкими тканями. На отдельных участках определялась выраженная лакунарная резорбция кости со стороны грануляционной ткани. Участки новообразованной кости определялись в толще грануляционной ткани, разделяющей поле некроза. В межблочных пространствах таких полей определялись участки васкуляризованной клеточно-волокнутой ткани и зоны остеогенеза на поверхности фрагментов кости.

Таким образом, на 42 сутки структура регенерата характеризовалась выраженными процессами некроза и секвестрации, а формирующаяся грануляционная ткань полностью отграничивала зоны некроза и секвестрации, а за ее пределами формировалась вторичная костная «коробка» из мелкопетливой сети новообразованных костных балочек.

На 90 сутки на гистотопограммах, согласно морфометрическим данным, объем некротических изменений и секвестрации уменьшился и составил 14,8%, клеточно-волокнутой ткани составляла 60%, мелко- и крупнопетлистая сеть новообразованных костных трабекул - 25,2% (20% и 5,2% соответственно) (рис. 4.2.).

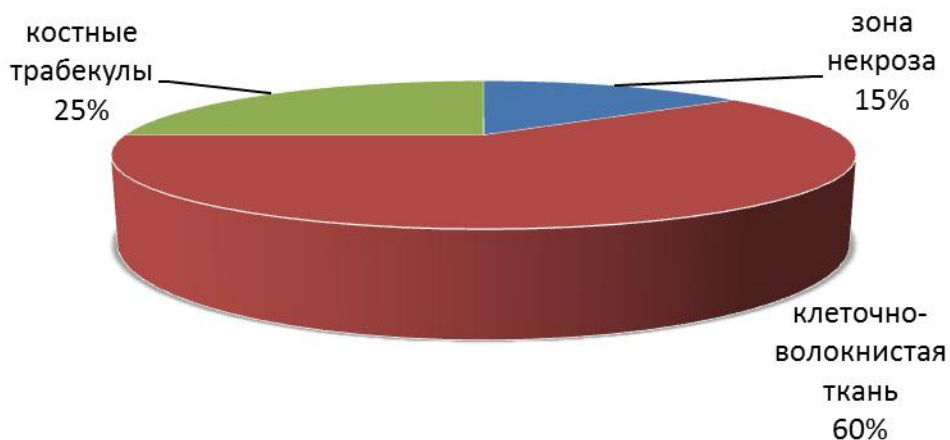


Рис. 4.2. Графическое изображение структуры регенерата кости при естественном заживлении на 90 сутки

Микроскопически на 90 сутки определялись беспорядочно расположенные участки некроза, с секвестрациями различной величины и грануляционной ткани. Во многих местах участки некроза, секвестрации и мелкопетлистая сеть новообразованных костных перекладин располагалась среди грануляционной ткани. Часть костных перекладин представляли безостеоцитные типичные секвестры, другая имела изъеденные контуры и была подобна секвестрам, но содержала хорошо окрашенные остеоциты. Поля новообразованной костной ткани также обнаруживались за пределами грануляций, формируя несплошную вторичную костную «коробку».

4.2. Регенерация кости после введения Коллапана на 42-е и 90-е сутки

В данной серии представлены результаты исследования морфогенеза регенерата у животных с моделью дырчатого дефекта нижней челюсти в сочетании с Коллапаном. На гистотопограммах на 42 сутки определялась значительно меньшая, чем в контрольной серии, интенсивность некротических изменений, которая составляла 14,6%, а также быстрое отграничение участков некроза и секвестров и более интенсивное развитие грануляционной ткани - 53%. Это создавало условия для заполнения дефекта за счет мелкопетлистой сети новообразованных костных балочек на 42 сутки и составило 32,4% (рис. 4.3.).

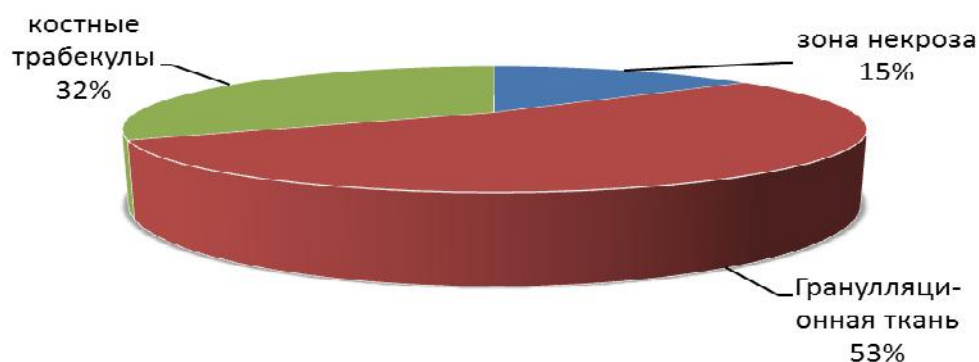


Рис.4.3. Структура регенерата кости после введения Коллапана на 42 сутки

Микроскопически на 42 сутки определялись участки некроза, мелкие секвестры в центре и грануляционная ткань, окружающая эти фрагменты, с незначительными участками лейкоцитарной инфильтрации.

В отдельных местах определялась остеокластическая резорбция фрагментов компактной кости на участках, их окружающих, и сращение новообразований костной ткани с поверхностью этих фрагментов. За счет полей костных балочек в некоторых местах обнаруживались участки сращения фрагментов костной ткани, но местами их разделяла грануляционная ткань с выраженной фиброзной основой.

Выявленные морфологические особенности на 42-е сутки отражают преобладания активности остеогенного компонента за счет сети мелкопетлистых костных балочек.

На 90-е сутки на гистотопограммах определялись некротические участки, которые составляли 10,2%, грануляционная ткань - 36,1 %, мелко- и крупнопетлистая сеть костных трабекул - 53,7% (21,7% и 32% соответственно) (рис. 4.4.).

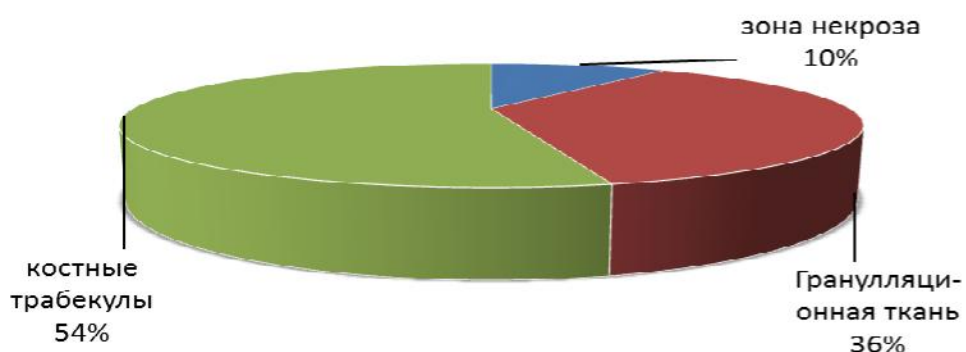


Рис. 4.4. Графическое изображение структура регенерата кости после введения Коллапана на 90-е сутки

Микроскопически на 90 сутки определялись незначительные участки некроза. Мелкопетлистая и крупнопетлистая сеть новообразованных костных перекладин определялась среди грануляционной ткани, по периферии обнаруживалась выраженная лакунарная резорбция фрагментов дефекта с интенсивным остеогенезом и участками новообразованной костной ткани.

Таким образом, на 90 сутки был значительно уменьшен объем некротических изменений, а также определялись выраженные сдвиги остеогенного компонента между 42 и 90 сутками, однако грануляционная ткань еще оставалась активным компонентом регенерата, что не позволяло сформировать целостность костной ткани нижней челюсти.

4.3. Регенерация дефекта кости нижней челюсти кролика после введения Коллапана с аутологичными СКЖТ

Стволовые клетки из жировой ткани в сочетании с Коллапаном Л вводили в зону дырчатого дефекта нижней челюсти кролям в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллиона.

4.3.1. Регенерация кости нижней челюсти после введения 100 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 42-е и 90-е сутки

После образования дырчатого дефекта и развития регенерата на 42-е сутки после введения 100 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном Л на гистотопограммах (рис. 4.5.) нижней челюсти некротические участки занимали 6%, гематома - 8%, грануляционная ткань - 54%, остеоидная - 20%, мелкопетлистая сеть костных трабекул - 12% (рис. 4.6.).

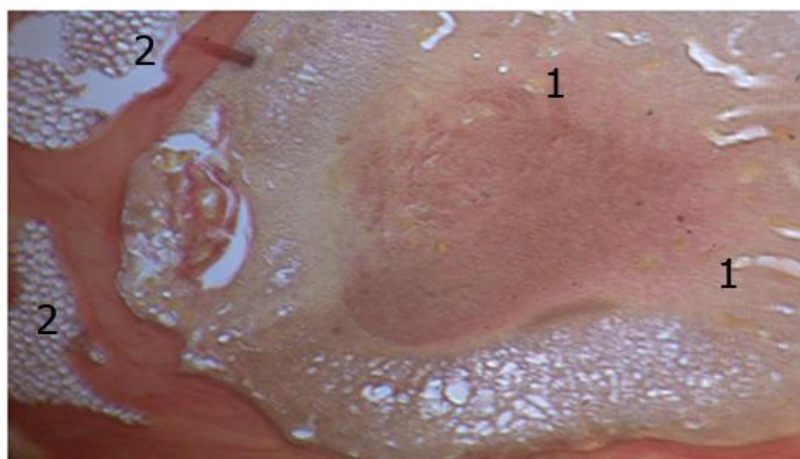


Рис. 4.5. Гистотопограмма. Зона дырчатого дефекта нижней челюсти (1) на 42 сутки после введения 100тыс. СКЖТ с Коллапаном (2). Окрашивание гематоксилин-эозин x 100

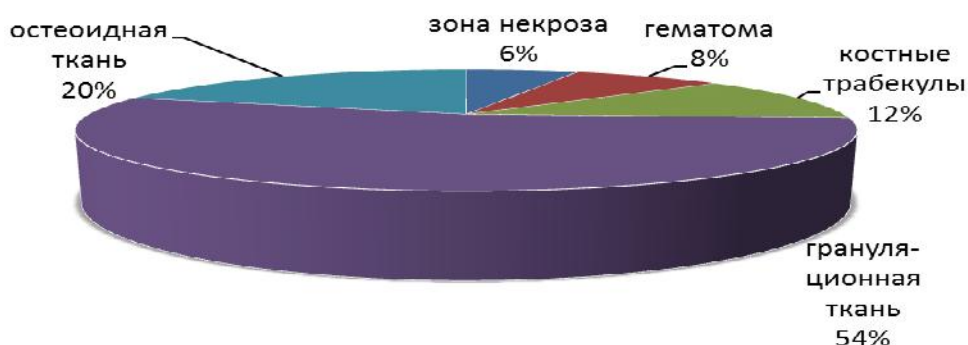


Рис. 4.6. Графическое изображение структуры регенерата кости после введения 100 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 42 сутки

Микроскопически (рис. 4.5., 4.7.) на 42 сутки после введения 100 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном зона дефекта расширилась, образуя в кости дефект с относительно ровными краями.

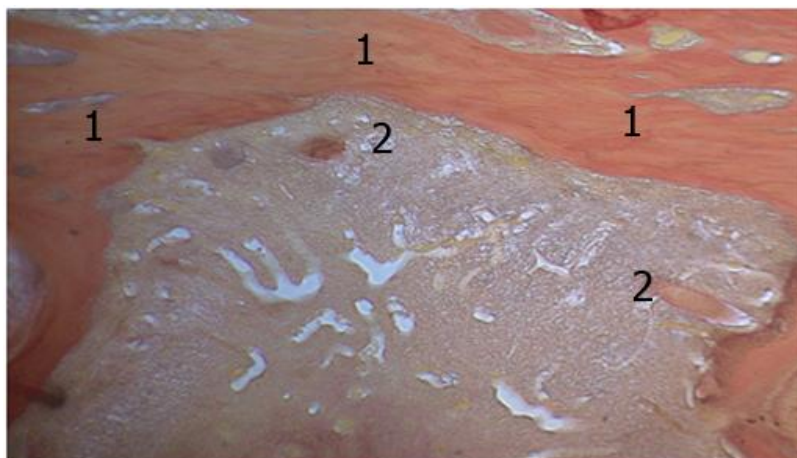


Рис. 4.7. Введение 100 тыс. СКЖТ с Коллапаном на 42-е сутки. Выраженная лакунарная резорбция (2) альвеолярной кости (1). Окрашивание гематоксилин-эозин x 100

На отдельных участках определялась выраженная лакунарная резорбция фрагментов кости, очагово и диффузно инфильтрированной лейкоцитами (рис. 4.8.).

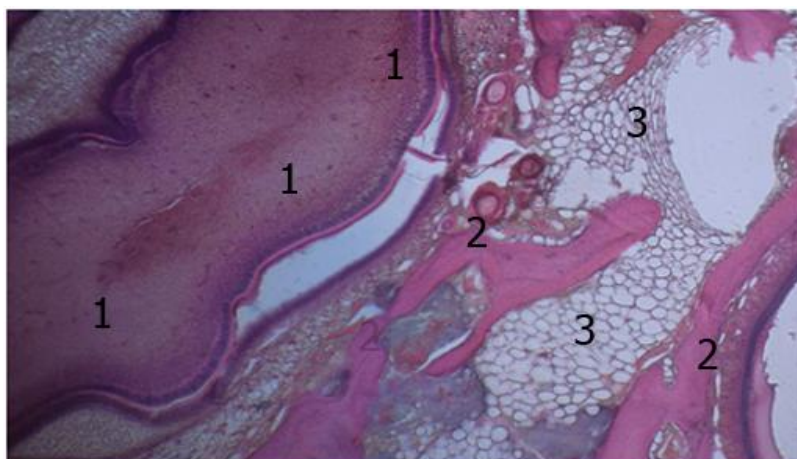


Рис. 4.8. Формирование новообразованной костной ткани (2) в толще грануляционной ткани (1) на 42 сутки после введения 100 тыс. СКЖТ с Коллапаном (3). Окрашивание гематоксилин-эозин x 100

Участки новообразованной костной ткани (рис. 4.8.) образовывались в толще грануляционной ткани, разделяющей поле некроза.

В межблочных пространствах таких полей определялась хорошо васкуляризованная клеточно-волокнистая ткань почти без лейкоцитарной инфильтрации, которая была наиболее выражена на границе некроза и грануляционной ткани.

Таким образом, после введения 100 тысяч аутологичных СКЖТ в структуре регенерата на 42-е сутки преобладала клеточно-волокнистая ткань с остеогенными потенциями, составившая 32% и участками остеогенеза, которые обнаруживались по периферии регенерата, где сохранилось микроциркуляционное русло.

На 90 сутки после введения 100 тысяч аутологичных СК с Коллапаном на гистотопограммах (рис. 4.9.) остатки гематомы и некротических участков занимали 4% общей площади регенерата, клеточно-волокнистая ткань - 66%, мелко - и крупнопетлистая сеть новообразованных костных трабекул – 30% (рис. 4.10.).

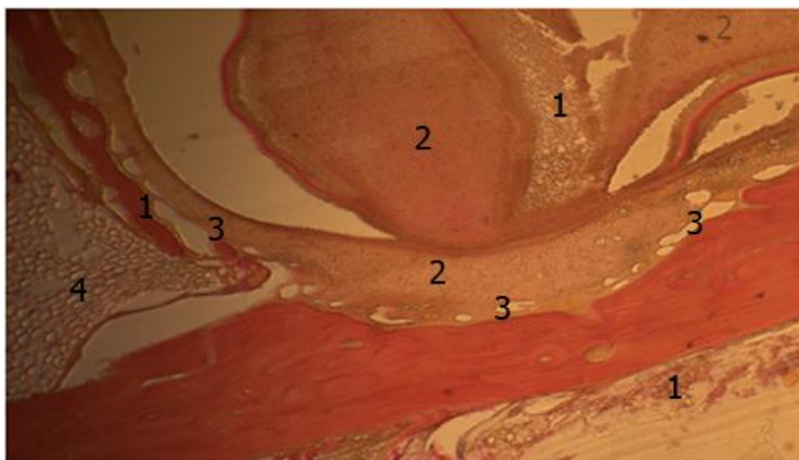


Рис. 4.9. Гистотопограмма. Введение 100 тыс. СКЖТ с Коллапаном на 90 сутки. 1– участок гематомы и некротической ткани; 2 - клеточно-волокнистая ткань; 3 - новообразованные костные трабекулы; 4 – остатки Коллапана. Окрашивание гематоксилин-эозин х 100



Рис. 4.10. Графическое изображение структуры регенерата кости после введения 100 тысяч аутологичных СК с Коллапаном на 90 сутки

Микроскопически (рис. 4.11.) на 90 сутки в зонах некроза наблюдались узкие поля грануляционной ткани в незначительном количестве, которые чередовались с полями выраженной лейкоцитарной инфильтрации.

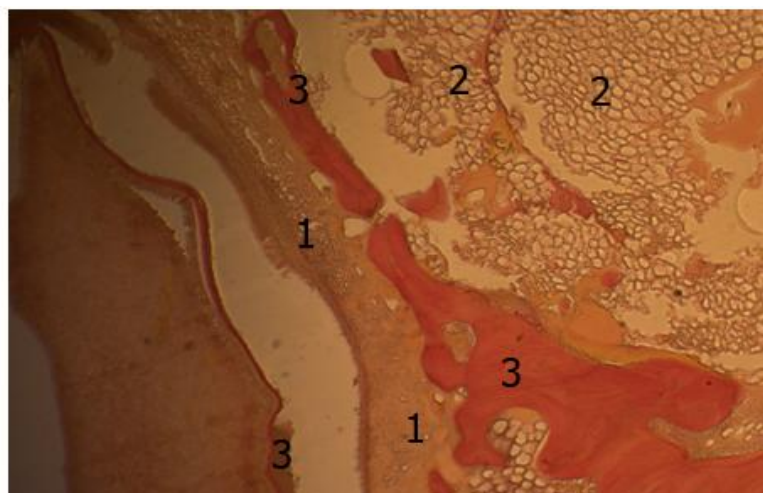


Рис. 4.11. Введение 100 тыс. СКЖТ с Коллапаном на 90 сутки. Формирование полей грануляционной ткани с выраженной лейкоцитарной инфильтрацией в зоне костного дефекта. 1 – грануляционная ткань; 2 – остатки Коллапана; 3 – участки с лейкоцитарной инфильтрацией. Окрашивание гематоксилин-эозин x 100

На отдельных участках, преимущественно вокруг фрагментов из пластинчатой кости, определялась лакунарная резорбция.

Наблюдались напластования новообразованной костной ткани по перистальной и эндостальной поверхности и очаговой лейкоцитарной инфильтрацией грануляционной ткани, окружающей эти поля.

Таким образом, морфологические исследования показали, что на 90-е сутки в структуре регенерата кости преобладала клеточно-волокнистая ткань с

многочисленными капиллярами, а количество крупно- и мелкотрабекулярной новообразованной костной ткани достигло 30%.

4.3.2. Регенерация кости нижней челюсти после введения 500 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 42-е и 90-е сутки

На 42 сутки после введения 500 тысяч аутологичных СКЖТ на гистотопограммах (рис. 4.12.) определяется зональность структуры регенерата с разделением на поверхностную и глубокую зоны.

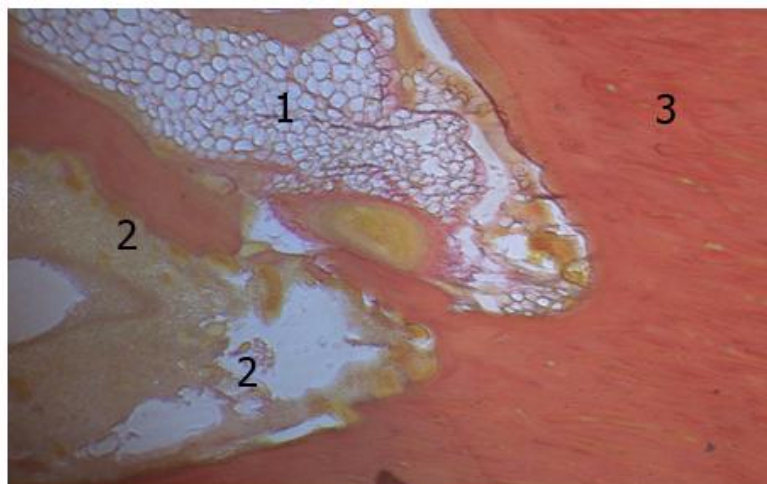


Рис. 4.12. Введение 500 тыс. СК с Коллапаном из жировой ткани на 42 сутки. 1 – Коллапан; 2 – грануляционная ткань; 3 – альвеолярная ткань. Окрашивание Ван Гизон x 100

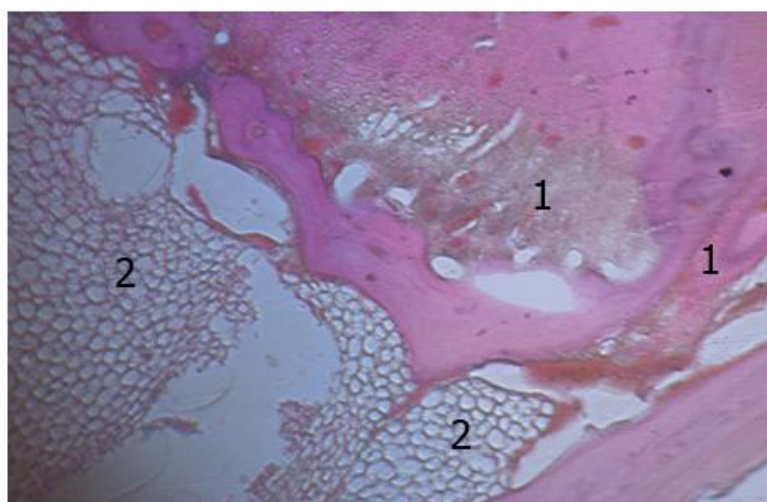


Рис. 4.13. Формирование клеточно-волокнутой ткани с многочисленными капиллярами в зоне регенерата после введения 500 тыс. СКЖТ с Коллапаном на 42-е сутки. 1 – клеточно-волокуниста ткань; 2 – Коллапан. Гематоксилин-эозин x 100

Если в первой зоне продолжала преобладать клеточно-волокнистая ткань с многочисленными капиллярами (рис. 4.13.), во второй обнаруживалась сеть новообразованных костных трабекул с многочисленными остеобластами на поверхности и богатой клеточными элементами и кровеносными сосудами в межтрабекулярных пространствах.

Согласно морфометрическим данным после введения 500 тысяч аутологичных СКЖТ на 42-е сутки в структуре регенерата 1% занимали остатки гематомы в поверхностной зоне, 55% - клеточно-волокнистая ткань, 12% - остеидные и 32% - новообразованные костные трабекулы (рис.4.14.).



Рис. 4.14. Структура регенерации кости после введения 500 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 42 сутки

Таким образом, на 42 сутки в структуре регенерата после введения 500 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном преобладала васкуляризованная клеточно-волокнистая ткань почти без лейкоцитарной инфильтрации, а зоны остеогенеза занимали глубокие отделы дефекта и составляли 44%.

На 90-е сутки после введения 500 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном на гистотопограммах (рис. 4.15.) клеточно-волокнистая ткань составляла в структуре регенерата всего 8%, а сеть остеидных и новообразованных костных трабекул - 85%, причем 9% из них имели крупнопетлистый характер.

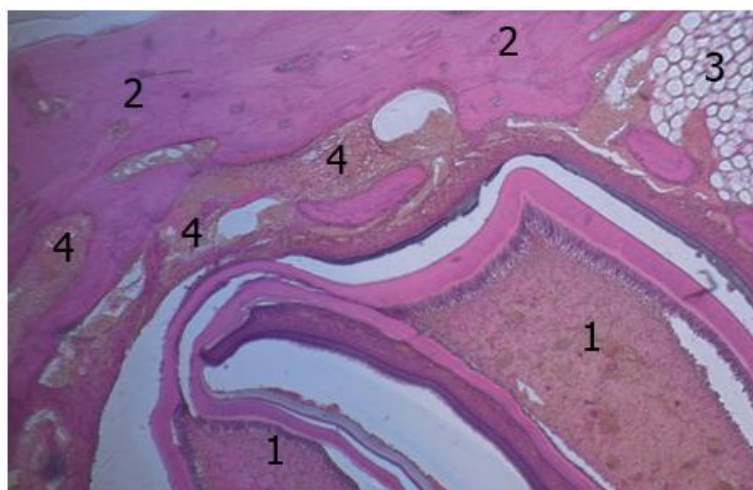


Рис. 4.15. Гистотопограмма. Введение 500 тыс. СКЖТ с Коллапаном на 90-е сутки. 1- клеточно-волоконистая ткань; 2 – остеоидная ткань; 3 – Коллапан; 4 – новообразованные костные трабекулы. Окрашивание гематоксилин-эозин x 100

В периферических участках сети костных трабекул обнаруживалось формирование кортикального слоя, который занимал 8% (всего 92%) (рис. 4.16.).

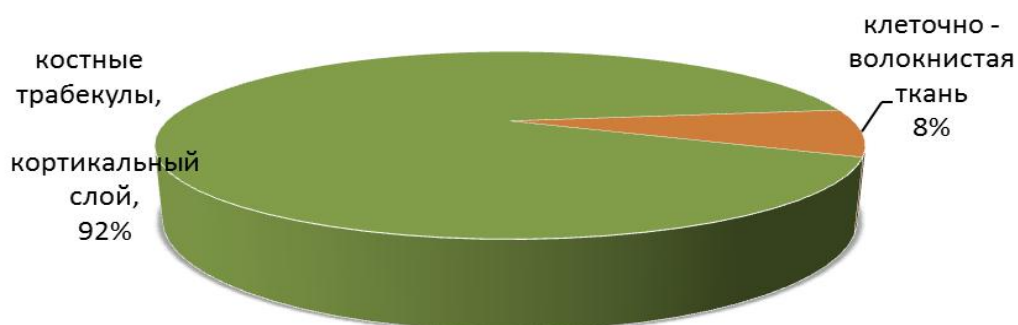


Рис. 4.16. Графическое изображение структуры регенерации кости после введения 500 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 90 сутки

Микроскопически в регенерате кости после введения 500 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 90-е сутки на отдельных участках, преимущественно вокруг фрагментов из пластинчатой кости, определялась лакунарная резорбция с напластованиями новообразованной костной ткани по перистальной и эндостальной поверхности и незначительной очаговой лейкоцитарной инфильтрацией грануляционной ткани (рис. 4.17.), окружающей эти поля в количестве менее 1%.

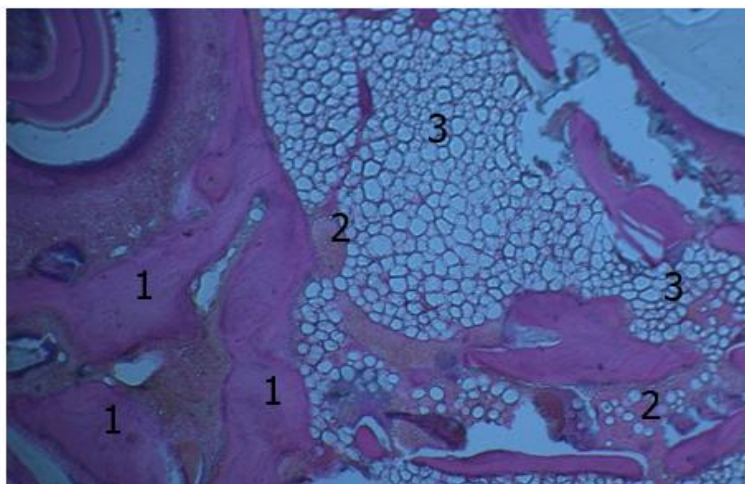


Рис. 4.17. Введение 500 тыс. СК из жировой ткани с Коллапаном на 90 сутки. Участки лакунарной резорбции вокруг фрагментов пластинчатой кости с напластованиями новообразованной костной ткани в зоне регенерата. 1 – пластинчатая кость; 2 – участки лакунарной резорбции; 3 – Коллапан. Окрашивание гематоксилин-эозин х 100

Таким образом, в регенерате кости, после введения 500 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном в период с 42 до 90 суток определялось существенное качественное изменение темпов остеогенеза в структуре регенерата, что привело к значительному увеличению новообразованных костных структур, с 44% до 85%.

4.3.3. Регенерация кости нижней челюсти после введения 1 млн. аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 42-е и 90-е сутки

На 42 сутки кости после введения 1 млн. аутологичных СКЖТ с Коллапаном на гистотопограммах (рис. 4.19.) 3% составляли беспорядочно расположенные участки некроза и грануляционной ткани – 40%, местами с интенсивно выраженной инфильтрацией, клеточно-волокнистая ткань - 8 %, остеодная - 10%, новообразованные костные трабекулы - 39% (рис. 4.18.).



Рис. 4.18. Графическое изображение структуры регенерата кости после введения 1 млн. аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 42 сутки.

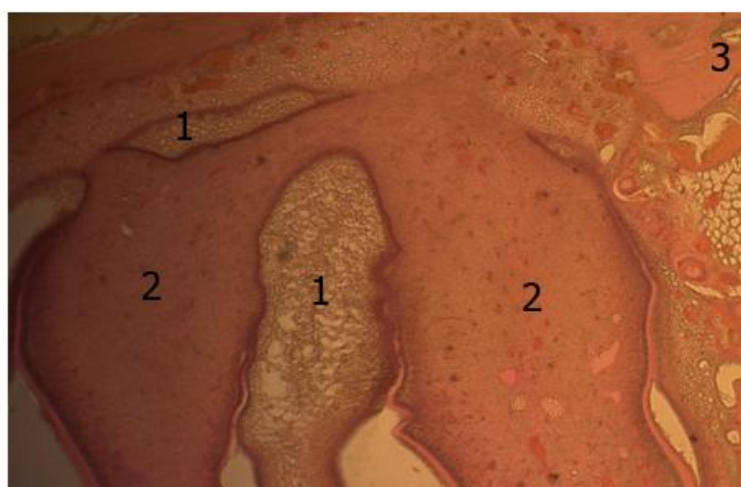


Рис. 4.19. Гистотопограмма. Введение 1 млн. СКЖТ с Коллапаном на 42 сутки. 1 - участки некроза и грануляционной ткани; 2 – остеοидная ткань; 3 – новообразованные костные трабекулы. Окрашивание Ван-Гизон X100

Отмечалось уменьшение площади дефекта, преимущественно в верхних отделах. Определялась резорбция альвеолярного отростка (рис. 4.20).

