

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ
МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ
ИМЕНИ И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

Ли Цзяци

**Экспериментальное обоснование применения мезенхимальных
стволовых клеток при дентальной имплантации**

14.01.14 - Стоматология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Чикунев Сергей Олегович

Москва - 2020

Оглавление

| | |
|--|----|
| ВВЕДЕНИЕ..... | 3 |
| ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ..... | 10 |
| 1.1.Стволовые клетки – сущность, свойства и источники получения. | 10 |
| 1.2. Методы выделение и идентификации стволовых клеток и оценка их жизнеспособности..... | 15 |
| 1.3. Патогенетическое обоснование использования мезенхимальных стволовых клеток в медицинской практике. | 18 |
| ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ..... | 23 |
| 2.1 Материалы и методы стоматологического обследования и ретроспективного анализа первичной медицинской документации. | 23 |
| 2.2. Материалы и методы экспериментального исследования. | 27 |
| 2.2.1. Метод культивирования мезенхимальных стволовых клеток. | 27 |
| 2.2.2. Методика фиксации культивированных стволовых клеток на аналоги дентальных имплантатов..... | 29 |
| 2.2.3. Характеристика экспериментального материала..... | 30 |
| 2.2.4 Исследование хода регенераторных процессов костной ткани. | 32 |
| 2.2.5. Цитологическое исследование области раны и гистологическое исследование препаратов костной ткани. | 33 |
| 2.2.6. Методика гистоморфометрического исследования. | 33 |
| 2.2.7. Для иммуногистохимического исследования использовались поликлоновые кроличьи сыворотки, содержащие антитела к антигену Vimentin и S-100. | 34 |
| 2.3. Статистическая обработка данных. | 34 |
| ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА ОСЛОЖНЕНИЙ ДЕНТАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С СОПУТСТВУЮЩЕЙ СОМАТИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ..... | 35 |
| ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ..... | 45 |
| ЗАКЛЮЧЕНИЕ | 65 |
| ВЫВОДЫ..... | 69 |
| ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ | 71 |
| Список используемой литературы. | 72 |

ВВЕДЕНИЕ

Состояние вопроса.

Применение стволовых клеток и тканевой инженерии в стоматологии является не новым, но еще перспективным направлением, обеспечивающим репаративный остеогенез при хирургических вмешательствах в полости рта. Если рассматривать аспект ортопедической реабилитации стоматологических пациентов в разрезе современных концепций, лидирующее место занимает дентальная имплантация [Бозо И.Я. и соавт., 2017., Маркин В.А., Степанов А.Г. 2018].

В настоящее время, дентальная имплантация является наиболее активно развивающимся направлением стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, поскольку частота патологии, требующей ортопедического лечения, остается на высоком уровне и в перспективе не будет иметь тенденции к уменьшению [Воложин А.И. и соавт., 2004-2007; Миронов С.П., 2007; Albrektsson T., Wennerberg A., 2005].

Описано, что остеоинтеграция имплантата определяется едиными механизмами пролиферации и остеогенной дифференцировке собственных стволовых мезенхимальных клеток, формировании клеток остеобластического ряда, создающих кость, которая в дальнейшем подвергается перестройке [Киселева Е.В. и соавт., 2009; Derubies A. et al., 2006]. Существует ряд методик увеличения числа стволовых клеток в регенерате [Minguel J.J., 2001; Leong D.T., 2006; Хашукоев А.З., Маркин В.А. 2019], практические врачи широко используют эти методики, получая стабильные и прогнозируемые результаты [[Воложин А.И. и соавт., 2006, 2007].

В то же время накопленный клинический опыт существенно обогнал рост теоретической базы изучения процессов регенерации кости в зоне имплантации, что послужило поводом проведения междисциплинарных фундаментальных исследований, ориентированных на выяснение механизмов биосовместимости

материала имплантата и характеристику особенностей регенераторного процесса на границе имплантат-кость.

Сложность дентальной имплантации у пациентов с сопутствующей соматической патологией связана с низкими регенеративными способностями организма в целом и в костной ткани в частности. Поэтому повышение качества ортопедического стоматологического лечения пациентов с применением стволовых клеток повышающих остеоинтеграцию дентальных имплантатов, является актуальной задачей современной медицины, что определило цели и задачи данного исследования.

Цель исследования.

Повышение эффективности репаративного остеогенеза в системе «имплантат-кость» для клинического применения, на основе экспериментального изучения процессов костной регенерации и остеоинтеграции имплантата с применением мезенхимальных стромальных клеток.

Задачи исследования.

1. Определить необходимость в оптимизации регенераторного процесса при неэффективной первичной имплантации у пациентов с наличием соматической патологии путем и ретроспективного анализа историй болезни, стоматологического обследования и оценки качества жизни.

2. Предложить технологию фиксации мезенхимальных стволовых клеток к поверхности аналогов титановых дентальных имплантатов и оценить ее эффективность в эксперименте *in vivo*.

3. Установить в эксперименте *in vivo* влияние культивированных мезенхимальных стволовых клеток фиксированных к поверхности аналогов дентальных имплантатов на процессы репаративного остеогенеза.

4. Характеризовать этапы регенераторного процесса в системе «имплантат - кость реципиента» определенные в эксперименте на животных.

5. Определить механизмы остеогенеза при использовании мезенхимальных стволовых клеток в сравнении с регенераторным потенциалом у животных контрольной группы.

Научная новизна.

Установлено, что одной из причин неэффективной имплантации у пациентов старшей возрастной группы является сопутствующая соматическая патология.

Впервые показано, что фиксация мезенхимальных стволовых клеток на поверхности образцов дентальных имплантатов приводит к репаративному остеогенезу у лабораторных животных.

Впервые определены стадии регенераторного процесса, механизмы его формирования и качество новообразованной кости при имплантации титановых аналогов с фиксированными мезенхимальными стволовыми клетками.

Установлено, что мезенхимальные клетки на начальных этапах участвуют в формировании костной ткани, формируя взаимонаправленные процессы синтеза костной ткани.

Оценено соотношение процессов дистантного и контактного остеогенеза в ходе репаративного процесса экспериментальной модели.

Проведено сравнение сроков и полноты остеоинтеграции, как основы прочностных характеристик комплекса «имплантат - кость реципиента» в экспериментах с применением мезенхимальных стволовых клеток и без их использования.

Теоретическая и практическая значимость.

Предложенная комплексная стадийная оценка может быть использована в экспериментальных и клинических исследованиях по изучению эффективности и

безопасности методов стимуляции репаративного остеогенеза, остеointegrации внутрикостных нерезорбируемых имплантатов с нанесенными на них мезенхимальными стволовыми клетками челюстно-лицевой хирургии, ортопедической стоматологии. Изученный характер остеопоза с использованием аллогенных мезенхимальных стволовых клеток позволят прогнозировать эффективность лечения и реабилитации в клинической практике. Выявленные закономерности регенераторного процесса кости с использованием мезенхимальных стволовых клеток позволят сократить сроки лечения.

В работе использованы следующие методы: клинические методы оценки стоматологического статуса, оценка качества жизни пациентов, модель внутрикостной имплантации на бедренной кости крыс, морфологическое исследование тканей в зоне имплантации, морфометрические методы оценки клеточно-тканевых соотношений в ходе регенераторного процесса, световая микроскопия, статистический анализ.

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Неэффективная дентальная имплантация значительно снижает качество жизни пациентов с сопутствующей соматической патологией.
2. При наличии состояний и соматических заболеваний, связанных со снижением регенераторных возможностей организма в случае ортопедической стоматологической реабилитации с использованием дентальных имплантатов, необходимо применять методы стимулирующие репаративный остеогенез.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследования используются в учебном процессе на кафедре ортопедической стоматологии Института стоматологии имени. Е.В. Боровского ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет), в стоматологической клинике «Арт Ораль Сергей Чикунов» и других клиниках г. Москвы.

Личное участие автора

Автор обследовал пациентов, самостоятельно проводил все виды стоматологических исследований, анкетировал пациентов в соответствии с опросником качества жизни ВОЗ-26 (WHOQOL-BREF) проводил анализ и систематизацию, а так же статистическую обработку полученных данных.

Лично проводил эксперимент на животных, готовил образцы аналогов дентальных имплантатов. Разработал и внедрил в экспериментальную часть работы методику фиксации МСК клеток на аналоги дентальных имплантатов. Готовил гистологические препараты и описывал морфологическую картину. Анализировал и систематизировал полученные данные. Готовил публикации по теме диссертации.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 8 работ, из них 7 в рецензируемых журналах, входящих в перечень ВАК Минобрнауки РФ, одна статья в журнале, входящем в Scopus.

1. **Ли Цзяци**, Чикунов С.О. Сравнительная оценка репаративных изменений в кости экспериментальных животных при имплантации с применением мезенхимальных стволовых клеток // Сборник трудов «Стоматология славянских государств» XI Международной научно-практической конференции, посвящённой 70-летию Заслуженного профессора А.В. Цимбалистова, НИУ БелГУ. – 2018. – С. 162-164.
2. **Ли Цзяци**, Чикунов С.О. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на процессы регенерации тканей полости рта при внутрикостной имплантации // Сборник трудов научной конференции с международным участием, посвященной 170-летию кафедры патологической анатомии им. Академика А.И. Струкова, ПМГМУ им. И.М. Сеченова. – 2019. – С.41-42.

3. **Ли Цзяци**, Чикунов С.О. Особенности остеointеграции имплантата с применением мезенхимальных стволовых клеток (экспериментальное исследование)» // Сборник научных трудов, «Актуальные вопросы стоматологии» МГМСУ им. А.И. Евдокимов посвящённой 90-летнему юбилею проф. В.Н. Копейкину. – 2019.
4. Ян Бовэнь, Чикунов С.О., **Ли Цзяци**. Особенности морфологических изменений в переимплантатных тканях при гипергликемии различной этиологии // Клиническая стоматология. – 2019. – № 3(91) – С. 56-58
5. **Ли Цзяци**, Чикунов С.О., Ян Бовэнь. Применение мезенхимальных стволовых клеток при внутрикостной имплантации. Особенности динамических морфологических изменений в эксперименте на животных // Клиническая стоматология. – 2019. – № 3(91) – С. 50-55 .
6. Ян Бовэнь, Чикунов С.О, **Ли Цзяци**. Прогностическое значение морфологических изменений в переимплантатных тканях при гипергликемии различной этиологии // Институт стоматологии. – 2019. – № 4(85) – С. 118-119.
7. **Ли Цзяци**, Чикунов С.О, Ян Бовэнь. Особенности регенерации костной ткани при внутрикостной имплантации с применением мезенхимальных стволовых клеток // Институт стоматологии. – 2019. – № 4(85) – С. 114-117.
8. A. Yumashev, E. Matveeva, N. Tambovtseva, **JQ. Li**, BW. Yang. Therapeutic and prophylactic application of mesodiencephalic modulation during dental impantation in pantients with type 2 diabetes mellitus/ Periodico Tche Quimica journal. – 2019. v.16.- №33. p.82-93 [Scopus].

Степень достоверности и апробация диссертационной работы.

Достоверность результатов обеспечивается достаточным объемом проведенных экспериментальных и клинических исследований, применением

современных методов морфологической и гистологической оценки препаратов, статистических методов обработки данных.

Материалы и результаты диссертации доложены на XI Международной научно-практической конференции «Стоматология славянских государств» посвящённой 70-летию профессора А.В. Цимбалистова (Белгород, 2018); Научно-практической конференции «Актуальные вопросы стоматологии»; посвящённой 90-летию юбилею проф. В.Н. Копейкина (МГМСУ им. А.И. Евдокимова, Москва, 2019); Научной конференции с Международным участием, посвящённой 170-летию кафедры патологической анатомии им. Академика А.И. Струкова (ПМГМУ им И.М. Сеченова; Москва, 2019); Всероссийской научной конференции с Международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии» (ФГБНУ; Москва, 2020).

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа содержит «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «2 Главы результатов собственных исследований», «Заключение», «Выводы», «Практические рекомендации» и «Список литературы». Диссертация изложена на 85 страницах, проиллюстрирована 21 рисунками и 11 таблицами. Список литературы включает 118 источников, в том числе 42 отечественных авторов и 76 иностранных.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.

Современная челюстно-лицевая хирургия требует знаний и технологий смежных дисциплин по ряду причин: во-первых, существует необходимость в обеспечении высокого качества жизни пациентам разных возрастных групп при наличии большого спектра соматических проблем, а во - вторых, - применение новых методов лечения требует патогенетического обоснования и теоретической подготовки их использования для снижения числа осложнений и развития сопряженных нарушений здоровья. Часть этих проблем можно решить с использованием продуктов молекулярной инженерии (Иванов С.Ю. и соавт.,2001; Деев Р.В. и соавт..2008; Gangji V.,2005).

1.1.Стволовые клетки – сущность, свойства и источники получения.

Стволовые клетки возникают в период эмбриогенеза во внутреннем клеточном слое эмбриона в бластоцисте, они называются эмбриональными стволовыми клетками (Warnke P.H.,2004). Кроме того, их обнаруживают на поздних стадиях развития плода, в этих случаях их называют фетальными стволовыми клетки. Стволовые клетки взрослого организма называют соматическими, или региональными стволовыми клетками (Смоляников А.Б., 2008).

Эмбриональные стволовые клетки выделяются из ранних эмбрионов или тератокарциномы (опухолевой линии) *in vitro* (Сергеева Н.С. и соавт., 2006). Выделят следующие разновидности стволовых клеток: тотипотентные, полипотентные и фетальные. Взрослые стволовые клетки делят по тканям, из которых их выделили: гемопоэтические, мезенхимальные и регионарные.

В соответствии с полнотой выделяют следующие типы стволовых клеток:

— тотипотентные стволовые клетки — зигота и бластомеры (способны к образованию всех эмбриональных и неэмбриональных тканей организма);

— плюрипотентные стволовые (ПС) клетки — эмбриональные стволовые клетки (способны к формированию всех тканей организма, но их вклад в развитие неэмбриональных тканей весьма ограничен);

— мультипотентные стволовые клетки — например, гемопоэтические стволовые клетки (способны к формированию зрелых клеток определенных типов);

— унипотентные стволовые клетки — например, сперматогонии (формируют единственный тип клеток — сперматозоиды). Таким образом, ПС клетки можно определить как самообновляющиеся и способные к формированию тканей всех трех зародышевых лепестков — эктодермы, мезодермы и энтодермы.

Стволовые клетки можно не только выделить из взрослых и эмбриональных тканей; их также можно сохранять в культурах в качестве недифференцированных клеток. Эмбриональные стволовые клетки способны производить все дифференцированные клетки взрослого организма. Таким образом, их потенциал можно расширить за пределы обычной мезодермальной клеточной линии до дифференцировки в печеночные, почечные, мышечные, кожные, сердечные и нервные клетки (Howell J.C. et.al, 2003).

Основная функция стволовых клеток - размножение и дифференцировка в ходе физиологической регенерации органов и тканей (Васильев А.В., 2005, Тверских В.В. и соавт., 2005)

Выделить стволовые клетки можно из костного мозга, крови, пульпы зуба, печени, кожи, поджелудочной железы, слизистых оболочек желудочно-кишечного тракта и других тканей (Роговая О.С. и соавт., 2004; Васильев А.В и соавт., 2008;)..

Объектом пристального внимания исследователей стала пульпа временных зубов: ее тщательное изучение в качестве потенциального источника стволовых клеток дало многообещающие результаты. Однако регенерация зуба целиком

представляет очень сложный процесс, который, несмотря на некоторые успехи, достигнутые с использованием животных моделей, пока еще невозможно воспроизвести и применять клинически (Wamke P.H., 2006). Совершенно иначе дело обстоит с регенерацией костной ткани челюсти; научно-доказательная база вполне достаточна для клинического применения этого метода (Вольперт У.В. и соавт., 2007).

В настоящее время региональные стволовые клетки получают помимо других тканей из костного мозга и жира (Bartholomew A., et al., 2002).

По понятным причинам наиболее логично получать стволовые клетки из костного мозга, поскольку их наличие там совершенно очевидно. Однако этот процесс имеет ряд трудностей. Во-первых, для выделения стволовых клеток из костного мозга необходимо проводить трепан-биопсию, при которой объем костного мозга крайне ограничен (Derubies A. et al., 2006). Во-вторых, эта не простая хирургическая процедура может иметь ряд клинических осложнений, развивающихся у донора стволовых клеток (Mauney J.R., 2005).

Поэтому наибольший интерес у специалистов молекулярной инженерии вызывают стволовые клетки, полученные из жировой ткани, поскольку жировая ткань имеет мезодермальное происхождение и содержит хорошо развитую строму (Карпюк В.Б. и соавт., 2007; Cowan C.M., 2004).

Метод получения стволовых клеток из жировой ткани имеет ряд преимуществ – их получать более просто, в том числе в большом количестве. Более того, число клеток можно увеличивать, культивируя их *in vitro* в специальных средах. В ходе перевивания клеточных пулов в течение 10 дней их число может быть увеличено в 2000 раз (Voquest A.C., 2006; Fang B., 2007).

Эта способность к делению стволовых клеток, полученных из жировой ткани, широко используется в травматологии, ортопедии, челюстно-лицевой хирургии с целью активации репарации кости (Zuk P.A., et al., 2002; Hattory et al., 2006).

В ряде исследований также показано, что ферментативная диссоциация и последующее центрифугирование тканей позволяют выделить из липоасpirата фибробластоподобные клетки, обладающие высокой пролиферативной активностью, длительно существующие как жизнеспособные в культуре и экспрессирующие маркеры МСК – СД13, СД44, СД90, СД105, что подтверждает их длительную жизнеспособность и сходство с тканями, требующими замены ил регенерации (Трактурев Д.О. и соавт., 2006; Minguell I.I. and Conget P., 2001).

Кроме того, при определенных методах стимуляции они успешно дифференцируются в клетки остеогенного ряда и эта способность незначительно зависит от возраста донора в отличие от стволовых клеток костного мозга. Так, при низкой концентрации витаминов С и Д, а так же, глицерофосфатов и дексаметазона стволовые клетки дифференцируются в остеобласты или клетки хондрогенной линии. В последующем при активации остеогенных клеток происходит образование остеокальцина, сиалопротеина и других белков. Как известно, сиалопротеин и остеокальцин обеспечивают прикрепление дифференцированных остеобластов к внеклеточному матриксу (Covan С.М.,2005).

Важным этапом регенераторного процесса кости является обеспечение адекватного питания пересаженным клеткам, что способствует поддержанию жизнеспособности клеточному трансплантату, обеспечивающему соответствующий продуктивный остеогенез, что затруднительно в условиях плохого кровоснабжения (Holnthoner W.,2015). Известно, что любые клетки, метаболизм которых зависит от молекулы кислорода, не жизнеспособны и замещаются соединительной тканью, если находятся на удаленном расстоянии от капилляров (Polykandriotis E. et al., 2007). В связи с этим, для обеспечения формирования инфраструктуры сосудистой сети во вновь образованной ткани в состав клеточного материала включают вещества инициирующие ангиогенез,

чаще, это фактор роста фибробластов и сосудистый эндотелиальный фактор (Парфенова Е.В. и соавт.,2006; Jiang A.,2015).

В технологиях молекулярной инженерии используют аутогенные и аллогенные стволовые клетки. Длительное время в медицине и биологии существовало традиционное, базирующееся на фундаментальных знаниях научное мнение, основанное на учении о гистосовместимости и вероятности развития реакции отторжения трансплантата, что предпочтительнее использовать клетки аутогенного происхождения (Aust L.,2004; Le Blanc K., et al., 2003).

Однако, экспериментальные исследования показали, что культивируемые клетки костного мозга и жировой ткани не экспрессируют антигены, необходимые для активации иммунокомпетентных клеток: CD80, CD86, CD40, CD40. Таким образом, мезенхимальные стволовые клетки имеют иммунопривилегированный статус, не являясь иммуногенными, опосредуя иммуносупрессию в условиях *in vitro* и *in vivo* (Domenis R.,2015).

Кроме того, в клинических исследованиях была установлена способность мезенхимальных стволовых клеток к супрессии смешанной культуры лимфоцитов, а также дендритных клеток головного мозга (Kakagia D.,PalluaN.,2014)

Несмотря на отсутствие реакции отторжения трансплантата, ряд авторов все же настаивают на более широком использовании аллогенных клеток, поскольку их использование легче переносится экспериментальными животными, что еще раз подтверждает отсутствие специфического негативного действия стволовых клеток на организм реципиента в целом (Niemoeyer P., et al., 2007).

Для осуществления методики использования стволовых клеток необходимо их выращивать на подложках, которые производятся из различных материалов по требованию авторов экспериментов. Исследователи в многочисленных экспериментах проанализировали показатели жизнеспособности и

пролиферативной активности стволовых клеток, выращенных на различных в химическом отношении основаниях (Лясникова А.В. и соавт.,2004; Григорян А.С.,2007; Ricci J.L., et al.,2008).

В первую очередь, исследовались металлические сплавы, поскольку именно они чаще всего используются в травматологии, хирургии и стоматологии в качестве опорных остеозамещающих материалов. Было показано, что многочисленные металлы, используемые в медицине, не обладают цитотоксическим или цитостатическим влиянием на культивируемые на них стволовые клетки. При этом стволовые клетки проявляли высокую адгезивную способность к поверхности, активную пролиферативную и синтезирующую способность (Поздеев А.И., и соавт., 2007, Олесова В.Н. и соавт., 2008).

Нанотехнологии, разработанные в последние десятилетия, поставили новые задачи перед исследователями в плане оценки использования керамических пористых гранулированных материалов в качестве матрицы для выращивания стволовых клеток. Исследования показали, что и эти материалы обеспечивают на своей поверхности пролиферацию фибробластов, с последующим преобразованием в объемные клеточные структуры (Li L.,2014). При длительном культивировании стволовых клеток на пористых фосфат-кальциевых матрицах, происходило формирование трехмерных структур, в которых гранулы материалов были сцементированы фибробластами (Сергеева Н.С. и соавт. 2008: Ricci J.L et al.,2008).

Это явилось теоретическим обоснованием практического использования керамических пористых материалов с колониями стволовых клеток на их поверхности в стоматологической практике (Bartholomew A., et al.,2012).

1.2. Методы выделения и идентификации стволовых клеток и оценка их жизнеспособности.

Способ выделения мезенхимальных стволовых клеток зависит от источника их получения (Bianchi F.,2013). Однако, существуют общие принципы выделения и культивирования мезенхимальных стволовых клеток.

Донорскую ткань измельчают до маленьких объемов и фиксируют на поверхностях культуральной посуды, для роста клеток в последующем используемых для пассирования.

Так же начальные клетки получают методом дезагрегации тканей трипсином или иными ферментами (Carvalho P.,2013). Последний способ более продуктивный по числу искомым клеток (Kakudo N.,2014).

Техника производства первичной культуры клеток методом дезагрегации основана на том, что наибольшее количество культур делятся монослойно, и фиксируются кспециальной поверхности (Dominici M.,2006). Асцитные опухоли и кроветворные клетки делятся в суспензии, далее полученную суспензию разводят. Распад клеток монослойной культуры обеспечивается воздействием фосфатным буфером с этилендиаминтетрауксусной кислотой с последующей инкубацией в растворе трипсина после чего, клетки становятся вторичной культурой (Francis M.P.,2010). После нескольких аналогичных процедур клетки перерождаются в длительно существующую линию или умирают (Bierbaum S., et al., 2003).

Перед культивированием клеток, после их забора у донора необходимо обеспечить привычные для них условия и это единственное условие для их дальнейшей дифференцировки и роста (Bunnell.V.,2008). Важнейшим условием, так же является поддержание в клетках определенного осмоса и кислотности, что обеспечивают соли с углеводами составляющими питательную среду.

Для прогрессивного роста клеточных популяций и продления срока жизнеспособности клеток важен состав внеклеточной среды, которая должна обеспечивать клетки питательными и гормональными веществами, и

стромальными факторами. Примерами таких сред являются: среда Дульбекко (DMEM – Dullbecco’s modified Eagle’s medium), среда Игла (MEM – minimal essential medium), а так же среда RPMI-1640 (Roswell Park 5 Memorial Institute) (Bartholomew A., et al.;2002). Указанные среды в своём составе имеют различные полезные вещества, обеспечивающие рост клеток различного происхождения. Основой сред можно считать раствор Эрла (Lin R.,2008).

В настоящее время специалисты используют ряд модифицированных методик выделения стволовых клеток, большинство из которых отличаются от базисного варианта оригинальностью технических рядом рационализаций (Srijaya TC et al., 2012; Zhao Q ,et al., 2015; Chang Y-LLY-CC,2014). Однако в целом технологии изоляции стволовых клеток из жировой ткани с применением ферментирования за последние десятилетия практически не изменились.

Особое внимание при выделении стволовых клеток из жировой ткани авторы уделяют определению оптимальных временных сроков ферментативного воздействия. Однако, по этому поводу среди исследователей нет однозначных рецептов. Так, ряд ученых рекомендует ферментировать в течение 1–2 часов (Matsumoto D., 2007). Другие исследователи полагают, что ферментативное расщепление жировой ткани до однородного вида клеток при температуре 37 °С в течение 2-х часов обеспечивает наилучший баланс между степенью диссоциации исходного биологического материала и количеством получаемых стволовых клеток (Zhao Q.et al.,2015).

Режимы последующих стадий обработки среды для выделения стволовых клеток также продолжают обсуждать в современной литературе, поскольку физические эффекты центрифугирования так же, как и параметры давления при вакуумной липосакции, могут влиять на жизнеспособность и количество стволовых клеток, используемых в итоге для культивирования. Так, ряд авторов продемонстрировали, что при скорости центрифугирования, превышающей 3000×g, возможны повреждения стволовых клеток (Kurita M.,2008). В ходе

центрифугирования в пробирке формируются несколько слоев: верхний – состоящий из масла и белых адипоцитов, средний содержащий осадок жировых клеток и нижний – стволовые клетки (Voquest .С.,2006).

Важным этапом получения стволовых клеток является определение их жизнеспособности после всех этапов извлечения клеток. Для оценки жизнеспособности фибробластов используют методику, основанную на способности восстанавливать 3 – (4,5 – диметил - 2 – тиазолил) – 2 – 5 – бромистый диметилтетразолий (МТТ) в не водорастворимые структуры диформаза. Этот метод является универсальным для оценки состояния различных клеток млекопитающих. Количество образовавшегося диформаза характеризует пролиферативную активность, следовательно, жизнеспособность различных клеток человека и животных (Mosman T., 1983).

В стоматологии важно индуцировать дифференцировку стволовых клеток в клетки остеобластического ряда. Для этого клетки рассеивают на 90 мм чашки Петри и по достижении 80% полноценного монослоя заменяют ростовую среду на дифференцировочную: DMEM с 10% аутологичной сыворотки крови, 100 мкг/мл амикацина, 50 мг/л L-аскорбиновой кислоты, 10 мМ/л β-глицерофосфата натрия и 10 нМ 1,25-дигидроксивитамина D3). Этот процесс также является трудоемким, поскольку замену среды на свежую производят каждые 3 суток (Bartholomew A., et al.,2002).

1.3. Патогенетическое обоснование использования мезенхимальных стволовых клеток в медицинской практике.

В настоящее время стволовые клетки применяются в лечении самых тяжелых заболеваний очень широк (Иванов С.Ю. с соавт,2001;Смирнов С. В. И соавт.,2003;С.П.,2007).

К числу первых заболеваний, при которых стали использовать с лечебной целью стволовых клеток относятся, гемобластозы - острые и хронические лейкозы, миеломная болезнь и другие (Niemyer P., Komacker M.,2007).

При перечисленных заболеваниях опухолевые гемопоэтические клетки разрушаются с помощью больших доз химиотерапии или общего облучения с последующим восстановлением нормального гемопоэза путем трансплантации аллогенных стволовых клеток (Stenderup K. et al.,2003).

По аналогии с лечением гемобластозов изучают возможность использования стволовых клеток при некоторых аутоиммунных заболеваниях - системной красной волчанке, синдроме Шегрена, ревматоидном артрите, сахарном диабете 1-го типа и рассеянном склерозе.

При этих заболеваниях у больных собирались и замораживались стволовые клетки, затем пациенты получали высокодозированную химио-радиотерапию, после чего проводилась аутогенная трансплантация ранее замороженных клеток. После указанной процедуры в течение 3 лет наблюдали 7 больных. На протяжении всего периода наблюдения у больных отсутствовали активные проявления болезни, и они не нуждались в иммуносупрессивной поддерживающей терапии (Le Blanc K.,2003,2008).

Так, на экспериментальной модели острого инфаркта миокарда было доказано свойство стволовых клеток трансформироваться в зрелые кардиомиоциты, окруженные фиброзной стромой с полноценными кровеносными сосудами, обеспечивающими питание новообразованной структурно-функциональной единицы миокарда. Таким образом, стромальные клетки полностью превращаются в клетки сердечной мышцы, восстанавливая ее функциональные свойства, что устраняет явления постинфарктной сердечной недостаточности у экспериментальных животных (Gimble J.M.,2010) .

Другим примером является использование стромальных клеток в лечении различных неврологических заболеваний, таких как болезнь Паркинсона, Альцгеймера, хореи Гентингтона, мозжечковых атаксий, рассеянного склероза и других нейтродегенеративных заболеваний, связанных с прогрессирующей дегенерацией и потерей допамин-продуцирующих нейронов , что приводит к

развитию тремора, ригидности и гипокинезии. В эксперименте трансплантированные стволовые клетки дифференцируются нейроны в головном мозге крыс с моделью болезни Паркинсона, что сопровождается высвобождением допамина и улучшением моторной функции (Bourgin P.,2013).

Поджелудочная железа является органом, в котором в физиологических условиях присутствует большое количество стромальных клеток эмбрионального типа, что послужило поводом к инициации формирования клона инсулин - продуцирующих клеток. В качестве исходного материала используют клетки, полученные при биопсии поджелудочной железы здоровых особей (Minguell J.J., et al.2001).

В эксперименте полученные таким способом стволовые клетки трансплантировали мышам с диабетом. Через 24 ч содержание глюкозы у мышей снизилось до нормы. Спустя 4 недели у 60% мышей уровень гликемии оставался нормальным, что свидетельствовало о приживлении трансплантированных клеток. Более того, клетки, продуцирующие инсулин, обнаружены у этих животных в селезенке и печени (Mizuno H.,2012).

Другим органом, в котором присутствуют эмбриональные клетки костного мозга, является печень, о чем свидетельствует наличие множественных зон внекостномозгового кроветворения у новорожденных млекопитающих. E. Lagasse и соавт. (2011) вводили мышам с моделью печеночной недостаточности нефракционированные мышинные стволовые клетки, что способствовало восстановлению показателей печеночных функций и увеличению выживаемости.

Сегодня, клеточные технология все чаще применяются при ожогах и глубоких травмах кожи. При этом физиологический ход регенераторного процесса не возможен из-за утраты источника регенерации – окружающих тканей (Lavker R.M., et al., 2003). Для этого культивировали кератиноциты в специальных средах, способствующих активному делению клеток. пул которых достигал нескольких миллиардов. В результате происходило восстановление кожного покрова без

развития гнойно-септических осложнений (Васильев А.В и соавт., 2008; Lavker R.M., et al., 2003). Более того, «искусственная кожа» может храниться в банке органов длительное время для последующего использования (Смирнов С.В. и соавт., 2003).

Мезенхимальные стромальные стволовые клетки широко используют в ортопедии. Основываясь на их свойстве легко трансформироваться в остеогенные клетки, их используют с целью замещения костных дефектов челюстей и возмещения деструктированных хрящей. (Mauney, J.R.,2005).

Используя достижения клеточных технологий, удалось успешно реконструировать нижнюю челюсть пациента, удаленную по поводу злокачественной опухоли. Стоматологи в данном клиническом эксперименте использовали несколько клеточных технологий- выращивание стволовых клеток, стимуляцию остеогенной дифференцировки, использование гидроксиапатита в качестве матрицы и поддержку жизнеспособности клеток вплоть до формирования полноценной костной ткани (Wagner P.H. et al.; 2004; 2006).

Однако, чаще всего клеточные технологии используются в стоматологии применяются в более рутинной практике – при частичной адентии или тяжелых формах пародонтоза.

Использование культивируемых фибробластов в хирургической пародонтологии позволяет улучшить результаты лечения пациентов с хроническим пародонтитом. Эта методика была подтверждена в экспериментах на модели пародонтита с формированием у животных глубокого зубо-десневого кармана. После трансплантации фибробластов у животных поэтапно развивалась соединительно тканая структура эмбрионального типа, на базе которой впоследствии формировалась грубоволокнистая ткань, способная выполнять функции периодонта, с последующей организацией зубодесневого контакта. (Пожарицкая М.М. и соавт, 2004).

Эти данные были неоднократно подтверждены и другими авторами (Перова М. Д. и соавт., 2007).

Суммируя представленные данные о роли стволовых клеток в организме человека, методах их выделения и использования, можно заключить, что изучение свойств стволовых клеток представляется крайне актуальной научной проблемой, решение которой способно совершить качественный прорыв в медицине.

Удачное практическое применение модифицированных клеток обуславливает дальнейшее проведение новых экспериментальных исследований в стоматологии для стимуляции регенеративного остеогенеза применительно в практике дентальной имплантации.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Материалы и методы стоматологического обследования и ретроспективного анализа первичной медицинской документации.

Задачей проводимого исследования явилась оценка потребности в оптимизации регенераторного остеогенеза при дентальной имплантации пациентов с коморбидными заболеваниями.

С целью решения поставленной задачи, было обследовано 134 пациента с жалобами на подвижность дентальных имплантатов, ранее установленных в стоматологических учреждениях Москвы разной формы собственности. В соответствии с разработанными критериями включения, не включения и исключения из исследования для дальнейшего исследования было отобрано 29 человек.

Критерии включения пациентов в исследование:

1. Пациенты в возрасте от 25 до 65 лет с жалобами, на подвижность дентальных имплантатов установленных до 3-х лет назад.
2. Наличие общесоматической эндокринологической патологии в стадии ремиссии.
3. Наличие толщины кости вокруг ранее установленного дентального имплантата не менее 1,5 мм с апроксимальных и не менее 3,5 мм в вестибулярной и оральной поверхностях.
4. Наличие прикрепленной десны у шейки дентального имплантата не менее 3 мм.
5. Отсутствие в анамнезе психогенных и психосоматических расстройств.

Критерии не включения пациентов в исследование:

1. Пациенты в возрасте до 25 и после 65 лет.

2. Наличие общесоматической эндокринологической патологии с показателями выше референтных значений.

3. Наличие толщины кости вокруг ранее установленного дентального имплантата менее 1,5 мм с апроксимальных и менее 3,5 мм в вестибулярной и оральной поверхностях.

4. Наличие прикрепленной десны у шейки дентального имплантата менее 3 мм.

5. Наличие в анамнезе психогенных и психосоматических расстройств.

Критерии исключения пациентов из исследования:

1. Отказ пациента от дальнейшего участия в исследовании.

2. Развитие у пациента в процессе исследования острых общесоматических патологий влияющих на ремоделирование костной ткани.

Разработанные и утвержденные критерии включения пациента в исследование аргументированы наличием патологии влияющей на остеогенез в стадии ремиссии. А характеристика ранее установленных имплантатов соответствует Международному протоколу имплантации SAFE предусматривающего операцию, гарантирующую её успешность, во избежание возможных допущенных дефектов лечения.

Были собраны и оценены жалобы пациентов, анализ первичной медицинской документации, а также проведен стоматологический осмотр полости рта с оценкой нарушений в проведенной имплантации, исследовано состояние перимплантных тканей, проведены рентгенологические исследования и разработан план дальнейшего лечения пациентов.

Все клинические исследования соответствовали рекомендациям биоэтических комитетов. Характеристика обследованных пациентов представлена в таблице 1.

Таблица 1. Клиническая характеристика пациентов с осложнениями дентальной имплантации, имеющих комарбидные сопутствующие патологии.

| Пол/возраст | Соматическая патология (количество человек) | | | |
|--------------|---|---|--|------------|
| | Метаболический синдром | Сахарный диабет 2 типа, системный остеопороз. | Артериальная гипертензия, гипертиреоз. | Гипотиреоз |
| М (61±6 лет) | 2 | 4 | 3 | 0 |
| Ж (59±7 лет) | 5 | 8 | 3 | 4 |

Как видно из представленной таблицы, нами было обследовано 20 женщин (средний возраст 59±7 лет) и 9 мужчин (средний возраст 61±6лет) с разнообразными диагнозами пациентов пожилого возраста – сахарным диабетом, кардиоваскулярной патологией, метаболическим синдромом и другими эндокринопатиями. Все пациенты обратились в клинику с жалобами на патологическую подвижность, боли при жевании и глотании, нарушение артикуляции, а также на головные боли, повышенную раздражительность, плохой сон и аппетит.