Микроскопически на 42-е сутки после введения 1 млн. аутологичных СКЖТ с Коллапаном обнаруживалась хорошо сформированная грануляционная ткань с узкими полями лейкоцитарной инфильтрации.

На отдельных участках определялись фрагменты компактной костной ткани, в которой наряду с четко окрашенными остеοцитами 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 составе последней выявлено значительное количество клеток с ассиметрично расположенным ядром и интенсивно оксифильной гомогенной цитоплазмой, что позволяет их отнести к преостеобластам.

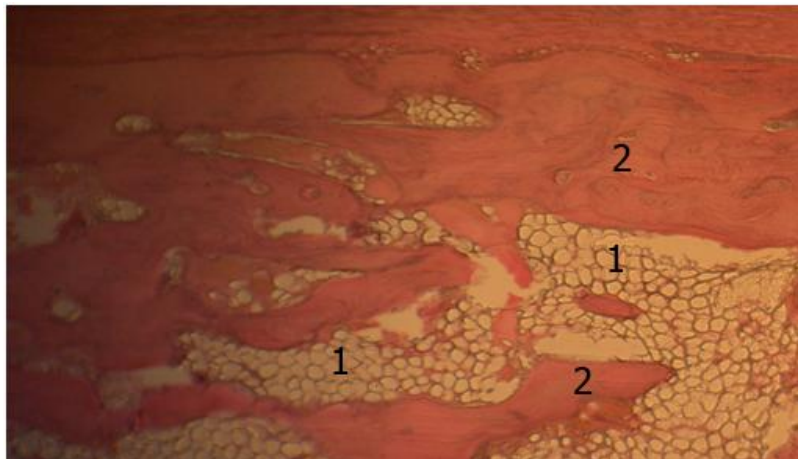


Рис. 4.20. Введение 1 млн. СК из жировой ткани с Коллапаном на 42 сутки. Формирование клеточных элементов с интенсивно оксифильной гомогенной цитоплазмой в зоне регенерата. 1 – остатки Коллапана; 2 – формирование костных балочек с грануляционной тканью. Окрашивание Ван-Гизон x 100

На 90 сутки после введения 1 млн. аутологичных СКЖТ с Коллапаном на гистотопограммах (рис. 4.22.) в составе компонентов регенерата обнаруживалось преобладание полей грануляционной ткани - 38% и новообразованной костной ткани – 52%, остеоидная ткань – 7% (рис. 4.21.). Участки некроза и секвестры (3%) четко ограничены грануляционной тканью, которая только в отдельных местах инфильтрирована лейкоцитами в виде узких зон.

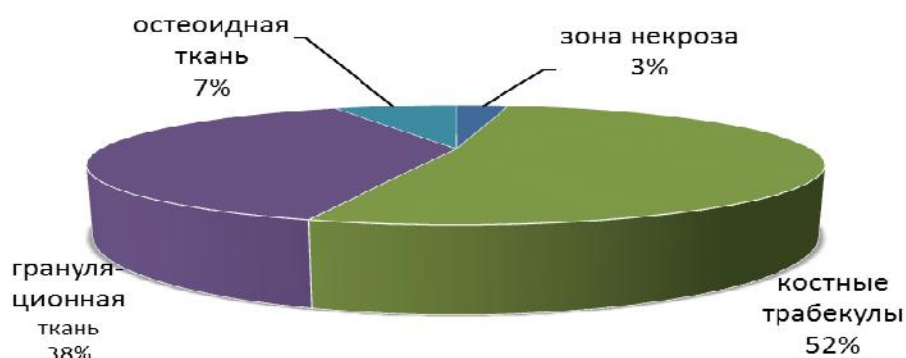


Рис. 4.21. Графическое изображение структуры регенерации кости после введения 1 млн. аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 90 сутки

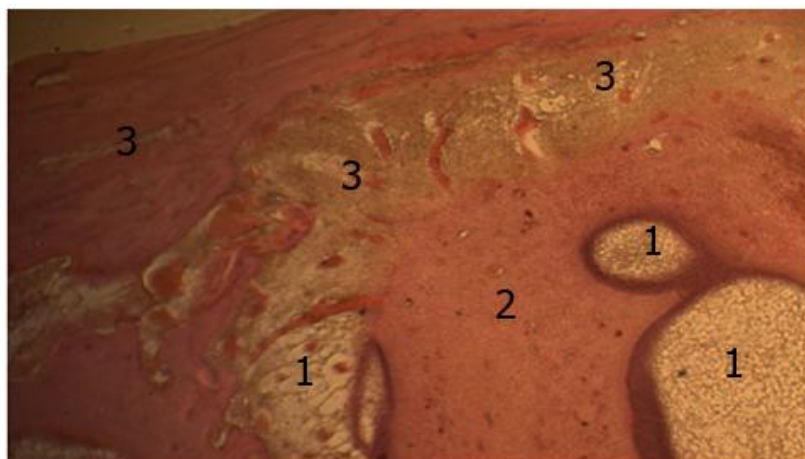


Рис. 4.22. Гистотопограмма. Введение 1 млн. СКЖТ с Коллапаном на 90-е сутки. 1 – грануляционная ткань; 2 – остеоидная ткань; 3 – новообразованная костная ткань. Окрашивание Ван-Гизон x100

На фоне большого числа новообразованных костных балочек, преимущественно спаянных с поверхностью фрагментов, наблюдались участки компактной костной ткани (рис 4.23.), которые характеризовались отдельными безостеоцитными зонами, местами лакунами резорбции.

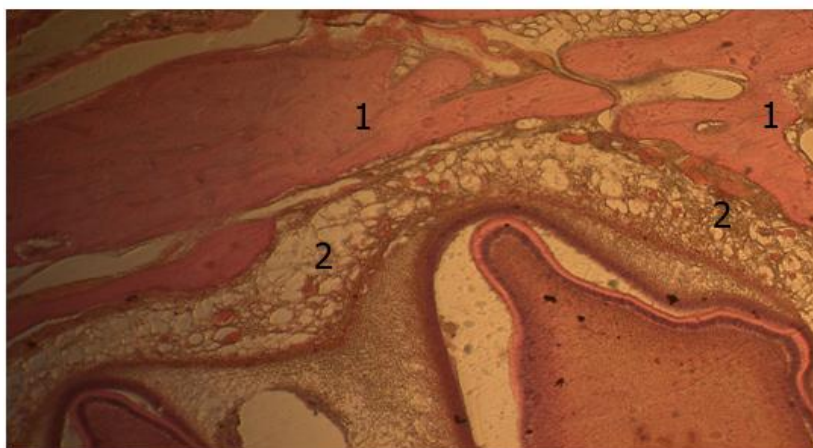


Рис. 4.23. Гистотопограмма. Введение 1 млн. СКЖТ с Коллапаном на 90-е сутки. Формирование участков новообразованной костной ткани в зоне регенерата. 1 – компактная костная ткань; 2 – участки новообразованной костной ткани. Окрашивание Ван-Гизон x 100

Таким образом, на 90-е сутки после введения 1 млн. аутологичных СКЖТ с Коллапаном продолжает сохраняться картина остеогенеза, характерная

для 42 суток (рис. 4.24.), усиление процессов костеобразования незначительное, с 40% до 48%.

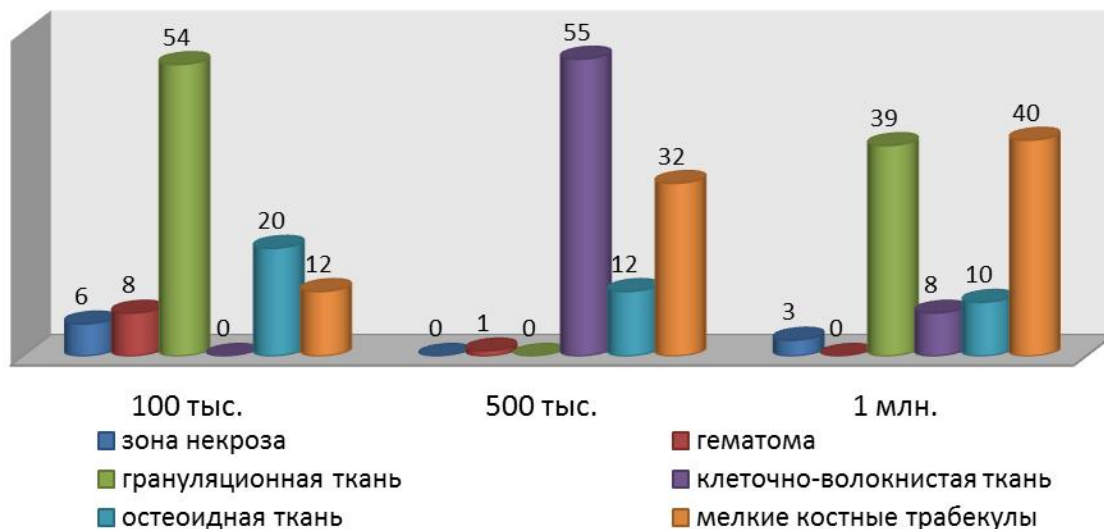


Рис. 4.24. Характер морфологических изменений структуры регенерата кости на 42 сутки (СКЖТ)

Расположение основных компонентов регенерации у отдельных животных не отличалось существенными особенностями. Большая часть полей состояла из утолщенных новообразованных костных балочек, которые формировали крупнопетлистую сеть, ограниченную от полей грануляционной тканью, отделяющую область некроза узкой зоной. В результате этого поля новообразованной костной ткани формировали несплошную вторичную костную «коробку». На отдельных участках определялись напластованные новообразования кости на пластинчатых фрагментах, которые были окружены рубцовой соединительной тканью.

Следовательно, в данной группе животных регенерация поврежденной нижней челюсти характеризовалась незначительно выраженными процессами некроза и инфильтрации тканей, некротические изменения составляли до 10% на 90 сутки после введения 1 млн стволовых клеток из жировой ткани в сочетании с Коллапаном (рис. 4.25.).

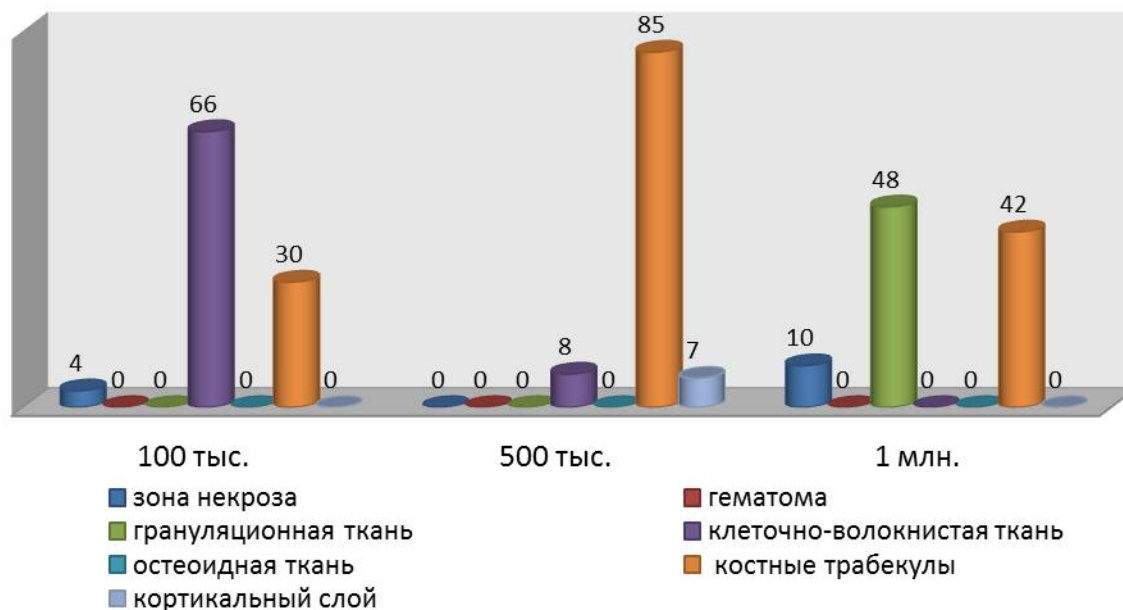


Рис. 4.25. Характер морфологических изменений структуры регенерата кости на 90 сутки (СКЖТ)

Выводы:

Следует отметить, что после введения 500 тысяч СКЖТ с Коллапаном, объем некротических изменений уменьшился до 1%, а на 90 сутки практически не определялся, при этом превалировала остеоидная и новообразованная костная ткань, которая составила 85%.

Введение СКЖТ 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 СКЖТ в сочетании с Коллапаном в количестве 500 тысяч, определялись значительные сдвиги в остеогенном компоненте между 42 и 90 сутками (рис. 4.24., 4.25.), 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 происходило.

4.4. Регенерация дефекта кости нижней челюсти кролика в условиях дырчатого и сочетанного действия Коллапана с аутологичными СККМ

Стволовые клетки из костного мозга в сочетании с Коллапаном вводили в зону дырчатого дефекта нижней челюсти экспериментальным кролям в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллиона.

4.4.1. Регенерация кости нижней челюсти кролика после введения 100 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном на 42-е и 90-е сутки

На 42 сутки после введения 100 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном на гистотопограммах (рис. 4.26.) согласно морфометрическим данным из общей площади регенерата 5% занимают некротические ткани, 35% - грануляционная ткань, 28% - остеоидная ткань, мелкопетлистая сеть костных трабекул – 32% (рис. 4.27.).



Рис 4.26. Гистотопограмма. Введение 100 тыс. СККМ с Коллапаном на 42-е сутки. 1 – остатки Коллапана; 2 – грануляционная ткань; 3 – участок некроза; 4 – остеоидная ткань; 5 – костные трабекулы. Окрашивание Ван-Гизон x 100

Микроскопически на 42-е сутки после введения 100 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном определялись небольшие ограниченные участки некроза, отделенные зонами грануляционной ткани от полей из сети новообразованных костных балочек.



Рис. 4.27. Графическое изображение структуры регенерата кости после введения 100 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном на 42 сутки

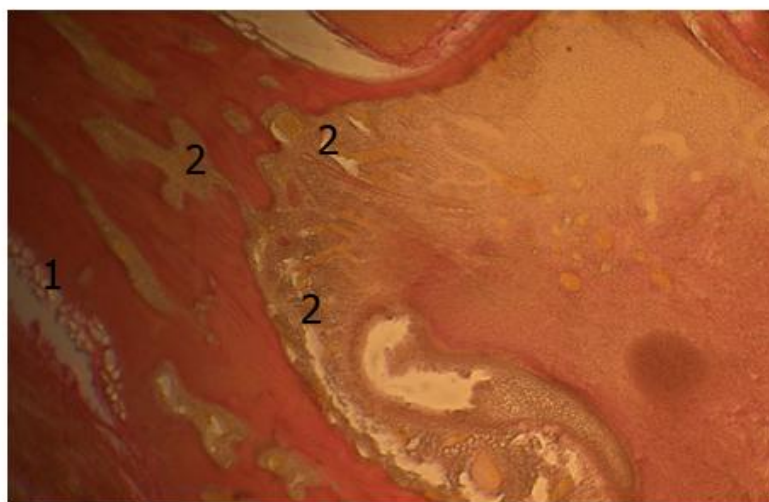


Рис. 4.28. Введение 100 тыс. СК из костного мозга с Коллапаном на 42-е сутки. Выраженный остеогенез с трансформацией в мелкопетлистую сеть костных балочек. 1 – остатки Коллапана; 2 – мелкопетлистая костная ткань. Окрашивание Ван-Гизон x 100

На отдельных участках (рис. 4.28.) обнаруживались выраженные проявления остеогенеза с трансформацией в мелкопетлистую сеть костных балочек. Фрагменты из компактной костной ткани в некоторых участках подвергались выраженному разрежению и срастались с полями новообразованных костных балочек по поверхности разражения фрагментов.

Таким образом, гистологические исследования на 42-е сутки после введения 100 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном свидетельствовали о том, что в структуре регенерата преобладали дифференцированные

компоненты, а узкие участки некротически измененной ткани определялись, скорее всего, как следствие недостаточного формирования микроциркуляторного русла.



Рис. 4.29. Гистотопограмма. Введение 100 тыс. СККМ с Коллапаном на 90 сутки. Выраженный остеогенез с трансформацией в мелкопетлистую сеть костных балочек. 1 – мелкопетлистая костная ткань; 2 – остеогенная ткань. Окрашивание Ван-Гизон x 100

На 90-е сутки после введения 100 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном на гистотопограммах (рис. 4.29.), согласно морфометрическим данным, 3% общей площади занимали некротически измененные ткани, в основном в интермедиарной зоне, 32% представлены остеонидной тканью, 32% составила мелкопетлистая сеть костных балочек, 21% - крупнопетлистая сеть костных балочек, 12% - грануляционная ткань (рис. 4.30.).

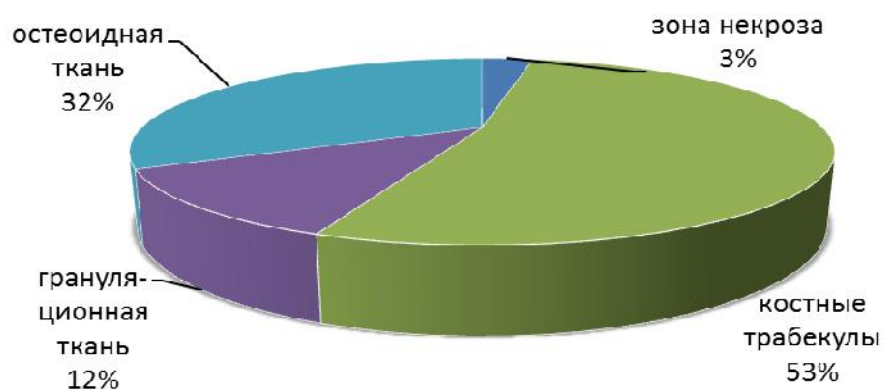


Рис. 4.30. Графическое изображение структуры регенерата кости после введения 100 тысяч аутологичных СК с Коллапаном на 90-е сутки

Микроскопически на 90-е сутки после введения 100 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном (рис. 4.31.) обнаруживалось преобладание полей новообразованной костной ткани, за счет которой формировался компактный слой, хотя между этими полями и определялись небольшие участки некроза, а также подвергающиеся резорбции секвестры.

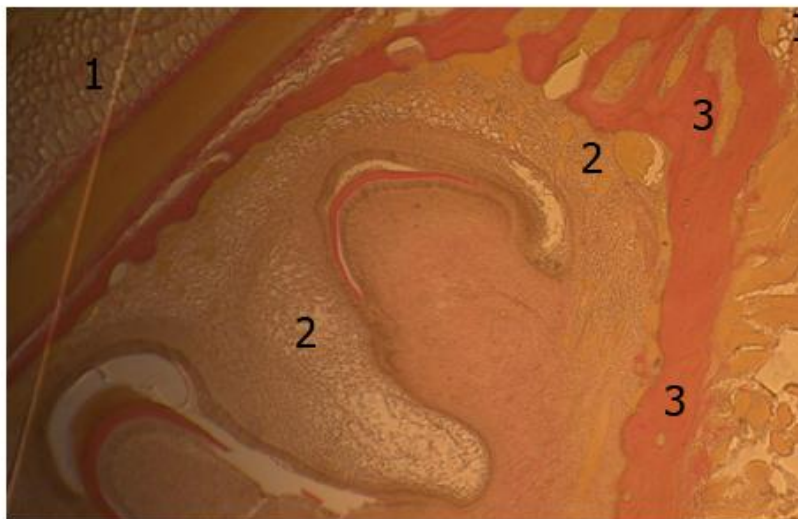


Рис. 4.31. Введение 100 тыс. СККМ с Коллапаном на 90-е сутки. Формирование крупнопетливой сети трабекул, четко отграниченных плотно прилегающей грануляционной тканью в зоне дефекта. 1 – остатки Коллапана; 2 – грануляционная ткань; 3 – крупнопетлистая ткань. Окрашивание Ван-Гизон x 100

В других участках, наряду с выраженным остеогенезом, обнаруживалась резорбция фрагментов костной ткани с образованием массивных внутрифрагментарных полостей. На отдельных участках определялись поля из крупнопетливой сети костных балочек, четко отграниченные от прилегающей грануляционной ткани, богатой пучками коллагеновых волокон.

Таким образом, на 90-е сутки гистологические исследования свидетельствовали об увеличении объема пролиферирующей ткани с преобладанием в составе регенерата остеогенных клеточных элементов.

4.4.2. Регенерация кости нижней челюсти кролика после введения 500 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном на 42-е и 90-е сутки

На 42-е сутки на гистотопограммах после введения 500 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном (рис. 4.32.) из общей площади перестраивающегося регенерата 1% занимали участки некротически измененных тканей, клеточно-волоконистая ткань – 13%, остеодная ткань – 4%, мелкопетлистая костная ткань - 36 %, крупнопетлистая костная ткань – 46% (рис.4.33.).

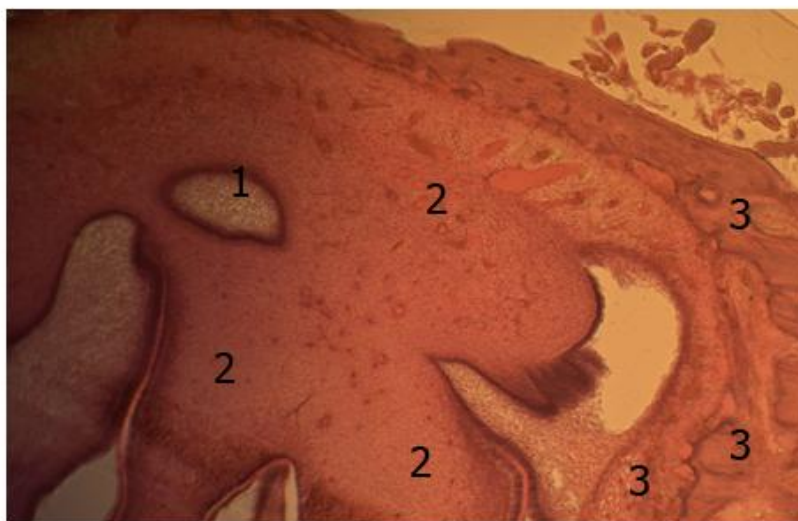


Рис. 4.32. Гистотопограмма. Введение 500 тыс. СККМ с Коллапаном на 42 сутки. 1 – участки некротической ткани; 2 – клеточно-волоконистая ткань; 3 – остеодная ткань. Окрашивание Ван-Гизон x 100

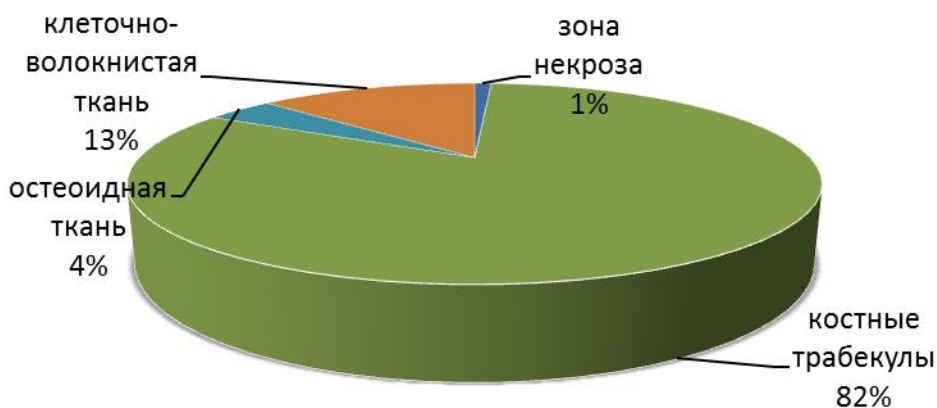


Рис. 4.33. Графическое изображение структуры регенерата кости после введения 500 тысяч аутологичных СК с Коллапаном на 42-е сутки

Микроскопически на 42 сутки после введения 500 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном (рис. 4.34.) процессы перестройки в зоне дефекта нижней челюсти имели выраженный характер.

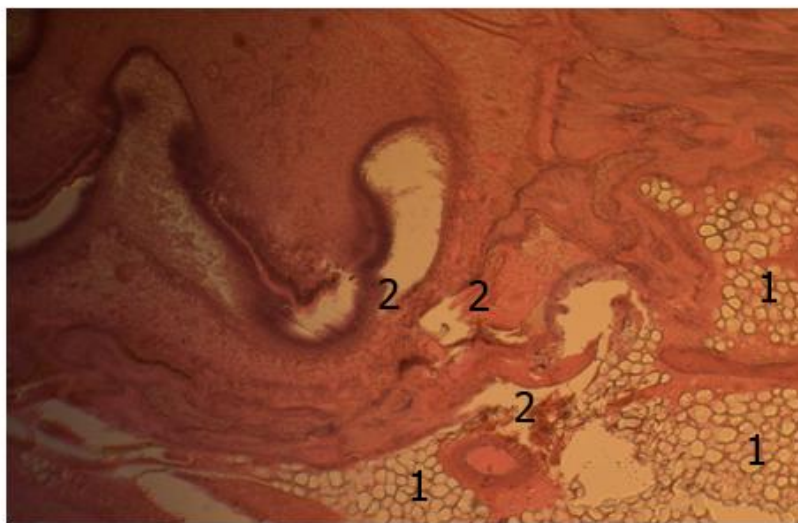


Рис. 4.34. Введение 500 тыс. СККМ с Коллапаном на 42 сутки. Активная резорбция костных отломков с пролиферации клеточных элементов в зоне регенерата. 1 – Коллапан; 2 – резорбция костных обломков. Окрашивание Ван-Гизон x 100

В зоне регенерата наблюдались периостальные наслоения по нижнему краю челюсти. В альвеолярном отростке, в сравнении с предыдущим наблюдением, изменений не было выявлено. Периостальное костеобразование сопровождалось активной резорбцией костного вещества отломков и пролиферацией клеточных элементов. Таким образом, на 42-е сутки наблюдалось значительное увеличение клеточных элементов остеогенного характера за счет периостального остеобразования.

На 90-е сутки на гистотопограммах, после введения 500 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном (рис.4.35.), обнаруживалась целостная структура из новообразованной костной ткани, в которой 38% занимала мелкопетлистая сеть костных трабекул, 46% - крупнопетлистая сеть костных трабекул, 16% занимал кортикальный слой, который без четкой границы формировался из сети костных трабекул (рис. 4.36.).

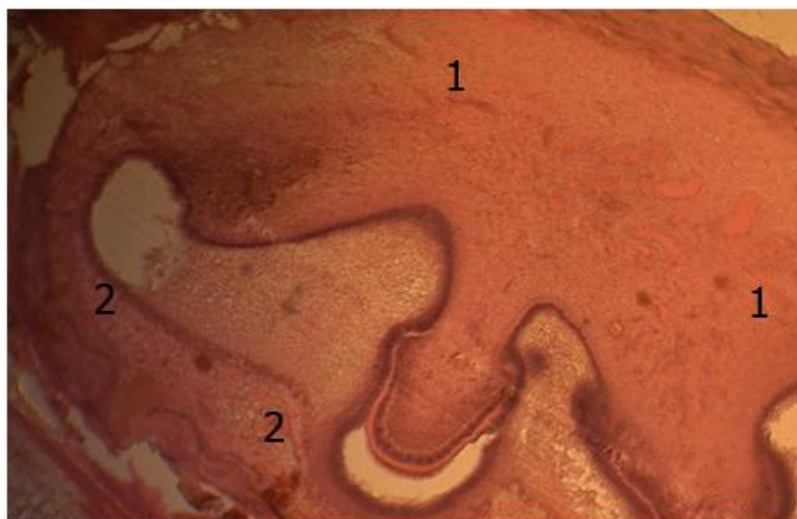


Рис. 4.35. Гистотопограмма. Введение 500 тыс. СККМ с Коллапаном на 90 сутки. 1 – кортикальный слой; 2 – мелко- и крупнопетлистые костные балочки. Окрашивание Ван-Гизон x 100

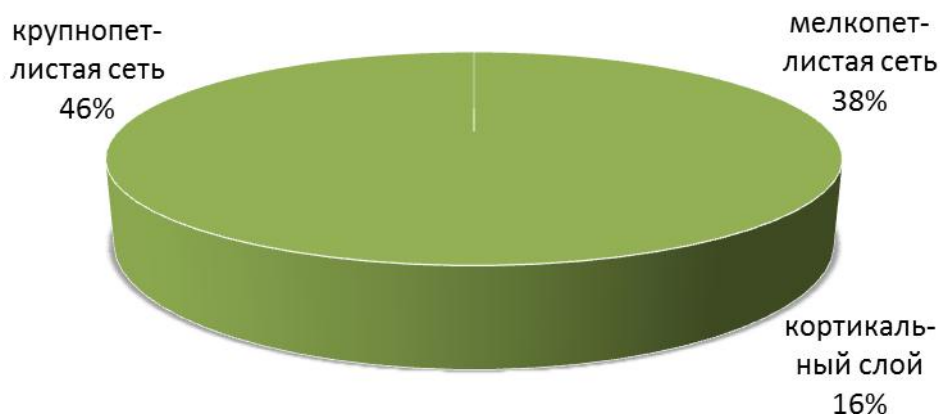


Рис. 4.36. Графическое изображение структуры регенерата кости после введения 500 тысяч аутологичных СК с Коллапаном на 90-е сутки

Микроскопически на 90-е сутки после введения 500 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном развитие остеогенеза имело более выраженный характер. Это выразалось в интенсивном костеобразовании и восстановлении целостности кости нижней челюсти, но с наличием тех компонентов (сеть мелкопетлистых и крупнопетлистых трабекул), которые будут подвергаться окончательной перестройке еще на протяжении длительного периода времени (рис. 4.37.).