Стоматологическое обследование включало, опрос, осмотр, определение гигиенических и пародонтальных индексов, определение глубины патологического кармана вокруг имплантатов, аппаратное определение подвижности дентальных имплантатов, компьютерную томографию с целью определения резорбции костной ткани вокруг имплантатов.

Оценка качества жизни исследуемых пациентов проводилась по краткому опроснику ВОЗ-26 (WHOQOL-BREF) [<http://diplomova.com/kratkij-oprosnik-voz-26-dlya-otsenki-kachestva-zhizni-whoqol-bref/nggallery/thumbnails>]. Анкета состоит из 26 вопросов, из которых 2 не влияют на определение показателей качества жизни и носят адаптационно-отвлекающий характер. Всего по результатам

ответов респондентов определяются 4 показателя (домена) качества жизни: физическое и психологическое благополучие, самовосприятие, микросоциальная поддержка и социальное благополучие, а также общий показатель качества жизни, рассчитываемый по сумме 4 показателей.

Качество жизни по доменам рассчитывается следующим образом:

Физическое и психологическое благополучие = $(6-Q3) + (6-Q4) + Q10 + Q15 + Q16 + Q17 + Q18$;

Самовосприятие = $Q5 + Q6 + Q7 + Q11 + Q19 + (6-Q26)$;

Микросоциальная поддержка = $Q20 + Q21 + Q22$;

Социальное благополучие = $Q8 + Q9 + Q12 + Q13 + Q14 + Q23 + Q24 + Q25$, где QX – числовое значение варианта ответа на вопрос анкеты номер X отдельно взятым респондентом.

Чтобы значения качества жизни по показателям были одинаковыми, его пересчитывают по следующей формуле:

$$\text{Пересчитанное значение} = \frac{(\text{Исходное значение} - \text{Минимально возможное значение})}{\text{Максимально возможный размах}} \times 100$$

, где минимально возможные значения и максимально возможный размах представлены в таблице 2.

Таблица 2. Лимитные значения показателей по доменам и общего показателя качества жизни пациентов.

| Домен | Минимально возможное значение | Максимально возможное значение | Максимально возможный размах |
|-------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|------------------------------|
| Физическое здоровье | 7 | 35 | 28 |
| Психофизиологическое здоровье | 6 | 30 | 24 |

| | | | |
|----------------------------|----|-----|----|
| Социальные взаимоотношения | 3 | 15 | 12 |
| Окружающая среда | 8 | 40 | 32 |
| Общий показатель | 24 | 120 | 96 |

Обработка результатов исследования проводили в программе Microsoft Excel.

2.2. Материалы и методы экспериментального исследования.

Экспериментальная часть работы заключалась:

- в выделении и культивировании МСК клеток из эпителиальной ткани полости рта донора;
- фиксации культивированных МСК на поверхности титановых аналогов дентальных имплантатов;
- исследование хода регенераторных процессов костной ткани у экспериментальных животных;
- цитологического и гистологического исследования области раны препаратов костной ткани экспериментального животного;
- гистоморфометрического исследования;
- иммуногистохимического исследования.

2.2.1. Метод культивирования мезенхимальных стволовых клеток.

Экспериментальное исследование соответствовало рекомендациям локального биоэтического комитета Федерального государственного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России). При их постановке руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с приказами МЗ СССР от

12.08.1977 № 755 и от 24.07.1978 № 701 и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» (2003 г.) [32].

Эксперимент проводили на 40 половозрелых крысах-самцах весом 250-320г. Животные содержались в виварии в клетках по 10 особей при естественном освещении на натуральном корме при температуре помещения 21°C. Условия содержания животных были организованы в соответствии с рекомендациями Европейской Конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или иных научных целей (Страсбург, 18 марта 1986 г.) [32].

Выделение и культивирование мезенхимальных стволовых клеток у экспериментальных животных проводили по методике описанной Хашукоевым А.З. с соавторами (Хашукоев А. З., Каракизов А. Ж., Степанов А. Г., Люндуп А. В. Способ замещения костных дефектов челюстей. Патент РФ № 2692452 от 24.06.2019).

Под премедикацией 0,1% раствором атропина сульфата из расчета 0,04 мг/кг подкожно в сочетании с инфльтрационной анестезией 3% раствором Мепивакаина гидрохлорида, хирургическим скальпелем осуществляли забор эпителизированной десны животного в проекции тела нижней челюсти.

Фрагмент десны погружали в раствор коллагеназы 2-го типа (0,05%), после чего подвергали тепловой обработке в термостате при температуре 37°C в течении 16 часов. Далее удаляли выпавший осадок лабораторной пипеткой и добавляли инсулин 0,4 мкМ, гентамицин сульфат в разведении 0,25 мг/л и питательную среду DMEM/F12 (Invitrogen, США) с 10 % телячий сыворотки («HyCloneDefined», HyClone, США).

Мезенхимальные стволовые клетки культивировали в инкубаторе в условиях повышенной влажности атмосферного воздуха с примесью 5% диоксида углерода. Питательную среду меняли каждые трое суток. Субконфлюэнтный монослой клеток отмывали в растворе Версена разбавленного 0,25 % раствором

трипсина с последующим центрифугированием и растворением осадка в новой культуральной среде. Дифференцировку клеток проводили по протоколу STEMPRO® MSC SFM; StemPro® Adipogenesis Differentiation Kit; Stem Pro® Chondrogenesis Differentiation Kit; Stem Pro® Osteogenesis Differentiation Kit.

2.2.2. Методика фиксации культивированных стволовых клеток на аналоги дентальных имплантатов.

В качестве аналогов дентальных имплантатов использовали титановые пластины размером 4x2x мм и толщиной 2 мм. Пластины изготавливали методом компьютерного фрезерования на аппарате М-5 системы ZirkonZahn (Италия) из титанового сплава марки 5 95Н10, также фирмы ZirkonZahn (Италия), содержащего в своей композиционной структуре 90% титана, 6% алюминия, 3 % ванадия, менее одного процента железа и менее одного процента кислорода.

Для фиксации на поверхности аналогов дентальных имплантатов культивированных мезинхимальных стволовых клеток, после фрезерования титановые пластины подвергали пескоструйной обработке порошком оксида алюминия с диаметром частиц в 100 мкм в режиме в 2 атмосферы. Пластины обрабатывали многократно по всем поверхностям до приобретения однородной матовости. После чего, аналоги имплантатов стерилизовали методом автоклавирования и помещали на культуральной среде в CO₂-инкубатор на сутки.

Из расчета площади поверхности титановых образцов, была рассчитана необходимая концентрация клеток линии 3Т3 монослоя, составляющая 30% общей площади.

Далее титановые пластины с культивированными МСК в пробирках помещались в ротатор помещенный в термостат. Скорость вращения составляла 2 оборота в минуту, при фиксируемой температуре в 37°C, с временем экспозиции 96 часов.

2.2.3. Характеристика экспериментального материала.

Животным проводили операцию на задне-наружной поверхности бедренной кости, чтобы избежать травматизации сосудисто-нервного пучка задней конечности. Операцию проводили под наркозом по методике, описанной Р.А. Гиммельфарбом для проведения операций на животных малого веса – премедикация атропин из расчета 0,04 мг/кг подкожно; основной наркоз- гексенал 2% на физрастворе внутривенно 45мг/кг После сбривания шерсти и обработки операционной зоны производили линейный разрез кожи длиной 2 см (Рис.1), затем раздвигали мышцы и освобождали боковую поверхность средней трети бедренной кости (Рис. 2). Острым путем производили насечку диафиза линейного вида размером 5x0,5x2мм (Рис. 3), в которую вставляли титановую пластину – аналог дентального имплантат (Рис. 4). Операции по имплантации металлической пластинки проводили в условиях операционной с соблюдением правил асептики и антисептики. По окончании операции кожу ушивали узловыми швами [32,36].



Рисунок 1. Разрез кожи над средней третью диафиза большеберцовой кости крысы



Рисунок 2. Раздвижение мышц бедра тупым способом



Рисунок 3. Формирование фиссурного дефекта диафиза большеберцовой кости

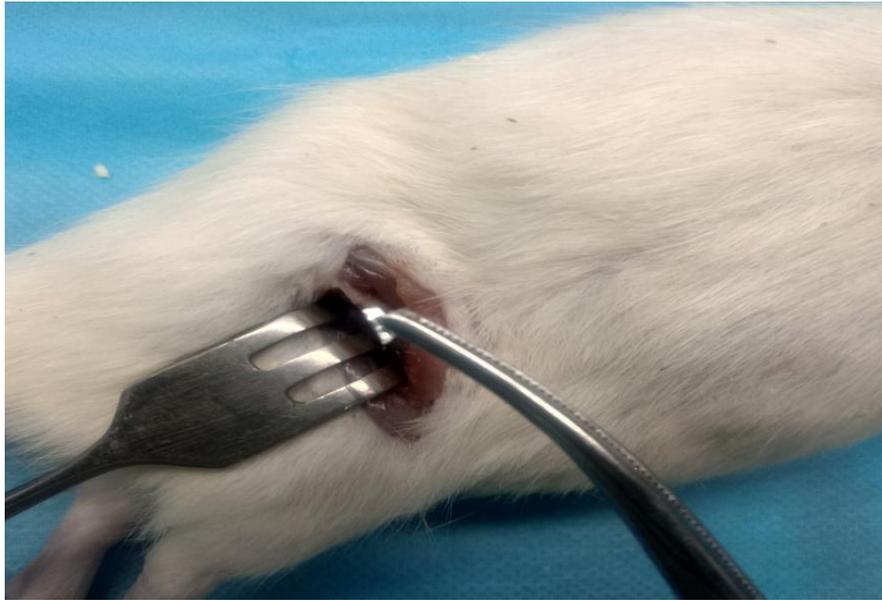


Рисунок 4. Установка имплантата в область дефекта бедренной кости.

Все животные были разделены на 2 группы. Первую группу составили животные, которым производили имплантирование металлической пластинки с нанесенными на нее мезенхимальными стволовыми клетками (20 животных). Вторая группа служила контролем - имплантация металлической пластинки без стволовых клеток (20 животных).

Цитологическое исследование клеточного состава области раны проводили на 3 и 7 сутки эксперимента. Морфологическое и морфометрическое исследование костной ткани проводили на 7, 15, 30 и 60 сутки эксперимента.

2.2.4 Исследование хода регенераторных процессов костной ткани.

Для оценки динамики регенераторного процесса проводилось макромикроскопическое исследование гистологических препаратов кости с проведением морфометрического анализа. Макроскопически оценивалось состояние перимплантных тканей, а также прочность соединения металлической пластинки с окружающей ее костью.

2.2.5. Цитологическое исследование области раны и гистологическое исследование препаратов костной ткани.

Фрагменты отделяемой жидкости из области раны помещали на предметное стекло, фиксировала над пламенем горелки в 70% этиловом спирте. Окрашивали по методу Романовского и исследовали с помощью светового микроскопа. Подсчет клеток производился в 50 произвольно взятых полях зрения при увеличении микроскопа 2000 (окуляр 20 х, объектив 100 х, масляная иммерсия) [32].

Образцы костной ткани замачивали в 10% р-ре формалина и декальцинировали в растворе уксусной кислоты со спиртами с повышением крепости, после чего фиксировали в разогретом парафине. Парафиновые блоки с препаратами нарезали микротомом (Leica HM-325, Германия), по 6-8-мкм. Окрашивали препараты с применением обзорных окрасок и просматривали в световой микроскоп BioBlue (Голландия) с увеличением – окуляр 15, объектив – 20х и 40х с последующим фотографированием цифровым фотоаппаратом «Canon» с макрообъективом [32,36].

2.2.6. Методика гистоморфометрического исследования.

Морфометрическое исследование проводили путем подсчета площадей тканевых элементов в 50 полях зрения при увеличении микроскопа 300х (ок 15х, об 20х)- зон некроза, воспаления, кровоизлияний, а также предсуществующей и сформированной “de novo” соединительной, хрящевой и костной ткани.

Гистоморфометрическую оценку проводили по показателям, полученным путем определения удельного веса костного матрикса (пластинчатого и фиброзного), низкодифференцированного костного матрикса, также изучали объем костномозговых пространств и долю фиброзной соединительной ткани в составе костной части регенерата [32, 36].

2.2.7. Для иммуногистохимического исследования использовались поликлоновые кроличьи сыворотки, содержащие антитела к антигену Vimentin и S-100.

Система визуализации – набор LSAB+ (DakoCytomation), основанный на стрептавидин-биотиновой технологии. В качестве красящей метки используется хромоген – DAB (диаминнобензидин). Учет экспрессии в клетках мембранных маркеров проводилась полуколичественным методом: отсутствие – 0, слабая - + (1+), умеренно выраженная - ++ (2+), интенсивная - +++ (3+).

2.3. Материалы и методы статистического исследования.

Результаты исследования статистически обрабатывали с использованием пакета SigtnaStat 3.0. и прикладных программ – Statistica 6,0. Для попарных межгрупповых различий метод Манна – Уитни. Различия между группами считали достоверными при $p \leq 0,05$ и $t > 2$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ АНАЛИЗА ОСЛОЖНЕНИЙ ДЕНТАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ У ПАЦИЕНТОВ С СОПУТСТВУЮЩЕЙ СОМАТИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИЕЙ.

На первом этапе исследования нами был проведен анализ осложнений имплантации, у 134 пациентов которым были проведены операции в стоматологических учреждениях города Москвы и Московской области различных форм собственности. У всех обследованных пациентов по результатам стоматологического обследования был поставлен диагноз периимплантит и мукозит, а также фиброинтеграция имплантатов.

Для более детального исследования проблемы нами были сформированы критерии включения пациентов в исследование, которые позволили исключить осложнения связанные с прогрессом общесоматических заболеваний. В соответствии с указанными критериями в дальнейшее исследования мы включили 29 человек. Результаты определения стоматологического статуса исследуемых пациентов представлены в таблице 3.

Таблица 3. Результаты оценки стоматологического статуса пациентов с осложнениями дентальной имплантации, имеющими в анамнезе общесоматическую патологию.

| № п\п | Пол | Возраст | Сроки дентальной имплантации | Соматический диагноз | Стоматологический диагноз |
|--------------|------------|----------------|-------------------------------------|---|--|
| 1 | Ж | 54 | 4мес | Метаболический синдром (гипергликемия, гипертензия, ожирение) | Периимплантит |
| 2 | Ж | 67 | 12мес | Сахарный диабет тип 2 | Генерализованный пародонтит, периимплантит |

| | | | | | |
|----|---|----|---------|---|--|
| 3 | Ж | 52 | 11мес | Сахарный диабет тип 2 | Генерализованный пародонтит, периимплантит |
| 4 | Ж | 50 | 6недель | Гипотиреоз | Периимплантит |
| 5 | Ж | 53 | 4мес | Сахарный диабет тип 2 | Периимплантит |
| 6 | Ж | 58 | 11мес | Метаболический синдром (гипергликемия, гипертензия, ожирение) | Генерализованный пародонтит, периимплантит |
| 7 | Ж | 60 | 1,5года | Артериальная гипертензия, гипертиреоз. | Патологическая подвижность имплантата |
| 8 | Ж | 53 | 4мес | Гипотиреоз | Периимплантит |
| 9 | Ж | 57 | 8мес | Сахарный диабет тип 2 | Генерализованный пародонтит, периимплантит |
| 10 | Ж | 50 | 6мес | Сахарный диабет тип 2 | Патологическая подвижность имплантата |
| 11 | Ж | 59 | 1,5года | Гипотиреоз | Патологическая подвижность имплантата, периимплантит |
| 12 | Ж | 54 | 8мес | Артериальная гипертензия, гипертиреоз. | Патологическая подвижность имплантата, мукозит |
| 13 | Ж | 58 | 14мес | Артериальная гипертензия, гипертиреоз. | Фиброинтеграция имплантата, мукозит. |
| 14 | Ж | 61 | 4мес | Сахарный диабет тип 2 | Патологическая подвижность имплантата, генерализованный пародонтит |
| 15 | Ж | 68 | 11мес | Сахарный диабет тип 2 | Периимплантит |

| | | | | | |
|----|---|----|---------|---|--|
| 16 | Ж | 53 | 4мес | Метаболический синдром (гипергликемия, гипертензия, ожирение) | Периимплантит |
| 17 | Ж | 50 | 6 мес | Сахарный диабет тип 2 | Фиброинтеграция имплантата, мукозит. |
| 18 | Ж | 63 | 2мес | Метаболический синдром (гипергликемия, гипертензия, ожирение) | Генерализованный пародонтит, периимплантит |
| 19 | Ж | 68 | 5мес | Сахарный диабет тип 2 | Патологическая подвижность имплантата |
| 20 | Ж | 60 | 2года | Метаболический синдром (гипергликемия, гипертензия, ожирение) | Патологическая подвижность имплантата, периимплантит |
| 21 | М | 62 | 2,5года | Сахарный диабет 2 типа, системный остеопороз. | Патологическая подвижность имплантата, периимплантит |
| 22 | М | 58 | 3мес | Артериальная гипертензия, гипертиреоз. | Фиброинтеграция имплантата, мукозит. |
| 23 | М | 67 | 2мес | Артериальная гипертензия, гипертиреоз. | Патологическая подвижность имплантата, периимплантит |
| 24 | М | 60 | 4мес | Сахарный диабет 2 типа, системный остеопороз. | Патологическая подвижность имплантата, периимплантит |

| | | | | | |
|----|---|----|-------|---|--|
| | | | | | |
| 25 | М | 62 | 12мес | Метаболический синдром (гипергликемия, гипертензия, ожирение) | Фиброинтеграция имплантата, мукозит. |
| 26 | М | 55 | 5мес | Сахарный диабет 2 типа, системный остеопороз. | Генерализованный пародонтит, периимплантит |
| 27 | М | 60 | 2года | Артериальная гипертензия, гипертиреоз. | Патологическая подвижность имплантата, периимплантит |
| 28 | М | 59 | 6мес | Сахарный диабет 2 типа, системный остеопороз. | Генерализованный пародонтит, периимплантит |
| 29 | М | 61 | 6мес | Метаболический синдром (гипергликемия, гипертензия, ожирение) | Фиброинтеграция имплантата, мукозит. |

Все жалобы предъявляемые пациентами были разделены на те, которые связаны непосредственно с патологией органов полости рта и на косвенные жалобы, которые опосредованно могли быть обусловлены имплантацией.

В таблице 4 представлены основные жалобы пациентов, связанные со стоматологическими проблемами.

Таблица 4. Жалобы пациентов, связанные с неэффективной имплантацией.

| Характер жалобы | Число пациентов |
|-----------------------------------|-----------------|
| Боль в области имплантата в покое | 13 |

| | |
|---------------------------------------|----|
| Боль при жевании | 18 |
| Нарушение акта жевания | 26 |
| Припухлость в области имплантата | 4 |
| Патологическая подвижность имплантата | 29 |
| Сухость во рту | 11 |
| Изменение вкуса пищи | 5 |
| Нарушение симметрии лица | 4 |
| Деформация лица | 4 |

Оценивая спектр жалоб, предъявляемых в ходе сбора клинических данных, полученных активно с использованием врачом-стоматологом наводящих вопросов, становится понятно, что ряд пациентов предъявляли комплекс жалоб. Количество их было различным и колебалось от 1 до 6. Результаты проведенного многопрофильного анализа приведены на диаграмме (Рис 5).

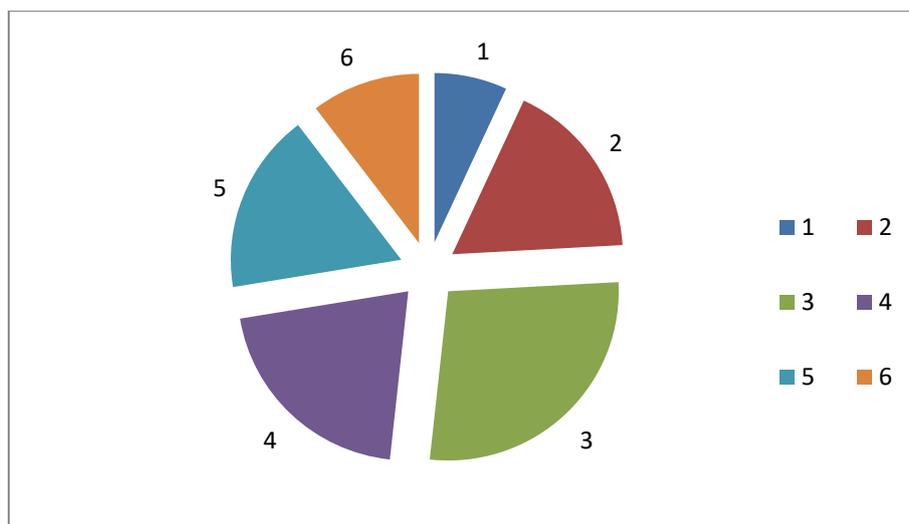


Рисунок 5. Схема распределения пациентов по количеству жалоб, связанных со стоматологической патологией.

Из представленной диаграммы следует, что все пациенты предъявляли 2 (5 человек) и более жалоб – 8 пациентов жаловались на 3 патологических изменения, 5 пациентов были недовольны 5-ю отклонениями от нормы, 6 пациентов - предъявляли 4 жалобы на изменения в полости рта, у трех человек был весь спектр недовольств лечением на предыдущем этапе, что свидетельствует о том, что неэффективная имплантация вызывает целый спектр патологических процессов в полости рта, которые снижают качество жизни пациента.

Поскольку обследованные нами пациенты в большинстве своем относились к старшей возрастной группы, был проведен анализ жалоб, которые на первый взгляд не связаны со стоматологическими проблемами, а явились результатом общей соматической патологии. Однако, ряд исследователей указывает на появление или утяжеление состояния пациентов после осложненной или неудачно проведенной имплантации. Характеристика таких субъективных ощущений представлена в таблице №3-5.

Таблица 5. Характеристика соматических жалоб пациентов.

| Жалоба | Число пациентов |
|---------------------------------|-----------------|
| Головная боль | 8 |
| Боль в области шеи | 4 |
| Напряжение мышц дна полости рта | 4 |
| Повышенная раздражительность | 16 |
| Плохой сон | 3 |
| Нарушение глотания | 3 |
| Снижение аппетита | 8 |
| Нарушение артикуляции | 10 |

| | |
|--|----|
| Дефекты речи | 18 |
| Боль в области нижнечелюстного сустава | 5 |

Из таблицы № 3-3 следует, что пациенты обращают внимание на изменения, которые могли быть и не связанными со стоматологическими проблемами, однако все пациенты указывают на их появление именно после операции по имплантации. При этом только 3 человека не имели подобных жалоб. Среди остальных 26 пациентов только четверо предъявляли одну жалобу, а остальные 22 пациента имели 2 или 3 жалобы (15 и 7 пациентов соответственно).

Сбор анамнеза показал, что период времени, прошедший с момента имплантации до развития осложнений был разнообразный и колебался от нескольких недель до 2-3х лет.

Стоматологический осмотр полости рта пациентов выявил ряд изменений

- патологическая подвижность имплантата- 25 пациентов
- нарушение оси расположения имплантата- 4 пациента
- реактивный гингивит разной степени выраженности в периимплантных тканях – 11 пациентов
- периостит 2 пациента
- пародонтит разной степени выраженности – 27 пациентов.

Помимо проведенного ретроспективного анализа историй болезни, определения стоматологического и общесоматического статуса, нами было проведено исследование качества жизни пациентов с отторжением ранее установленных дентальных имплантатов и сахарным диабетом в анамнезе.

В результате анкетирования были определены значения 4 показателей качества жизни: физическое здоровье, психофизиологическое здоровье, социальные взаимоотношения и окружающая среда, а также общий показатель

качества жизни. Опросник состоял из 26 вопросов, ответы на 2 из которых не учитывались в подсчете показателей. Исходные суммы баллов по доменам формировались и суммы остальных 24 вопросов:

Качество жизни пациента интерпретировалось как низкое, если значение общего показателя качества жизни было 30% и ниже, сниженным – от 31 до 60% и в норме – свыше 61% (табл. 6). В группу исследования было включено 29 человек с осложнениями дентальной имплантации в возрасте 65 лет и старше, с сопутствующими соматическими патологиями.

Таблица 6. Графическая интерпретация значений индекса качества жизни, рассчитанных по доменам.

| Показатели | Респонденты | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|------------|-------------|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | Общий |
| 1 | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н |
| 2 | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н |
| 3 | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н |
| 4 | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н |
| 5 | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н | н |

Показатели качества жизни: 1 - Физическое здоровье; 2 - Психофизиологическое здоровье; 3 - Социальные взаимоотношения; 4 - Окружающая среда; 5 - Общий показатель.



Исходные данные анкетирования подвергались статистической обработке в программе “Microsoft Excel” (рис. 6). Значение показателя физического здоровья было интерпретировано как низкое у 45% респондентов, сниженное и норма – у

38% и 17%, соответственно. Показатель психофизиологического здоровья оказался низким у 52% респондентов, сниженным – у 45% и нормальным – у 3%. Показатель социальных взаимоотношений в данной группе был интерпретирован как низкий у 28%, сниженный – у 48%, норма – у 24% опрошенных. Удовлетворенность окружающей средой была низкой у 28%, сниженной у 48%, а норма значения этого показателя определялась у 24% респондентов.



Рисунок 6. Диаграмма показателей качества жизни (физическое и психологическое благополучие, самовосприятие, микросоциальная поддержка и социальное благополучие), а также общий уровень благополучия у группы людей с отторжением ранее установленных дентальных имплантатов в возрасте 65 лет и старше, с сопутствующей соматической патологией.

Таким образом, по результатам анкетирования, у 31% респондентов качество жизни было определено как низкое, у 59% - сниженное, и норма – лишь у 10%. Значение стандартного отклонения составило 14,39.

Анализ этих данных показал, что увеличение продолжительности жизни населения, наблюдаемое в последние десятилетия, требует от врачей всех специальностей, и в том числе стоматологов, необходимость повышения качества

жизни пациентов, в том числе, путем разработки методов повышения качества оказания стоматологической помощи пациентам старшей возрастной группы с сопутствующей соматической патологией.

Нами был предложен экспериментальный подход к оценке влияния мезенхимальных стволовых клеток на ход остеогенеза, что было реализовано на втором этапе исследования.

ГЛАВА 4. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

По результатам эксперимента, проведено динамическое цитологическое, морфологическое и морфометрическое исследование тканей животного в области окружающей аналог дентального имплантата.

В раннем послеоперационном периоде животные контрольной и опытной групп проявляли одинаковый уровень гиподинамии и щадили оперированную конечность. Макроскопический осмотр зоны операции показал, что у всех животных швы на коже состоятельны, края раны дряблые, светло-розового цвета, выделения из раны отсутствуют [32,36].

Перед забором материала на гистологическое исследование были приготовлены мазки-отпечатки надкостницы в зоне операции, исследование которых показало отсутствие разницы в клеточном составе мазка, который состоял из эритроцитов, нейтрофильных лейкоцитов, макрофагальных элементов и участков некротизированной ткани. Соотношение этих элементов на 100 исследованных клеток опытной группы составляло $61,5 \pm 11,6 / 24,4 \pm 7,3 / 14,7 \pm 8,8 / 19,7 \pm 5,0$ соответственно, в контрольной группе животных - $66,0 \pm 7,9 / 26,7 \pm 9,1 / 16,1 \pm 5,8 / 15,7 \pm 4,2$.

Отсутствие в мазке-отпечатке в опытной группе животных мезенхимальных стволовых клеток свидетельствует об их плотном прикреплении на поверхности титанового аналога дентального имплантата.

Гистологическое исследование препаратов кости в области имплантации показало, что морфологическая картина зоны имплантации дистантно у животных контрольной (Рис. 7) и опытной (Рис. 8) групп не различаются и характеризуется наличием участков некротизированной кости, отдельно лежащих мелких костных фрагментов, чередующихся с кровоизлияниями и клеточными инфильтратами [32,36].

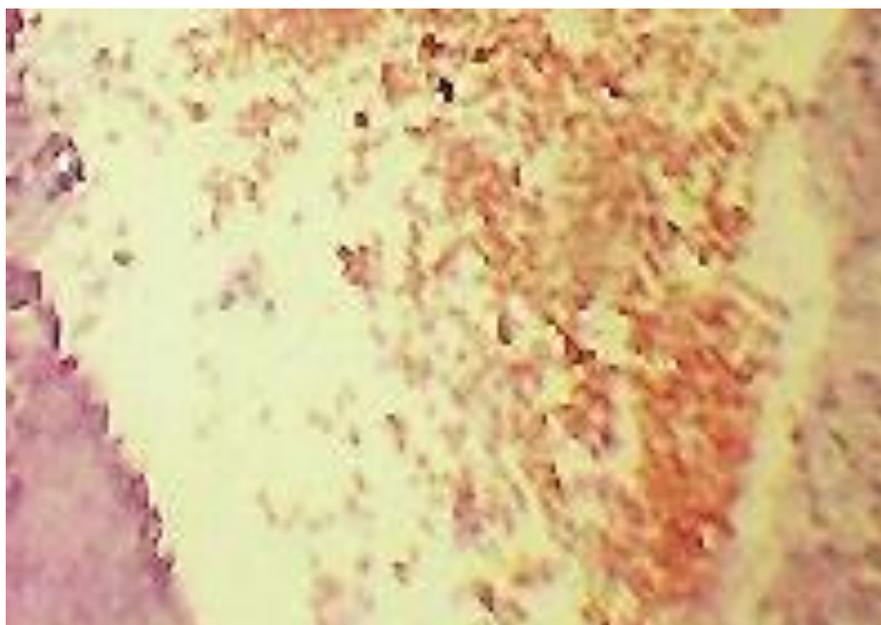


Рисунок. 7. Зона операции на 15 сутки эксперимента. Животное контрольной группы. Доминирование эритроцитов. (гематоксилин-эозин,ув 100х)

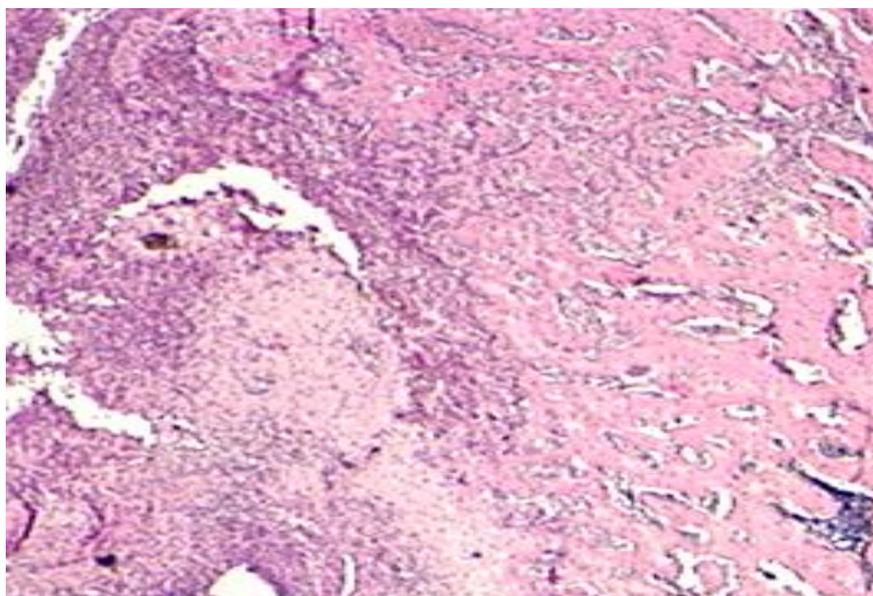


Рисунок. 8. Зона операции на 15 сутки эксперимента. Животное контрольной группы. Диффузный полиморфноклеточный инфильтрат. (гематоксилин-эозин,ув 100х)

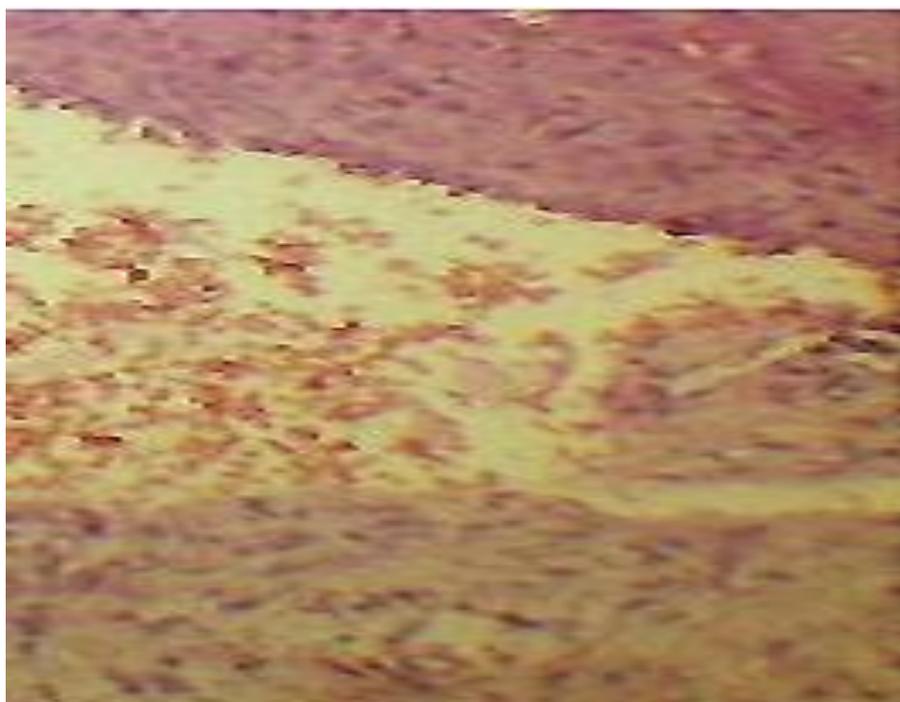


Рисунок. 9. Зона операции на 15 сутки эксперимента. Животное опытной группы. Доминирование эритроцитов. (гематоксилин-эозин,ув 100х)

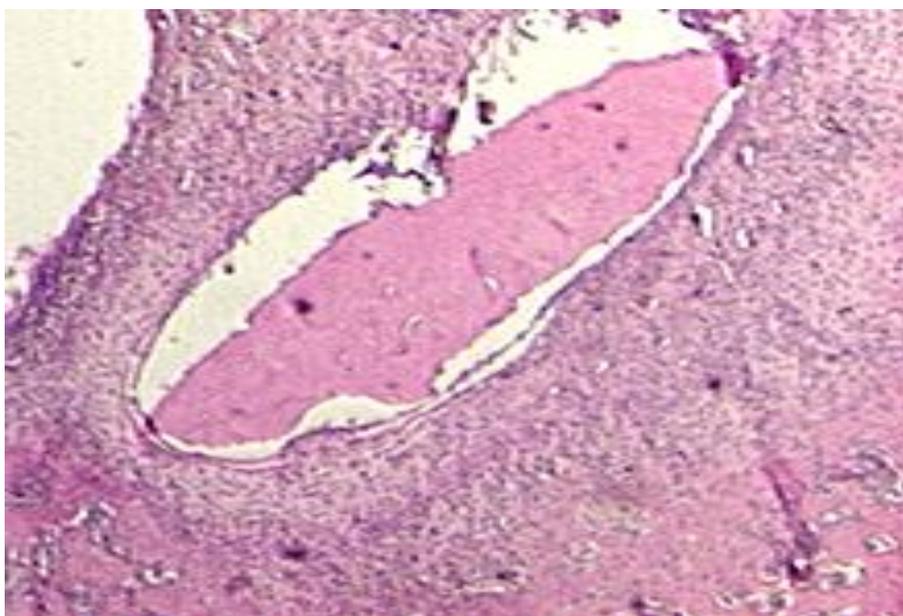
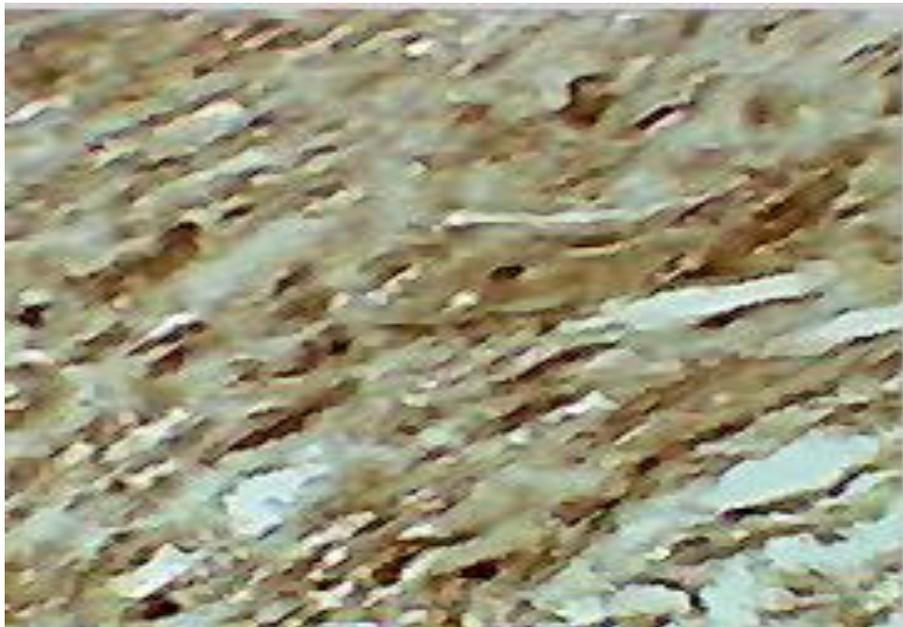