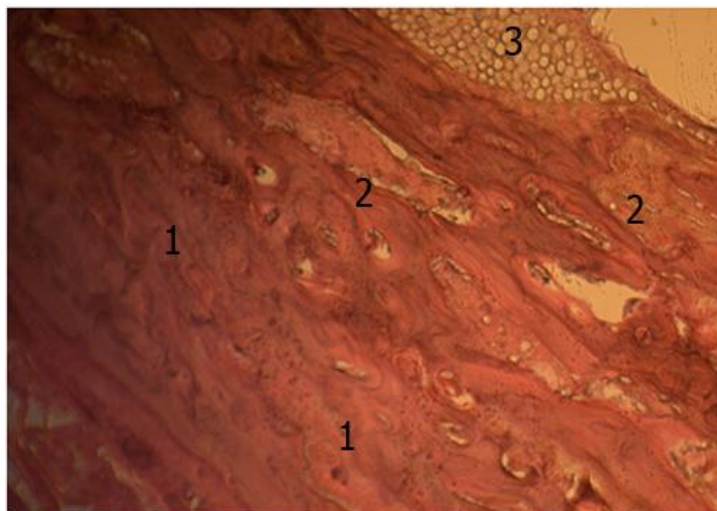


Рис. 4.37. Введение 500 тыс. СККМ с Коллапаном на 90-е сутки. Интенсивное костеобразование за счет формирования сети мелкопетлистых и крупнопетлистых трабекул в зоне регенерата. 1 – мелкопетлистая костная ткань; 2 – крупнопетлистая костная ткань; 3 - остатки Коллапана. Окрашивание Ван-Гизон x 100

Таким образом, введение аутологичных СККМ в количестве 500 тысяч в сочетании с Коллапаном на 90 сутки в зоне регенерата создавали условия для более интенсивного развития остеогенеза и на этой основе приводили к интенсификации пролиферативных процессов и процессов дифференциации по остеогенному типу.

4.4.3. Регенерация кости нижней челюсти кролика после введения 1 миллиона аутологичных СККМ с Коллапаном на 42-е и 90-е сутки

На 42 сутки на гистотопограммах после введения 1 миллиона аутологичных СККМ с Коллапаном (рис. 4.38.) из общей площади регенерата 6% занимали некротически измененные ткани, грануляционная ткань - 4%, крупнопетлистая сеть костных трабекул - 40%, остеоидная ткань - 30%, бесклеточное поле - 20%, с гомогенными эозинофильными массами (рис. 4.39.).

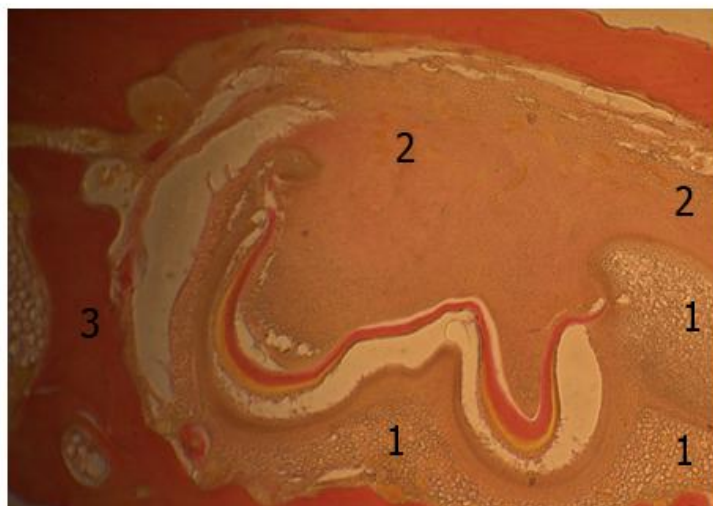


Рис. 4.38. Гистотопограмма. Введение 1 млн. СККМ с Коллапаном на 42-е сутки. 1 – грануляционная ткань; 2 – остеоидная ткань; 3 – костные трабекулы. Окрашивание Ван-Гизон x 100



Рис. 4.39. Графическое изображение структуры регенерата кости после введения 1 млн. аутологичных СККМ с Коллапаном на 42-е сутки

Микроскопически на 42-е сутки после введения 1 млн. аутологичных СККМ с Коллапаном (рис. 4.40.) определялись отдельные зоны некроза и секвестры, отграниченные грануляционной тканью и инфильтрированные лейкоцитами. За грануляционной тканью, на сохранившихся участках компактной костной ткани, обнаруживались поля новообразованной кости. Местами отчетливо определялись фрагменты из компактной пластины частично с безостеоцитными зонами, поверхность которых была сращена мелкопетлистой сетью новообразованных костных балочек.

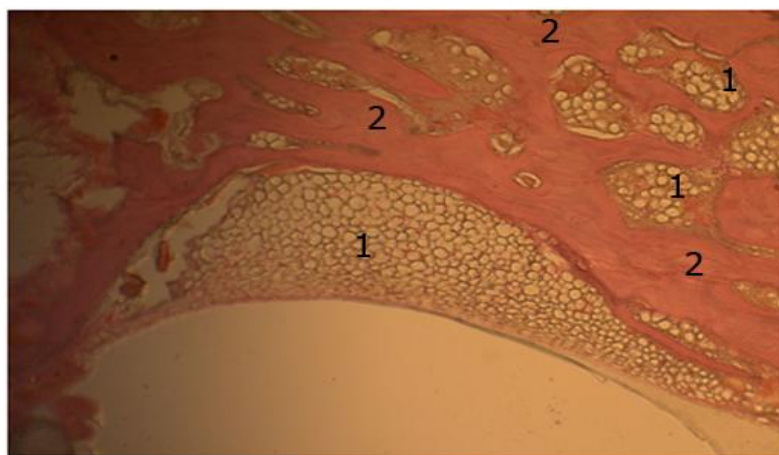


Рис. 4.40. Введение 1 млн. СККМ с Коллапаном на 42-е сутки. Формирование полей новообразованной костной ткани в зоне регенерата. 1 – остатки Коллапана; 2 – новообразованная костная ткань. Окрашивание Ван-Гизон x 100

На 42-е сутки после введения 1 млн. аутологичных СККМ с Коллапаном гистологические исследования свидетельствовали о замедлении восстановительного процесса, связанного с уменьшением объема пролиферирующей ткани и неравномерным распределением клеточных элементов в зоне регенерата, по сравнению с этим же сроком при введении дозы 500 тысяч СК.



Рис. 4.41. Гистотопограмма. Введение 1 млн. СК из костного мозга с Коллапаном на 90 сутки. 1 – остатки Коллапана; 2 – зона некроза; 3 – костные трабекулы. Окрашивание Ван-Гизон x 100

На 90-е сутки после введения 1 млн. аутологичных СККМ с Коллапаном (рис. 4.41.) на гистотопограммах, согласно морфометрическим данным, из общей площади регенерата 1% занимали некротические ткани, клеточно-волоконная ткань - 15%, остеοидная ткань - 33%, мелкопетлистая сеть костных трабекул - 35%, крупнопетлистая сеть костных трабекул - 16% (рис. 4.42.).

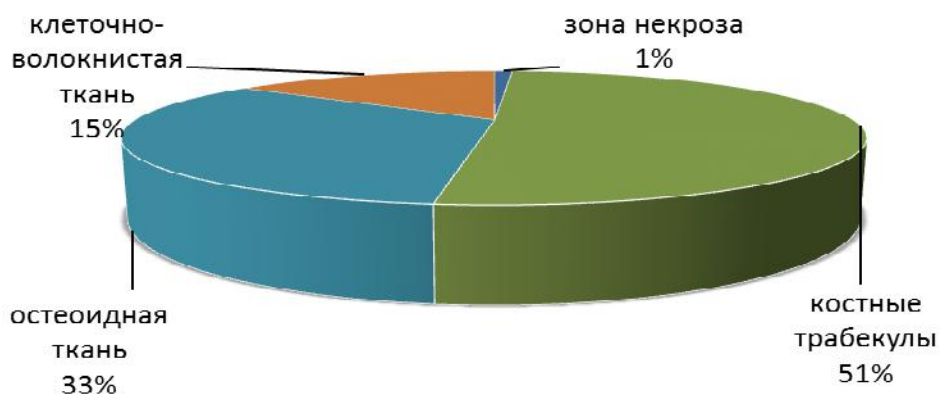


Рис. 4.42. Графическое изображение структуры регенерата кости после введения 1млн. аутологичных СККМ с Коллапаном на 90 сутки

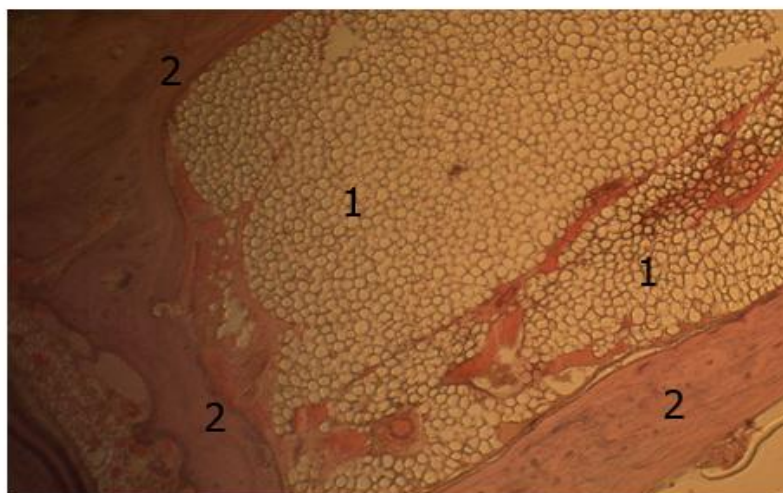


Рис. 4.43. Введение 1 млн. СК из костного мозга с Коллапаном на 90 сутки. Активная пролиферация клеточных элементов периостальной зоны и дифференцировка их в остеобласты. 1 – Коллапан; 2 – костная (мелко- и крупнопетлистая). Окрашивание Ван-Гизон x 100

Микроскопически после введения 1 млн. аутологичных СККМ с Коллапаном на 90 сутки (рис. 4.43.) отмечались незначительные деструктивные изменения и резорбция альвеолярного отростка.

На отдельных участках наблюдалась активная пролиферация камбиальных клеточных элементов периостальной зоны и дифференцировка их в остеобласты. В структуре регенерата определялись участки из мелкопетливой и крупнопетливой сети костных трабекул, а также хорошо васкуляризованная клеточно-волоконистая ткань, что свидетельствовало об интенсификации ангиогенеза.

Следовательно, на 90-е сутки СККМ в дозе 1 млн. в сочетании с Коллапаном оказывали существенное влияние на структурно-функциональные особенности клеточных элементов регенерата, их распределение и взаимоотношение с межклеточным веществом, что в свою очередь определяло формирование тканевых структур и темпы восстановительных процессов.

4.5. Сравнительная характеристика остеогенеза костных дефектов нижней челюсти кроликов после введения СКЖТ с Коллапаном в зону дырчатого дефекта в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллиона на 42 сутки

После введения 100 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном в зону дырчатого дефекта на 42 сутки: в структуре регенерата преобладала грануляционная ткань - 54%, а участки остеогенеза обнаруживались по периферии регенерата в толще грануляционной ткани, где сохранилось микроциркуляционное русло, в виде остеоидной ткани - 20% и мелкопетливой сети костных трабекул - 12%.

Местами прослеживалась выраженная лакунарная резорбция фрагментов кости, очагово и диффузно инфильтрированной лейкоцитами, участки некроза и гематомы занимали соответственно около 14%.

После введения 500 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 42-е сутки структура регенерата делилась на поверхностную и глубокую зоны.

Поверхностная зона состояла из клеточно-волокнутой ткани с хорошей васкуляризацией - 55% и остатками гематомы - 1%. В глубокой зоне остеогенез был представлен остеοидной тканью и костными трабекулами с множеством кровеносных сосудов в межтрабекулярных пространствах - 44%.

После введения 1 млн. аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 42-е сутки обнаруживали сформированную грануляционную ткань - 40% с узкими полями лейкоцитарной инфильтрации, а также небольшое количество клеточно-волокнутой ткани - 8%.

Костные фрагменты с большим количеством лакун резорбции сращены с новообразованными костными балочками, местами сформировавшими поля, состоящими на 10% из остеοидной и на 39% - из новообразованных костных трабекул. Зона некроза составила 3% (рис. 4.44.).

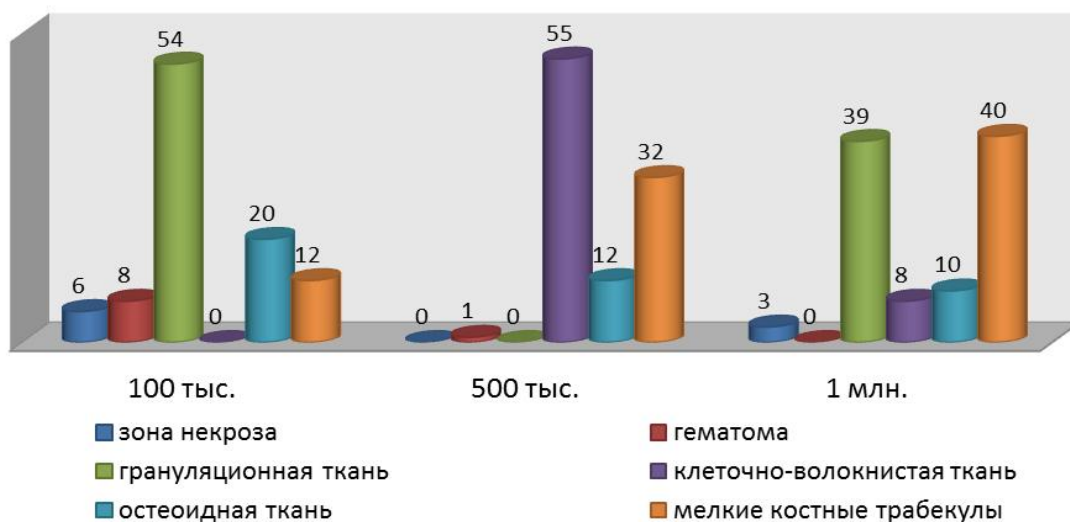


Рис. 4.44. Графическое изображение морфологических изменений структуры регенерата кости на 42 сутки (СКЖТ)

Таким образом, картина репаративного остеогенеза после введения СК из жировой ткани в сочетании с Коллапаном в зону дырчатого дефекта в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллион на 42 сутки, в целом, имеет сходные характеристики. Однако, при введении 500 тысяч СКЖТ, остеогенез происходит, как более целостный процесс, без зоны некроза. Новообразованные ткани имеют наиболее выраженные остеогенные потенции,

т.к. представлены остеогенной тканью, костными трабекулами и клеточно-волокнуистой тканью.

4.6. Сравнительная характеристика остеогенеза костных дефектов нижней челюсти кроликов после введения СККМ с Коллапаном в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллиона на 42 сутки

Стволовые клетки костного мозга в сочетании с Коллапаном вводили в зону дырчатого дефекта нижней челюсти экспериментальным кролям в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллиона.

После введения 100 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном в зону дырчатого дефекта на 42 сутки в структуре регенерата преобладали ткани с выраженными проявлениями остеогенных свойств: остеоидная ткань, мелкопетлистая сеть костных трабекул - 60% объема регенерата. Фрагменты компактной костной ткани в некоторых участках срастались с полями новообразованных костных балочек по поверхности разряжения фрагментов. Грануляционная ткань составила 35%.

Прослеживались узкие участки некроза, отделенные зонами грануляционной ткани, объемом около 5%, как следствие недостаточного формирования микроциркуляторного русла.

На 42-е сутки после введения 500 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном процессы перестройки в зоне дефекта нижней челюсти имели выраженный характер. Наблюдалось значительное увеличение клеточных элементов остеогенного характера за счет периостального костеобразования из общей площади перестраивающегося регенерата – около 90% (4% - остеоидная ткань, 36 % - мелкопетлистая костная ткань, 46% - крупнопетлистая костная ткань) 1% занимали участки некротически измененных тканей, клеточно-волокнуистая ткань – 13% общей площади регенерата.

После введения 1 млн. аутологичных СККМ с Коллапаном на 42-е сутки прослеживались поля новообразованной костной ткани, составившие 70% регенерата, представленные на 40% - крупнопетливой сетью костных трабекул, на 30 % - остеоидной тканью.

Особенностью, свидетельствующей о замедлении репаративного остеогенеза, связанного с неравномерным распределением клеточных элементов в зоне регенерата, явилось бесклеточное поле, заполненное гомогенными эозинофильными массами - 20% регенерата. Определялись отдельные зоны некроза и секвестры - 6%, отграниченные грануляционной тканью – 4% и инфильтрированные лейкоцитами (рис.4.45.).



Рис. 4.45. Характер морфологических изменений структуры регенерата кости на 42-е сутки (СККМ)

Таким образом, картина репаративного остеогенеза после введения СК из костного мозга на Коллапане в зону дырчатого дефекта в количестве 500 тысяч на 42-е сутки, имеет наиболее выраженный остеогенный потенциал.

Наиболее целесообразным для восстановления костных дефектов размерами 3x3 мм является введение аутологичных СККМ в количестве 500 тысяч в сочетании с Коллапаном, так как это создает наиболее благоприятные условия для более интенсивного развития остеогенеза, ускорения пролиферативных процессов и процессов дифференциации по сравнению с введением 100 тысяч и 1 млн. СККМ.

4.7. Сравнительная характеристика остеогенеза костных дефектов нижней челюсти кроликов после введения СКЖТ с Коллапаном в зону дырчатого дефекта в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллиона на 90-е сутки

Стволовые клетки из жировой ткани в сочетании с Коллапаном вводили в зону дырчатого дефекта нижней челюсти экспериментальным кролям в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллиона.

После введения 100 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном в зону дырчатого дефекта на 90 сутки в структуре регенерата остеогенные ткани составили 30%, а преобладала клеточно-волоконистая ткань, занимавшая 66% объема регенерата. Участки некроза и остатки гематомы занимали соответственно около 4%.

После введения 500 тысяч аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 90-е сутки структура регенерата состояла на 85% из сети остеоидной ткани, костных трабекул и кортикального слоя, занимающего 7%. Зона клеточно-волоконистой ткани составила всего 8%, т. е. в период с 42 по 90-е сутки имело место значительное качественное изменение темпов репаративного остеогенеза, которое привело к значительному увеличению объема новообразованных костных структур.

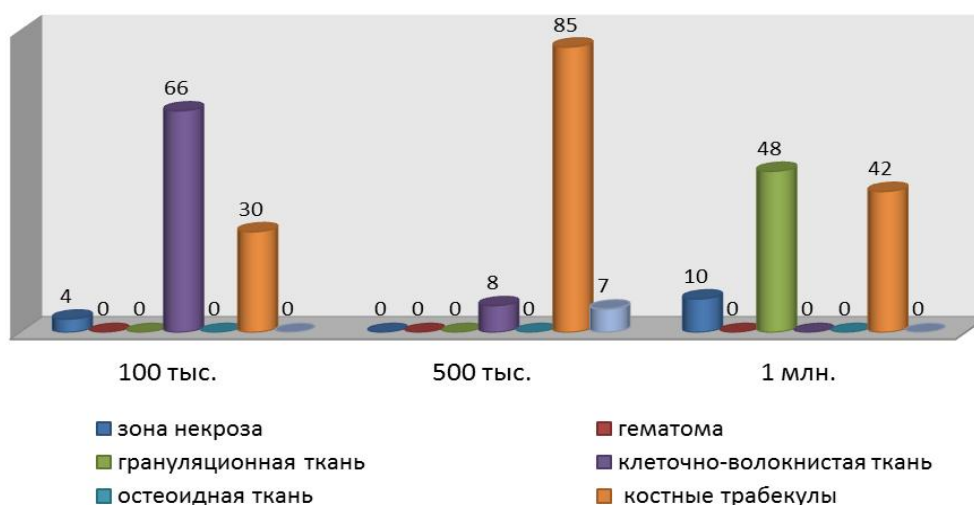


Рис. 4.46. Характер морфологических изменений структуры регенерата кости на 90-е сутки (СКЖТ).

После введения 1 млн. аутологичных СКЖТ с Коллапаном на 42-е сутки обнаруживали сформированную грануляционную ткань – 42% регенерата. Новообразованные костные балочки, поля остеοидной ткани составляли 48%. Зона некроза и секвестры, четко ограниченные грануляционной тканью составили 10% объема регенерата. На 90 сутки после введения 1 млн. СКЖТ продолжает сохраняться картина остеогенеза, характерная для 42 суток с незначительным усилением процесса костеобразования (рис. 4.46.).

Таким образом, после введения 500 тысяч СК из жировой ткани в сочетании с Коллапаном в зону дырчатого дефекта на 90 сутки процесс остеогенеза происходит, как более целостный, без зоны некроза.

4.8. Сравнительная характеристика остеогенеза костных дефектов нижней челюсти кроликов после введения СККМ с Коллапаном в зону дырчатого дефекта в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллиона на 90-е сутки

После введения 100 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном в зону дырчатого дефекта на 90-е сутки в структуре регенерата преобладали ткани с выраженными проявлениями остеогенных свойств: остеοидная ткань, мелкопетлистая сеть костных трабекул - 85% объёма регенерата. Объем грануляционной ткани уменьшился до 12%. Между этими полями определялись небольшие участки некроза с резорбирующимися секвестрами с образованием массивных внутрифрагментарных полостей, составившие 3% объема регенерата.

На 90-е сутки после введения 500 тысяч аутологичных СККМ с Коллапаном процесс остеогенеза в зоне дефекта имел выраженный характер. Согласно морфометрическим данным, образовалась целостная структура из новообразованной костной ткани, происходило восстановление целостности кости, но с наличием тех компонентов, которые будут подвергаться окончательной перестройке.

После введения 1 млн. аутологичных СККМ с Коллапаном на 90-е сутки прослеживались поля новообразованной костной ткани, составившие 84% регенерата, представленные на 51% мелко- и крупнопетливой сетью костных трабекул, на 33% - остеοидной тканью. Определялись отдельные зоны некроза

и секвестры - 1%, хорошо васкуляризованная клеточно-волоконная ткань занимала 15% общего объема регенерата (рис. 4.47.).

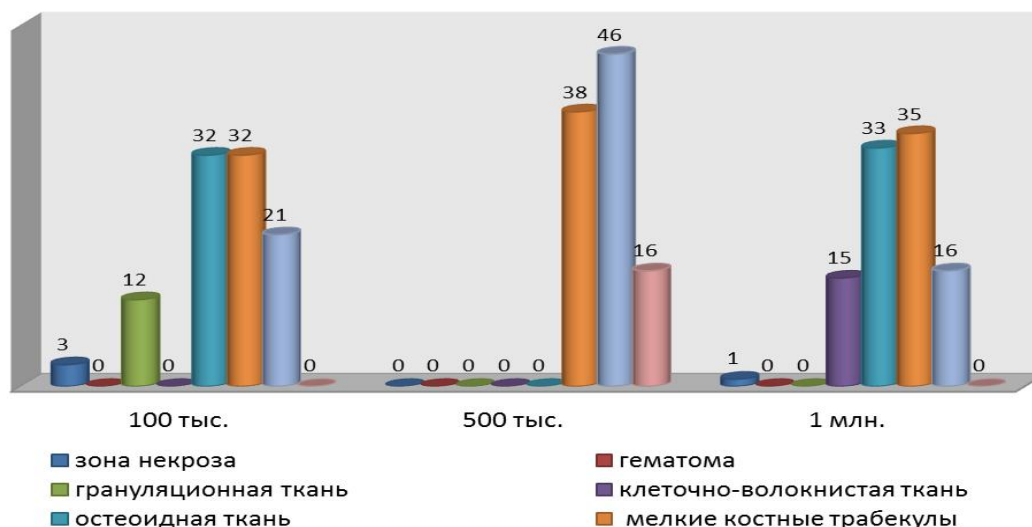


Рис. 4.47. Морфологические изменения структуры регенерата кости на 90-е сутки (СККМ)

Таким образом, картина репаративного остеогенеза после введения СККМ на Коллапане в зону дырчатого дефекта в количестве 500 тысяч на 90-е сутки, имеет выраженный остеогенный потенциал. Наиболее целесообразным для восстановления костных дефектов размерами 3x3 мм является введение аутологичных СККМ в количестве 500 тысяч в сочетании с Коллапаном, так как это создает наиболее благоприятные условия для более интенсивного развития остеогенеза, интенсификации пролиферативных процессов и процессов дифференциации по сравнению с введением 100 тысяч и 1 млн. СККМ.

4.9. Сравнительная характеристика репаративного остеогенеза дырчатого дефекта в зависимости от свойств стволовых клеток различного происхождения на 42-е сутки после введения СК с Коллапаном

На 42-е сутки после образования дырчатого дефекта нижней челюсти и введения в него по 100 тысяч СКЖТ и СККМ соответственно на Коллапане, у двух групп экспериментальных животных гистотопографически определялись различные варианты заживления дефекта. В группе с введением СКЖТ некротические ткани и гематомы были выражены в 3 раза интенсивнее, а также

объем грануляционной ткани превалировал в 1,5 раза, чем у животных группы с введением СКЖТ. При этом развитие новообразованных остеогенных тканей было в 2 раза меньше, чем в группе с введением СКЖТ (рис.4.48.).



Рис. 4.48. Сравнительная характеристика репаративного остеогенеза 42 сутки 100 тыс. СКЖТ – СКЖТ

Таким образом, развитие репаративного остеогенеза имело место в обеих группах, однако введение СКЖТ в количестве 100 тысяч в зону дырчатого дефекта стимулировало остеогенез значительно интенсивнее, чем введение такого же количества СКЖТ.



Рис. 4.49. Сравнительная характеристика репаративного остеогенеза 42-е сутки 500 тыс. СКЖТ – СКЖТ

На 42-е сутки после введения по 500 тысяч СКЖТ и СККМ на Коллапане у двух групп экспериментальных животных гистотопографически определяется более выраженный потенциал заживления дефекта (рис. 4.49.).

Некротические ткани и остатки гематомы в обеих группах были выражены одинаково, объем клеточно-волокнутой ткани в группе с введением СКЖТ превалировал в 4 раза, по сравнению с животными группы с введением СККМ. Развитие новообразованных остеогенных тканей было в 2 раза меньше, чем в группе с введением СККМ.

Таким образом, развитие репаративного остеогенеза в группах с введением 500 тысяч СК имело те же тенденции, что и при введении 100 тысяч СК в зону дырчатого дефекта, однако стимуляция репаративного остеогенеза в этих группах происходила значительно интенсивнее.

На 42-е сутки после образования дырчатого дефекта нижней челюсти и введения в него по 1 млн. СКЖТ и СККМ на Коллапане у двух групп экспериментальных животных, гистотопографически имели характеристики, сходные с введением 100 тысяч СК. В группе с введением СКЖТ некротические ткани и гематомы были чуть менее выражены, чем в группе с введением СККМ, объем грануляционной ткани в группе с введением СКЖТ превалировал в 10 раз, в сравнении с животными группы с введением СККМ (рис.4.50.).

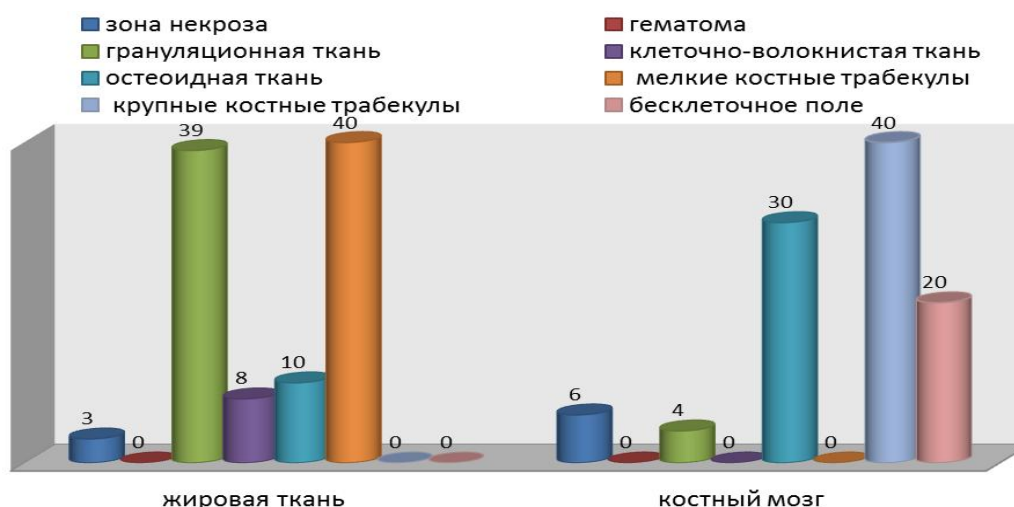


Рис. 4.50. Сравнительная характеристика репаративного остеогенеза 42 сутки 1 млн. СКЖТ – СККМ

Образование остеогенных тканей было на 14% меньше, чем в группе с введением СККМ. Однако, в отличие от групп сравнения, в регенерате группы с введением СККМ определялась бесклеточная зона, которая, безусловно, замедляла процесс заживления.

Таким образом, развитие репаративного остеогенеза имело место в обеих группах, однако введение СККМ в количестве 1 млн. в зону дырчатого дефекта стимулировало остеогенез значительно интенсивнее, чем введение такого же количества СКЖТ. Но регенерация костной ткани при введении 1 млн. СК происходила менее физиологично, чем при введении 500 тысяч СК.