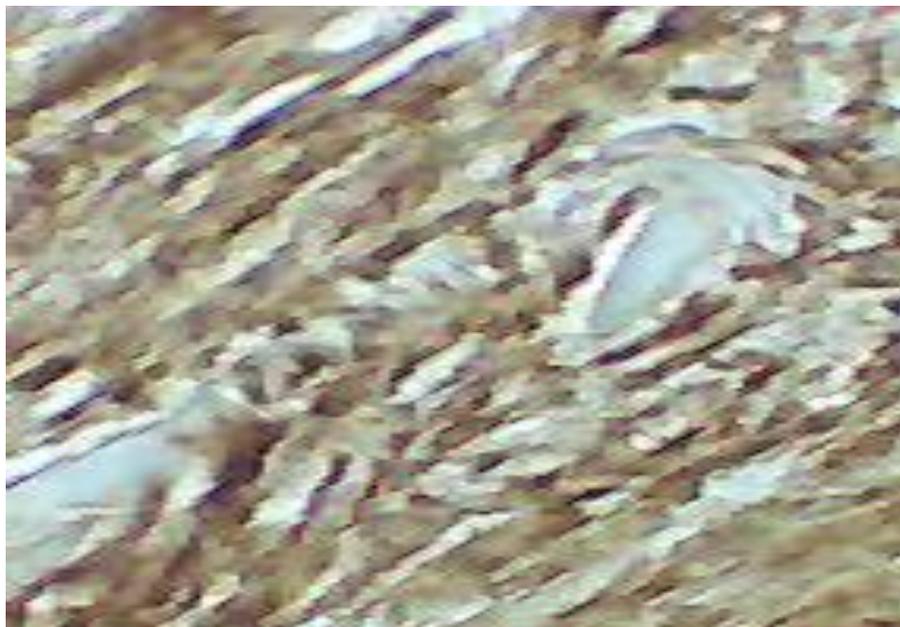
Рисунок. 10. Зона операции на 15 сутки эксперимента. Животное опытной группы. Диффузный полиморфноклеточный инфильтрат, свободно лежащие костные фрагменты. (гематоксилин-эозин,ув 100х)

У животных опытной группы в участках, приближенных к имплантату, определялись мезенхимальные клетки, слой которых был соскоблен перед этапом

декальцинации. Клеточные и ядерные мембраны фибробластов были сохранены, цитоплазма равномерно прокрашена, ядра содержали плотный хроматин. Иммуногистохимическое исследование показало умеренную активность экспрессии S-100 (2+) и виментина (2+) (Рис 11) [32,36].



А



Б

Рисунок. 11. Экспрессия S-100 (А) и виментина (Б) в периимплантационной зоне у животных опытной группы на 3-и сутки эксперимента (увеличение 400х).

Морфометрический анализ клеточных и тканевых соотношений подтвердил описательные данные (Таб. 7)

Таблица 7. Клеточные и тканевые соотношения периимплантатной зоне на 3-и сутки эксперимента.

| Группа | Эритроциты | Нейтрофилы | Мононуклеары | Тканевой детрит |
|-----------------|------------|------------|--------------|-----------------|
| 1 (контроль) | 65.7 ±11.0 | 8,1 ±1,3 | 8,1 ±1.3 | 20,1 ±6.6 |
| 2 (опытная) | 67,9 ±8,9 | 9,4 ±0,9 | 4,7 ±1,0 | 19.7 ±5,9 |

Данные, представленные в таблице, характеризуют ранний послеоперационный период как стадию альтерации, которая характеризует острый период травмы и является инициирующей фазой воспалительного процесса. В этот период доминирует процесс разрушения клеточных и тканевых элементов, возникает вторичная альтерация и еще не происходит активизации остеокластов, работа которых заключается в резорбции структурно измененных костных фрагментов [32,36].

Таким образом, ранние сроки после операции (2-3-е сутки) характеризуются неспецифическим процессом альтерации, продолжительность которого отражает физиологический процесс, зависит лишь от силы травмирующего фактора и не может быть сокращена применением различных модифицирующих или стимулирующих воздействий.

Через неделю после имплантации экспериментальные животные выглядели здоровыми, передвигались, не опираясь на конечность, при пальпации отдергивали ногу. Операционная рана выглядела спокойно, раневого отделяемого не было.

Мазки отпечатки в области имплантации были значительно более скудными по клеточному составу, что сделало необходимым сделать мазок более концентрированным (Рис.12;13).

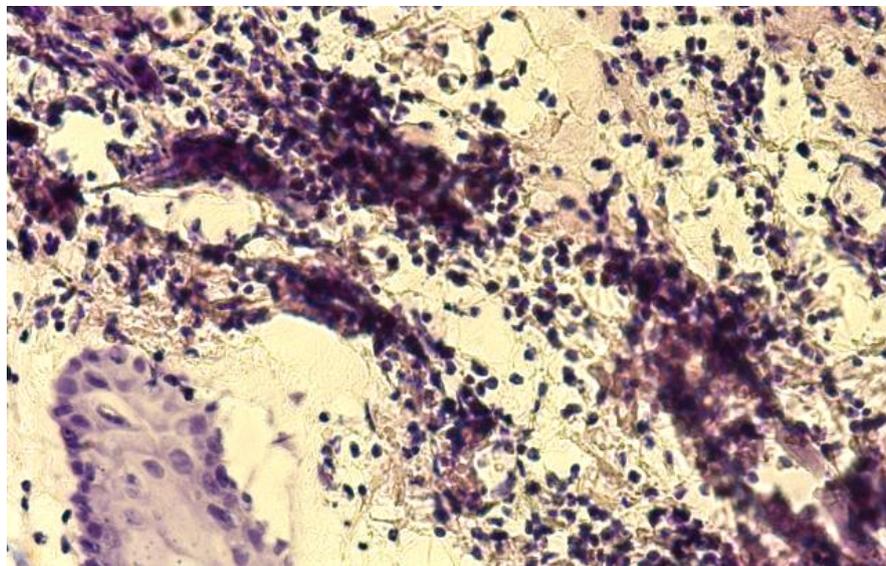


Рисунок. 12. Мазок-отпечаток с области операции у животного контрольной группы (окраска по Романовскому-Гимзе.ув. 100х)

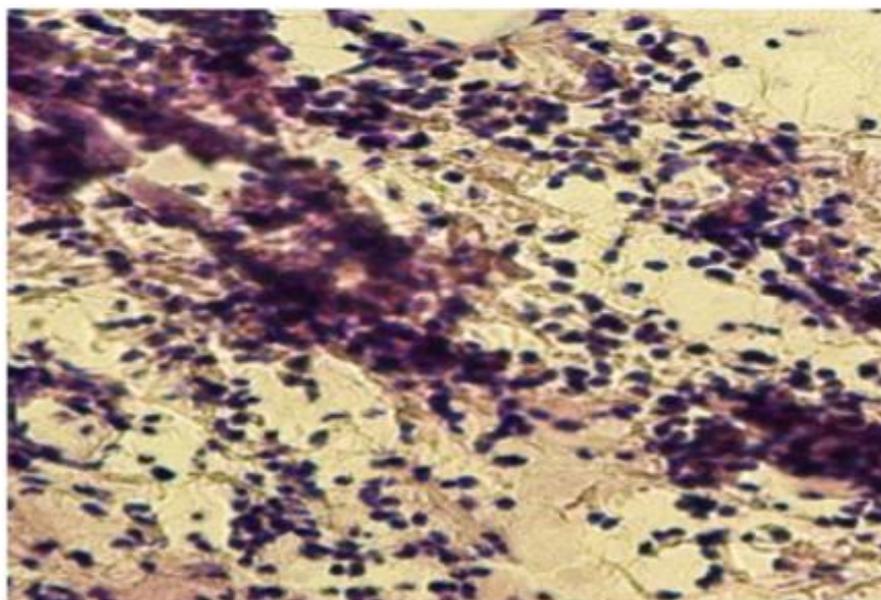


Рисунок 13. Мазок-отпечаток с области операции у животного опытной группы (окраска по Романовскому-Гимзе ; ув. 100х)

Спектр клеток в мазке был практически однородным, поскольку был представлен преимущественно нейтрофильными лейкоцитами (Таб. 7).

Таблица 7. Клеточный состав мазков отпечатков с зоны имплантации на 7 сутки после операции.

| Группы | Эритроциты | Нейтрофильные лейкоциты | Мононуклеары |
|-------------|------------|-------------------------|--------------|
| 1(контроль) | 4,4 ±1,0 | 56,7± 5.5 | 28,8± 4,2 |
| 2 (опыт) | 7,1±2,1 | 66,6 ±9,4 | 25,3 ±3.6 |

Как видно и представленной таблицы, указанные сроки, также не выявили разницы между контрольной и опытной группами в плане развития регенераторного процесса, начинающегося с диапедезом нейтрофилов, развитием экссудативного воспаления, сменой реакции инфильтративной на пролиферативную, формированием грануляционной ткани [32, 36].

Полученные данные также свидетельствуют о том, что экссудативная стадия воспалительного процесса не зависит от применения модифицирующих и стимулирующих факторов воздействия. Вот почему в кинике важно соблюдение стерильности оперативного вмешательства, чтобы не удлинить и утяжелить эту стадию воспаления путем создания благоприятных условий для развития патогенных микробов (сгустки крови, обширные некротизированные участки ткани и др.) [32, 36].

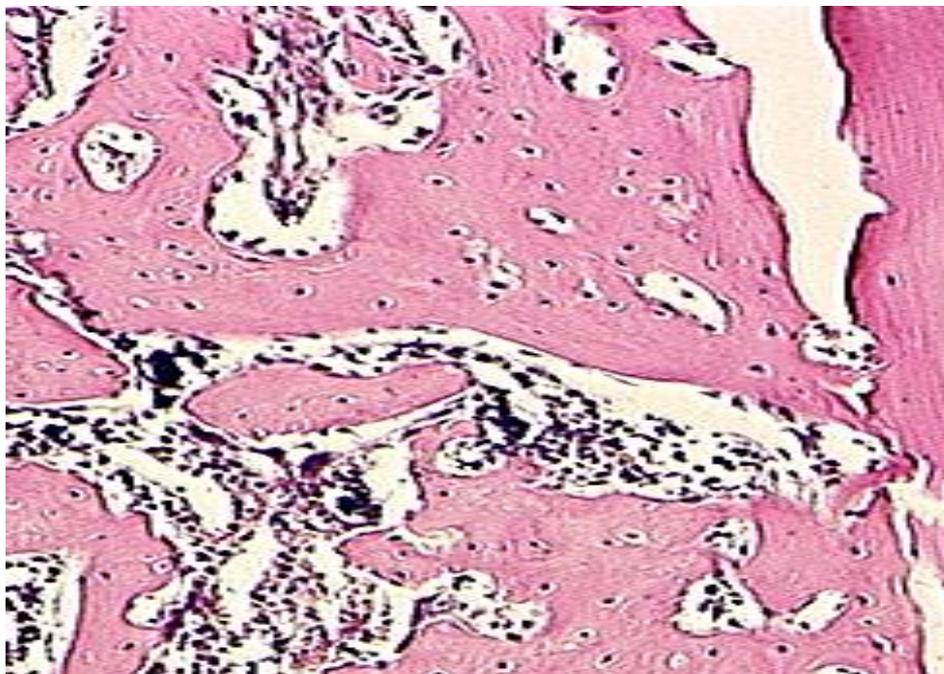
К 14-м суткам эксперимента животные выглядели спокойными, почти не щадили заднюю конечность при ходьбе. Зона операции обрастала шерстью.

Гистологическое исследование костных фрагментов животных в эти сроки показало, что у животных опытной группы существует разница между зоной контакта с имплантатом и дистантными участками на расстоянии 4-5 мм от него, тогда как в контроле морфологические изменения мало отличались в этих двух зонах [36].

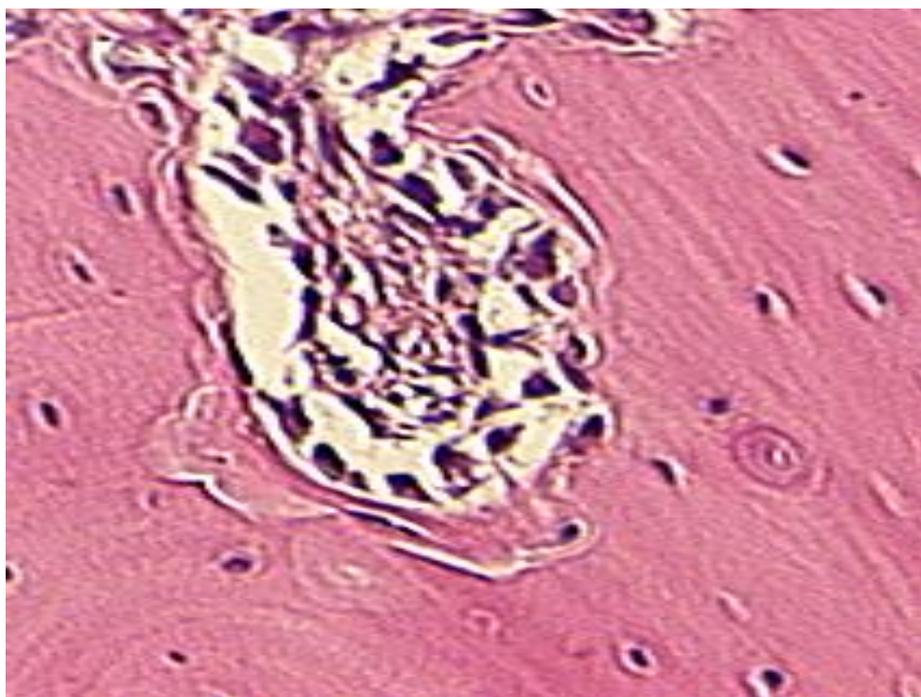
Так, у животных контрольной группы изменения в костной ткани характеризовались началом активизации остеокластов, которые разрушают структурно измененную кость в зонах операции. Этот процесс происходит у животных как контрольной, так и опытной групп.

В контроле доминирует лакунарное рассасывание костной ткани, когда формируются погружное движение остеокластов с образованием лакун, не содержащих костных структур. Причем в дистантных и контактных с имплантатом участках этот процесс выглядел одинаково выраженным (Рис 14).

[36]



А



Б

Рисунок. 14. Активное лакунарное рассасывания костной ткани в зоне имплантации у животных контрольной группы на 15 сутки опыта (гематоксилин-эозин; ув 200 х (А) и 400 (Б)).

В опытной группе в дистантных участках процесс рассасывания кости идет по тем же закономерностям, что и в контроле. Дистанционно определяются скопления остеокластов, которые также включаются в рассасывание костных фрагментов. Вдали от имплантата морфологическая картина костных процесс не отличается от контрольной, она характеризуется процессами активного остеокластического рассасывания фрагментов костной ткани. В то же время в зоне контакта с имплантатом процесс рассасывания кости происходит не так активно, как в контроле, что позволяет сохранить фрагменты разрушенной кости в виде фрагментов, на базе которых будет формироваться новообразованная кость [32, 36].

Для объективизации наблюдений было предпринято вычисление длины зон рассасывания костной ткани и оценки числа остеокластов в 50 полях зрения при увеличении микроскопа 400х, исходя из полученных данных был высчитан

коэффициент числе остеокластов на единицу длины фронта рассасывания кости, который является косвенным показателем активности резорбции костной ткани. Полученные данные приведены в таблице 8.

Таблица 8. Показатели остеокластического рассасывания некротизированных участков кости на 7 сутки эксперимента.

| Группа | Зона контакта с имплантатом | | | Дистантная зона | | |
|-----------------|---------------------------------------|--------------------|---|---------------------------------------|--------------------|---|
| | Длина фронта рассасывания кости (мкм) | Число остеокластов | Коэффициент активности и рассасывания кости | Длина фронта рассасывания кости (мкм) | Число остеокластов | Коэффициент активности рассасывания кости |
| 1 (контроль) | 1134,91±91,1 | 189±27 | 0.16 | 750,7± 29,3 | 120±32 | 0,16 |
| 2 (опыт) | 447.7 ±7,6* | 50±7* | 0.11 | 644,8± 50,2 | 114±21 | 0,17 |

*- $p \leq 0,001$

При гистологическом исследовании зоны имплантации вблизи титановой пластины видны жизнеспособные мезенхимальные клетки, имеющие полноценную структуру мембран. (Рис. 15). Сохранность структуры стволовых клеток к данным срокам опыта свидетельствует об их участии в процессах остеогенеза, что было подтверждено рядом авторов.

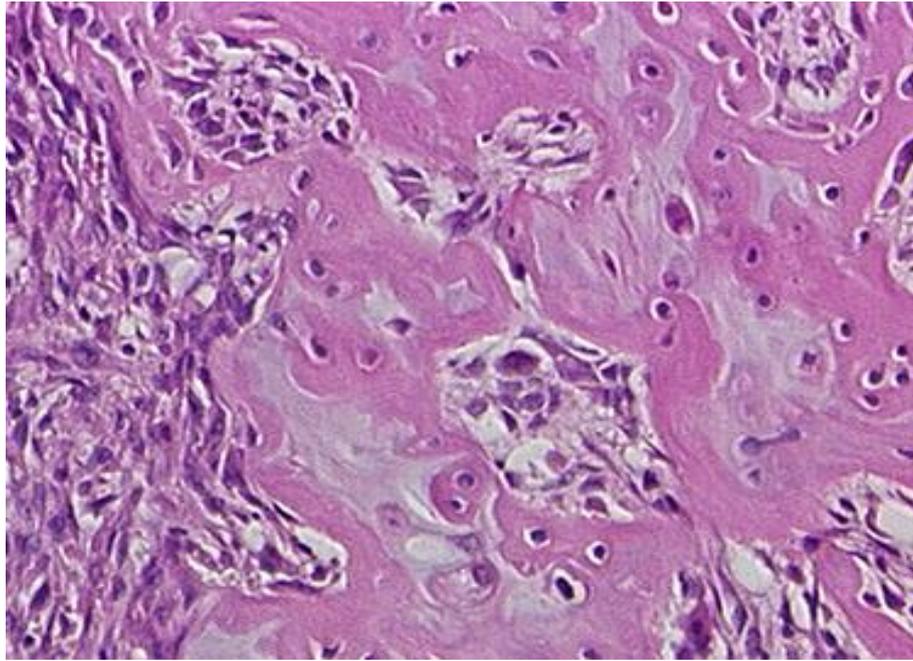


Рисунок 15. Область имплантации, прилежащая к слою мезенхимальных стволовых клеток. Менее выраженная активность остеокластов у животных опытной группы .(15-е сутки эксперимента) (гематоксилин-эозин .ув 200х).

В некоторых образцах у животных в контактной зоне имело место начало формирования фиброзной ткани (Рис 16).

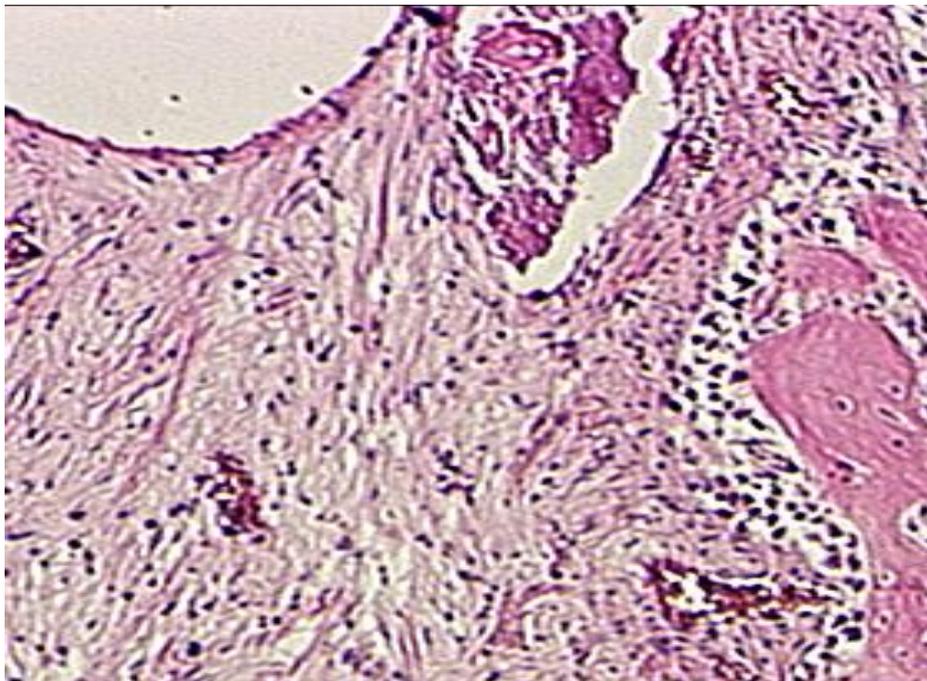


Рисунок 16. Область имплантации у животных опытной группы. Пазушное рассасывание костной ткани и параллельно идущий процесс формирования соединительной ткани (гематоксилин-эозин ; ув 200х).

Морфометрический подсчет тканевых соотношений в целом в периимплантной ткани в 50 полях зрения при увеличении 400х показал, что в контрольной группе животных площадь некротизированных участков кости снижена в сравнении с контролем в результате начала остеокластического процесса резорбции. Это привело к относительно большему проценту присутствия участков костной ткани реципиента (Таб. 9) [32,36].

Таблица 9. Тканевые соотношения (в %) в периимплантной ткани к 15-м суткам эксперимента.

| Группа | Зона альтерации | Зона воспаления | Соединительная ткань | Костная ткань | Кровеносные сосуды |
|--------------|-----------------|-----------------|----------------------|---------------|--------------------|
| 1 (контроль) | 13.2±0,2 | 23.0 ±2.3 | 23,4± 0,7 | 35,2 ±3,1 | 3,2 ±0.1 |
| 2 (опыт) | 24,2±1,3* | 6,0± 0,5 | 20.6 ±5.1 | 24,8 ±2,2 | 26,2 ±2,1 |

*- $p \leq 0,005$

Из представленной таблицы следует, что в целом в опытной группе площадь зоны альтерации костной ткани достоверно выше, чем в контрольной группе животных. Это объясняется более активным процессом резорбции костных фрагментов, образованных в ходе операции у животных контрольной группы. В контроле при этом уже начинает формироваться фиброзная ткань в контактной части операционной зоны, что подтверждает влияние метаболитов мезенхимальных стволовых клеток на регенераторный процесс [32,36].

Изучение кости, контактирующей с имплантатом покрытым стволовыми клетками к 15 суткам эксперимента продемонстрировало, сведенную к минимуму экссудативную составляющую воспаления, а в зоне контакта определяется хорошо сформирована грануляционная ткань типичного строения с наличием многочисленных тонкостенных кровеносных сосудов и прилегающая к ней зона

клеточно волокнистой ткани, с большим количеством сформированных сосудов. Все это характеризует переход грануляционной ткани в соединительную, содержащую все структурно-функциональные элементы – клетки, волокна и кровеносные сосуды, обеспечивающие полноценный метаболизм, пролиферацию и дифференцировку [32,36].

Соответственно, уже на ранних сроках наблюдаются процессы, обеспечивающие, в конечном итоге активный остеогенез: формирование кровеносного русла, обеспечивающего доступ питательных веществ и образование зрелой соединительной ткани, поскольку зрелая соединительная ткань, как предполагается, будет подвергаться остеогенной дифференцировке впоследствии.

Это предположение было подтверждено исследованиями костной ткани животных на 30 сутки опыта.

К концу первого месяца опыта в контрольной группе происходила физиологическая регенерация костной ткани, как вблизи имплантата, так и дистантно. К этому сроку экссудативный компонент трансформировался в продуктивный с формированием грануляционной ткани, богатой тонкостенными кровеносными сосудами, формирующими обширное русло доставки питательных веществ и кислорода вновь образующейся костной ткани. Кроме того, активно шел процесс созревания грануляций с развитием рыхлой фиброзной ткани (Рис. 17).

Доминирующей морфологической характеристикой зоны операции у животных опытной группы явилось наличие полноценно сформированной костной ткани. Межтрабекулярные пространства сформированной кости представлены красным костным мозгом, что отчетливо видно на рисунке (Рис. 18).

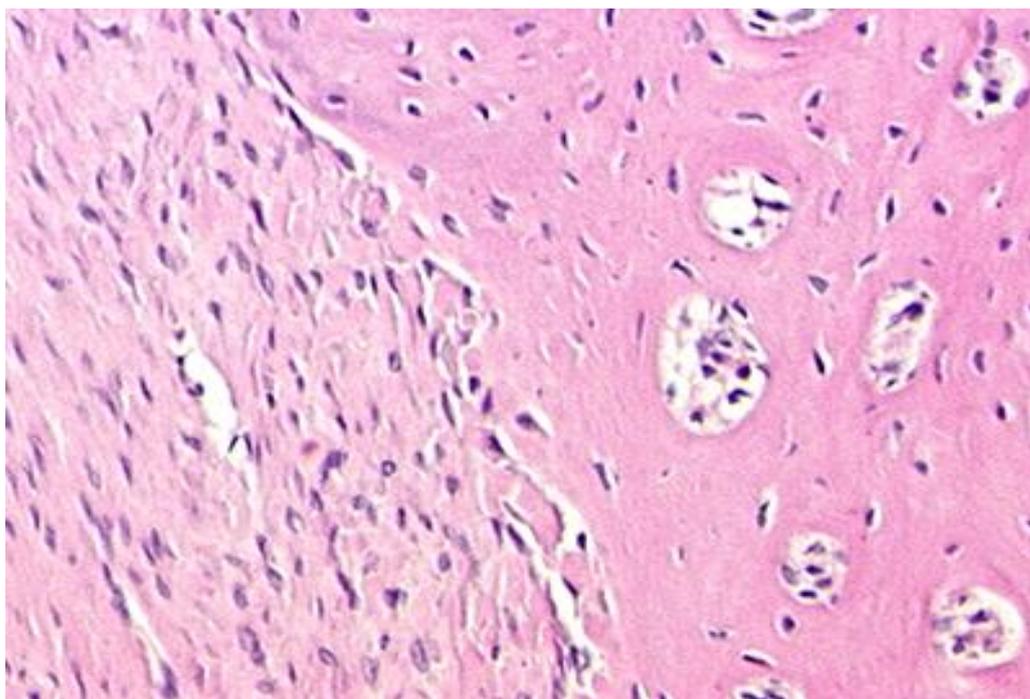


Рисунок 17. Рыхлая соединительная ткань с прилежащими новообразованными костными структурами Животное контрольной группы, 30 сутки эксперимента (гематоксилин-эозин; ув.100х)

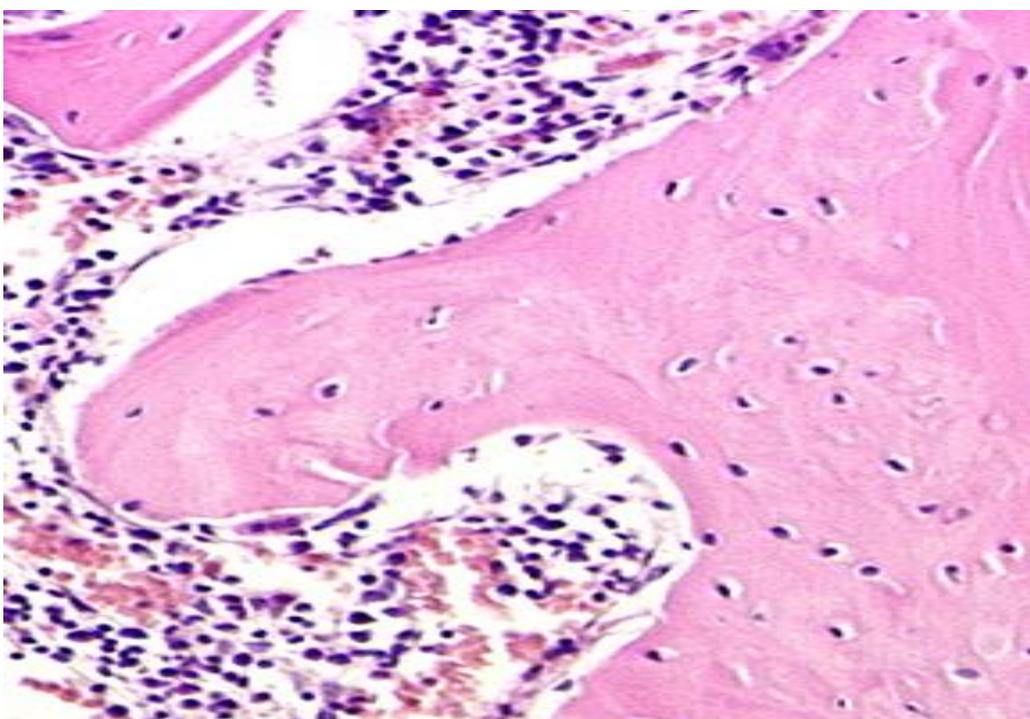


Рисунок 18. Компактные костные структуры с пластинчатым характером матрикса. Присутствие костного мозга. Животное опытной группы. 30-е сутки эксперимента (гематоксилин-эозин; ув.400х).

То есть, та соединительная ткань, которая в первом слое образовалась, как предшественник новообразованной костной ткани превратилась в тонкую костную пластинку, что свидетельствует о более выраженных остеогенных процессах в сравнении с контрольной группой.

Тканевые соотношения к тому сроку характеризуются увеличением площади кровеносного русла в контроле и снижением у животных опытной группы. В контрольных образцах доминировали площади фиброзной ткани и пластинчатой костной ткани, отражая ход физиологической регенерации костной ткани к данному сроку. У животных опытной группы имел место уже следующий этап регенерации – формирование остеонов, заполненных костным мозгом.

Морфометрический анализ тканевых соотношений у контрольных и опытных животных представлен в таблице 10.

Таблица 10. Тканевые соотношения (%) в зоне имплантации к 30-м суткам эксперимента.

| Группа | Зона альтерации | Соединительная ткань | Костная ткань | Сосуды |
|-----------------|-----------------|----------------------|---------------|------------|
| 1 (Контроль) | 1,2± 0,1 | 41,3 ±5,8 | 34.1± 15.9 | 30,4±5,7** |
| 2 (Опыт) | 13,0± 0,2* | 24,7 ±3,0** | 55,6 ± 4,5* | 19,6±0,9 |

*- $p \leq 0.001$ **- $p \leq 0,05$

Как следует из данных представленных в таблице, у животных опытной группы более длительное время существуют некротизированные фрагменты кости, которые в последствии будут работать подобно костной крошке, которая

по данным ряда авторов, выполняет роль опорных костных фокусов будущего остеогнеза.

Наряду с этим у животных опытной группы площадь новообразованной костной ткани достоверно выше, чем в контроле, что обусловлено, влиянием активных метаболитов мезенхимальных стволовых клеток. Площадь сосудов при этом снижается в сравнении с животными контрольной группы, поскольку у них все еще продолжается стадия физиологической регенерации в виде формирования грануляционной ткани, богатой кровеносными сосудами.

К концу двух месяцев эксперимента животные обеих групп выглядели спокойными, не реагировали на пальпацию зоны операции, которая была покрыта шерстью. Формирование фрагмента кости для гистологического исследования было осложнено удалением металлического имплантата, который плотно был прикреплен к окружающим тканям, выделить его без потерь периимплантных тканей не удалось.

Гистологическое исследование костной ткани показало, что у животных опытной и контрольной групп доминирующим морфологическим признаком явилась костная ткань, как вблизи зоны имплантации, так и дистанционно.

Так, к 60-м суткам эксперимента в препаратах животных определяется костная пластинка по всему периметру полости. При этом в контроле кость, прилегающая к дефекту, еще не завершила процесс созревания, тогда как на периферии она уже трансформировалась в губчатую кость с наличием костного мозга (Рис. 19). У животных опытной группы участок кости граничащий установленным имплантатом представлен пластинчатым матриксом. В межтрабекулярных пространствах костномозгового канала, в губчатом веществе, визуализируется красный костный мозг с четкими очагами кроветворения. Костное вещество выглядит более дифференцированным и продолжает проявлять тенденцию к компактизации (Рис. 20) .

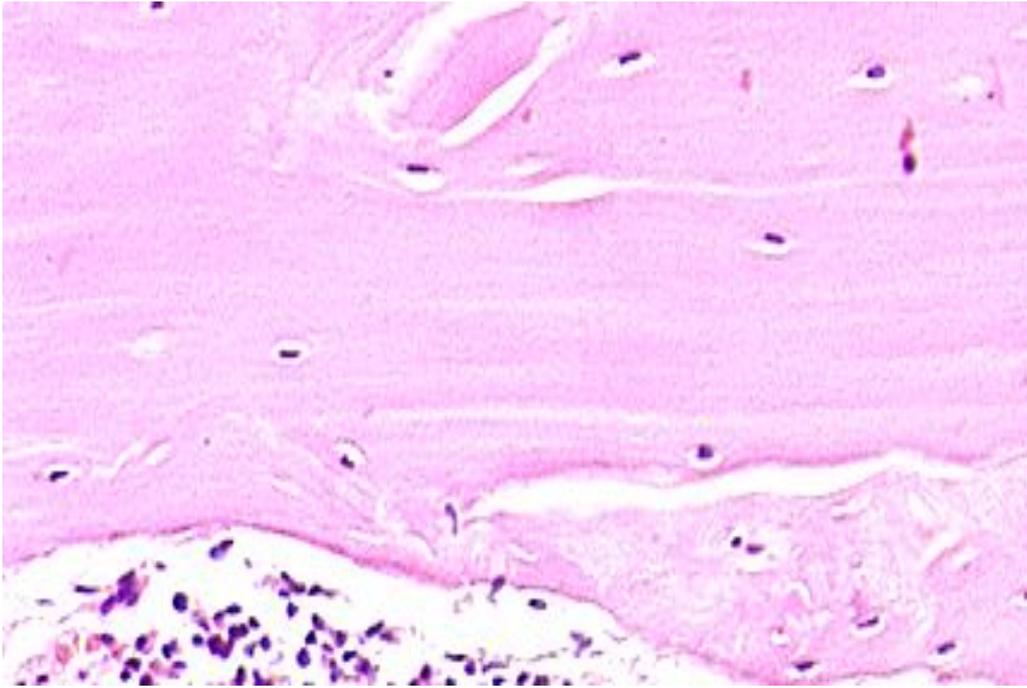


Рисунок 19. Костная пластинка в области дна костного дефекта. Незрелая костная ткань. Животное контрольной группы. 60-сутки эксперимента (гематоксилин-эозин; ув. 200х)

Таким образом, данные гистологического исследования свидетельствуют о том, что при наличии на поверхности имплантата жизнеспособных мезенхимальных стволовых клеток происходит ускорение процессов остеогенеза в области сформированного костного дефекта с формированием зрелой костной ткани.

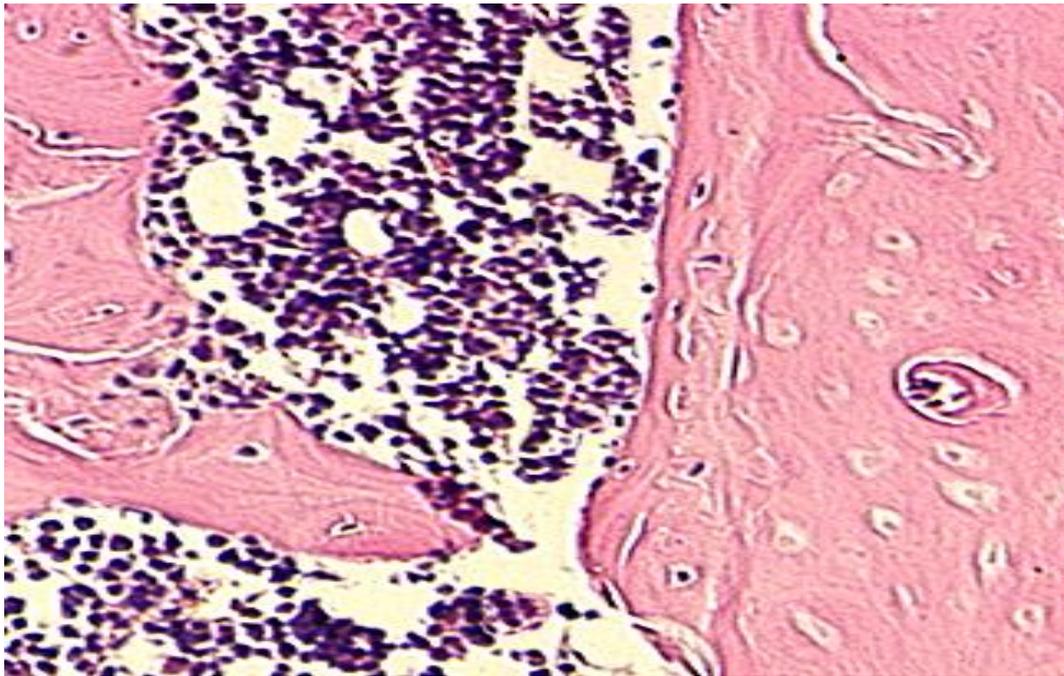


Рисунок 20. Костная пластинка в области дна костного дефекта. Зрелая костная ткань с формированием остеонов. Животное опытной группы. 60-сутки эксперимента (гематоксилин-эозин; ув. 200х)

Данные гистологического исследования были подтверждены морфометрическими показателями соотношений соединительной ткани, незрелой и зрелой костной ткани в зонах, близких к имплантату (Таб.11).