4.10. Сравнительная характеристика репаративного остеогенеза дырчатого дефекта в зависимости от свойств стволовых клеток различного происхождения и их количества на 90-е сутки

Нами проведен анализ репаративного остеогенеза экспериментального дырчатого дефекта угла челюсти кролика, в зависимости от свойств стволовых клеток, их количества и происхождения.

На 90-е сутки после образования дырчатого дефекта нижней челюсти и введения в него по 100 тысяч СКЖТ и СККМ соответственно на Коллапане у двух групп экспериментальных животных гистотопографическая картина заживления дефекта также была различной.

В обеих группах некротические ткани и гематомы были обнаружены в приблизительно равных количествах - от 3 до 4%. Тканей, обладающих остеогенными свойствами в группе с введением СККМ, было обнаружено вдвое больше, чем в группе сравнения. Однако грануляционная ткань в группе с введением СКЖТ к 90-м суткам была замещена клеточно-волокнистой тканью, которая также имела остеогенные свойства (рис.4.51.).

Таким образом, развитие репаративного остеогенеза происходило в обеих группах, однако темпы его в группах сравнения значительно отличались.



Рис. 4.51. Сравнительная характеристика репаративного остеогенеза 90-е сутки 100 тыс. СКЖТ – СККМ

На 90-е сутки введения по 500 тысяч СКЖТ и СККМ на Коллапане у двух групп кроликов гистотопографически определяется выраженный потенциал заживления дефекта. Объем клеточно-волоконистой ткани в группе с введением СКЖТ составил 8%, количество новообразованных тканей составило 82% объема регенерата. После введения 500 тысяч аутологичных СККМ обнаруживалась целостная структура из новообразованной костной ткани (крупнопетлистая - 46%, мелкопетлистая - 38%, кортикальный слой - 16%) (рис. 4.52.).



Рис 4.52. Сравнительная характеристика репаративного остеогенеза 90-е сутки 500 тыс. СКЖТ – СККМ

Таким образом, введение 500 тысяч СКЖТ в зону дырчатого дефекта создавало условия для наиболее интенсивного остеогенеза, однако процессы

костеобразования в группе с введением 500 тысяч СККМ происходили значительно интенсивнее.

На 90-е сутки после введения 1 млн. СКЖТ и СККМ на Коллапане у двух групп экспериментальных животных гистотопографически имелись характеристики, сходные с введением 100 тысяч СК. В группе с введением СКЖТ некротические ткани и гематомы были гораздо более выражены, чем в группе с введением СККМ, и составляли 10%, количество грануляционной ткани в группе с введением СКЖТ занимало практически половину объема регенерата.

При этом образование остеогенных тканей было в 2 раза меньше, чем в группе с введением СККМ и составляло 42%. В регенерате группы с введением СККМ определялось небольшое количество клеточно-волоконистой ткани - 12% (рис. 4.53.).



Рис. 4.53. Графическое изображение сравнительной характеристики репаративного остеогенеза на 90-е сутки после введения 1 млн. СКЖТ и СККМ

Таким образом, введение СККМ в количестве 1 млн. в зону дырчатого дефекта стимулировало остеогенез значительно интенсивнее, чем введение такого же количества СКЖТ. Однако регенерация костной ткани в обеих группах при введении 1 млн. СК претерпевало некоторое замедление по сравнению с введением 500 тысяч СК.

Подводя итог наших исследований, следует отметить, что во всех опытных группах при введении СК, полученных как из жировой ткани, так и из

костного мозга, на носителе Коллапан, отмечается стимуляция остеогенеза. Однако, согласно морфометрическим данным структуры регенерата выявлено, что на 42-е сутки образование остеогенных тканей было на 14% больше в группах с введением СККМ.

На 90-е сутки образование остеогенных тканей в группах животных, которым вводили СККМ, было в 3 раза больше, чем в группах с введением СКЖТ.

Если сравнить структуру регенерата ткани в зависимости от количества клеток, стимуляция остеогенеза была более оптимальной, физиологичной, при введении 500000 СККМ для дефекта объемом $0,027\text{см}^3$. Эта доза создает наиболее благоприятные условия для более интенсивного развития остеогенеза, ускорения пролиферативных процессов и процессов дифференциации.

Результаты данного исследования опубликованы в статьях:

Направленная регенерация костных дефектов альвеолярного отростка с использованием стволовых клеток жировой ткани на коллапановой подложке у экспериментальных животных / В. Ф. Куцевляк, В. І. Куцевляк, О. А. Омельченко, І. В. Циганова, А. С. Забірник // Інновації в стоматології. - Одеса, 2013. - № 3. – С. 21-25.

Изучение динамики регенерации костных дефектов альвеолярного отростка с использованием аутологичных стволовых клеток костного мозга на коллапановой матрице у экспериментальных животных / В. Ф. Куцевляк, В. І. Куцевляк, О. А. Омельченко, І. В. Циганова, А. С. Збірник // Проблеми безперервної освіти. - Харків, 2015. – № 2 (18). - С. 47-51.

Особенности заживления дырчатых дефектов угла челюсти кролика при введении 100 тыс. аутологичных СК костного мозга и жировой ткани / В. Ф. Куцевляк, В. І. Куцевляк, І. В. Циганова // Інновації в стоматології - Одеса, 2015. - № 3. – С. 18-22.

Направленная регенерация костных дефектов альвеолярного отростка с использованием стволовых клеток / В. Ф. Куцевляк, В. І. Куцевляк, О. А. Омельченко, І. В. Циганова, А. С. Забірник // Стоматологический журнал (Білорусь). – Мінськ, 2015. - № 2. – С. 120-123.

РАЗДЕЛ 5
РЕЗУЛЬТАТЫ ХИРУРГИЧЕСКОГО ЛЕЧЕНИЯ БОЛЬНЫХ
ГЕНЕРАЛИЗОВАННЫМ ПАРОДОНТИТОМ

II – III СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ

Под нашим наблюдением находилось 20 больных генерализованным пародонтитом II и III степени, распределенных в две группы, которым было проведено комплексное лечение, состоявшее в профессиональной гигиене и санации полости рта, долговременном шинировании подвижных зубов, устранении травматической окклюзии, фармакотерапии, состоявшей из приема антимикробных, остеотропных, десенсибилизирующих препаратов, витаминных комплексов.

На хирургическом этапе комплексного лечения больным контрольной группы проводили лоскутные операции с направленной регенерацией костной ткани с введением коллапана и 2 млн. аутогенных стволовых клеток и резорбируемой мембраной. Больным контрольной группы были проведены аналогичные операции без применения стволовых клеток.

При первичном обследовании средние показатели индексной оценки состояния пародонта у больных обеих групп были равнозначными.

Таблица 5.1.

Индексная оценка состояния пародонта больных опытной и контрольной группы при первичном обследовании ($M \pm m$)

Показатели	I группа	II группа
Проба Шиллера – Писарева	5,15±0,05 $p_1 > 0,05$	5,15±0,05
ГИ по Федорову – Володкиной	3,0 ± 0,5 $p_1 > 0,05$	3,0 ± 0,5
Индекс кровоточивости по Muhlermann (РВІ)	3,0 ± 0,05 $p_1 > 0,05$	3,0 ± 0,05
Костный индекс Фукса	0,48±0,05 $p_1 > 0,05$	0,48±0,05
Подвижность по шкале Мюллера	1-2 $p_1 > 0,05$	1-2

Примечание. p - достоверность рассчитана по отношению к показателям первичного обследования, p_1 - по отношению к группе сравнения.

При контрольном осмотре больных обеих групп через 6 месяцев после окончания хирургического лечения в индексной оценке состояния тканей пародонта у больных основной и контрольной группы наметились незначительные различия.

В отличие от больных основной группы, пациенты контрольной группы через 6 месяцев после окончания хирургического этапа комплексного лечения отмечали отдельные случаи кровоточивости при чистке зубов и при приеме жесткой пищи. У них появился мягкий налет на зубах, незначительное количество наддесневого камня во фронтальном участке нижней челюсти.

Пациенты основной группы жалоб не предъявляли.

Таблица 5.2.

Индексная оценка состояния пародонта через 6 месяцев после окончания хирургического этапа лечения

Показатели	I группа	II группа
Проба Шиллера – Писарева	1,3±0,1 $p < 0,05$ $p_1 < 0,05$	1,8±0,05 $p < 0,05$
ГИ по Федорову – Володкиной	1,1±0,1 $p < 0,05$ $p_1 > 0,05$	1,3±0,03 $p < 0,05$
Индекс кровоточивости по Muhlermann (РВІ)	0	1,0±0,02 $p < 0,05$
Костный индекс Фукса	0,73±0,5 $p < 0,05$ $p_1 > 0,05$	0,70±0,5 $p < 0,05$
Подвижность по шкале Мюллера	0	0

Примечание. p - достоверность рассчитана по отношению к показателям первичного обследования, p_1 - по отношению к группе сравнения.

Данные исследования пародонтального статуса с помощью аппаратно-диагностического комплекса «Florida Proub» показали аналогичные незначительные расхождения в показателях.

Через 12 месяцев результаты объективного исследования имели больше отличий. Больные контрольной группы предъявляли жалобы на наличие признаков воспаления в пародонте. Отдельные десневые сосочки в наиболее тяжелых участках приобрели синюшный оттенок, были слегка пастозны, кровоточили при зондировании.

У больных опытной группы жалоб практически не было.

Показатели исследования пародонтального статуса по системе «Florida Proub» показали расхождения в показателях, аналогичные табличным.

Рентгенологически у больных опытной группы определялось увеличение высоты межальвеолярных перегородок на 1-1,5мм, по сравнению с дооперационными ортопантомограммами. Отмечалось усиление плотности рисунка губчатой кости межзубных перегородок, увеличение его рентген-контрастности.

У больных контрольной группы было отмечено усиление контрастности костного рисунка на ортопантомограммах, по сравнению с исходными, однако количественные изменения значительно уступали показателям опытной группы.

Таблица 5.3.

Индексная оценка состояния пародонта через 12 месяцев после окончания хирургического этапа лечения

Показатели	I группа	II группа
Проба Шиллера – Писарева	1,3 ± 0,1 p<0,05 p ₁ > 0,05	2,0 ± 0,5 p<0,05
ГИ по Федорову – Володкиной	1,1 ± 0,1 p<0,05 p ₁ > 0,05	1,3 ± 0,5 p<0,05
Индекс кровоточивости по Muhlermann (РВІ)	0	2,0 ± 0,3 p<0,05
Костный индекс Фукса	0,74±0,5 p<0,05 p ₁ < 0,05	0,64±0,3 p<0,05
Подвижность по шкале Мюллера	0	0

Примечание. p - достоверность рассчитана по отношению к показателям первичного обследования, p_1 - по отношению к группе сравнения.

В качестве иллюстрации приводим выписку из истории болезни больной В. 1971 года рождения, вошедшей в основную группу.

17.11.2012 г. больная В. обратилась на кафедру стоматологии и терапевтической стоматологии ХМАПО с жалобами на подвижность зубов, кровоточивость десен при чистке и при приеме жесткой пищи, неприятный запах изо рта. Перечисленные жалобы впервые появились около восьми лет назад после рождения первого ребенка. Проводимое ранее лечение стойкого положительного результата не дало. Из перенесенных и сопутствующих заболеваний отмечает детские инфекции, при обследовании патологии со стороны внутренних органов не выявлено. Вредные привычки и профессиональные вредности отсутствуют, аллергические реакции на лекарственные препараты отрицает.

Развитие настоящего заболевания происходило следующим образом: около восьми лет назад появилась кровоточивость десен при чистке зубов, затем небольшая подвижность резцов нижней челюсти, оголились шейки передней группы зубов обеих челюстей, стала наблюдаться подвижность боковой группы зубов нижней челюсти слева, затем подвижность центральных резцов верхней челюсти

Данные осмотра полости рта: лицо симметрично, открывание рта в полном объеме, преддверие полости рта среднее, прикус глубокий, слизистая оболочка десны отечна, гиперемирована, зубодесневые сосочки синюшные, бочкообразной конфигурации, обильные над - и поддесневые зубные отложения во фронтальном отделе.

На верхней челюсти 2 мостовидных протеза с опорой на 15, 12, 21 и 32, 24, 26. На нижней челюсти - консольный протез с опорой на 37 зуб.

Пародонтальные карманы в области 17 - 5мм; в области 16, 15 - 6мм; в области 14, 12 - 5мм; в области 21 - 4мм; в области 22, 23 - 5мм; в области 24,

26, 27, 28 - 4мм; в области 38 - 4мм; в области 37 - 6мм; 35, 34, 33 - 4мм; 45, 46, 47, 48 – 5мм.

Проба Шиллера - Писарева 5,1 в области верхней и нижней челюсти. Гигиенический индекс по Федорову – Володкиной - 3,5. Костный индекс Фукса – 4,7. Подвижность зубов по шкале Мюллера 1-2 степени. Индекс кровоточивости по Muhlermann -2,3 (PBI).

На ортопантомограмме от 17.11.12 (рис. 5.1.) деструкция костной ткани по смешанному типу с преобладанием вертикального типа резорбции. Снижение высоты межальвеолярных перегородок в области 17, 16, 15 более $\frac{1}{2}$ длины корня, 14, 12, 21 на $\frac{1}{3}$ длины корня, 22, 23, 24 на $\frac{1}{2}$ длины корня, 26 более $\frac{1}{2}$ длины корня, 27, 28 на $\frac{1}{2}$ длины корня, 48, 47, 46, 45 более $\frac{1}{2}$ длины корня, 44, 43, 42, 41, 31, 32, 33, 34, 35 – $\frac{1}{3}$ длины корня, в области 37, 38 на $\frac{1}{2}$ длины корня.

В теле челюсти очаги остеопороза превалируют, перемежаются с очагами остеосклероза. Структура ткани крупно - и среднеплетистая.

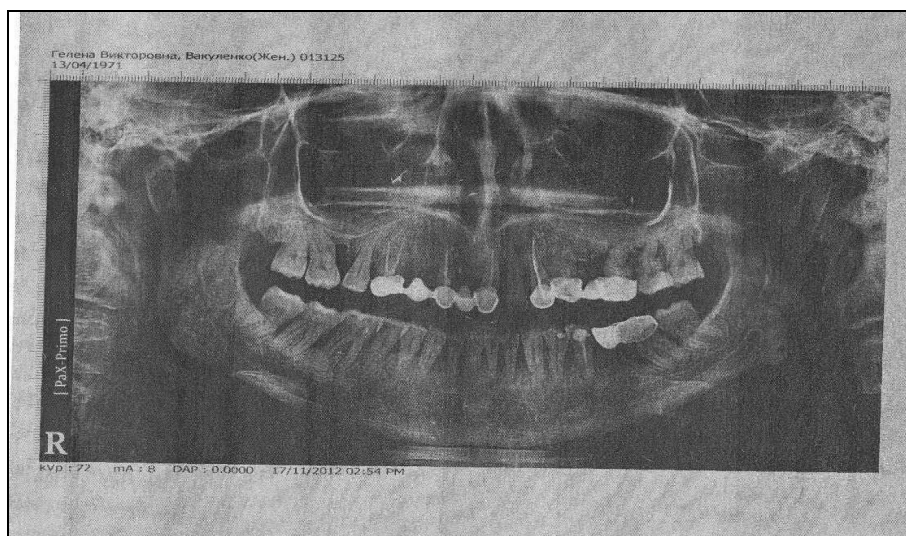


Рис. 5.1. Ортопантомограмма больной В. до хирургического вмешательства

На основании данных клинических и лабораторных исследований нами поставлен диагноз: пародонтит генерализованный, III степени тяжести, стадия обострения.

Лабораторные показатели (клинический анализ крови, общий анализ мочи, содержание глюкозы в крови, заключение терапевта) отклонений от нормы не выявили.

Содержание глюкозы в крови: 4,6 ммоль/л.

Клинический анализ крови:

Гемоглобин 140,2; Эритроциты 4,53; Цветовой показатель 0,98;

Тромбоциты 233,0; Скорость оседания эритроцитов 11;

Палочкоядерные 5; Сегментоядерные 52; Эозинофилы 3;

Лимфоциты 30; Моноциты 3.

Анализ мочи общий:

Цвет желтый; Прозрачность прозрачная; Удельный вес 1,013;

Реакция(pH) 5,5; Белок не обнаружен; Глюкоза не обнаружена;

Кетоновые тела не обнаружены; Лейкоциты 2-3 в поле зрения;

Эпителий плоский местами; Слизь немного.

Заключение терапевта: Практически здорова.

План консервативного лечения состоял из профессиональной гигиены, санации полости рта, медикаментозной обработки пародонтальных карманов, долговременного шинирования подвижных зубов, фармакотерапии.

С 23.11.2012. по 10.12 2012 больная прошла консервативное лечение, состоявшее в проведении профессиональной гигиены полости рта при помощи пародонтологического ультразвукового аппарата, обработки всех поверхностей зубов циркулярной щеткой и полировочной суспензией «Depural-Neo»; медикаментозной обработки пародонтальных карманов раствором хлоргексидина 0,05%; инстилляций мирамистина в пародонтальные карманы. Пациентка обучена гигиене полости рта, ей рекомендованы индивидуальная зубная щетка и лечебная зубная паста. Назначено общее лечение по схеме:

метронидазол - по 0,25 г 4 р. в день 5 суток,

кальцит - 0,5мг. 2раза в день 30 суток;

супрадин - 1таб 1 раз в день 30 суток;

стоматофит - полоскание 10 мин. 3 раза в день;

фитолизин - аппликации 20 мин. 2 раза в день.

Произведено долговременное шинирование 31, 32, 33, 34, 35 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 31, 32, 33, 34, 35 с использованием адгезивной системы «Полиглас» и микрогибридного фотополимера «Natural Look».

После проведенного лечения жалоб нет. Слизистая оболочка десен бледно-розового цвета, без признаков воспаления. Выполняет рекомендации, медикаментозное лечение. Проба Шиллера - Писарева 1,1 в области верхней и нижней челюсти. Гигиенический индекс по Федорову – Володкиной - 1,1. Костный индекс Фукса – 4,7.

Пациентка В. направлена на консультацию к челюстно-лицевому хирургу стоматологической клиники «Фортуна» для проведения хирургического этапа лечения.

13.12.12. Больная В. направлена на клиническое обследование. Получены следующие результаты:

Эхокардиография: Заключение.

Аномально расположенные хорды левого желудочка. Физиологический пролапс передней створки левого желудочка. Физиологическая регургитация на ТК. Незначительное расширение правого желудочка.

ЭКГ: Заключение

Признаки расширения левого желудочка.

Содержание глюкозы в крови: 4,8 ммоль/л.

Клинический анализ крови:

Гемоглобин 142,6; Эритроциты 4,45; Цветовой показатель 0,96

Тромбоциты 231,1; Скорость оседания эритроцитов 10;

Палочкоядерные 5; Сегментоядерные 55; Эозинофилы 2;

Лимфоциты 32; Моноциты 4

Анализ мочи общий:

Цвет желтый; Прозрачность умеренная; Удельный вес 1,013;

Реакция(pH) 5,5; Белок не обнаружен; Глюкоза не обнаружена;

Кетоновые тела не обнаружены; Лейкоциты 2 -3 в поле зрения;

Эпителий плоский местами; Переходный местами; Слизь немного

Заключение терапевта:

Противопоказаний к оперативному вмешательству у стоматолога нет.

Хирургическое лечение.

Пациентка направлена в Центр ожогов, реконструктивной и пластической хирургии на базе Харьковской городской клинической больницы № 4 скорой неотложной помощи им. О.И. Мещанинова для выделения и культивации аутологичных клеток костного мозга.

У больной В. из подвздошной кости взят костный мозг, выделены стволовые клетки, культивированы до необходимого количества.

28.03.13. Больная В. явилась с целью подготовки к хирургическому этапу лечения. Проведена профессиональная гигиена полости рта и медикаментозная обработка пародонтальных карманов. Даны рекомендации по гигиене полости рта.

15.04.13. Челюстно-лицевым хирургом проведена лоскутная операция с направленной регенерацией костной ткани с введением 2 млн. аутогенных стволовых клеток на «Коллапане Л» под резорбируемую мембрану в области 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 зубов.

Под наркозом и местной анестезией раствором Септанеста 1:1000000 произвели сосочковый разрез нижней челюсти слева от 41 до 48. Отслоили лоскут вниз до 1 - 1,5 см, шейки и корни зубов обработаны алмазным бором, удалены грануляции, произведена кортикотомия между корнями. Коллапан смешали с 2 млн. аутологичных стволовых клеток, уложили в дефекты и на альвеолярный отросток. Резорбируемую мембрану пришили, фигурно вырезали и уложили на Коллапан. Рану без натяжения ушили наглухо.

25.04.13. Жалоб нет. В данный момент состояние удовлетворительное. Сняты швы. Даны рекомендации.

20.06.13. Больная В. явилась с целью продолжения хирургического лечения. Жалоб нет. Состояние удовлетворительное. Слизистая оболочка десен в области 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48 бледно розового цвета, эластичная,

плотно прилегает к шейкам зубов. На остальных участках слизистая десен более рыхлая, определяются пародонтальные карманы. Пародонтальные карманы в области 17 - 5мм; в области 16, 15 - 6мм, в области 14, 12 - 5мм, в области 21 - 4мм; в области 22,23 - 5мм, в области 24, 26, 27, 28 - 4мм, в области 38 - 4мм; в области 37 - 6мм; 35, 34, 33 - 4мм. Проба Шиллера-Писарева 2,1 в области 31-36 зубов. Состояние зубочелюстной системы подтверждено исследованием пародонтального статуса по системе «Florida Proub» (рис.5.2.).

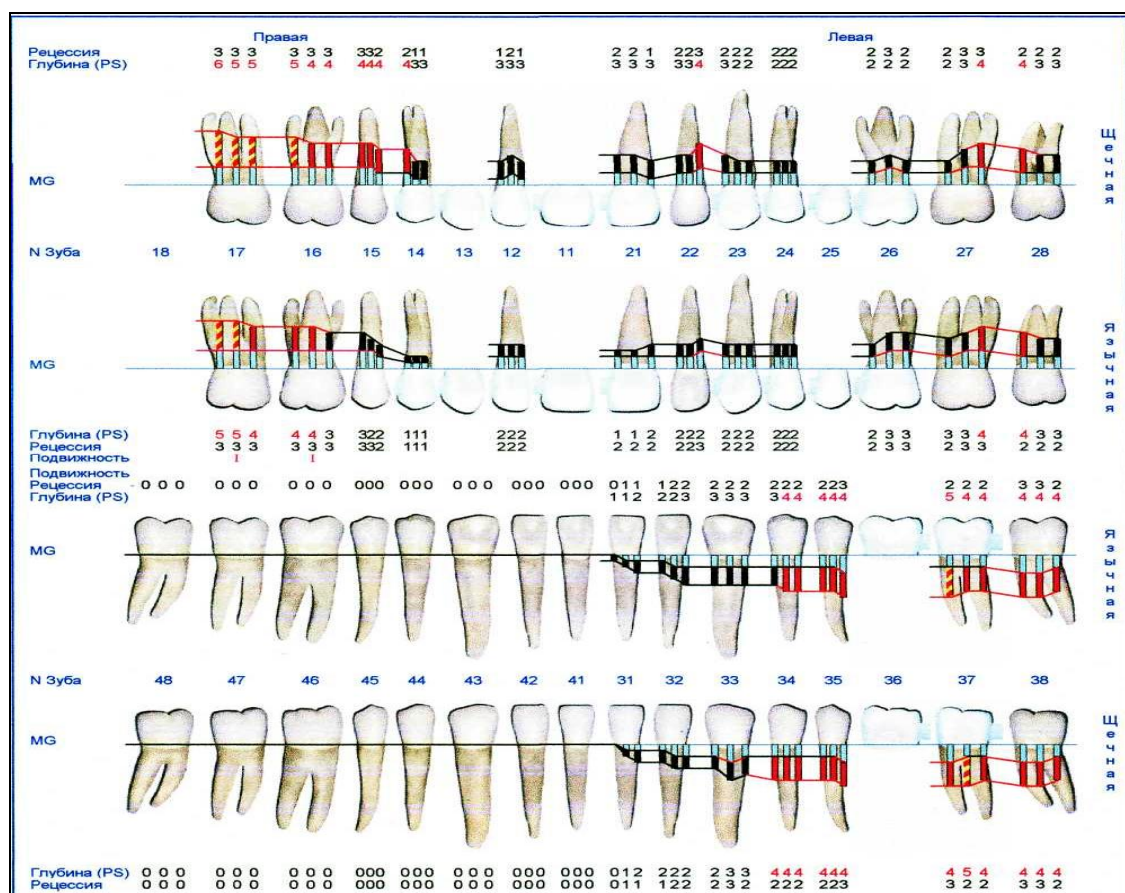


Рис. 5.2. Исследование пародонтального статуса больной В. по системе «Florida Proub» от 20.06.13 г.

27.06.13. Челюстно-лицевым хирургом проведена лоскутная операция с введением 2 млн. аутологичных стволовых клеток на «Коллапане Л» с подрезорбируемую мембрану в области 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38.

После местной анестезии Sol. Septanest 1:1000000 произвели сосочковый разрез нижней челюсти слева от 31 до 38. После отслоения лоскута шейки и корни зубов обработали алмазным бором, произвели кортикотомию между

корнями. Коллапан смешали с 2 млн. аутологичных стволовых клеток, уложили в дефекты и на альвеолярный отросток. Резорбируемую мембрану пришили, фигурно вырезали и уложили на Коллапан. Рану без натяжения ушили наглухо.

05.07.13. Жалоб нет. Состояние удовлетворительное. Сняты швы. Даны рекомендации по уходу за полостью рта.

28.10.13. Пациентка В. явилась на плановый осмотр с целью продолжения хирургического лечения. Слизистая оболочка десен нижней челюсти бледно-розового цвета, эластичная, влажная, плотно прилегает к шейкам зубов. Пародонтальные карманы в области 17 - 5мм; в области 16, 15 - 6мм, в области 14, 12 - 5мм, в области 21 - 4мм; в области 22, - 5мм, в области 24, 26, 27, 28 - 4мм, что подтверждается исследованием пародонтального статуса по системе «Florida Proub» (рис.5.3.). Проведена профессиональная чистка зубов. Даны рекомендации.

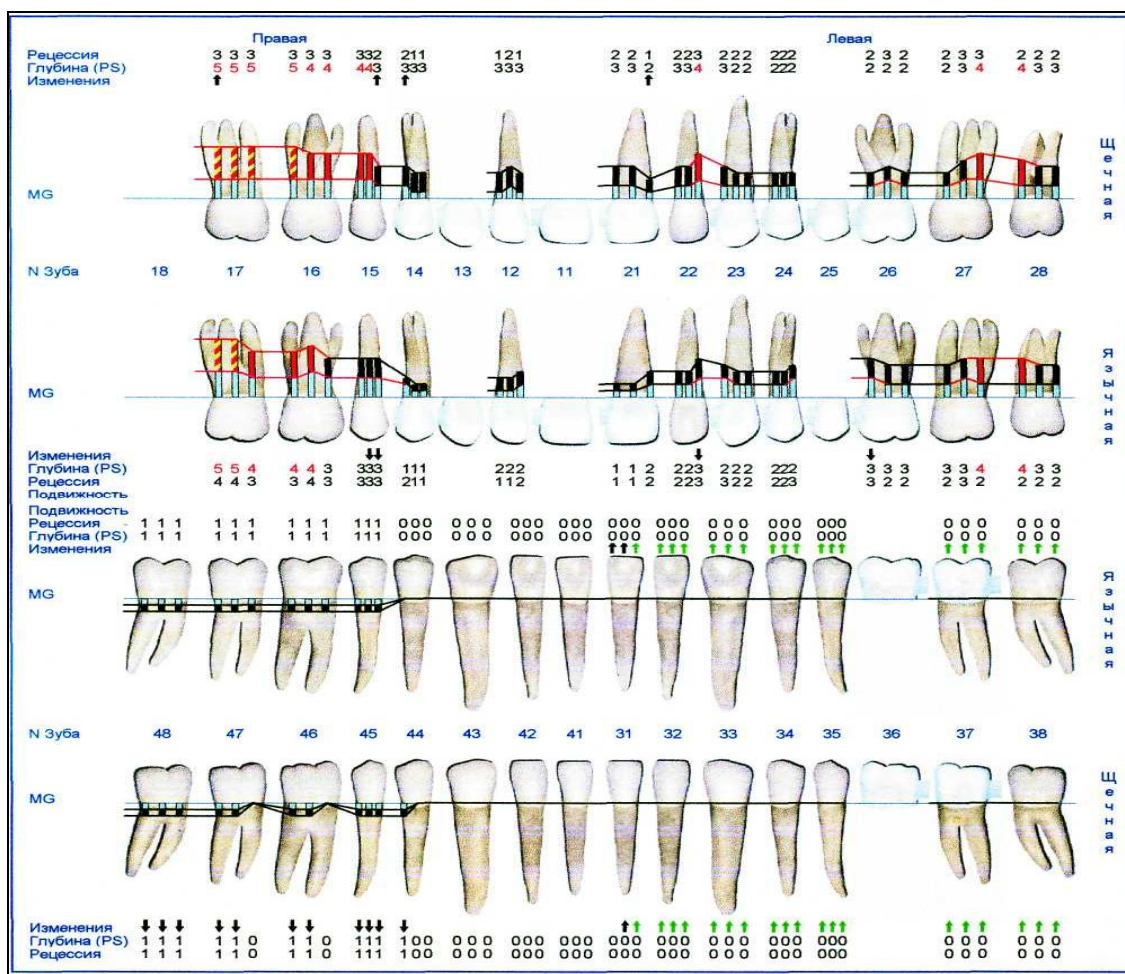


Рис. 5.3. Исследование пародонтального статуса больной В. по системе «Florida Proub» от 28.10.13 г.