Таблица 11.Тканевые соотношения (в %) в участках контактного остеогенеза у животных на 60-е сутки опыта.

| Группа | Фиброзная ткань | Незрелая костная ткань | Зрелая компактная кость | Кровеносные сосуды |
|--------------|-----------------|------------------------|-------------------------|--------------------|
| 1 (контроль) | 14,0 ± 3,3 | 43,6 ± 4,4 | 23,4 ± 6,7 | 25,3 ± 5,1 |
| 2 (опыт) | 17,6 ± 11,0 | 26,7 ± 5,2* | 42,9 ± 7,9* | 10,6 ± 2,0* |

*- $p \leq 0,001$

Другим доказательством созревания и компактизации кости являются морфометрические показатели площади сосудистого русла, которые являются максимальными в стадию формирования грануляционной ткани, затем

снижаются в период образования зрелой соединительной ткани. Дальнейшее снижение числа сосудов и площади кровеносного русла, свидетельствует о трансформации соединительной ткани в костную с дальнейшим ее уплотнением, формированием компактной кости с остеонами и губчатой кости с островками костного мозга (Рис. 21).

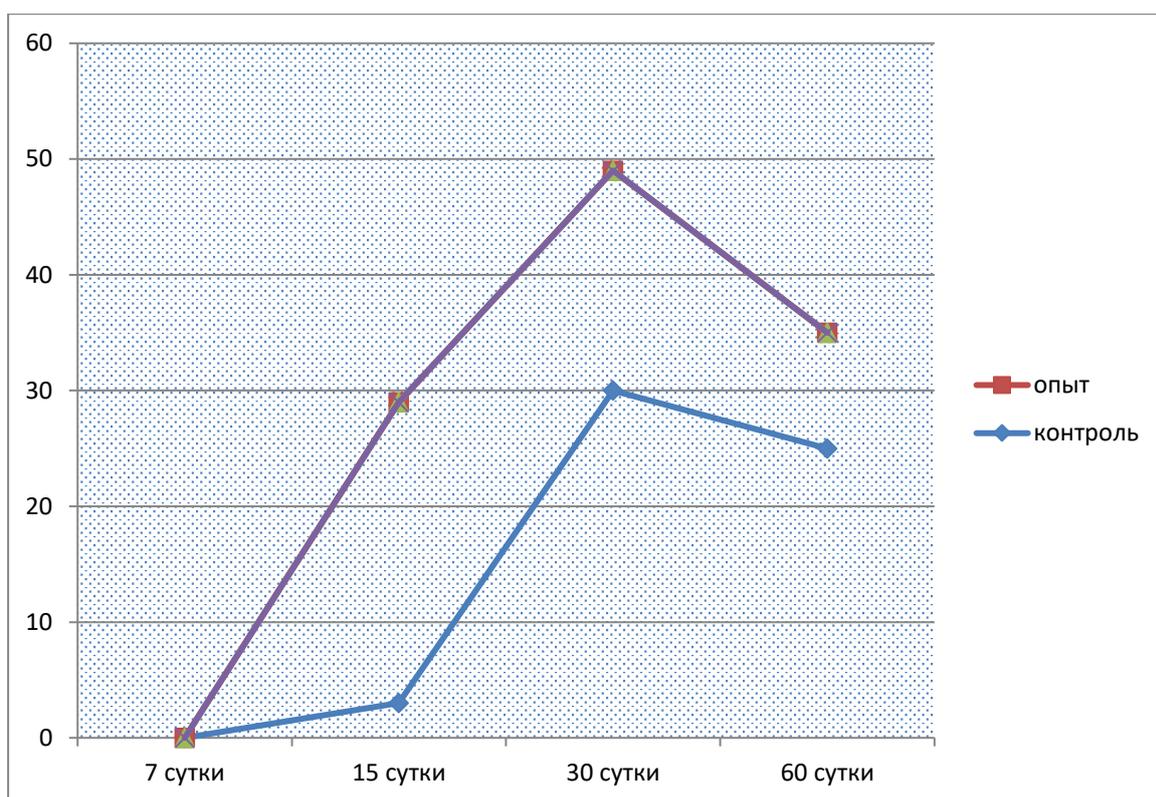


Рисунок 21. Динамика изменений площади кровеносного русла в зоне имплантации по мере развития регенераторного процесса.

Репаративный остеогенез на границе с имплантатом характеризуется тем, что он зависит от наличия стимулирующего фактора, которым в данном эксперименте являются мезенхимальные стволовые клетки и их метаболиты.

Так, в отсутствие мезенхимальных стволовых клеток образование кости слабее в участке окружающем имплантат, и к концу эксперимента в зоне дефекта формировались поля фиброзной соединительной ткани, кнаружи от которых шло формирование незрелой костной ткани, которая в месте с фиброзной заполняла зону костной раны. Это отражает естественный регенерационный процесс в

кости, который далек от завершения даже к концу второго месяца после имплантации.

При использовании мезенхимальных стволовых клеток ранний посттравматический период не отличался от аналогичного в контрольной группе. Период альтерации и экссудативной фазы воспаления при неосложнённом течении процесса протекал в те же сроки, что и в физиологических условиях.

В то же время, присутствие мезенхимальных стволовых клеток проявляют свое воздействие на непосредственный период восстановления костной ткани. На первом этапе они тормозят окстеокластическую функцию макрофагов, оставляя сохранными некротизированные фрагменты предсуществовавшей кости, которые стали в последующем платформой формирования новообразованной кости, выполняя при этом функцию «костной крошки». Грануляционная ткань при этом имеет более выраженную тенденцию к быстрому созреванию, превращению в зрелую фиброзную ткань, имеющую все типовые компоненты - клетки, волокна и кровеносные сосуды. В дальнейшем происходила трансформация фиброзной ткани в костную с формированием зрелой, полноценной в структурном отношении кости, обеспечивающей прочностные характеристики имплантата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние десятилетия важным демографическим достижением является увеличение в структуре населения доли лиц пожилого возраста. В настоящее время благодаря программам профилактической медицины и активной фармакотерапии хронических заболеваний люди старшей возрастной группы проявляют желание к активной жизни, стараются не только следить за своим здоровьем, но получать качественную медицинскую помощь во всех областях медицины, в том числе стоматологическую помощь. В то же время за долгие годы жизни накапливается целый спектр хронических заболеваний, которые необходимо учитывать в ходе специализированного стоматологического лечения.

В связи с этим, нами, ретроспективно были проанализированы 134 истории болезни пациентов старшей возрастной группы с сопутствующей соматической патологией и неэффективной дентальной имплантацией. С целью детализации существующей проблематике, нами было проведено клиническое исследование по изучению соматического, стоматологического статуса пациентов, а также определено их качество жизни. Для чего, в соответствии с разработанными критериями включения и не включения в исследование, позволяющими исключить осложнения, связанные с прогрессом общесоматических заболеваний, было отобрано 29 человек.

Изучение соматического статуса пациентов с осложненным постимплантационным периодом выявил целый спектр хронических заболеваний, включая эндокринную, сердечно-сосудистые патологии и др., при которых процесс физиологической регенерации ослаблены. Так, рядом авторов описаны проблемы с заживлением ран больных с нарушенным метаболизмом, удлинение сроков сращения переломов костей у больных сахарным диабетом.

Результаты анкетирования по определению качества жизни, проведенные по краткому опроснику ВОЗ-26 (WHOQOL-BREF), продемонстрировали статистически достоверный низкий уровень.

По данным литературы, известно, что пациенты, страдающие эндокринопатиями, заболеваниями костно-мышечной системы, а также с сердечно-сосудистой патологией, находятся в группе риска по развитию осложнений в постимплантационном периоде (Иванов С.Ю. и соавт., 2001; Миронов С.П., 2007), что требует разработки эффективных методов интеграции имплантата в окружающие ткани, в частности, в костную ткань хозяина для обеспечения высоких прочностных характеристик имплантата, полноценного акта жевания, отсутствия неприятных ощущений в полости рта, свободной и привычной артикуляции. С этой целью многие исследователи предлагают разнообразные методы воздействия на процесс регенерации, включая стимуляцию коллагенообразования, ангиогенеза и других процессов обеспечения формирования полноценных тканей.

Проблема стимулирования остеоинтеграции имплантатов при замещении дефекта зубного ряда все еще остается важной проблемой в стоматологии. В связи с этим в условиях широкого применения в практике ортопедической стоматологии современных типов протезов исследователи не только детально изучают причины неблагоприятных исходов протезирования, пытаются изыскать пути оптимизации конструкций, но и разрабатывают методики сокращения сроков лечения и предотвращения возможных осложнений (Колесов О.Ю., 2008; Розов Р.А., 2009; Федотова Е.А., 2011; Трезубов В.В., 2012; Чикунев С.О., 2013).

Биомедицинские клеточные технологии с применением стволовых клеток - новая, но уже активно используемая многообещающая область практической стоматологии, которая развивается во всем мире (авторы). Вместе с тем вопросов в этой области намного больше, чем ответов, что и определяет выбранную нами цель исследования динамического морфологического анализа процессов

заживления кости и остеоинтеграции имплантата при восстановлении дефектов зубных рядов, используя для этого экспериментальных животных.

Учитывая невозможность проведения клинических исследований с применением мезенхимальных стволовых клеток, нами был предложен экспериментальный подход к оценке их влияния на ход остеогенеза, что было реализовано на втором этапе исследования.

С этой целью, была предложена и апробирована, методика культивирования, а главное, фиксации МСК на титановой поверхности аналогов дентальных имплантатов, которые в экспериментальном исследовании на лабораторных животных внедрялись в интраоперационный костный дефект. С последующим изучением регенераторных процессов костной ткани, проведением цитологического, гистологического, гистоморфометрического и иммуногистохимического исследования на различных сроках послеоперационного периода.

Гистологическое исследование препаратов кости в области имплантации показало, что морфологическая картина периимплантной зоны дистантно от имплантата животных контрольной и опытной групп не различаются, и характеризуется наличием участков некротизированной кости, отдельно лежащих мелких костных фрагментов, чередующихся с кровоизлияниями и клеточными инфильтратами. Таким образом, ранние сроки после травматизации характеризуются неспецифическим процессом альтерации, продолжительность которого отражает физиологический процесс, зависит лишь от силы травмирующего фактора и не может быть сокращена применением различных модифицирующих или стимулирующих воздействий.

Данные, полученные при изучении периода острой фазы воспаления, также свидетельствуют о том, что экссудативная стадия воспалительного процесса также не зависит от применения модифицирующих и стимулирующих факторов воздействия.

Через две недели после имплантации были выявлены первые признаки регенерационного процесса, заключающегося в взаимнонаправленных процессах развития соединительной ткани- со стороны отдаленной зоны от имплантата и со стороны имплантата, в которой определялись жизнеспособные мезенхимальные стволовые клетки. Этот факт позволяет предположить, что мезенхимальные клетки и их метаболиты влияют на процесс разрастания соединительной ткани, которая в последующие сроки подвергается остеогенной дифференцировке. В контрольной группе животных соединительная ткань наплаивает с дистанционного края зоны альтерации, что удлиняет регенераторный процесс. В группе с использованием мезенхимальных стволовых клеток раньше происходит созревание фиброзной ткани, ее трансформация с формированием типичной костной ткани, способствующей более ранней остеоинтеграции имплантата, обеспечивающей более выраженные его прочностные характеристики.

ВЫВОДЫ

1. Показатели качества жизни, а именно, физическое и психологическое благополучие, самовосприятие, микросоциальная поддержка и социальное благополучие, а также общий уровень благополучия у пациентов с неудачами дентальной имплантации, вызванными сопутствующей соматической патологией, определены как: низкие у 31% и сниженные у 59% респондентов, при значении стандартного отклонения 14,39.

2. Предложенная технология фиксации мезенхимальных стволовых клеток к поверхности аналогов титановых дентальных имплантатов заключающаяся, в специальной пескоструйной обработке образцов с последующим термическим центрифугированием при фиксируемой температуре и временной экспозиции показала высокую выживаемость клеток в эксперименте *in vivo*.

3. В результате проведенного эксперимента на 60 сутки в опытной группе зрелая компактная кость вокруг аналога дентального имплантата преобладала и составляла 42,9 % общего объема интраоперационного дефекта, что 2,1 раза превосходит аналогичные показатели в контрольной группе ($p \leq 0,001$), тогда, как незрелая костная ткань в аналогичной прогрессии преобладала в контрольной группе, что в целом, интерпретируется как, положительное влияние на репаративный остеогенез, мезенхимальных стволовых клеток фиксированных к поверхности аналогов дентальных имплантатов.

4. Характерным этапом регенераторного процесса в системе «имплантат - кость реципиента» определенным в эксперименте является снижение процесса резорбции костной ткани при использовании мезенхимальных стволовых клеток, что обеспечивает сохранение точек остеогенеза в контактной зоне.

5. Основным механизмом оптимизации остеогенеза при использовании мезенхимальных стволовых клеток является их влияние на формирование взаимонаправленного процесса развития фиброзной ткани и ее трансформация с

формированием типичной костной ткани, способствующей более ранней
остеоинтеграции имплантата, обеспечивающей более выраженные его
прочностные характеристики.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Принятие решения о перспективном методе восстановления потери зубных рядов с опорой на дентальные имплантаты, должно быть основано на полном сборе анамнеза пациента с активным выяснением не только стоматологической и соматической патологии, но и изучения качества жизни пациентов на всех этапах лечения.

2. При наличии состояний и заболеваний, связанных со снижением регенераторных возможностей организма (пожилой возраст, иммунодефицит, остеопороз, эндокринная патология, онкологические заболевания и др.) необходимо использовать методы, стимулирующие репаративный процесс в тканях, так как мезенхимальные клетки и их метаболиты влияют на процесс разрастания соединительной ткани, которая в последующие сроки подвергается остеогенной дифференцировке.

3. Для фиксации культивированных мезенхимальных стволовых клеток на поверхности аналогов дентальных имплантатов, необходимо, провести многократную пескоструйную обработку поверхности порошком оксида алюминия с диаметром частиц в 100 мкм в режиме в 2 атмосферы, до приобретения однородной матовости и автоклавировать. Поместить имплантаты в пробирку с взвесью МСК в ротатор и термостат, со скоростью вращения 2 оборота в минуту, при фиксируемой температуре в 37°C, с временем экспозиции 96 часов.

Список используемой литературы.

1. Биоактивные материалы и покрытия в дентальной имплантологии: Учебное пособие / Лясникова А.В., Бутовский К.Г., Лепилин А.В., Лясников В.Н. – Саратов, 2004
2. Бозо И.Я., Рожков С.И., Комлев В.С., Воложин Г.А., Еремин И.И., Смирнов И.В., Савва О.В., Исаев А.А., Попов В.К., Дробышев А.Ю., Деев Р.В. // Сравнительная оценка биологической активности ген-активированных остеопластических материалов из октакальциевого фосфата и плазмидных Днк, несущих гены vegf и sdf: часть 2 - in vivo. // Гены и Клетки. 2017. Т. 12. № 4. С. 39-46.
3. Воложин А.И., Денисов-Никольский Ю.И., Татаренко-Козьмина Т.Ю. и др. Создание имплантационных материалов нового поколения на основе биостабильных композитов с костными клетками, полученными из стромальных клеток костного мозга. В кн.: Наука – городу Москве. Издание Московского комитета по науке и технике 005; 2: 36 – 40.
4. Вольперт У.В., Янушевич О.О., Григорьян А.С., Мальгинов Н.Н., Воложин А.И. // Заживление костных дефектов ветви нижней челюсти кроликов под имплантатами из титанового и золотого сплава с ксеногенными мезенхимальными стволовыми клетками. Российский стоматологический журнал, 2008., № 5., С. 5 -7.
5. Государственный контроль в стоматологической практике / В.К. Леонтьев [и др.]. - М. : Медицинская книга, 2006. - 148 с.
6. Деев Р.В., Исаев А.А., Кочиш А.Ю., Тихилов Р.М. Пути развития клеточных технологий в костной херургии // Травматология и ортопедия в России 2008. № 1. С. 71-74.
7. Иванов С. Ю. Перспективы применения в стоматологии материалов «Биоматрикс» и «Апломатрикс-имплант» в сочетании с остеогенными

- клетками - предшественниками костного мозга / С.Ю. Иванов, Г.В. Кузнецов, Р.К. Чайлахян и др. // Клиническая имплантология и стоматология. - 2001. - № 3/4. - С. 37-40.
8. Использование полимера с металлическими и керамическими покрытиями в качестве основы для гибридных имплантатов / А.С. Григорян [и др.] // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: Материалы симпозиума – М., 2007. – С. 61-63.
 9. Карпюк В.Б., Перова М.Д., Козлов В.А., Шубич М.Г., Понкина О.Н., Мельник Е.А. Экспериментальная модель реконструкции кости путем остеогенной трансформации аутотрансплантированных свежесыводенных стромальных клеток жировой ткани. // Анналы пластической реконструктивной и эстетической хирургии. – 2007. №4 – С. 14-18
 10. Карпюк, В. Б. Сравнительная характеристика мезенхимальных стволовых клеток костного мозга и жировой ткани / В. Б. Карпюк, С. В. Коченова, М. Г. Шубич // Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. - 2005. -№ 2.-С. 46-51.
 11. Киселева Е.В., Черняев С.Е., Васильев А.В. , Воложин А.И. // Перспективы использования стволовых клеток в реконструкции черепно-лицевого скелета. Стоматология, 2009., № 4., С. 77 – 79.
 12. Копейкин, В.Н. Ошибки в ортопедической стоматологии. Профессиональные и медико-правовые аспекты / В.Н. Копейкин, М.З. Миргазизов, А.Ю. Малый. - М. : Медицина, 2002. - 240 с.
 13. Кулаков А.А., Григорьян А.С, Филонов М.Р., Штанский Д.В., Топоркова А.К. Влияние различных по химическому составу покрытий интраоссальных титановых имплантатов на их интеграцию в кость // Росс. вест. дент. Имплантологии.-2007. т. 5.- №2.- С. 132 - 138.