На ортопантомограмме (рис. 5.4.) больной В. через 4 месяца после вмешательства в обл. 31-37 зубов (через 7 мес. после операции), высота межальвеолярных перегородок достигает $\frac{1}{2}$ длины корня. Костная ткань альвеолярного отростка в областях лоскутных операций четко выражена, рентгенконтрастна.



Рис. 5.4. Ортопантомограмма больной В. через 4 месяца после вмешательства в обл. 31-37 зубов (через 7 мес. после операции)

04.11.13. Челюстно-лицевым хирургом проведена лоскутная операция с введением 2 млн. аутологичных стволовых клеток на «Коллапане Л» с под резорбируемую мембрану в области 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17.

Под наркозом и местной анестезии раствора Септанеста 1:1000000 сделан сосочковый разрез верхней челюсти слева от 11 до 17. Отслоен лоскут, корни и шейки зубов и костные карманы обработаны алмазным бором, сглажены костные выступы, удалены грануляции, произведена кортикотомия между корнями. Коллапан смешан с 2 млн. аутологичных стволовых клеток и уложен в дефекты. Резорбируемая мембрана пришита и уложена на коллапан. Рана без натяжения ушита наглухо.

13.11.13. Жалоб нет. Состояние удовлетворительное. Сняты швы. Даны рекомендации по уходу за полостью рта.

03.11.14. Больная В. явилась с целью подготовки к хирургическому этапу лечения. Жалоб нет. В области 11,12,13,14,15,16,17, а также фронтальных и жевательных зубов нижней челюсти слизистая оболочка десен плотная, эластичная, бледно-розового цвета, без признаков воспаления. Пародонтальные карманы в области в области 22,23 - 5мм, в области 24,26,27,28 - 4мм, что подтверждается проведенным исследованием пародонтального статуса по системе «Florida Proub» (рис 5.5.). Проведена профессиональная гигиена полости рта и медикаментозная обработка пародонтальных карманов.

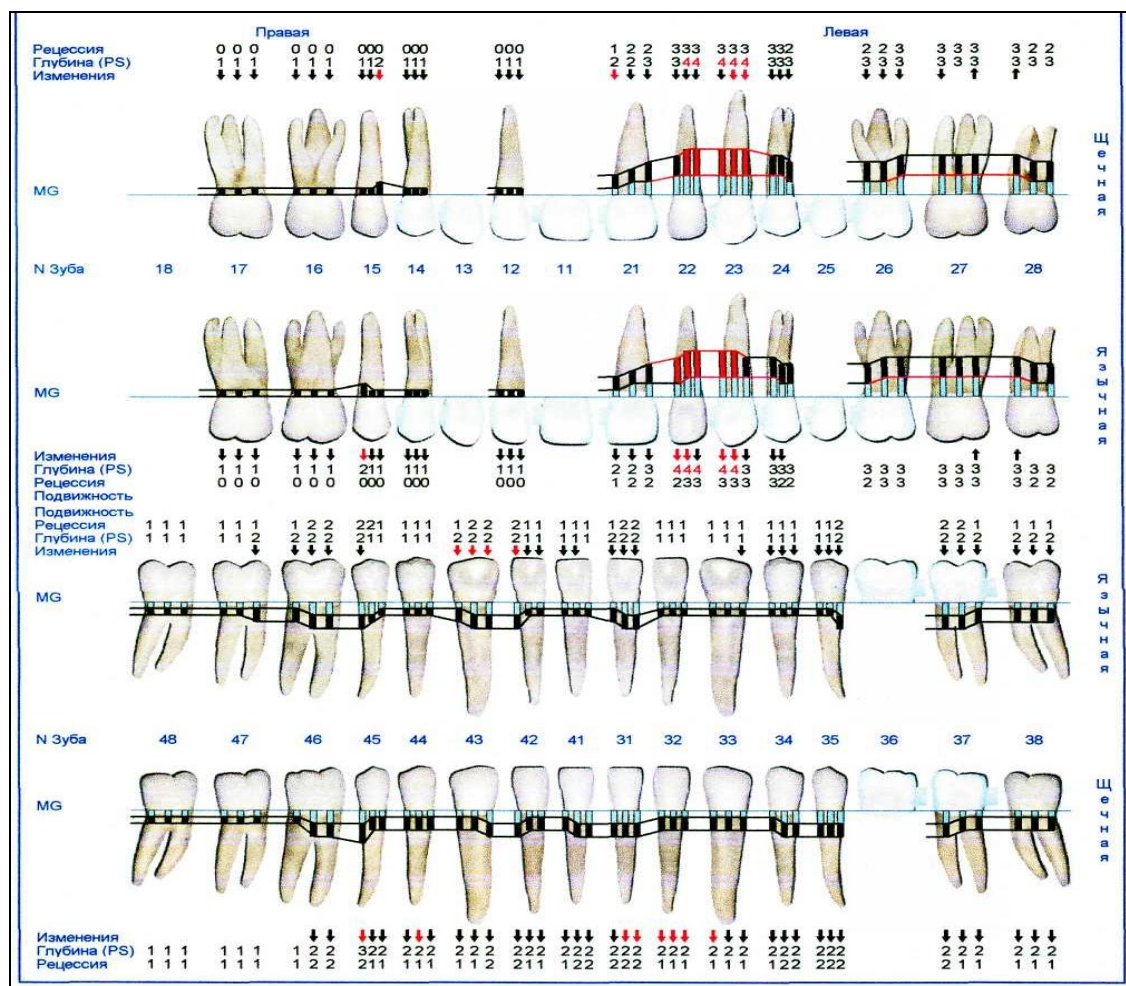


Рис. 5.5. Исследование пародонтального статуса больной В. по системе «Florida Proub» от 03.11.14 г.

20.11.14. Челюстно-лицевым хирургом проведена лоскутная операция с введением 2 млн. аутологичных стволовых клеток на «Коллапане Л» под резорбируемую мембрану в области 21,22,23,24,25,26,27,28.

Под местной анестезией раствора Септанеста 1:1000000 сделан сосочковый разрез нижней челюсти справа, от 21 до 28. Отслоен лоскут вверх до 1 – 1,5 см. Шейки и корни зубов обработаны алмазным бором, удалены грануляции, произведена кортикотомия между корнями. Смесь Коллапана и 2 млн. аутологичных стволовых клеток уложена в дефекты и на альвеолярный отросток. Резорбируемая мембрана пришта и фигурно вырезана и уложена на коллапан. Рана ушита наглухо.

28.11.14. Жалоб нет. Состояние удовлетворительное. Сняты швы. Даны рекомендации по уходу за полостью рта.

06.04.15. Больная В. явилась на контрольный осмотр. Жалоб не предъявляет. Слизистая оболочка десен бледно-розового цвета, плотная, эластичная, влажная, без признаков воспаления. Плотно прилегает к шейкам зубов. Проба Шиллера – Писарева - 1. Гигиенический индекс по Федорову – Володкиной 1,1. Костный индекс Фукса – 7,45. Индекс кровоточивости по Muhlermann (РВІ) – 0. Подвижность зубов отсутствует, что подтверждается данными исследования пародонтального статуса по системе «Florida Proub» (рис 5.б.).

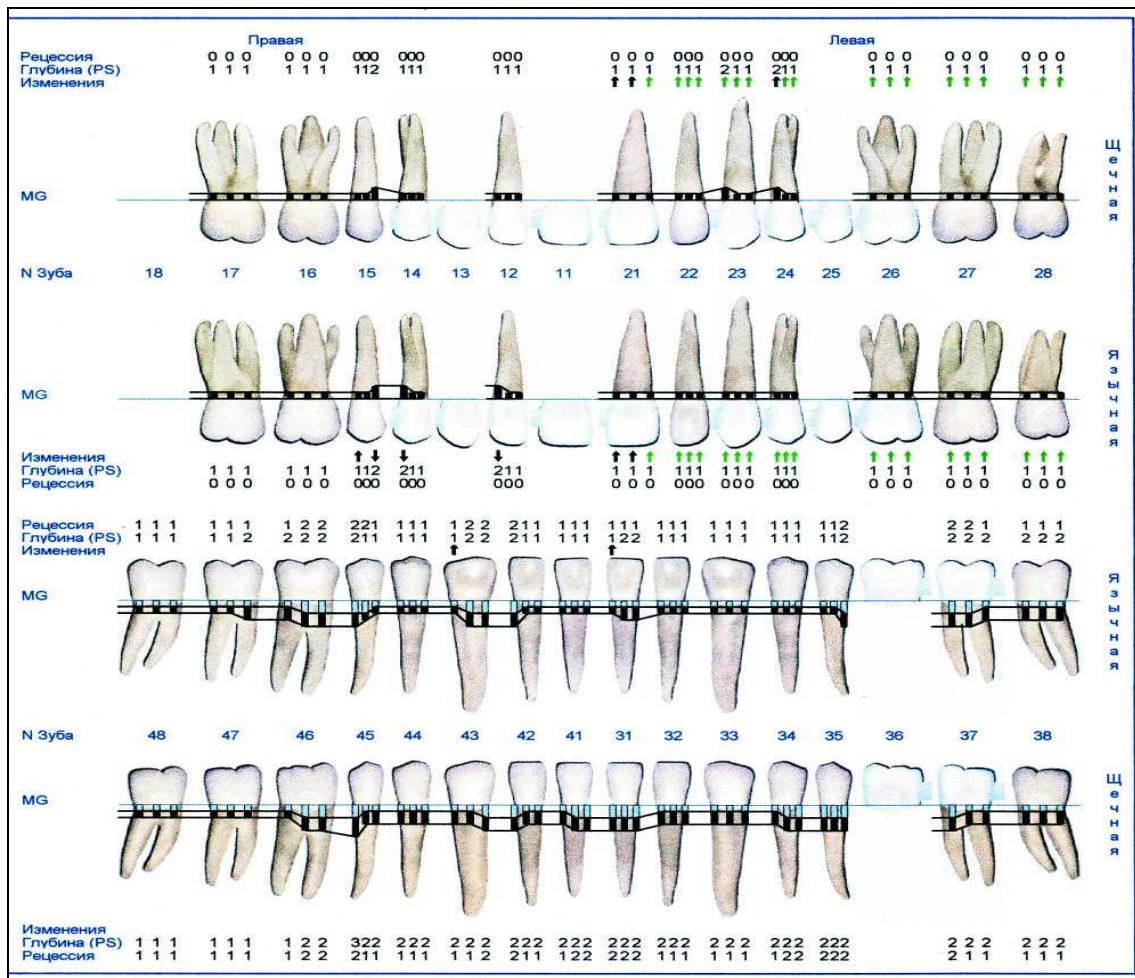


Рис. 5.6. Исследование пародонтального статуса больной В. по системе «Florida Proub» от 06.04.15 г.

На ортопантограмме (рис. 5.7.) высота межальвеолярных перегородок достигает $2/3$ длины корня. Костная ткань альвеолярного отростка в областях лоскутных операций четко выражена, рентгенконтрастна.



Рис. 5.7. Ортопантомограмма больной В. через 1 год после вмешательства в обл. 21-28 зубов (через 1 год 7 мес. после 1-й операции).

В качестве иллюстрации приводим выписку из истории болезни больного К. 1974 года рождения, вошедшего в контрольную группу.

02.11.2012. Больной К. обратился на кафедру стоматологии и терапевтической стоматологии ХМАПО с жалобами на подвижность зубов, кровоточивость десен, оголение корней, болезненные ощущения при приеме пищи и нарушение эстетики. Считает себя больным в течение 10 лет.

Ранее проводимое лечение состояло из профессиональной гигиены полости рта, аппликаций антисептиков, фармакотерапии и давало кратковременный эффект.

Объективно: лицо симметрично, без особенностей, открывание рта в полном объеме. Слизистая оболочка десен отечна, застойно гиперемирована. Большое количество зубных отложений и мягкого налета.

Пародонтальные карманы в области 18,17,16,15 - 5мм; в области 14,13,12,11,21,22 - 6мм, в области 23,24,25,27,27,28 - 4мм, в области 38,37,36,35,34 - 3мм; в области 33,32,31,41,42 - 5мм; в области 43,44,45 - 4мм.

Гигиенический индекс по Федорову – Володкиной 3,3. Проба Шиллера - Писарева 4,3 в области верхней и нижней челюсти. Костный индекс Фукса – 4,5. Подвижность зубов по шкале Мюллера 1-3 степени. Индекс кровоточивости по Muhlermann -2,35 (РВІ)

На ортопантомограмме от 2.11.12. резорбция межзубных перегородок в области 18, 17, 16, 15 - $\frac{1}{2}$ длины корня, 13,14, 12,11, 21,22,23 более $\frac{1}{2}$ длины корня 24,25, 26, 27, 28 на $\frac{1}{3}$ длины корня, 26 более $\frac{1}{2}$ длины корня, 45,44,43, ,34,35 – $\frac{1}{3}$ длины корня, в области 42,41,31,32,33 более $\frac{1}{2}$ длины корня (рис. 5.8.).

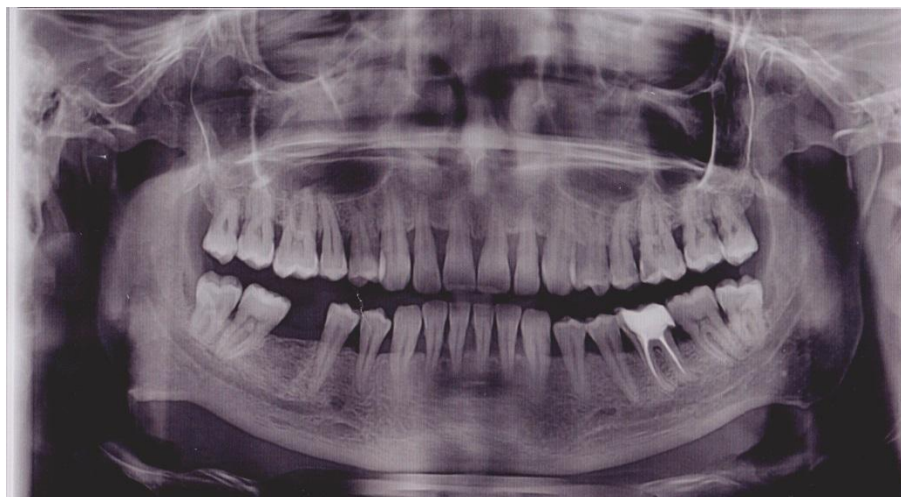


Рис. 5.8. Ортопантомограмма больного К. до хирургического вмешательства.

На основании данных клинических и лабораторных исследований нами поставлен диагноз: пародонтит генерализованный, III степени тяжести, стадия обострения.

Лабораторные показатели (клинический анализ крови и мочи, содержание глюкозы в крови, заключение терапевта) отклонений от нормы не выявили.

Содержание глюкозы в крови: 4,6 ммоль/л.

Клинический анализ крови:

Гемоглобин 141,2; Эритроциты 4,7; Цветовой показатель 0,96;

Тромбоциты 230,0; Скорость оседания эритроцитов 9;

Палочкоядерные 6; Сегментоядерные 50; Эозинофилы 5;

Лимфоциты 31; Моноциты 2

Анализ мочи общий:

Цвет желтый; Прозрачность прозрачная; Удельный вес 1,013;

Реакция (pH) 5,5; Белок не обнаружен; Глюкоза не обнаружена;

Кетоновые тела не обнаружены; Лейкоциты 2-3 в поле зрения;

Эпителий плоский местами; Слизь немного.

Заключение терапевта:

Практически здоров.

План консервативного лечения состоял из профессиональной гигиены, санации полости рта, медикаментозной обработки пародонтальных карманов, долговременного шинирования подвижных зубов, фармакотерапии.

С 05.11.2012 – 13.11.2012. больной прошел консервативное лечение, состоявшее в проведении профессиональной гигиены полости рта при помощи пародонтологического ультразвукового аппарата, обработки всех поверхностей зубов циркулярной щеткой и полировочной суспензией «Depural-Neo»; медикаментозной обработки пародонтальных карманов раствором хлоргексидина 0,05%; инстилляций мирамистина в пародонтальные карманы. Пациент обучен гигиене полости рта, ему рекомендованы индивидуальная зубная щетка и лечебная зубная паста.

Назначен курс лечения:

Трихопол 0,25мг 4раза в день, 5 суток;

Кальцит 0,5мг. 2раза в день, 30 суток;

Супрадин 1таб 1 раз в день, 30 суток;

Стоматофит - полоскание 10мин 3 раза в день;

Фитолизин – аппликации 20 мин 2раза в день.

Произведено долговременное шинирование 16, 15, 14, 13, 12, 11, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27 зубов с использованием адгезивной системы «Полиглас» и микрогибридного фотополимера «Natural Look».

13.11.12. Жалоб нет. Состояние полости рта хорошее. Слизистая оболочка десен бледно-розового цвета, без признаков воспаления. Выполняет рекомендации, медикаментозное лечение. Пациент направлен на консультацию к челюстно-лицевому хирургу стоматологической клиники «Фортуна» для проведения хирургического этапа лечения.

03.12.12. Больной К. направлен на клиническое обследование. Получены следующие результаты:

ЭКГ: Заключение

Практически здоров.

Содержание глюкозы в крови: 4,5 ммоль\л.

Клинический анализ крови:

Гемоглобин 140; Эритроциты 4,7;Цветовой показатель 0,90;
Тромбоциты 230,7;Скорость оседания эритроцитов 11;
Палочкоядерные 4;Сегментоядерные 53;Эозинофилы 4;
Лимфоциты 35;Моноциты 1.

Анализ мочи общий:

Цвет желтый; Прозрачность прозрачная; Удельный вес 1,020;
Реакция(pH) 5,5;Белок не обнаружен; Глюкоза не обнаружена;
Кетоновые тела не обнаружены; Лейкоциты 1 - 2 в поле зрения;
Эпителий плоский 2 - 32 в поле зрения; Слизь немного.

Заключение терапевта:

Противопоказаний к оперативному вмешательству нет.

Хирургическое лечение.

Больной К. всесторонне обследован, противопоказаний к оперативному лечению не выявлено.

13.12.12. Челюстно-лицевым хирургом проведена лоскутная операция с введением «Коллапана Л» под резорбируемую мембрану в области 41, 42, 43, 44, 45.

Под наркозом и местной анестезией раствора Септанеста 1:1000000 сделан сосочковый разрез нижней челюсти слева от 41 до 48. Отслоен лоскут вниз до 1 - 1,5 см, шейки и корни зубов обработаны алмазным бором, произведено удаление грануляций, между корнями сделана кортикотомия. Коллапан уложен в дефекты на альвеолярном отростке. Резорбируемая мембрана пришита и фигурно вырезана и уложена на коллапан. Рана без натяжения ушита наглухо.

21.12.12. Жалоб нет. В данный момент состояние удовлетворительное. Сняты швы. Даны рекомендации.

21.01.13. Жалоб нет. Состояние удовлетворительное. Слизистая оболочка десен в области 41, 42, 43, 44, 45 бледно розового цвета, эластичная, плотно прилегает к шейкам зубов. На остальных участках слизистая десен более

рыхлая, определяются пародонтальные карманы, что подтверждается исследованием пародонтального статуса по системе «Florida Proub» (Рис. 5.9.). Проведена профессиональная гигиена полости рта, медикаментозная обработка пародонтальных карманов. Даны рекомендации.

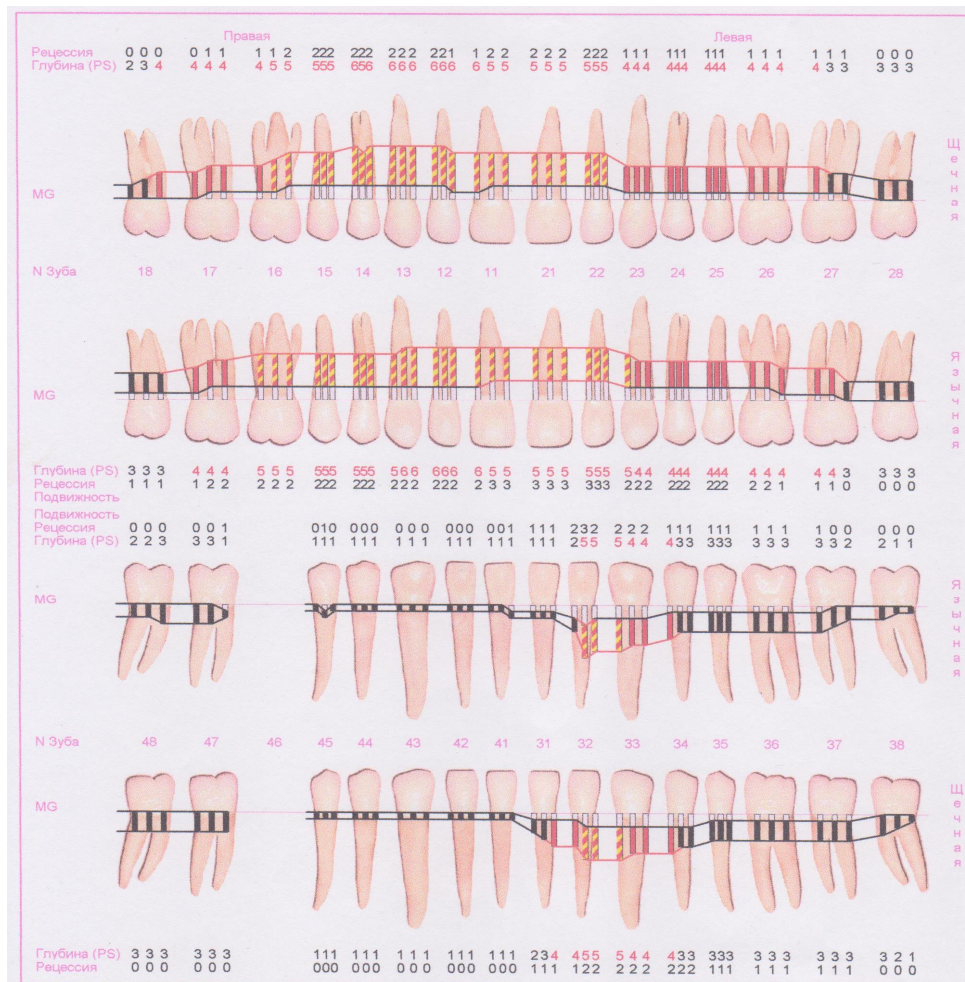


Рис. 5.9. Исследование пародонтологического статуса больного К. по системе «Florida Proub» от 21.03.13 г.

3.06.13. Больной К. явился с целью подготовки к хирургическому лечению. Проведен курс профессиональной гигиены.

10.06.13. Челюстно-лицевым хирургом проведена лоскутная операция с введением Коллапана Л» под резорбируемую мембрану в области 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38. Под местной анестезией раствором Септанеста 1:1000000 сделан сосочковый разрез нижней челюсти слева от 31 до 38. После отслоения лоскута произведена обработка шеек и корней зубов алмазным бором, удаление грануляций, кортикотомия между корнями. Коллапан уложен на альвеолярный

отросток. Резорбируемая мембрана пришта и уложена на коллапан. Рана без натяжения ушита наглухо.

17.06.13. Жалоб нет. Состояние удовлетворительное. Сняты швы. Даны рекомендации по уходу за полостью рта.

14.10.13. Пациент К. явился на плановый осмотр. Произведена профессиональная чистка зубов. Проведено исследование пародонтального статуса по системе «Florida Proub» (рис.5.10.). Даны рекомендации.

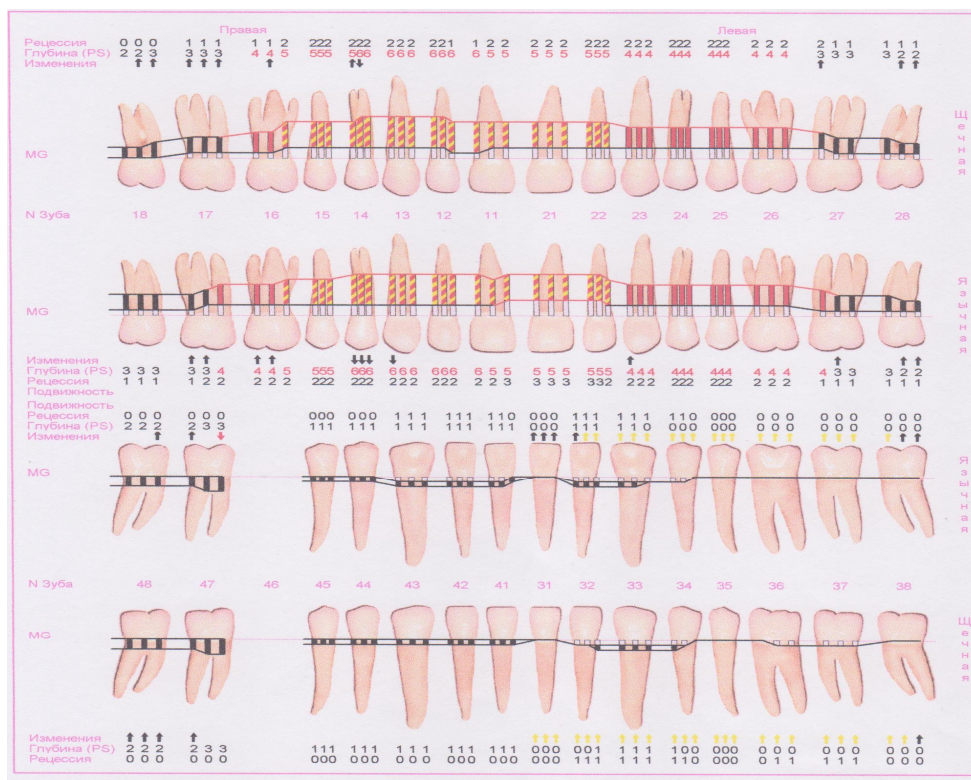


Рис. 5.10. Исследование пародонтального статуса больного К. по системе «Florida Proub» от 14.10.13 г.

На ортопантограмме (рис. 5.11.) больного К. через 4 месяца после вмешательства в обл. 31-38 зубов. Костная ткань альвеолярного отростка в областях лоскутных операций четко выражена, рентгенконтрастна.

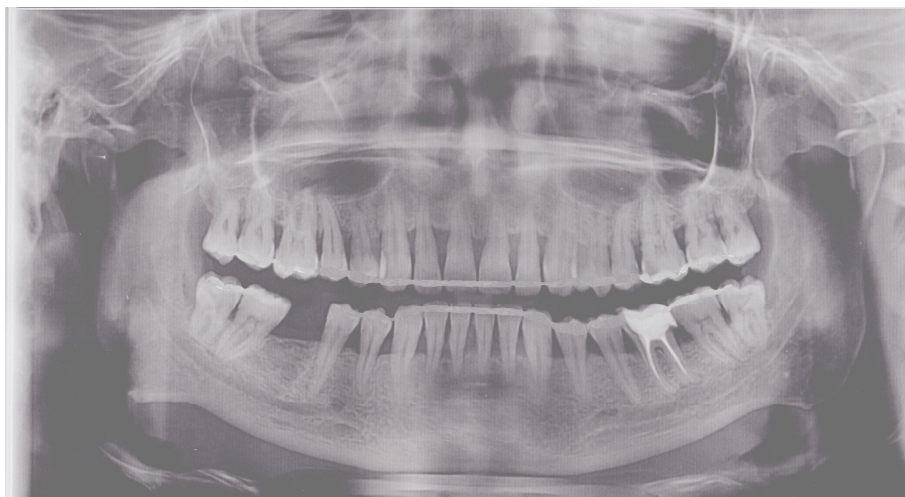


Рис. 5.11. Ортопантомограмма больного К. через 4 месяца после вмешательства в обл. 31-38 зубов(10 месяцев после 1-й операции).

02.12.13. Челюстно-лицевым хирургом проведена лоскутная операция с введением «Коллапана Л» под резорбируемую мембрану в области 11,12,13,14,15,16,17. Под наркозом и местной анестезии Sol. Septanest 1000000 сделан сосочковый разрез верхней челюсти слева от 11 до 17. Отслоен лоскут, корни и шейки зубов и костные карманы обработаны алмазным бором, сглажены костные выступы, удалены грануляции. Коллапан уложен в дефекты и на альвеолярный отросток. Резорбируемая мембрана пришта и уложена на коллапан. Рана без натяжения ушита наглухо.

09.12.13. Жалоб нет. Состояние удовлетворительное. Сняты швы. Даны рекомендации по уходу за полостью рта.

21.04.14. Жалоб нет. Состояние удовлетворительное. Слизистая оболочка десен в области 41, 42, 43, 44, 45, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17 бледно розового цвета, эластичная, плотно прилегает к шейкам зубов. На остальных участках слизистая десен более рыхлая, определяются пародонтальные карманы, что подтверждается исследованием пародонтального статуса по системе «Florida Proub» (рис. 5.12.). Проведена профессиональная гигиена полости рта, медикаментозная обработка пародонтальных карманов. Даны рекомендации.

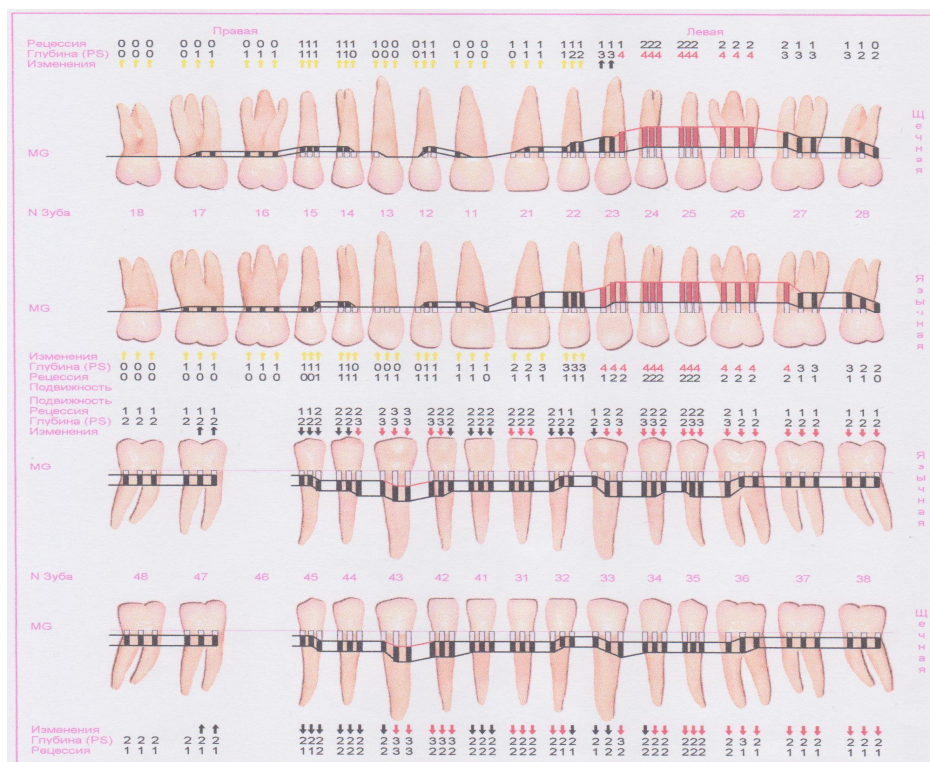


Рис. 5.12. Исследование пародонтального статуса больного К. по системе «Florida Proub» от 21.04.14 г.

2.06.14. Больной К. явился с целью подготовки к хирургическому этапу лечения. Жалоб нет. Слизистая оболочка десен в области 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 пастозна, застойно гиперемирована. В области 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, а также фронтальных и жевательных зубов нижней челюсти слизистая оболочка десен плотная, эластичная, бледно-розового цвета, без признаков воспаления. Пародонтальные карманы в области 23, 24, 25, 26, 27, 28 - 4мм. Проведена профессиональная гигиена полости рта и медикаментозная обработка пародонтальных карманов. Даны рекомендации по гигиене полости рта.

16.06.14. Челюстно-лицевым хирургом проведена лоскутная операция с введением «Коллапана Л» под резорбируемую мембрану в области 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28.

Под местной анестезией раствора Септанеста 1:1000000 сделан сосочковый разрез нижней челюсти справа от 21 до 28. Отслоен лоскут вверх до 1 – 1,5 см. Обработка шеек и корней зубов, удаление грануляций, кортикотомия. Коллапан уложен в дефекты и на альвеолярный отросток. Резорбируемая мембрана пришита и уложена на коллапан. Рана ушита наглухо.

23.06.14. Жалоб нет. Состояние удовлетворительное. Сняты швы. Даны рекомендации по уходу за полостью рта.

06.10.14. Больной К. явился на контрольный осмотр. Жалобы на изредка появляющуюся незначительную кровоточивость десен при чистке зубов и приеме твердой пищи. Слизистая оболочка десен розовая. В области 33, 32, 31, 41, 42, 43 зубов отмечается наличие мягкого налета. Проба Шиллера – Писарева- 1,5. Гигиенический индекс по Федорову – Володкиной 1,6. Костный индекс Фукса – 5,7. Подвижность зубов по шкале Мюллера отсутствует. Индекс кровоточивости по Muhlermann (PBI) – 1,3. Проведено исследование пародонтального статуса по системе «Florida Proub» (рис. 5.13.).

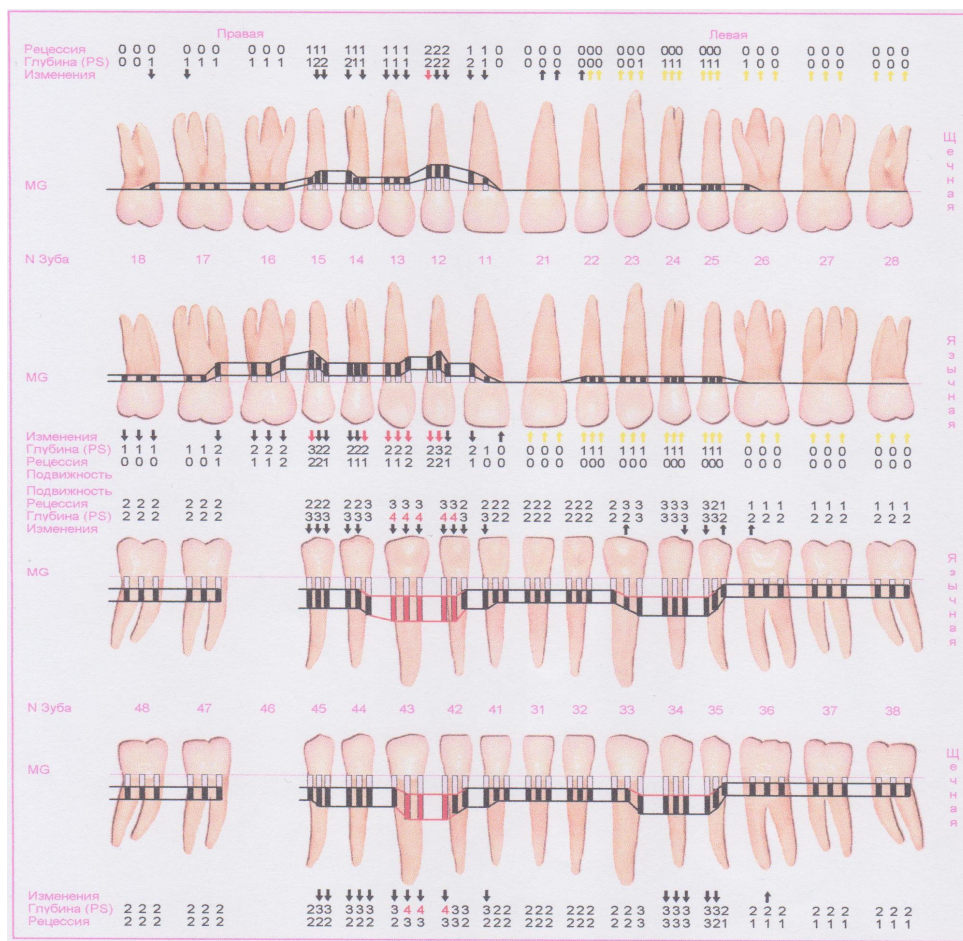


Рис. 5.13. Исследование пародонтального статуса больного К. по системе «Florida Proub» от 06.10.14 г.

На ортопантомограмме (рис. 5.14.) костная ткань альвеолярного отростка в областях лоскутных операций четко выражена, рентгенконтрастна.

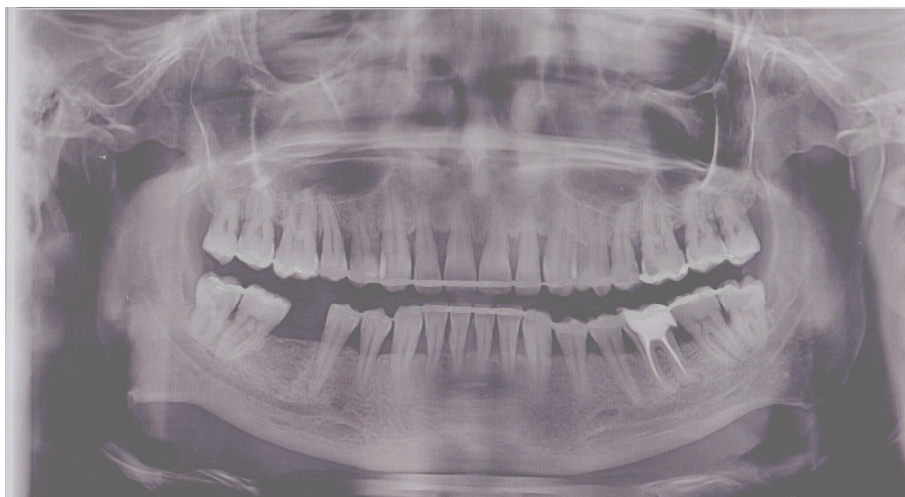


Рис. 5.14. Ортопантограмма больного К. через 1 год после вмешательства в обл. 21-28 зубов (через 1 год 10 мес. после операции)

ВЫВОДЫ К РАЗДЕЛУ 5

Сравнительный анализ результатов обследования больных основной и контрольной группы больных генерализованным пародонтитом через 12 месяцев после окончания хирургического этапа комплексного лечения свидетельствует об улучшении показателей индексной оценки состояния пародонта в обеих группах. Однако у больных контрольной группы появились признаки воспаления: отдельные десневые сосочки приобрели синюшный оттенок, пастозность, кровоточили при зондировании. Проба Шиллера-Писарева в этих участках достигала 2; ухудшились показатели пробы Федорова-Володкиной, 1,3 – 1,6; индекс кровоточивости по Muhlermann (PBI) – $2 \pm 0,03$; показатели костного индекса Фукса были в пределах 0,6. Т.е., больные этой группы нуждались в противорецидивном лечении.

Показатели обследования больных основной группы были значительно лучше. Проба Шиллера-Писарева отрицательная, гигиенический индекс Федорова-Володкиной в пределах 1,1 - 1,3; Muhlermann (PBI) – 0; костный индекс Фукса достигал 0,74. У больных опытной группы продолжалась ремиссия.

Приведенные клинико-лабораторные исследования свидетельствуют, что применение метода направленной регенерации с использованием аутологичных стволовых клеток костного мозга на подложке из коллапана с резорбируемой мембраной на хирургическом этапе комплексного лечения генерализованного пародонтита позволяет существенно улучшить состояние пародонта, поднять уровень костной ткани альвеолярного отростка, устранить пародонтальные карманы, уменьшить степень тяжести течения процесса, добиться долговременной ремиссии.

Результаты данного исследования опубликованы в статье:

Комплексное лечение больных генерализованным пародонтитом с применением метода направленной регенерации альвеолярного отростка / И. В. Цыганова, В. Ф. Куцевляк, В. И. Куцевляк // Вісник стоматології. – Одеса, 2015. - № 3. – С. 37-40.

АНАЛИЗ И ОБОБЩЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время распространенность генерализованного пародонтита как в Украине, так и во всем мире, занимающего одно из ведущих мест среди стоматологических заболеваний, является не только медицинской, но и социальной проблемой, значимость которой определяется высокой распространенностью, тяжестью течения, отрицательным влиянием на организм в целом, и ухудшением качества жизни человека.

Предложено большое количество рациональных методов лечения, намечены пути профилактики. Накопленный научный и клинический опыт предполагает комплексный подход к лечению, в котором важнейшую роль играют хирургические методы. Однако процент неудач при использовании традиционной терапии требует поиска и разработки новых, более эффективных методик.

Анализ литературных данных свидетельствует о том, что в последние десятилетия, в связи с ухудшением экологической обстановки, воздействием мощных стрессовых факторов на организм, отмечено снижение регенераторных возможностей костной ткани, и, следовательно, интенсивности репаративных процессов.

Одним из новых перспективных направлений коррекции процесса регенерации является трансплантация стволовых клеток различного происхождения, которая имеет явные преимущества перед традиционными методами лечения воспалительных заболеваний пародонта, поскольку позволяет купировать воспалительный процесс, анатомически восстановить структурные компоненты пародонта, в первую очередь, альвеолярную кость, получить длительную ремиссию. Использование метода направленной регенерации костной ткани альвеолярного отростка с добавлением аутологичных стволовых клеток открывает новые перспективы в пародонтальной хирургии при лечении генерализованного пародонтита II и III, имплантологии, травматологии.

Целью работы является повышение эффективности комплексной терапии больных генерализованным пародонтитом путем применения аутологичных стволовых клеток как стимулятора остеогенеза на хирургическом этапе лечения.

С этой целью нами были изучены транспортные свойства остеотропных материалов, как носителей культуры клеток, и выбран оптимальный носитель *in vitro*. А также *in vivo* проведён сравнительный анализ процесса заживления костных дефектов нижней челюсти кролика при применении различных костно-пластических материалов с добавлением аутологичных стволовых клеток.

Для экспериментального подтверждения возможности использования метода тканевой терапии было проведено исследование влияния аутологичных клеток кролика, полученных их костного мозга и жировой ткани на заживление дырчатых дефектов альвеолярного отростка.

В экспериментальных исследованиях было использовано 12 белых лабораторных крыс-самцов линии Wistar в возрасте 13 месяцев, массой 200 ± 20 г и 45 кроликов породы Шиншилла массой $3 \pm 0,2$ кг.

Эксперименты *in vitro* были проведены на двух группах костно-пластического материала природного и искусственного происхождения: Биоген, Биоколлаген, Био-осс, Перио-Глас, Остеопатит, Кергап, Коллапан Л, Стимул-Осс.

Костномозговые клетки крысы наносили на костно-пластические материалы химической и биологической природы для изучения особенностей и качества их приживления и размножения с целью определения оптимального носителя СК.

В результате исследования нами установлена цитотоксичность для МСК двух из восьми материалов - Перио-Гласса и Стимул-Осса. После культивирования с этими носителями МСК быстро дегенерировали. После добавления его к культуре клетки быстро деградировали и всплывали. рН среды возрастала и становилась щелочной.

В то же время, 6 исследованных стоматологических материалов, а именно Коллапан Л, Био-Ген, Биоколаген, Био-Осс, Остеопатит и Кергап - не оказывали негативного влияния на МСК, что обосновывает возможность их использования в качестве клеточных носителей в регенеративной терапии.

В экспериментальных исследованиях по сравнительному анализу процесса заживления костных дефектов тела нижней челюсти проводили на 13 кроликах породы Шиншилла массой $3 \pm 0,2$ кг.

После обработки морфологического материала и получения микрофотографий по каждой серии эксперимента, согласно морфометрическим данным, нами установлено, что наилучший результат получен в случае использования Коллапана как носителя стромальных клеток в сочетании с мембраной и СК.

В экспериментальных исследованиях по изучению влияния аутологичных клеток кролика, полученных из костного мозга и жировой ткани, на заживление дырчатых дефектов альвеолярного отростка, объёмом $0,027 \text{ см}^3$, было использовано 32 кролика породы Шиншилла, возрастом 1 год массой $2 \pm 0,2$ кг. В соответствии с целью и задачами исследования, экспериментальные животные были распределены на 8 серийных групп по 4 кролика в каждой.

В связи с тем, что задачей нашего исследования являлось определение состояния регенерации костной ткани в зависимости от количества введенных аутологичных стволовых клеток и источника их получения, нами проведены серии экспериментальных исследований. Стволовые клетки костного мозга и жировой ткани, в сочетании с коллапаном, вводили в зону дырчатого дефекта нижней челюсти кроликов основной группы в количестве 100 тысяч, 500 тысяч, 1 миллион.

В образовавшийся костный дефект имплантировалась исследуемая композиция, после чего рана ушивалась наглухо. После оперативного вмешательства по созданию костного дефекта и восполнению его

остеопластической композицией уже через 2 – 3 суток животные могли полноценно принимать корм.

Стволовые клетки костного мозга и жировой ткани кроликов получали по технологии, разработанной в институте криобиологии и криомедицины НАНУ им. ак. Грищенко В.И.

После морфометрического подсчета при введении 100 тысяч аутологичных СКЖТ в структуре регенерата на 42 сутки преобладала клеточно-волоконистая ткань с остеогенными потенциями, составившая 32 % и участками остеогенеза, которые обнаруживались по периферии регенерата, где сохранилось микроциркуляционное русло, на 90 сутки в структуре регенерата кости также преобладала клеточно-волоконистая ткань с многочисленными капиллярами, а количество крупно – и мелкотрабекулярной новообразованной костной ткани достигло 30 %.

На 42 сутки в структуре регенерата после введения 500 тысяч аутологичных СКЖТ с коллапаном преобладала клеточно-волоконистая ткань, хорошо васкуляризованная, почти без лейкоцитарной инфильтрации, а зоны остеогенеза занимали глубокие отделы дефекта и составляли 44 %, в регенерате кости, после введения 500 тысяч аутологичных СКЖТ с коллапаном, в период с 42 до 90 суток определялось значительное увеличение темпов остеогенеза в структуре регенерата, с 85 % новообразованных костных структур.

На 42 сутки после введения 1 млн. аутологичных СКЖТ с коллапаном обнаруживалась хорошо 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 с участками остеогенной грануляционной ткани. В составе грануляционной ткани выявлено значительное количество клеток с ассиметрично расположенным ядром и интенсивно оксифильной гомогенной

цитоплазмой, что позволяло отнести их к преостеобластам; на 90 сутки после введения 1 млн. аутологичных СКЖТ с коллапаном продолжала сохраняться картина остеогенеза, характерная для 42 суток, усиление процессов костеобразования незначительное, с 40 % до 48 %. Большая часть полей крупнопетливой сети, отграниченной от полей грануляционной тканью, состояла из утолщенных новообразованных костных балочек, которые формировали узкую зону, отделяющую область некроза. Поля новообразованной костной ткани формируют несплошную вторичную костную «коробку». На отдельных участках определялись напластованные новообразования кости на пластинчатых фрагментах, которые были окружены рубцовой соединительной тканью.

Следует отметить, что после введения 500 тысяч СКЖТ с коллапаном, объем некротических изменений уменьшился до 1 %, а на 90 сутки практически в структуре регенерата не определялся, при этом превалировала остеоидная и новообразованная костная ткань, которая составила 85 %.

Введение СКЖТ в количестве 100 тысяч с коллапаном также стимулировало увеличение клеточно-волокнистой 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 из жировой ткани 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 происходило.

После введения 100 тысяч аутологичных СК костного мозга с коллапаном на 42 сутки, гистологические исследования свидетельствуют о том, что в структуре регенерата начинают преобладать дифференцированные

компоненты, а узкие участки некротически измененной ткани определяются, как следствие недостаточного формирования микроциркуляторного русла. На 90 сутки гистологические исследования свидетельствуют об увеличении объема пролиферирующей ткани с преобладанием в составе регенерата остеогенных клеточных элементов.

Наши данные согласуются с исследованиями Юхта М.С. (2014), что на 42 сутки после введения 500 тысяч аутологичных СККМ с коллапаном процессы перестройки в зоне дефекта нижней челюсти имели выраженный характер. На 42 сутки микроскопически наблюдалось значительное увеличение клеточных элементов остеогенного характера за счет периостального остеобразования. На 90 сутки после введения 500 тысяч аутологичных СККМ с коллапаном развитие остеогенеза имело более выраженный характер. Это выражалось в интенсивном костеобразовании и восстановлении целостности кости нижней челюсти, но с наличием тех компонентов (сеть мелкопетлистых и крупнопетлистых трабекул), которые будут подвергаться окончательной перестройке еще на протяжении длительного периода времени.

На 42 сутки после введения 1 млн. аутологичных СККМ с коллапаном гистологические исследования свидетельствуют о замедлении восстановительного процесса, связанного с уменьшением объема пролиферирующей ткани и неравномерным распределением клеточных элементов в зоне регенерата, по сравнению с этим же сроком при введении дозы 500 тысяч СК. На 90 сутки отмечались незначительные деструктивные изменения и резорбция альвеолярного отростка. На отдельных участках наблюдалась активная пролиферация камбиальных клеточных элементов периостальной зоны и дифференцировка их в остеобласты. В структуре регенерата определялись участки из мелкопетливой и крупнопетливой сети костных трабекул, а также хорошо васкуляризованная клеточно-волокнистая ткань, что свидетельствовало об интенсификации ангиогенеза.

Таким образом, введение аутологичных СК из костного мозга в количестве 500 тысяч в сочетании с коллапаном на 90 сутки в зоне регенерата

создавали условия для более интенсивного развития остеогенеза и на этой основе приводили к интенсификации пролиферативных процессов и процессов дифференциации по остеогенному типу.

Обследование больных с заболеваниями пародонта проводили по традиционной схеме. У больных выясняли жалобы, уточняли продолжительность заболевания, предыдущие обращения, эффективность проведенного лечения, анализировали условия жизни, перенесенные заболевания, аллергологический статус и вредные привычки.

Группу клинических наблюдений составили 20 больных генерализованным пародонтитом II и III степени, которым проведено комплексное лечение, состоявшее в профессиональной гигиене полости рта, устранении травматической окклюзии, фармакотерапии, состоявшей из приема antimicrobных, остеотропных, десенсибилизирующих препаратов, витаминных комплексов.

С использованием системы «Florida Probe» пациентам исследовали рецессию десны, глубину пародонтальных карманов, кровоточивость, отделяемое из пародонтальных карманов, фуркацию, зубной налет, подвижность.

Результаты регистрировали в распечатанных таблицах.

На хирургическом этапе комплексного лечения больным основной группы проводили лоскутные операции с направленной регенерацией костной ткани с введением 2 млн. аутогенных стволовых клеток на коллапане и резорбируемой мембраной.

Больным контрольной группы проводили лоскутные операции с направленной регенерацией костной ткани с введением коллапана.

Все пациенты, непосредственно перед хирургическим вмешательством, делали клинический анализ крови, обследовали иммунологический статус.

При первичном обследовании средние показатели индексной оценки состояния пародонта у больных обеих групп были равнозначными. Проба Шиллера–Писарева $5,15 \pm 0,05$; ГІ по Федорову–Володкиной $3,0 \pm 0,5$; индекс

кровоточивости по Muhlermann (PBI) - $3,0 \pm 0,05$; костный индекс Фукса - $0,48 \pm 0,05$; подвижность зубов за шкалою Миллера - 1-2.

Через 6 месяцев после окончания хирургического этапа комплексного лечения пациенты контрольной группы отмечали случаи кровоточивости при чистке зубов и при приеме жесткой пищи. У них появился мягкий налет на зубах, незначительное количество наддесневого камня во фронтальном участке нижней челюсти. Проба Шиллера – Писарева $1,8 \pm 0,5$, GI по Федорову – Володкиной $1,3 \pm 0,3$, Индекс кровоточивости по Muhlermann (PBI) $1 \pm 0,07$ костный индекс Фукса $0,70$; подвижность отсутствует.

Пациенты основной группы жалоб не предъявляли. Проба Шиллера – Писарева $1,3 \pm 0,1$; GI по Федорову – Володкиной $1,1 \pm 0,1$ Индекс кровоточивости по Muhlermann (PBI) – 0, костный индекс Фукса $0,73$. Данные исследования пародонтального статуса по системе «Florida Proub» показали аналогичные расхождения в показателях.

Через 12 месяцев результаты объективного исследования имели еще большие отличия. Больные контрольной группы предъявляли жалобы на наличие воспаления в пародонта, отмечалось уменьшение глубины пародонтальных карманов. Но отдельные десневые сосочки в наиболее тяжелых участках приобрели синюшный оттенок, были пастозны, кровоточили при зондировании. Проба Шиллера – Писарева $2,0$, GI по Федорову – Володкиной $1,3 \pm 0,5$. Индекс кровоточивости по Muhlermann (PBI) - $2 \pm 0,3$, костный индекс Фукса $0,64$.

У больных опытной группы жалоб практически не было. Проба Шиллера – Писарева $1,3$. GI по Федорову - Володкиной $1,1 \pm 0,1$. Индекс кровоточивости по Muhlermann (PBI) – 0, костный индекс Фукса $0,74$.

У больных контрольной группы на ортопантомограммах отмечалось уплотнение, усиление костного рисунка, по сравнению с исходными.

Рентгенологически у больных опытной группы определялось увеличение высоты межальвеолярных перегородок на 1 - 1,5мм, по сравнению с дооперационными ортопантомограммами. Отмечалось увеличение плотности

рисунка губчатой кости межзубных перегородок, увеличение его рентген-контрастности.

Показатели исследования пародонтального статуса по системе «Florida Proub» показали расхождения в показателях, аналогичные табличным. Приведенные данные свидетельствуют о том, что применение аутологичных стволовых клеток на хирургическом этапе комплексного лечения болезней пародонта имеет явные преимущества перед традиционными хирургическими методами лечения этих заболеваний, поскольку происходит восстановление структуры пародонта, устранение пародонтальных карманов, устанавливается продолжительная ремиссия, что является одним из значимых позитивных изменений.

Таким образом, результаты проведенных экспериментально-клинических исследований свидетельствуют о высокой эффективности разработанного комплексного метода лечения заболеваний пародонта, который может быть предложен практическому здравоохранению как метод выбора.

ВЫВОДЫ

В диссертационной работе представлены экспериментально и клинически обоснованное новое решение актуальной для современной стоматологии задачи – повышение эффективности хирургического этапа комплексного лечения генерализованного пародонтита путем использования для направленной регенерации костной ткани аутологичных стволовых клеток из костного мозга и жировой ткани на коллапановой подложке.

1. Изучение ряда остеотропных материалов искусственного и природного происхождения в качестве носителей стволовых клеток позволило установить, что Био-Осс, ОссаБейс, Остеопатит, Кергап, Коллапан Л обеспечивают адгезию, пролиферацию и не оказывают цитотоксического действия на костномозговые стволовые клетки и могут быть использованы в качестве носителя в клеточной терапии, при этом наилучший результат получен в случае использования Коллапана.

2. Установлено, что СК, введенные в область дефекта на Коллапане, обеспечивают качественную полноценную регенерацию костной ткани. На 30 сутки сформирована плотная сеть костных трабекул с высокой плотностью остеоцитов на их поверхности с выраженной остеобластической дифференцировкой клеток. На 60 сутки в тканях регенерата превалирует компактная кость.

3. Доказано, что на 42 сутки образование остеогенных тканей было на 14% больше в группах с введением СККМ, чем в группах с СКЖТ. На 90 сутки образование остеогенных тканей в группах с введением СККМ было в 3 раза больше, чем в группах с СКЖТ.

4. Установлено, что оптимальной явилась доза 500 000 СККМ и СКЖТ. После введения 500 тысяч аутологичных СКЖТ с коллапаном в период с 42 до 90 суток определялось существенное качественное изменение темпов остеогенеза в структуре регенерата, что привело к значительному увеличению новообразованных костных структур, с 44% до 85%. Введение 500 тысяч

аутологичных СККМ с коллапаном к 90 суткам привело к восстановлению гистологической структуры нижней челюсти кролика.

5. Доказано, что применение аутологичных стволовых клеток на хирургическом этапе комплексного лечения болезней пародонта имеет явные преимущества перед традиционными хирургическими методами лечения этих заболеваний, поскольку происходит восстановление структуры пародонта, устраняются пародонтальные карманы, возникает новое зубодесневое прикрепление, устанавливается длительная ремиссия.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Исходя из полученных результатов данного исследования, с учетом клинических и патоморфологических изменений пародонта, стандартов оказания стоматологической помощи больным воспалительными заболеваниями пародонта, необходимо составить план клинического обследования и лечения генерализованного пародонтита, который должен включать в себя ниже перечисленные методы:

1. Обязательное клиническое обследование врачом-стоматологом и смежными специалистами. Для объективной оценки течения пародонтита необходимо проводить индексную оценку состояния пародонта, рентгенологическое исследование. На этапе планирования и в процессе комплексного лечения оценивать уровень стоматологического здоровья пациента: состояние твердых тканей зубов, индексную оценку состояния тканей пародонта, уровень гигиены полости рта.

2. Предлагаем при необходимости хирургического лечения генерализованного пародонтита проводить лоскутные операции с использованием метода направленной регенерации костной ткани с использованием аутологичных стволовых клеток костного мозга с применением Коллапана в качестве скаффолда. Забор, культивацию и, в случае необходимости, криоконсервирование стволовых клеток костного мозга осуществлять в Центре ожогов, реконструктивной и пластической хирургии на базе Харьковской городской клинической больницы № 4 скорой неотложной помощи им. А. В. Мещанинова (для харьковского региона).

3. Применение в клинической практике аутологичных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани для ускорения процесса остеогенеза должно сопровождаться точным подсчетом их оптимального количества в зависимости от объема дефекта костной ткани.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Куцевляк В. И. Регенерация костной ткани в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии с использованием клеточных биотехнологий / В. И. Куцевляк, Ф. Ф. Куцевляк, Ю. Е. Микулинский. // Стоматологический журнал, Здоровоохранение Беларуси, Минск. – 2004. – №4. – С. 54–57.
2. Применение клеточных технологий для повышения эффективности хирургического лечения пародонтита / [М. М. Пожарицкая, Е. В. Руднева, Н. А. Попкова и др.]. // Пародонтология. – 2004. – №3. – С. 3–9.
3. Куцевляк В. И. Клеточные биотехнологии в регенерации костной ткани стоматологических больных / В. И. Куцевляк, В. Ф. Куцевляк. // Материалы III международной научно-практической конференции «Стоматология славянских государств», Белгород. – 2009. – С.188-190.
4. Куцевляк В. И. Применение аутологичных стволовых клеток в аугментации кости в пародонтологии и имплантологии / В. И. Куцевляк, В. Ф. Куцевляк // Vesnik stomatologi 3rd PAN-European dental Congress, Киев, 9 - 11 грудня 2009, Одеса, 2009, №4, С. 27.
5. Клеточные технологии в травматологии и ортопедии: пути развития / Р.В. Деев, А.А. Исаев, А.Ю. Кочиш, Р.М. Тихилов. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – № 2(4). – С. 18–30
6. Грудянов А. И. Методика направленной регенерации тканей. Подсадочные материалы. / А. И. Грудянов, П. В. Чупахин. – М.: ООО "Медицинское информационное агентство", 2007. – 64 с.
7. Использование мембранной техники для направленной регенерации костной ткани при стоматологических вмешательствах / С. Ю. Иванов, Ю. В. Гажва., А.А. Мураев, А. П. Бонарцев // Современные проблемы науки и образования. – 2012. – № 3. – С. 57-69.
8. Косенко К. Н. Стволовые клетки в стоматологии (обзор литературы) / К. Н. Косенко // Вісник стоматології. – № 3. – 2011. – С. 85-88.
9. Фриденштейн А. Я. Клонирование клеток-предшественников фибробластов в монослойной культуре / А.Я. Фриденштейн, Ю.Ф. Деригласова,

Н.Н. Кулагина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1973. – Т.75. №10. С. 90-94.

10. Фриденштейн А.Я. Стромальные клетки костного мозга и кроветворное микроокружение. / А. Я. Фриденштейн, Р. К. Чайлахян // Архив. Патолог. - 1982. – Т. 44. №10 – С. 3-11.

11. Клеточная трансплантация: перспективы развития и практического применения / Р. В. Салютин, С. С. Паляница, Р. М. Борис, М. П. Комаров. // Медицина сьогодні і завтра. – 2011. – №1. – С. 246–247.

12. Способы выделения и условия культивирования стромальных клеток жировой ткани человека, полученной из различных источников / [О. В. Повещенко, А. П. Колесников, И. И. Ким и др.]. // Бюллетень СО РАМН. – 2008. – №5. – С. 90–95.

13. Фриденштейн А. Я., Лурия Е. А. Клеточные основы гемопоэтического микроокружения. Терапевт. архив. - 1980. - Т. 52; № 9. - С. 67-71.

14. Использование тканевых препаратов плаценты, полученных по методу академика В. П. Филатова, для профилактики ускоренного старения человека. / Д. Ф.Чеботарев, А. В. Коркушко, Е. Г. Калиновская, Е. Г. Шатало // Актуальні питання тканинної терапії та перспективи застосування природних біологічно - активних речовин у сучасній медицині: Наук.-практ. конф. з міжнар. уч., 17-18 вересня 2003р. Одеса: Астропринт. – 2003. – С. 108.

15. Подходы к культивированию гематопоэтических стволовых клеток пуповинной крови для трансплантации при онкогематологических заболеваниях / [А.А. Айзенштадт, В.В. Багаева, Н. А. Иванова и др.] // Фундаментальные исследования в современной медицине: достижения и перспективы: сборник материалов 1-ой научной сессии научных подразделений СЗГМУ им. И.И. Мечникова, 23 марта 2013 (Под ред. д. м. н. Силина А.В.) – СПб.: СЗГМУ им. И.И. Мечникова – 2013. – С. 6.

16. Иванова Н. А. Разработка биопрепарата на основе плазмы пуповинной крови и мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани для

применения в травматологии и ортопедии /Н. А. Иванова, В. В. Багаева // «Трансляционная медицина: от теории к практике»: сборник материалов научно-практической конференции молодых ученых и специалистов. 24 апреля 2013 года / под ред. А. В. Силина. – СПб.: Издательство СЗГМУ им. И. И. Мечникова 2013 – с. 63.

17. Выделение и подготовка стволовых клеток пуповинной крови к трансплантации / [О. Г. Хурцилава, Д. А. Иволгин, К. В. Коровина та ін.] // Вестник СЗГМУ им. И.И. Мечникова. – 2012. – Т.4, №2. – С. 7–16.

18. Expansion and homing of umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells for clinical transplantation. / [S. Bari, K.K. Seah, Z. Poon et al.] // Biol. Blood Marrow Transplant/ - 2015. – Vol. 21. N. 6. – P.1008-1019.

19. Liu S.S. Human umbilical cord blood-derived stromal cells: A new source of stromal cells in hematopoietic stem cell transplantation. / S.S. Liu, C. Zhang, X. Zhang, X.H. Chen // Crit. Rev Oncol. Hematol. 2014 Vol. 90. N.2. P. 93-98.

20. Umbilical cord mesenchymal stem cells: role of regulatory genes in their differentiation to osteoblasts / [S. Ciavarella, F. Dammacco, D. Matteo et al.]. // Stem Cells Dev. 2009. – Vol. 18. – 2009. – №8. – P. 1211–1220.

21. Angoulvant D. Neovascularization derived from cell transplantation in ischemic myocardium / D. Angoulvant, S. Fazel, RK. Li // Mol. Cell Biochem. – 2004. – Vol. 264(1-2). – P. 133–142.

22. Human bone marrow-derived adult stem cells for post-myocardial infarction cardiac repair: current status and future directions / H.M. Wei, P. Wong, L.F Hsu., W. Shim // Singapore Med. J. – 2009. – Vol. 50 (10). – P. 204-215.

23. Матюков А.А. Сравнительное влияние интрамиокардиальной аутооттрансплантации различных типов клеток костного мозга на перфузию ишемизированного миокарда в эксперименте / А. А. Матюков. // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – №3. – С. 42–47.

24. Введение в молекулярную медицину (Под ред. Пальцева М. А.). - М., «Медицина». – 2004. – С. 319-337.

25. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein / [K. Iohara M. Nakashima, M. Ito et al.] // J. Dent. Res. – 2004. – Vol. – 83. N. 8, – P. 590-595.

26. Effects of intracoronary infusion of peripheral blood stem-cells mobilised with granulocyte colony stimulating factor on left ventricular systolic function and restenosis after coronary stenting in myocardial infarction: the MAGIC cell randomised clinical trial / [H.J. Kang, H.S. Kim, S.Y. Zhang et al.] // Lancet. – 2004. - Vol. 363 - P. 751-756.

27. Charbord P. Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. / P. Charbord. // Human Gene Therapy. – 2010. – Vol. 21(9) – P. 1045-1056.

28. Hass R. Different populations and human mesenchymal stem cells (MSC): a companion of adult and neonatal tissue-derived MSC / R. Hass, C. Kasper, S. Bohm, R. Jacods // Cell communication and signaling : CCS. – 2011. – Vol. 9, N.1. – P.12.

29. Human reserve pluripotent mesenchymal stem cells are present in the connective tissues of skeletal muscle and dermis derived from fetal, adult, and geriatric donors / [H. E. Young, T. A. Steele, R. A. Bray et al.] // Anat. Rec. – 2001. - № 264. – P. 51– 62.

30. Запорожан В. Н. Стволовые клетки / В. Н. Запорожан, Ю. И. Бажора. – Одесса: Одесский мед. университет, – 2004. – 228 с.

31. Биологические основы и перспективы терапии стволовыми клетками. / Е. Б. Владимирская, О. А. Майорова, С. А. Румянцев, А Г. Румянцев. – М: Медпрактика - М, 2005. – 392 с.

32. Differentiation of human embryonic stem cells on periodontal ligament fibroblasts in vitro / [B. Inane, A. Elcin, E. Unsa et al.] // Artificial Organs. – 2007. – Vol. 32. – N. 2, P. 100-109.

33. Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dentalpulp stem cells into functionally active neurons / [M. Kiraly,

B. Porcsalmy, A. Pataki et al.] // *Neurochemistry International*. – 2009. - Vol.55. – P. 323-332.

34. Петренко Ю.А. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки из разных источников: криоконсервирование, свойства при многослойном и трехмерном консервировании: автореф. дис. на соискание уч. степени док. биол. наук: спец. 03.00.19 / Петренко Ю.А. – Х., 2013. – 313 с.

35. Терских В. В. Ниши стволовых клеток / В. В. Терских, А. В. Васильев, Е. А. Воротеляк. // *Известия РАН. Серия биология*. – 2007. – №2. – С. 1–12.

36. Использование столовых клеток крови плода крысы при воспалительно-деструктивных процессах в тканях пародонта / [В. В. Алямовский, Л. А. Шестакова, Е. И. Ярыгин и др.] // *Новые исследования в стоматологии*. – 2014. – №1. – С. 103–105.

37. Mesenchymal and induced pluripotent stem cells: general insights and clinical perspectives / H. D. Zomer, A. S. Vidane, N. N. Gonçalves, C. E. Ambrósio. // *Stem Cells Cloning*. – 2015. – Vol. 28. №8. – P. 125–134.

38. Identificacion of mesenchymal stem/ progenitor cell in human first-trimestr fetal blood, liver, and bone marrow / [C. Campagnoli, I.A. Roberts, S. Kumar et al.] // *Blood*. – 2001. Vol. 98, N. 8. – P. 2396-2402.

39. Перспективы лечения обширных дермальных ожогов при использовании культивированных аллофибробластов в синтетической гелевой среде / [И. Д. Козулин, П. К. Крылов, К. М. Крылов и др.] // *Ожоги и медицина катастроф: Материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием Сб. тезисов докл. (Уфа 11-13 сентября 2014 г.)*. – 2014. – С. 224–225.

40. Доскалиев Ж. А. Многолетний опыт применения фетальных стволовых клеток в Национальном медицинском центре г. Астана при лечении пациентов с различными заболеваниями / Ж. А. Доскалиев. // *Инновационные технологии в медицине: Материалы междунар. конгресса (Астана, 7-9 октября 2011 г.)*. – 2011. – С. 299–300.

41. Рассохин А.В. Тканевая плацентарная терапия / А. В. Рассохин. – СПб.: ЭЛБИ-СПб, – 2014. – 208 с.
42. Трансплантация моноклеарной фракции клеток аутологичного костного мозга в комплексном хирургическом лечении переломов длинных трубчатых костей / [А.М. Савинцев, О. Г. Хурцилава, А.Б. Смолянинов, А.Т. и др.] // Вестник Санкт-Петербургского университета. Серия 11. Медицина. – 2013. – № 4. – С. 156–163.
43. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на лимфоциты, активированные аллергеном / [А. А. Айзенштадт, А. С. Хрупина, А. Б. Смолянинов и др.] // Российский иммунологический журнал – 2013. – том 7 (16), №2-3. – С. 171.
44. Влияние мезенхимальных стволовых клеток пупочного канатика на лимфоциты, активированные аллергеном / [А. А. Айзенштадт, О. В. Супильникова А. Б. Смолянинов и др.] // Стволовые клетки и регенеративная медицина: V Всероссийская научно-практическая конференция; 18-21 ноября 2013 г.: Сборник тезисов – М.: МАСК Пресс, 2013. – С. 2.
45. Гемопоэтические стволовые клетки пуповинной крови для лечения пациентов с ВИЧ-инфекцией: возможности и перспективы / [И. А. Пирожков, М. А. Глебова, М. Д. Канаева и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия – 2013 – Том VIII, № 1. – С. 23–28.
46. Yang W. Safety evaluation of allogeneic umbilical cord blood mononuclear celltherapy for degenerative conditions (Shenzen Beike ell Engineering Research Institute Shenzen, China) / W. Yang // Journal of Transplantation Medicine. – 2010. Vol. 75. №.8. – P. 1–6.
47. Юрченко Т. Н. Биологические вещества в криоконсервированном и лиофилизированном экстрактах плаценты / Т. Н. Юрченко, В. И. Строна, Т. П. Говоруха. // Актуальні питання тканинної терапії та перспективи застосування природних біологічно-активних речовин у сучасній медицині. 17-18 вересня 2003р. Одеса, Астропринт. – 2003. – С. 41–42.

48. Fatigue and human umbilical cord stem cell seeding characteristics of calcium phosphate-chitosan-biodegradable fiber scaffolds. / [L. Zhao, E. F. Burguera, H. H. Xu et al.] // *Biomaterials*. – 2010. – Vol. 31. №5. – P. 840–847.

49. Sun H. Calcium Phosphate Scaffolds Combined with Bone Morphogenetic Proteins or Mesenchymal Stem Cells in Bone Tissue Engineering / H. Sun, H. L. Yang. // *Chin Med J*. – 2015. – №128. – P. 1121–1127.

50. Long-term survival and characterization of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on dermal equivalents. / [R. K. Schneider, A. Pullen, R. Kramann et al.] // *Differentiation*. - 2010. - Vol.79. - P. 182-193.

51. Stem cell property of postmigratory cranial neural crest cells and their utility in alveolar bone regeneration and tooth development. / [I.H. Chung, T. Yamaza, H. Zhao et al.] // *Stem Cells*. 2009. - Vol. 27. - № 4. - P. 866-877.

52. Внутриклеточные иммуноглобулины в линиях NAMALVA и U266 при сокультивировании с мезенхимными стромальными клетками / [А. А. Айзенштадт, Н. А. Иванова, В. В. Багаева, и др.] // *Цитология* – 2014 - Том 56 № 2 - С. 117–122.

53. Онищенко Н. А. Современные представления о биологии стволовых клеток костного мозга и крови в аспекте их клинического применения. / Н. А. Онищенко, М. Е. Крашенинников // *Вестник трансплантологии и искусственных органов*. – 2004. – № 3. – С. 54–62.

54. Human marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages / [M. K. Majumdar, M. A. Thiede, S. E. Haynesworth et al] // *J. Hematother. Stem Cell Res*. – 2000. – № 9. – P. 841–848.

55. Conversion of bone marrow mesenchymal stem cells into type II alveolar epithelial cells reduces pulmonary fibrosis by decreasing oxidative stress in rats / [K. Huang, X. Kang, X. Wang та ін.]. // *Molecular Medicine Reports*. Nov 2014. – 2014.

56. Карпюк В. Б. К изучению свежeweыделенных 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.

57. Новый подход к оценке остеогенного потенциала мезенхимальных стромальных клеток. / [А. Л. Останин, Я.Л. Петровский, Е.Я. Шевела и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине – 2008. – № 4. – С. 219- 226.

58. Zhao Y. A human peripheral blood monocyte-derived subset acts as pluripotent stem cells / Y .Zhao, D. Glesne, E. Huberman // Proc Natl Acad Sci USA. – 2003. – Vol. 100. – P. 2426.

59. Chen L. The role of nanotechnology in induced pluripotent and embryonic stem cells research. / L. Chen, R. Qiu, L. Li // J Biomed Nanotechnol. - 2014. – Vol. 10. N. 12. – P. 3431-3461.

60. Cordelio-Spinetti E. Human bone marrow mesenchymal progenitors: perspectives on an optimized in vitro manipulation / [E. Cordelio-Spinetti, W. de Mello, L. S. Trinilale et al.] // Frontier in Cell and Developmental Biology. – 2014. - Vol.2. - P. 1-8.

61. Review: ex vivo engineering of living tissues with adult stem cells / B. Barrileaux, D.G. Phinney, D.J. Prockop, K.C. O'Connor // Tissue engineering. – 2006. – Vol. 12. – N. 11. – P. 3007-3019.

62. Grantwohl F. Nerds of hematopoietic stem cell transplantation in third millennium / F. Grantwohl // Curr. opin. Hematol. – 2009. – N. 16. – P. 420-426.

63. Recovery of regional but not global contractile function by the direct intramyocardial autologous bone marrow transplantation: results from a randomized controlled clinical trial / [M. Hendrikx, K. Hensen, C. Clijsters et al.] // Circulation. – 2006. – Vol. 114 (Suppl. 1). – P. 101-107.

64. Гетерогенность популяции базальных кератиноцитов в культуре. Стволовые и прогениторные клетки / Е. А. Воротеляк, А. В. Васильев, Е. Б. Цитрин // Цитология. – 2004. – Т. 46. - №10. – С. 904-905.

65. Genetically engineered mesenchymal stem cells: The ongoing research for bone tissue engineering. / D. Hong, H.X. Chen, R.S. Ge, J.C. Li // Anat. Rec. (Hoboken). 2010. - Vol. 293. - № 3. - P. 531-537.

66. Jackson W. M. Potential therapeutic applications of muscle-derived mesenchymal stem and progenitor cells. / W. M. Jackson, L. J. Nesti, R. S. Tuan // Expert opinion on biological therapy. – 2010. – Vol. 10. N.4. – P.505-517.

67. Юхта М. С. К вопросу о применении клеточной терапии при дегенеративно-дистрофическом повреждении межпозвонковых дисков. / М. С. Юхта, В. И. Грищенко // Вісник ортопедії, травматології та протезування. – 2010. – №4(67). – С. 70-75.

68. Myocardial regeneration therapy for heart failure: hepatocyte growth factor enhances the effect of cellular cardiomyoplasty / [S. Miyagawa, Y. Sawa, S. Taketani et al.] // Circulation. - 2002, - Vol. 105. – P. 2556-2561.

69. Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: eighteen months follow, up data from the randomized, controlled BOOST (Bone marrow \ transfer to enhance ST-elevation infarct regeneration) trial / [G.P. Meyer, K.C. Wollert, J. Lotz et al.] // Circulation. - 2006. -Vol. 113. - P. 1287-1294.

70. Стромальные клетки костного мозга, жировой ткани и кожи человека в ходе экспансии проявляют 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.

71. Mesenchymal stem cells: Molecular characteristics and clinical applications / [F. Rastegar, D. Shenaq, J. Huang et al.] // World J Stem Cells. 2010. Aug 26. – N. 2(4). – P. 67–80.

72. Comprehensive phenotypic characterization of human adipose-derived stromal/stem cells and their subsets by a high throughput technology. / [Baer PC, Kuci S, Krause M, et al] // Stem Cells Dev. – 2013. – N.22. – P. 330-339.

73. Корочкин Л. И. Стволовые клетки в биологии и медицине. / Л. И. Корочкин. // Вестник эстетической медицины. – 2005. – №1. – С. 9–18.

74. Репин В. С. Эмбриональные стволовые клетки: фундаментальная биология и медицина / В. С. Репин, А. А. Ржанинова, Д. А. Шамянков. – М.: "Ремертекс", 2002. – 225 с.

75. Odorico J.S. Multilineage differentiation from human embryonic stem cell lines / J.S. Odorico, D.S. Kaufman., J.A. Thomson // *Stem Cells*. – 2001. – Vol.19. – P. 193—204.

76. Isolation and characterization of human amniotic mesenchymal stem cells and their chondrogenic differentiation. / [M. Nogami, H. Tsuno, C Koike et al.] // *Transplantation*. - 2012. – Vol. 93, N. 12 - P. 1221-1228.

77. Петровский Я.Л. Сравнительная характеристика мезенхимальных стромальных клеток костного мозга, жировой ткани и плаценты человека: Автореф. дис. на соискание науч. степени канд. мед. наук. / Петровский Я. Л. – Новосибирск, 2009. – 19 с.

78. Культура високого ступеня щільності мезенхімальних клітин скелетогенних тканин ембріонів щурів / [С. В. Малишкіна, Я. В. Дєдх, І. В. Бадрадінова та ін]. // *Укр. Морфолог. журн.* - 2003. - № 1. - С. 23-29.

79. Шумаков В. И. Клеточная трансплантация в современной медицине. / В. И. Шумаков, Н. Л. Онищенко. // *Патологическая физиология и экспериментальная медицина*. – 2004. – №4. – С. 23–25.

80. Noel D. Cells specific different between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials / [D. Noel, D. Caton, S. Roche et al.] // *Experimental cell research*. – 2008. – Vol. 314, N. 7. – P. 1575-1584.

81. Петренко А. Ю. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения / А. Ю. Петренко, Ю. А. Хунов, Э. И. Иванов. – Луганск: Пресс-Экспресс, 2011. – 368 с.

82. Mesenchymal pre cursor cells in the blood of normal individuals/ [N. J. Zvaifler, L. Marinova-Mutafchieva, G. Adams et al.] // *Arthritis Res*. – 2000. – Vol. 2. – P. 477–488.

83. Волков А. В. Тканевая инженерия: новые перспективы развития медицины. / А. В. Волков. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2005. – №1. – С. 59–63.

84. Смирнова С. А. Определение количества жизнеспособных CD34+ гемопоэтических стволовых клеток пуповинной крови после замораживания / С. А. Смирнова, А. Б. Смолянинов. // Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения: Труды 8-й Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участ. – 2013 – Т. 8, часть 2. – С. 695.

85. Использование низких температур для хранения биологических продуктов: две концепции криохранения пуповинной крови / [А. Б. Смолянинов, Д. А. Иволгин, Ш. М. Багаутдинов и др.] // Вестник МАХ – 2013. – №3. – С. 18–21.

86. Юхта М.С. Досвід застосування мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин для відновлення дегенеративно-дистрофічних пошкоджень міжхребцевих дисків в експерименті / М.С. Юхта, Н.О. Волкова// Вісник ортопедії, травматології та протезування. – 2013. – №2. – С. 29–32.

87. Первый опыт клинического применения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга для восстановления сократительной функции миокарда. / [В. И. Шумаков, Э. Н. Казаков, Н. Л. Онищенко и др.] // Рос. кардиол. Журн. – 2003. – №5. – С. 42–50.

88. Оцінка впливу аутологічних клітинних культур на відновлення дегенеративно пошкодженого сухожилля в експерименті / [О. О. Коструб, В. І. Грищенко, Р. І. Блонський и др.] // Вісник ортопедії та протезування. – 2011. – № 2. – С. 10–12.

89. Bosch P. Isolation, characterization, gene modification and nuclear reprogramming of porcine mesenchymal stem cells / P. Bosch, Pratt S.L., S.L. Stice // Biol Reprod. – 2006. – Vol. 74. – P. 46-57.

90. Исследование иммуномодулирующих свойств мезенхимальных стволовых клеток человека *in vitro* / [А. А. Айзенштадт, В. В. Багаева, О. В. Супильникова и др.] // Здоровье - основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения: Труды 8-й Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием. – 2013 – Т. 8. часть 2. – С. 659–661.

91. Application of multipotent mesenchymal stromal cells in pediatric patients following allogeneic stem cells transplantation / [I. Miller, S. Kordowicych, C. Holzwarth et al.] // *Blood cells, molecules and diseases*. – 2008. – Vol. 40. N.1. – P. 25-32.
92. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm: Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype / R. A. Waterman, S. L. Tomchuck, S. L. Henkle, A. M. Betancourt // *Plos one*. – 2010. – Vol. 5. N. 4. – P. 1-14.
93. Le Blanc K. Mesenchymal stromal cells: Tissue repair and immune modulation. / K. Le Blanc // *Cytotherapy*. – 2006. – Vol. 8. N. 6. – P. 559-561.
94. Bischoff D.S., Constitutive expression of human telomerase enhances the proliferation potential of human mesenchymal stem cells. / D.S. Bischoff, Makhijani N. S., Yamaguchi D. T. // *Biores Open Access*. – 2012. – Vol. N. 6. – P. 273–279.
95. Коррекция миелосупрессии у крыс с помощью имплантации матриксов, несущих мезенхимальные стволовые клетки / [Н. Г. Абдулкина, К. В. Зайцев, И. А. Хлусов и др.] // *Медицина и образование*. – 2014. – № 6 – С. 87–94.
96. Moroni L. Human mesenchymal stem cells: a bank perspective on the isolation? Characterization and potential of alternative sources for the regeneration of musculoskeletal tissues / L. Moroni, P.M. Fornasari // *Journal of cellular physiology* – 2013. – Vol.228. N.4. - P.680-687.
97. Reconstruction of osteochondral defects with a stem cell-based cartilage-polymer construct in a small animal model. / [A. Berner, S. Siebenlist, J.C. Reichert et al.] // *Z. Orthop. Unfall*. 2010. – Vol. 148. – N. 1. – P. 31–38.
98. Regeneration of large bone defects in sheep using bone marrow stromal cells / [P. Giannoni , P. Mastrogiacomo, M. Alini et al] // *J. Tissue Eng. Regen. Med*. – 2008. – Vol. 2. – P. 253-262.
99. Cao Y. Human adipose tissue- derived stem cells differentiate into endothelial cells in vitro and improve postnatal neovascularization in vivo / Y. Cao,

Z. Sun, L. Liao // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2005. – Vol. 332. N. 2. – P. 370–379.

100. Gimble J.M. *Adipose-Derived Stem Cells for Regenerative Medicine* / J.M. Gimble., J. KatzA, B.A. Bunnell // *Circulation Research.* – 2007. – Vol. 100. N. 9. – P. 1249–1260.

101. Spontaneous Cardiomyocyte differentiation from adipose tissue stroma cells/ [V. C. Planat-Benard, C. Menard, M. Andre et al.] // *Circ Res.* – 2004. – Vol. 94. N. 2. – P. 223–229.

102. Schaffler A. Concise Review: Adipose tissue-derived stromal cells - basic and clinical implications for novel cell-based therapies / A. Schaffler, C. Buchler // *Stem Cells.* – 2007. – Vol. 25. – P. 818-827.

103. Synovium-derived mesenchymal stem cells: a new cell source for musculoskeletal regeneration / [J. Fan, R. R. Varshney, L. Ren et al.] // *Tissue engineering. Part B, Reviews.* - 2009 - Vol. 15, N.1. – P. 75-86.

104. Maffulli N. *Tendon injuries. Basic science and clinical medicine.* / Maffulli N., Renstrom P., Leadbetter W.B. // London Limited: Springer Verlag, 2005. - 332 p.

105. Применение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в лечении повреждений ахиллова сухожилия / [А.М. Савинцев, О.М. Дегтярев, Л.А. Матвеев и др.] // *Здоровье - основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения: Труды 8-й Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием* – 2013 – Т. 8, часть 1 – С. 506–507.

106. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. / G. Chamberlain, J. Fox, B. Ashton, J. Middleton // *Stem Cells.* – 2007. – Vol. 25. N 11. – P. 2739-2749.

107. Favorable response to human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in steroid-refractory acute graft-versus-host disease. / [B. Fang, Y. Song, L. Liao et al.] // *Transplantation Proceedings.* – 2007. – Vol. 39 – P. 3358-3362.

108. Using human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells as salvage therapy for hepatic graft-versus-host disease resembling acute hepatitis. / [B. Fang, Y. Song, R.C. Zhao et al.] // *Transplantation Proceedings*. – 2007. – Vol. 39. – P. 1710-1713.

109. Emerging therapy for improving wound repair of severe radiation burns using local bone marrow-derived stem cell administrations / [E. Bey, M. Prat, P. Duhamel et al.] // *Wound repair and regeneration: official publication of the Wound Healing Society and European Tissue Repair Society*. – 2010. – Vol. 18. N.1. – P. 1187-1194.

110. Савинцев А. М. Применение аутологичных мезенхимальных стволовых клеток жировой ткани в комплексном лечении переломов проксимального отдела бедренной кости / А. М. Савинцев, А. В. Малько, В. В. Багаева // *Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения: Труды 8-й Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием*. – 2013. - Т. 8. часть 1. - С. 507–508.

111. Potential applications for using stem cells in spine surgery. / [T. Goldschlager, G. Jenkin, P. Ghosh et al.] // *Curr. Stem Cell. Res. Ther.* – 2010. – Vol. 5. N. 4. – P. 345-355.

112. Chanda D. Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton. / D. Chanda, S. Kumar, S. Ponnazhagan // *J. Cell Biochem.* – 2010. – Vol. 111. N. 2. – P. 249–257.

113. David J. P. Mesenchymal stem cells in arthritis. / J. P. David, J. Zwerina, G. Schett. // *Zeitschrift fur Rheumatologie*. – 2009. – Vol. 68. N 3. – С. P. 228–233.

114. Dehne T., Tschirschmann M., Lauster R., Sittering M. Regenerative potential of human adult precursor cells: cell therapy an option for treating cartilage defects? / Dehne T., Tschirschmann M., Lauster R., Sittering M. // *Zeitschrift fur Rheumatologie*. – 2009. – Vol. 68. N. 3. – P. 234–238.

115. Cartilage engineering from mesenchymal stem cells. / [C. Goepfert, A. Slobodianski, A. F. Schilling et al.] // *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* – 2010. N. 123. – P. 163-200.

116. Cao Q. Stem cell repair of central nervous system injury / Q. Cao, R. L Benton, S. R. Whittmore // J. Neurosci. Res. – 2002. – N. 68. – P. 501–510.

117. Subcutaneous Transplantation of Neural Precursor Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Reduces Chemotactic Signals in the Central Nervous System. / [Ravanidis S, Poulatsidou KN, Lagoudaki R. et al.] // Stem Cells Transl Med. – 2015. - Epub ahead of print.

118. Clines G.A. Prospects for osteoprogenitor stem cells in fracture repair and osteoporosis. // Curr. Opin. Organ. Transplant. 2010. - Vol. 15. - № 1. - P. 73-78.

119. Superior therapeutic potential of yong bone marrow mesenchymal stem cells by direct intramyocardial delivery in aged recipients with acute myocardial infraction: in vitro and in vivo investigation. / [M. Nayan, A. Paul, G. Chen et al.] // Journal of Tissue Engineering. – 2011. – Vol.35. N.3 – P. 17.

120. Intravenous administration of auto serum-expanded autologous mesenchymal stem cells in stroke / [O. Honmou, K. Houkin, T. Matsunaga et al.] // Brain: a jornmal of neurolology. – 2011. – Vol. 134. N.6. – P.1790–1807.

121. Mesenchymal stem cells help pancreatic islet transplantation to control type 1 diabetes / Figliuzzi M, Bonandrini B, Silvani S, Remuzzi A. // World J Stem Cells. – 2014. – Vol. 6. N. 2. – P. 163–172.

122. Dave S. Mesenchymal stem cells derived *in vitro* transdifferentiated insulin-producing cells: A new approach to treat type 1 diabetes / S. Dave // Adv Biomed Res. – 2014. 3: 266.

123. Liu M. Mesenchymal stem cells: biology and clinical in type 1 diabetes therapy. / M. Liu, ZC. Han // Journal of cellular and molecular medicine. – 2008. – Vol. 12. N.4. – P. 1155–1168.

124. Аскарлов М. Б. Коррекция цитокинового дисбаланса и стимуляция регенерации длительно незаживающих аутоиммунных язв желудка при трансплантации стромальной фракции клеток аутологичного костного мозга / М. Б. Аскарлов, И. Е. Трубицына, Н. А. Онищенко // Патол. физиология и эксперим. терапия. – 2008. – № 4. – С. 26–28.

125. Improvement of liver function in liver cirrhosis after autologous mesenchymal stem cells injection: a phase I-II clinical trial / [P. Kharaziha, P.M. Yellstron, B. Noorinayer et al.] // European journal of gastroenterology and hepatology. – 2009. - Vol. 21. N.10. – P.1199-1205.

126. In Vitro Differentiation of Human Liver-derived Stem Cells with Mesenchymal Characteristics into Immature Hepatocyte-like Cells / [J.-H. Lee, H.-J. Park, I.K. Jang et al.] // Transplantation Proceedings, - 2014. - Vol. 46, Issue 5. - P. 1633–1637.

127. Autologous bone marrow mesenchymal stem cells transplantation in liver failure patients caused by hepatitis b: short-term outcomes / [L. Peng, D. Xie, B.L. Lin et al.] // Hepatology. – 2011. – Vol. 54. N.3. – P.820-828.

128. Safety and immunological effects of mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis and amyotrophic lateral sclerosis / [D. Karussis, C. Karageorgiou, A. Vaknin-Dembinske et al.] // Arch. Neurol. – 2010. – Vol. 67 N. 10. – P. 1187-1194.

129. Autologous mesenchymal stem cells for the treatment of secondary progressive multiple sclerosis: an open-label phase 2a proof-of-concept study. / [P. Connick, V. Kolappan, C. Crawley et al.] // Lancet Neurol. – 2012. – Vol. 11. N. 2. – P. 150-156.

130. Selection of optimal passage of bone marrow-derived mesenchymal stem cells for stem cell therapy in patients with amyotrophic lateral sclerosis. / [M. R. Choi, H.Y. Kim, J.Y. Park et al.] // Neuroscience letters. – 2010. – Vol. 472. N.2. – P. 94-98.

131. Новицкий М. В. Регенеративная терапия аутологичными стволовыми клетками при рассеянном склерозе / М. В. Новицкий, А. Б. Смолянинов // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2013 – Том 8, № 2. – С. 685 – 687.

132. Hirsch A. Intracoronary infusion of autologous mononuclear bone marrow cells or peripheral mononuclear blood cells after primary percutaneous coronary intervention: rationale and design of the HEBE trial--a prospective,

multicenter, randomized trial. / [A. Hirsch, R. Nijveldt, P. A. van der Vleuten et al.] // *Am. Heart. J.* – 2006. – Vol. 152. N. 3. – P. 434-441.

133. Adult bone marrow cell therapy improves survival and induces long-term improvement in cardiac parameters: a systematic review and meta-analysis. / [V. Jeevanantham, M. Butler, A. Saad et al.] // *Circulation.* - 2012. - Vol. 126. N. 5. - P. 551-568.

134. Current and future applications for stem cell therapies in spine surgery. / [T. Goldschlager, D. Oehme, P. Ghosh. et al.] // *World J Stem Cells.* – 2013. – Vol. 8. N. 5. – P. 381-393.

135. Mesenchymal stem cell tracking in the intervertebral disc. / [C.Handley, T. Goldschlager, D. Oehme et al.] // *World J Stem Cells.* – 2015. – Vol. 7. N. 1. – P. 65-74.

136. Phase i trial: the use of autologous cultured adipose-derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. / [A. Bura, V. Planat-Benard, P. Bourin et al.] // *Cytherapy.* – 2014. – Vol. 16. N. 2. – P. 245-257.

137. Сергеев В.С. Иммунологические свойства мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. / В. С. Сергеев. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* – 2005. – №2. – С. 39–42.

138. Bagaeva, V. Regenerative Medicine and Cell Technologies in Stem Cells Bank Pokrovsky / V.Bagaeva, A.Aiezenshtadt, A. Smolyaninov // 2014 International Regenerative Medicine Conference. April 9-10, 2014 Brno, Czech Republic. – 2014. – P. 42.

139. Сергеев В.С. К механизму иммуносупрессивной активности мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга / В. С. Сергеев. // *Гены и клетки.* – 2007. – №2. – С. 17-18.

140. “In vitro” and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulation identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and in the derived mesenchymal stem cells. / [G. Astori, F. Viqnati, S. Bardelli et al.] // *Journal of translational medicine.* – 2007. – Vol. 5. - P.55.

141. Дифференцировка мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из костного мозга и подкожно-жировой клетчатки, в клетки костной ткани / [А. С. Тепляшин, М. С. Ростовская, И. П. Савченкова и др.] // Цитология. – 2008. – Т.50. - №10, С. 855-860.

142. Surface protein expression between human adipose tissue-derived stromal cells and mature adipocytes. / [F. Festy, L. Hoareau, S. Bes-Houtmann et al.] // Histochem Cell Biol. – 2005. – Vol. 124. N.2. – P. 113-121.

143. Савченкова И. П. Изменение экспрессии интегринов мультипотентными мезенхимными стромальными клетками, выделенными из подкожно-жировой ткани человека, при длительном культивировании / И. П. Савченкова, Е. А. Савченкова // Цитология. - 2014.- № 8.-С. 574-580.

144. Стромальные клетки жировой ткани - пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом / Е. В. Парфенова, В. А. Ткачук, Д. О. Трактуев, К. Л. Марч. // Цитология. – 2006. – №2. – С. 83–94.

145. Коржикова С. В. Подкожно-жировая ткань человека, подвергнутая низкотемпературному шоку, как источник жизнеспособной клеточной популяции с характеристиками мультипотентных мезенхимных стромальных клеток / С. В. Коржикова, И. П. Савченкова // Цитология. 2010. - № 8. - С.621-627.

146. Vascularization mediated by mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue: a comparison. / K. Pill, S. Hofmann, H. Redl, W. Holnthoner // Cell Regen. – 2015. Vol. 23. N.4. P. 8.

147. Bochlev I. Mesenchymal stem cells from human bone marrow or adipose tissue differently modulate mitogen-stimulated B-cell immunoglobulin production in vitro. / [I. Bochlev, G. Elmadijian, D. Kyurkchiev et al.] // Cell biology international. - 2008. – Vol. 32. N. 4. – P. 384-393.

148. Кирик В. М. Стволовые клетки из жировой ткани: основные характеристики и перспективы клинического применения в регенеративной

медицине (обзор литературы). / В.М. Кирик, Г.М. Бутенко // Журнал НАМН Украины. – 2010. – Т. 16. № 4. – С. 576-604.

149. Mesenchymal stem cells from the oral cavity and their potential value in tissue engineering / Antonio R. Sanz, Flavio S. Carrión, Alejandra P. Chaparro // Periodontology 2000. – 2015. - Vol. 67. No. 10. –P. 251-267.

150. Katz A. J. Cell surface and transcriptional characterization of human adipose-derived adherent stromal (hADAS) cells. / Katz A. J., Tholpady A., Tholpady S. S. et al. // Stem Cells. – 2005. – Vol. 23. N. 3. – P. 412-423.

151. Zuk P.A. Human adipose tissue is source of multipotent stem cells / [P.A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian et al.] / Molecular Biology of the Cell. – 2002. – Vol.13. N.12. – P. 4279-4295.

152. Enhancement of bone regeneration by gene delivery of BMP2/Runx2 bicistronic vector into adipose-derived stromal cells. / [Lee S.J., Kang S.W., Do H.J. et al.] // Biomaterials. 2010. – Vol. 31. – № 21. – P. 5652-5659.

153. Adipose stromal cells stimulate angiogenesis via promoting progenitor cell differentiation, secretion of angiogenic factors, and enhancing vessel maturation. / [K. Rubina, N. Kalinina, A. Efimenko et al.] // Tissue Eng Part A. – 2009 Vol. 15. N. 8. – 2039-2050.

154. Використання аутологічних мезенхімальних стовбурових клітин при травматичних пошкодженнях суглобового хряща (експериментальне дослідження) / [Гайко Г. В., Коструб О. О., Грищенко В. І. та ін.] // Вісник ортопед. травматол. та протезув. – 2008. – №1. – С. 5-9.

155. Порівняння травматичного і компресійного методів моделювання дегенеративно-дистрофічних ушкоджень міжхребцевих дисків в експерименті / [Юхта М. С., Волкова Н. О., Гончарук О. І. та ін.] // Вісн. проблем біології і медицини. – 2011. - №1. – С. 227-232.

156. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells influence early tendon-healing in a rabbit achilles tendon model. / [Chong A. K., Ang A.D., Goh J.C. et al] // J Bone Joint Surg Am. – 2007. – Vol. 89. – P. 74-81.

157. Strauer B. E. The therapeutic potential of stem cells in heart disease / B. E. Strauer, M. Brehm, C. M. Schannwell // *Cell Prolif.* – 2008. – V. 41. – P. 126-145.

158. Strauer B. 10 years of intracoronary and intramyocardial bone marrow stem cell therapy of the heart: from the methodological origin to clinical practice / B. Strauer, G. Steinhoff // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2011. – Vol. 58. N. 11. – P. 1095-1104.

159. Эффективность использования аутологичных мононуклеаров костного мозга в лечении больных с ишемической болезнью сердца / [В. М. Седов О.Г. Зверев, Б.В. Афанасьев и др.] // *Вестник хирургии* – 2006. – №4. – С. 11-14.

160. Влияние клеточной трансплантации на течение хронической сердечной недостаточности у больных с ишемической болезнью сердца / [В. К. Гринь, А. Г. Попандопуло, М. В. Петрова и др.] // *Медицина сьогодні і завтра.* – 2011. – №1-2 (50-51) – С.52-56.

161. Effect of intramyocardial injection of autologous bone marrow-derived mononuclear cells on perfusion, function, and viability in patients with drug-refractory chronic ischemia. / [S. L. Beers, J. J. Wax, P. Dibbets et al.] // *J. Nucl. Med.* – 2006. – Vol. 47. – P. 574-580.

162. Аутологічні стовбурові клітини у лікуванні хронічної серцевої недостатності ішемічної етіології / В. К. Гринь, А. Г. Попандопуло, О. М. Денисова, Н. В. Сергієнко // *Сучасні медичні технології.* – 2011. - № 3-4. – С. 93-97.

163. Использование системной трансплантации «кардиомиобластов», полученных из мезенхимальных стволовых клеток аутогенного костного мозга, при комплексной терапии больных хронической сердечной недостаточностью / [А. Ф. Цыб А. Г. Коноплянников, М. А. Каплан и др.]. // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия.* - 2009. – Том IV. № 1. - С. 78-84.

164. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights

from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging. / [M. B. Britten., N. D. Abolmaali., B. Assmus et al.] // *Circulation*. - 2003. - № 108. - P. 2212-2218.

165. Nicol S. Mobilization of stem cells in cardiovascular disease. Improvement of vascularization, cardiac function and arrhythmias / S. Nicol, M. Kuhlmann // *Med. Klin. (Munich)*. - 2006. - Vol. 101 (Suppl. 1). - P. 190-192.

166. Демин Ю. А. Современные тенденции развития клеточных технологий в лечении нейроретинопатий / Ю. А. Демин // *Международный медицинский журнал*. – 2013. – № 1. – С. 60-62.

167. Potential role of induced pluripotent stem cells (IPSCs) for cell-based therapy of the ocular surface. / Casaroli-Marano RP, Nieto-Nicolau N, Martínez-Conesa EM et al. // *J Clin Med*. – 2015. Vol. 4. N. 2. – P. 318-342.

168. Восстановление дефектов роговицы с помощью тканевой инженерии / [А. В. Васильев, П. В. Макаров, О. С. Роговая и др.] // *Известия АН. Серия биол.* - 2005. - № 32. - С. 5-8.

169. Holland E. J. Management of aniridic keratopathy with keratolimbic allograft: a limbal stem cell transplantation technique. / E. J. Holland, A. R. Djalilian, G. S. Schwartz // *Ophthalmology*- 2003. - Vol. 110 - P. 125-130.

170. Ramaesh K. Ex vivo expansion of corneal limbal epithelial/stem cells for corneal surface reconstruction / K. Ramaesh, B. Dhillon // *Eur J. Ophthalmol*. – 2003. - Vol. 13. - P. 515-524.

171. Zhao X. Adult corneal limbal epithelial: a model for studying neural potential of nonneural stem cells/progenitors / X. Zhao, A. V. Das, W. B. Thorson [et al] // *Dev Biol*.- 2002,- № 250,- P. 317-331.

172. Tissue engineering in dentistry. / [E.A. Abou Neel, W. Chrzanowski, V. M. Salih et al.] // *J Dent*. 2014 Vol. 42. N. 8. – P. 915-928.

173. Байдик О.Д. Тканевая инженерия в стоматологии / О.Д. Байдик М. А. Титаренко, П. Г. Сысолятин // *Стоматология*. - 2015. – Т. 94. №2 – С.65 -68.

174. Seo B.M., Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament / [B.M. Seo, M. Miura, S. Gronthos et al.] // *Lancet*. – 2004. - Vol 364. - P. 149-155.

175. Tobita M. Periodontal tissue regeneration with adipose-derived stem cells / [M. Tobita, A.C. Vysal, R Ogawa, H. et al.] // *Tissue Eng Part A*. - 2008. - Vol. 14. –P. 945-953.

176. A tissue engineering approach for periodontal regeneration based on a biodegradable double-layer scaffold and adipose-derived stem cells. / JF Requicha, CA Viegas, F Muñoz et al. // *Tissue Eng Part A*. -2014. - Vol. 20. – P. 2483-2492.

177. In vivo bone formation by human bone marrow stromal cells: reconstruction of the mouse calvarium and mandible / [M.H. Mankani, S.A. Kuznetsov, R.M. Wolfe et al.] // *Stem Cells*. – 2006. – Vol. 24. – P. 2140 - 2149.

178. Mesenchymal progenitor cells in adult human dental pulp and their ability to form bone when transplanted into immunocompromised mice. / [S. Otaki, S. Uesbima, K. Shiraishi et al. // *J Cell Biol. int.* – 2007 - Vol. 31. N. 10. - P. 1191-1197.

179. Fabrication of vascularized bone grafts of predetermined shape with hydroxyapatite-collagen gel beads and autogenous mesenchymal stem cell composites / [S.H. Chang, K. K. Tung, Y. J. Wang et al.] // *Plats Reconstruct Surg.* - 2010; Vol. 125, N 5: P 1393-1402.

180. Burkhardt R. Coverage of localized gingival recessions: Comparison of micro- and macrosurgical techniques. / R. Burkhardt, N. P. Land // *Journal of Clinical Periodontology*. – 2005. – № 32. – P. 287-293.

181. In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells / [T. Nakahara, T. Nakamura, E. Kobayashi et al.] // *Tissue Eng*. – 2004. – Vol. 10. – P. 537 - 544.

182. Nakashima M. The application of bone morphogenetic protein to dental tissue engineering. / M. Nakashima, A. H. Reddi // *Nat. Biotechnol.* - 2003. - № 21. - P.1025-1032.

183. Newly established cell lines from mouse oral epithelium regenerate teeth when combined with dental mesenchyme. / [C. Takahashi, H. Yoshida, A. Komine et al. // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* – 2010. Vol. 46. N. 5. - P. 457-464.

184. Cell sheet engineering and other novel cell-based approaches to periodontal regeneration / [I. Ishikawa, I. Takanori, W. Raoru el al.] // Periodontology 2000. – 2009. - Vol. 51. – P. 220-238.

185. Tziafas D. Differentiation potential of dental papilla, dental pulp, and apical papilla progenitor cells. / D. Tziafas, K. Kodonas // J Endod. - 2010 - Vol. 36(5) -P. 781-789.

186. Алексеева И.Е. Восстановление костной ткани после удаления зубов при использовании тканеинженерной конструкции на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани / И.Е. Алексеева, А. А. Кулаков, Д. В. Гольдштейн, А. В. Волков // Стоматология. - 2012. - №4. – С. 32—35.

187. Stem cell properties of human dental pulp stem cells. / [S. Gronthos, J. Brahim, W. Li et al.] // J Dent Res. - 2002. - Vol. 81. - P. 531-535.

188. Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. / [T. Yamaza, A. Kentaro, C. Chen et al.] // Stem Cell. Res. Ther. 2010. - Vol. 1. - № 1. - P. 5.

189. Влияние аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения на регенерацию поврежденной кости нижней челюсти крыс / [И. В. Майбородин, В. А. Матвеева, И. С. Колесников и др.] // Стоматология, 2012, №1, С. 5-8.

190. Оценка роста нового зубодесневого прикрепления после аутотрансплантации стромальных клеток, выделенных из жировой ткани / М. Д. Перова, А. В. Фомичева Е. Л. Фомичева, В. Б. Карпюк // Пародонтология. - 2006. - №4. – P. 28-31.

191. Возможности использования стволовых стромальных клеток в регенерации тканей пародонта и их взаимодействие с тканевым микроокружением / [М. Д. Перова, М. Г. Шубич, В. Б. Карпюк и др.] // Морфология. - 2007. – № 3. – С. 7-15.

192. Комплексная терапия хронического генерализованного пародонтита и периимплантита с применением мобилизованных аутологичных стволовых

клеток / [А. Б. Смолянинов, А. К. Иорданишвили, Д. А. Кириллов и др.] // «Проблемы геронтологии и гериатрии - 2006». Материалы III региональной научно-практической конференции РАН в Северо-Западном Федеральном округе. - Сыктывкар, 2006. - С. 21-22.

193. Способ прогнозирования течения пародонтита и периимплантита на основе динамики количества стволовых клеток / [А. Б. Смолянинов, А. К. Иорданишвили, Д. А. Кириллов и др.] // «Проблемы геронтологии и гериатрии - 2006». Материалы III региональной научно-практической конференции РАН в Северо-Западном Федеральном округе. - Сыктывкар. - 2006. - С. 22-23.

194. Боброва Н. А. Использование мезенхимальных стволовых клеток для восстановления межкорневых перегородок при хроническом пародонтите. / [Н.А. Боброва, Л.Я. Богашова, И.П. Яринич-Бучинская и др.] // Журн. АМН України. - 2010. - №16, - С. 27-28.

195. Дмитриева Л.А. Современные аспекты клинической пародонтологии. / Л. А. Дмитриева. - М.: Медпресс, 2001. - 128 с.

196. Яринич-Бучинська Н. И. Клініко - експериментальні обґрунтування застосування аутологічних клітин крові в комплексному лікуванні хронічного генералізованого пародонтиту: автореф. дис. на здобуття наук. ступеня канд. мед. наук : спец. 14.01.22 / Яринич-Бучинська Н. И. - Полтава, 2008. - 19 с.

197. Кауламбаева М. Р. Экспериментальное обоснование применения аутологичных стволовых клеток костного мозга для лечения костных дефектов и генерализованного пародонтита. / М. Р. Кауламбаева // Материалы Всероссийской научной школы - конф. для молодежи «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования». - 2009. - С. 29-30.

198. Чаусская И.Ю. Применение композиции аутогенных стромальных клеток и гидроксиапатита для восстановления объема альвеолярного отростка / части верхней и нижней челюстей. / И.Ю. Чаусская, А.Ю. Дробышев, К.А.

Рубина // Сборник тезисов 4-го Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии». СПб: Изд-во «Человек и его здоровье». - 2010. – С. 334.

199. Клиническое исследование применения тканеинженерной конструкции на основе аутологичных стромальных клеток из жировой ткани у пациентов с дефицитом костной ткани в области альвеолярного отростка верхней челюсти и альвеолярной части нижней челюсти / [А. Ю. Дробышев, К. А. Рубина, В. Ю. Сысоева и др.] // Вестник экспериментальной и клинической хирургии. - 2011. - Том 4. № 4. - С. 767-775.

200. 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 / [И. С. Алексеева, А. В. Волков, А. А. Кулаков и др.] // Материалы Всеросс. науч. школы-конф. для молодежи «Аутологичные стволовые клетки: экспериментальные и клинические исследования. – 2009. – С. 53.

201. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report / [S. Lendeckel, A. Jödicke, P. Christophis et al.] // J Craniomaxillofac Surg. - 2004. –Vol. 32. – P. 370—373.

202. Актуальные проблемы теоретической и клинической остеоартрологии. / Ю. И. Денисов-Никольский, С. П. Смирнов, Н. П. Омеляненко, Н. П. Матвейчук. – М., 2005. – 178 с.

203. Стромальные мезенхимальные клетки - источник создания костной ткани для повышения эффективности дентальной имплантации / [Ф. Ф. Лосев, А. И. Воложин, Т. Ю. Татаренко-Козьмина и др.] // Росс. вестн. дент. имплантол. - 2005. - № 1/2 (9/10). - С.38-43.

204. Цаллагов А. К. Стоматологическая ортопедическая реабилитация больных после направленной регенерации костной ткани альвеолярного гребня челюстей биоконпозиционным материалом: автореф. дисс. на соискание науч. степени канд. мед. наук : спец. 14.00.21 / Цаллагов А. К. – М., 2006. – 20 с.

205. Somatic stem cells for regenerative dentistry. / [C. Morsezeek, G. Schmaiz, Th.Reichert et al.] // Clin Oral Investig. – 2008. – Vol. 12 (2). – P. 113-118.

206. Reconstructing mandibular defects using autologous tissue-engineered tooth and bone constructs. / [I. H. Abukawa, W. Zhang. C.S. Young et al.] // J. Oral Maxillofac Surg. – 2009. - Vol. 67(2). - P. 335-347.

207. Спосіб направленої регенерації кісткової тканини у стоматології / [В. І. Грищенко, В. І. Куцевляк, В. Ф. Куцевляк та ін.] // Методичні рекомендації. - 2012. - 16 с.

208. Bioluminescence imaging of calvarial bone repair using bone marrow and adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. / [I.R. Décano, M. Vilalta, J.R. Bagó et al.] // Biomaterials. - 2008. – Vol. 29. – N. 4. - P. 427-437.

209. Иммунофенотипическая характеристика биоинженерных аутотрансплантатов применяемых для восстановления тканей пародонта / [И. П. Кайдашев, П. Н. Скрипников, А. А. Богашова и др.] // Современная стоматология. – 2008. – № 4. – С. 60-63.

210. Куцевляк В. І. Віддалені результати направленої регенерації кісткової тканини в пародонтології і імплантології із застосуванням аутологічних стовбурових клітин / В. І. Куцевляк, В. Ф. Куцевляк // Східноєвропейська конференція з проблем стоматологічної імплантології «Якість життя та імплантологія» присвячена 10-річчю Асоціації імплантологів України, Львів, 12-14 березня 2009 р.

211. Применение геля гидроксипропилцеллюлозы в качестве клеточного носителя для трансплантации культивированных аллофибробластов на обширные раневые поверхности / [А. С. Хрупина, Ю. В. Юркевич, А. Б. Смолянинов и др.] // Здоровье — основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения: Труды 8-й Всерос. науч.-практ. конф. с междунар. участием – 2013. - Т. 8, часть 2 - С. 698–701.

212. Куцевляк В.І. Віддалені результати застосування аутологічних стовбурових клітин в імплантології і пародонтології / В. І. Куцевляк,

В. Ф. Куцевляк // Имплантология, пародонтология, остеология. – 2009. - №3 (15). - С. 54-56.

213. Устранение критических костных дефектов с помощью биоинженерной конструкции на нерезорбируемой полимерной основе с использованием аутогенных мультипотентных стромальных клеток из жировой ткани. / [А.А.Кулаков, А.С Григорян, Е.В. Киселева и др.] // Стоматология. - 2010. – № 3. Р. 9-12.

214. Заживление костного дефекта в челюсти кроликов под влиянием ксеногенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, культивированных на титановых носителях. / [А. С. Григорьян, Е. Н. Фролова, Н. Н. Мальгинов и др.] // Рос. стомат. журн. – 2008. - №3. - С. 12 - 14.

215. Свойства мезенхимальных стромальных клеток человека при инкапсуляции в альгинатные микросферы. / А. И. Правдюк, Ю. А. Петренко, Н. А. Волкова, А. Ю. Петренко // Биотехнология. - 2010. - Т. 3, № 2. - С. 62-69.

216. Мирсаева Ф.З. Экспериментальное обоснование применения комбинированного трансплантата на основе «Аллопланта» в хирургическом лечении хронического генерализованного пародонтита / Ф. З. Мирсаева, Л. Р. Агзамова // Проблемы стоматологии. - 2010. - № 4. - С. 42-46.

217. Репаративные процессы в нижней челюсти кроликов при использовании остеопластического материала ИНДОСТ пластины с мезенхимальными стромальными клетками / [Э. В. Фионова, К. С. Десятниченко, А. А. Докторов и др.] // Cathedra. – 2008. – Vol.7. N.1, Р. 16-20.

218. Фионова Э. В. Анализ репаративных процессов в нижней челюсти при использовании модифицированных остеопластических материалов серии Гапкол с мезенхимальными стромальными клетками в эксперименте: автореф. дисс. на соискание науч. степени канд. мед. наук : спец. 14. 00. 21 / Фионова Э. В. – М., 2008. – 24 с.

219. Григорьян А. С. Использование нерезорбируемых мембран для направленной регенерации тканей. Экспериментальное исследование

/ А. С. Григорьян, А. И. Грудянов, П. В. Чупахин // Материалы конференции, посвященной памяти проф. В.В. Паникаровского. – М. – 2002. – С. 16–18.

220. Применение костнопластического материала как носителя аутологических стволовых клеток кролика для замещения костного дефекта челюсти. / В. И. Куцевляк, В. Ф. Куцевляк, Ю. Е. Микулинский, Е. А. Щегельская // Матеріали II Українського міжнародного конгресу «Стоматологічна імплантологія, остеointegraція» 11-13 травня 2006р., Київ, с.72- 82.

221. Костина И. Н. Хирургическое лечение хронического периодонтита с использованием материала «КоллапАн» / // Проблемы стоматологии. – 2011. - № 1. – С. 35-39.

222. Использование препарата «КоллапАн-Л» в хирургической стоматологии / [В. В. Никитенко, А. К. Иорданишвили, В. Г. Гололобов и др.] // Акт. вопр. стоматологии: Сб. тез. науч.-практ. конф. - М., 2003. - С.102-103.

223. Enzymatic degradation of collagen-guided tissue regeneration membranes by periodontal bacteria / [M. N. Sela, D. Kohavi, E. Krausz et al.] // Clinical Oral Research. - 2003. - № 14 (3). - P. 263-268.

224. Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells / [J. A. Conejero, J. A. Lee, B. M. Parrett et al] // Plast Reconstr Surg. - 2006. – Vol. 117. - N. 3. - P. 857—863.

225. Early implant loading in the atrophic posterior maxilla: 1-stage lateral versus crestal sinus lift and 8 mm hydroxyapatite-coated implants. A 5-year randomised controlled trial / [G. Cannizzaro, P. Felice, A. F. Minciarelli et al.] // Eur. J. Oral Implantol. - 2013. – Vol. 6. N 1. - P. 13-25.

226. Байтус Н. А. Современный взгляд на выбор материалов при лечении хронических воспалительно-деструктивных процессов тканей апикального периодонта / Н. А. Байтус // Вестник Витебского государственного медицинского университета. - 2012. - Т. 11, № 2. - С. 171-178.

227. Байтус Н.А. Перспективы применения препаратов на основе гидроксипатита в стоматологии у пациентов с деструктивными процессами в костной ткани / Н. А. Байтус // Стоматолог. - 2014. - № 3. - С. 42-47.

228. Иванов С. Ю. Опыт применения биоматериалов и биорезорбируемой мембраны «Остеопласт» в практике челюстно-лицевой хирургии и дентальной имплантологии / С. Ю. Иванов, Н. Ф. Ямуркова // Обозрение стоматология. - 2009. - № 2 (67). - С. 28-29.

229. Исследование барьерной функции коллагеновой мембраны «Остеопласт» при заживлении костных дефектов в эксперименте / [С. Ю. Иванов, А. Б. Зайцев Н. Ф. Ямуркова и др]. // Современные технологии в медицине. - 2011. - № 3. - С. 33-35.

230. Effect of biological/physical stimulation on guided bone regeneration through asymmetrically porous membrane / [T. H. Kim, S. H. Oh, S. Y. Na et al.] // Biomed. Mater. Res. Part A. - 2012. - Vol. 100. N.6 – P. 1512-1520.

231. Метод направленной регенерации тканей при устранении ошибок дентальной имплантации / [С. Ю. Иванов, А.А. Мураев, Ю.В. Гажва, и др.] // Обозрение стоматологии. - 2012. - № 2 (76). - С. 14.

232. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль индукции и кондукции в остеогенезе. / [Н. А. Корж, В. А. Радченко, Л. А. Кладченко и др.] // Ортопедия, травматология и протезирование. - 2003. - № 2. - С. 150-157.

233. Nonwoven Polylactide Scaffolds Obtained by Solution Blow Spinning and the In Vitro Degradation Dynamics / [S. I. Tverdokhlebov, K. S. Stankevich, E. N. Volbasov et al.] // Advanced Materials Research. — 2014. — Vol. 872. — P. 257–262.

234. Применение мезенхимальных стромальных клеток для усиления интегративных свойств имплантационных материалов на основе биостабильных композитов пластмасс / [Ю. И. Денисов-Никольский, Ф. Ф. Лосев, А. А. Докторов и др.] // Здоровоохранение и медицинская техника. – 2005. -№ 8. – P. 27.

235. Kolerman R. Combined osteotome-induced ridge expansion and guided bone regeneration simultaneous with implant placement: a biometric study. / R Kolerman, J Nissan, H. Tal // Clin Implant Dent Relat Res. -2014. – Vol. 16. N. 5. – P. 691-704.

236. Саркисов Д. С. Общая патология человека. / Д. С. Саркисов, М. А Пальцев, Н. К. Хитров // – М.: Медицина, 1997. – 608 с.

237. Саркисов Д. С. Микроскопическая техника: Руководство для врачей и лаборантов. / Д. С. Саркисов, Ю.Л. Перов. – М.: Медицина, 1996. 544 с.

238. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. / Р. Лилли. – М.: Мир, 1969. – 624 с.

239. Лапач С. Н. Статистические методы в медико-биологических исследованиях с использованием Excel / С. Н. Лапач, А. В. Чубенко, П. Н. Бабич. – Киев: «Морион», 2001. – 408 с.

240. Гмурман В. Е. Теория вероятностей и математическая статистика / В. Е. Гмурман. – М.: Высшая школа, 1972. – 368 с.

241. Thirumata S. Evaluation of methylcellulose and dimethyl sulfoxide as the cryoprotectants in a serum-free freezing media for cryopreservation of adipose-derived adult stem cells / S. Thirumata, J.M. Gimble, R.V. Devireddy // Stem Cells and Development. - 2010. – Vol. 19. N. 4. – P. 513-522.

242. Леус П.А. Некариозные болезни твердых тканей зубов : учеб.-метод. пособие / П.А. Леус. – Минск : БГМУ, 2008. – 56 с.