14. Мальгинов Н.Н. Повышение эффективности остеоинтеграции титановых дентальных имплантатов путем оптимизации их формы, структуры поверхности и применения клеточных технологий в эксперименте : диссертация ... доктора мед. наук : 14.01.14.- Москва, 2011. – 125 с.
15. Маркин В.А., Разумная З.В., Хашукоев А.З., Степанов А.Г. Анализ репаративных процессов дефекта костной ткани челюсти при применении биокомпозиции с аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками десны // Дентал Форум – 2019. – №4 (75). – С.64-65.
16. Маркин В.А., Степанов А.Г., Хашукоев А.З. Разработка и применение композиции, из аутологичных клеток на основе костно-пластического материала, для повышения эффективности направленной тканевой регенерации при дефектах костной ткани челюсти. Восточный Европейский научный журнал, 2018. - №9(37), - с. 52-58.
17. Миронов С.П. Современное положение и перспективы российской биоимплантологии / С.П. Миронов // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии. Материалы 111 Всероссийского симпозиума с международным участием – М., 2007. – С.6-7.
18. Олесова В.Н., Журули Г.Н., Силаев Е.В., Кузнецов А.В., Рамазанов С.Р., Магамедханов Ю.М., Грузинов Д.В., Пименов А.Б. // Пролиферация мезенхимальных стволовых клеток человека на стоматологических сплавах. Современная ортопедическая стоматология, 2008., № 9., С. 28-30.
19. Парфенова Е.В., Николаева З.И., Трактует Д.О., Джонстон В., Рахмат-Задэ Т.М., Калинина Н.И., Талицкий К.А., Ратнер Е.И., Марч К.Л., Ткачук В.А. Поиск новых "инструментов" для терапевтического ангиогенеза // Молекулярная медицина. - 2006. - №2. - С 10-23.

20. Патент № 2685148 Российская Федерация, МПК C12N 5/0664. Композиционный материал для замещения костных дефектов/ Хашукоев А.З., Маркин В.А., Каракизов А.Ж., Степанов А.Г.. – № 2018102314; заяв. 22.01.2018; опубл. 16.04.2019, Бюл. № 11. – 6 с.
21. Патент № 2692452 Российская Федерация, МПК A61C 8/00. Способ замещения костных дефектов челюстей/ Хашукоев А.З., Маркин В.А., Каракизов А.Ж., Степанов А.Г., Люндуп А.В.. – № 2018102313; заяв. 22.01.2018; опубл. 24.06.2019, Бюл. № 34. – 7 с.
22. Перова М.Д, Шубин М.Г., Карпюк В.Б., Фомичева А.В., Мельник Е.А. Возможности стволовых стромальных клеток для регенерации тканей пародонта и их взаимодействие с тканевым микроокружением. // Морфология. С-Пб., 2007. - Том 131, №3. - С. 7-15.
23. Перова М.Д., Фомичева А.В., Е.А. Карпюк В.Б. Клинико-гистологические результаты клеточной терапии при тяжелом пародонтите //Кубанский научный медицинский Вестник. Краснодар. - 2007. - №1-2 (94-95). - С. 142-146.
24. Пожарицкая М. М., Руднева Е. В., Попкова Н. А. и др. Применение клеточных технологий для повышения эффективности хирургического лечения пародонтита. Пародонтология 2004; 3: 3-10.
25. Поздеев А.И., Олесова В.Н., Мушеев И.У., Зорин В.Л., Зорина А.И., Зубкова Я.Ю. //Экспериментальная оценка пролиферации мезенхимальных стволовых клеток человека на металлических сплавах. Российский стоматологический журнал, 2007., № 3., С. 6 – 8.
26. Роговая О. С, Васильев А. В., Киселев И. В., Терских В. В. Использование фибробластов человека, выращенных на микроносителях, для формирования эквивалента соединительной ткани. Онтогенез 2004; 35: 105—109.

- 27.Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Маршутина Н.В., Ахмедова С.А., Махмурова Н.Т., Титова Н.С. Культивирование и характеристика негемопоэтических постнатальных стволовых клеток из жировой ткани человека // Молекулярная медицина. - 2006. - №2. - С. 23-29
- 28.Смирнов С. В., Киселев И. В., Роговая О. С. и др. Восстановление кожного покрова путем трансплантации выращенных кератиноцитов. Бюл. exper. биол. 2003; 135: 711-713.
- 29.Терских В. В., Васильев А. В. Апоптоз и дифференциация эпидермальных кератиноцитов. Онтогенез 2005; 36: 85-89
- 30.Трактувев Д.О., Парфенова Е.В., Ткачук В.А., Марч К.Д. Стромальные клетки жировой ткани - пластический тип клеток, обладающих высоким терапевтическим потенциалом // Цитология. - 2006. - т. 48 - №2. - С. 83-94.
- 31.Фриденштейн, А.Я. Клонирование стромальных клеток-предшественников / А.Я. Фриденштейн // Методы культивирования клеток. – Л., 1987. – С. 257-265. Ashian P.H.,Elbarbary A.S., Edmands V.et al. //Plast. Reconstr. Surg.-2003. – Vol. 111, N 6. – P. 1922-1931.
- 32.Цзяци Ли, Чикунов С.О, Ян Бовэнь. Особенности регенерации костной ткани при внутрикостной имплантации с применением мезенхимальных стволовых клеток // Институт стоматологии. – 2019. – № 4(85) – С. 114-117.
- 33.Цзяци Ли, Чикунов С.О. Влияние мезенхимальных стволовых клеток на процессы регенерации тканей полости рта при внутрикостной имплантации // Сборник трудов научной конференции с международным участием, посвященной 170-летию кафедры патологической анатомии им. Академика А.И. Струкова, ПМГМУ им. И.М. Сеченова. – 2019. – С.41-42.

- 34.Цзяци Ли, Чикунов С.О. Особенности остеоинтеграции имплантата с применением мезенхимальных стволовых клеток (экспериментальное исследование)» // Сборник научных трудов, «Актуальные вопросы стоматологии» МГМСУ им. А.И. Евдокимов посвящённой 90-летнему юбилею проф. В.Н. Копейкину. – 2019.
- 35.Цзяци Ли, Чикунов С.О. Сравнительная оценка репаративных изменений в кости экспериментальных животных при имплантации с применением мезенхимальных стволовых клеток // Сборник трудов «Стоматология славянских государств» XI Международной научно-практической конференции, посвящённой 70-летию Заслуженного профессора А.В. Цимбалистова, НИУ БелГУ. – 2018. – С. 162-164.
- 36.Цзяци Ли, Чикунов С.О., Ян Бовэнь. Применение мезенхимальных стволовых клеток при внутрикостной имплантации. Особенности динамических морфологических изменений в эксперименте на животных // Клиническая стоматология. – 2019. – № 3(91) – С. 50-55 .
- 37.Черняев С.Е. Оптимизация заживления костной раны челюсти путем использования аутологичных и аллогенных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани (экспериментальное исследование) ::диссертация ... кандидата мед. наук : 14.01.14.- Москва, 2011. – 104 с.
- 38.Ян Бовэнь, Чикунов С.О, Цзяци Ли. Прогностическое значение морфологических изменений в переимплантатных тканях при гипергликемии различной этиологии // Институт стоматологии. – 2019. – № 4(85) – С. 118-119.
- 39.Ян Бовэнь, Чикунов С.О., Цзяци Ли. Особенности морфологических изменений в переимплантатных тканях при гипергликемии различной этиологии // Клиническая стоматология. – 2019. – № 3(91) – С. 56-58

40. Ярыгин К.Н. Роль резидентных и циркулирующих стволовых клеток в физиологической и репаративной регенерации // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. 2008.-№1.- С. 2-7.
41. A. Yumashev, E. Matveeva, N. Tambovtseva, JQ. Li, BW. Yang. Therapeutic and prophylactic application of mesodiencephalic modulation during dental impantation in pantients with type 2 diabetes mellitus/ Periodico Tche Quimica journal. – 2019. v.16.- №33. p.82-93 [Scopus].
42. A. Yumashev, E. Matveeva, N. Tambovtseva, JQ. Li, BW. Yang. Therapeutic and prophylactic application of mesodiencephalic modulation during dental impantation in pantients with type 2 diabetes mellitus/ Periodico Tche Quimica journal. – 2019. v.16.- №33. p.82-93 [Scopus].
43. Ahmad J. The American Society for Aesthetic Plastic Surgery (ASAPS) survey: current trends in liposuction /J. Ahmad [et al.]// Aesthet. Surg. J. – 2011 – Vol. 31, № 2 – P. 214-224.
44. Ahrendt, G. Angiogenic growth factors: a review for tissue engineering / G. Ahrendt, D.E. Chickering, J.P. Ranien // Tissue Eng. – 1998. – Vol. 2. – P. 117-130.
45. Albrektsson T, Wennerberg A. The impact of oral implants-past and future, 1966-2042. J Can Dent Assoc 2005;71:327.
46. Anselme K, Bigerelle M, Loison I, Noël B, Hardouin P. Kinetic study of the expression of α -catenin, actin and vinculin during osteoblastic adhesion on grooved titanium substrates. //Bio-Medical Materials and Engineering. 2004. - Vol. 14. - No4. - pp. 545-556.
47. Aust, L. Yield of human adipose-derived adult stem cells from liposuction aspirates / L. Aust [et al.] // Cytotherapy. - 2004. -Vol. 6.-P. 7-14.
48. Autonomously vascularized cellular constructs in tissue engineering: opening a new perspective for biomedical science / E. Polykandriotis [et al.] // J. Cell. Mol. Med. – 2007. – Vol. 11, N 1. – P. 6-20.

49. Autonomously vascularized cellular constructs in tissue engineering: opening a new perspective for biomedical science / E. Polykandriotis [et al.] // *J. Cell. Mol. Med.* – 2007. – Vol. 11, N 1. – P. 6-20.
50. Bartholomew A., Sturfeon C. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 2002; 30: 42 – 48.
51. Bartholomew A., Sturgeon C., Siatskas M. et al. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. // *Exp. Hematol.* - 2012; 30; 42-48.
52. Bianchi F. A new nonenzymatic method and device to obtain a fat tissue derivative highly enriched in pericyte-like elements by mild mechanical forces from human lipoaspirates /F. Bianchi [et al.]// *Cell Transplant.* – 2013 – Vol. 22, no. 11 – P. 2063-2077.
53. Bierbaum S, Beutner R, Hanke T, Scharnweber D, Hempel U, Worch H.
54. Boquest A.C. Isolation of stromal stem cells from human adipose tissue / A.C. Boquest [et al.]// *Methods Mol. Biol.* – 2006 – No. 325 – P. 35-46.
55. Bourin P. Stromal cells from the adipose tissue-derived stromal vascular fraction and culture expanded adipose tissue-derived stromal/stem cells: a joint statement of the International Federation for Adipose Therapeutics and Science (IFATS) and the International Society for Cellular Therapy (ISCT) /P. Bourin, [et al.]// *Cytherapy.* – 2013 – Vol.15, no. 6 – P. 641-648.
56. Bunnell B.A. Adipose-derived stem cells: isolation, expansion and differentiation / B.A. Bunnell [et al.]// *Methods.* – 2008 – Vol. 45, no. 2 – P. 115-120.
57. Carvalho P.P. Xenofree enzymatic products for the isolation of human adipose-derived stromal/stem cells / P.P. Carvalho [et al.]// *Tissue Eng. Part C Meth.* – 2013 – Vol. 19, no. 6 – P. 473-478.

- 58.Chang Y-LLY-CC, Li W-CC, Twu N-FF, et al. Induction of dental pulp-derived induced pluripotent stem cells in the absence of c-Myc for differentiation into neuron-like cells. *J Chinese Med Assoc.* 2014;77(12):618-625. doi:10.1016/j.jcma.2014.08.009
- 59.Chen X, Xu H, Yuan P, et al. Integration of External Signaling Pathways with the Core Transcriptional Network in Embryonic Stem Cells. *Cell.* 2008;133(6):1106-1117.
- 60.Cowan C.M., Aalami O.O., Shi Y.Y. et. al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 560-567.
- 61.Cowan C.M., Aalami O.O., Shi Y.Y. et. al. Bone morphogenetic protein 2 and retinoic acid accelerate in vivo bone formation, osteoclast recruitment, bone turnover. *Tissue Eng* 2005; 11: 645 – 658.
- 62.Cowan C.M., Aalami O. O., Shi Y. Y. et al. Bone morphogenetic protein 2 and retinoic acid accelerate in vivo bone formation, osteoclast recruitment, and bone turnover. *Tissue Eng* 2005; 11; 645—658.
- 63.Cowan C.M., Shi Y. Y, Aalami O.O. et al. Adipose-derived adult stromal cells heal critical-size mouse calvarial defects. *Nat Biotechnol* 2004; 22: 560—567.
- 64.Derubeis A., Pennesi G., Cancedda R. //Stem Cell and Gene-Based Therapy / Eds A. Battler, J. Leor. – London, 2006. – P. 159 – 168.
- 65.Derubeis A., Pennesi G., Cancedda R. // Stem Cell and Gene-Based Therapy / Eds A. Battler, J. Leor. — London, 2006. — P. 159-168.
- 66.Dicker A., Le Blanc K., et al. Functional studies of mesenchymal stem cells derived from adult human adipose tissue./ *Exp. Cell Res* 2005; 308: 283 – 290.
- 67.Domenis R. Adipose tissue derived stem cells: in vitro and in vivo analysis of a standard and three commercially available cell-assisted lipotransfer

- techniques /R. Domenis [et al.]// *Stem Cell Res. Ther.* – 2015 – Vol. 6, no. 1 – P. 2
68. Dubois S.G. Isolation of human adipose-derived stem cells from biopsies and liposuction specimens /S.G. Dubois [et al.]// *Methods Mol. Biol.* – 2008 – № 449 – P. 69-79.
69. Eom Y.W. Rapid isolation of adipose tissue-derived stem cells by the storage of lipoaspirates /Y.W. Eom [et al.]// *Yonsei Med. J.* – 2011 – Vol. 52, no. 6 – P. 999-1007.
70. Evans MJ, Kaufman MH. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature*. 1981;292(5819):154-156.
71. Fang B., Song Y., Lin Q et al. Human adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells as salvage therapy for treatment of severe refractory acute graftvs-host disease in two children. *Pediatr Transplantation* 2007; 11: 814-817.
72. Francis M.P. Isolating adipose-derived mesenchymal stem cells from lipoaspirate blood and saline fraction /M.P. Francis [et al.]// *Organogenesis*. – 2010 – Vol.6, no. 1 – P. 11-14.
73. Gangji V. Treatment of Osteonecrosis of the Femoral Head with Implantation of Autologous Bone-Marrow Cells / V. Gangji, J. -P. Hauzeur // *The Journal of Bone and Joint Surgery (American)*; - 2005. - Vol. 87. - P. 106-112.
74. Gimble J.M. Clinical and preclinical translation of cell-based therapies using adipose tissue-derived cells /J.M. Gimble [et al.]// *Stem Cell Res. Ther.* – 2010 – Vol. 1, no. 2 – P. 19
75. Hattori H., Masuoka K., Sato M. et al. Bone formation using human adipose tissue-derived stromal cells and a biodegradable scaffold. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2006; 76: 230-239.

76. Holnthoner W. Adipose-derived stem cells induce vascular tube formation of outgrowth endothelial cells in a fibrin matrix /W. Holnthoner [et al.] // J. Tissue Eng. Regen. Med. – 2015 – Vol. 9, no. 2 – P. 127-136.
77. http://www.ibmc.msk.ru/content/Education/w-o_pass/CellBiol/6.pdf.
78. Jiang A. Improvement of the survival of human autologous fat transplantation by adipose-derived stem-cells-assisted lipotransfer combined with bFGF /A. Jiang [et al.] // The Scientific World J. – 2015 – Vol. 12, no. 6 – P. 96-105.
79. Kakagia D., Pallua N. Autologous fat grafting: in search of the optimal technique / D. Kakagia, N. Pallua // Surg. Innov. – 2014 – Vol. 21, no. 3 – P. 327-36.
80. Kakudo N. Adipose-derived regenerative cell (ADRC)-enriched fat grafting: optimal cell concentration and effects on grafted fat characteristics /N. Kakudo, [et al.] // J. Transl. Med. – 2013– No. 11 – P 254.
81. Kawasaki H, Mizuseki K, Nishikawa S, et al. Induction of Midbrain Dopaminergic Neurons from ES Cells by Stromal Cell—Derived Inducing Activity. *Neuron*. 2000;28(1):31-40. doi:10.1016/S0896-6273(00)00083-0
82. Kurita, M. Influences of centrifugation on cells and tissues in liposuction aspirates: optimized centrifugation for lipotransfer and cell isolation /M. Kurita [et al.] // *Plast. Reconstr. Surg.* – 2008 – Vol. 121, no. 3 – P. 1033-1041.
83. Laflamme M a, Chen KY, Naumova A V, et al. Cardiomyocytes derived from human embryonic stem cells in pro-survival factors enhance function of infarcted rat hearts. *Nat Biotechnol*. 2007;25(9):1015-1024. doi:10.1038/nbt1327.
84. Lavker R. M., Sun T. T., Oshima H. et al. // *J. Invest. Dermatol.* - 2003. - Vol. 8, N 1. - P. 28-38.

85. Le blanc K., Frassoni F., Ball L. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008; 371: 1579 – 1586.
86. Le blanc K., Mesenchymal stromal repair and immune modulation. // *Cytotherapy*. - 2006; 8: 6: 559 – 561.
87. Le blanc K., Tammik C, Rosendahl K. et al. HLA expression and immunologic properties and undifferentiated mesenchymal stem cells *Exp Hematol* 2003; 31: 10: 890-896.
88. Le Blanc K., Tammik C, Rosendahl K. et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. // *Exp Hematol* 2003; 5: 485-489
89. Lee J, Kim H-W, Seo S. Biomedical Application of Dental Tissue-Derived Induced Pluripotent Stem Cells. // *Stem Cells Int.* 2016;2016:9762465.
90. Leong D. T., Khor W.M., Chew ET. et al. Characterization of osteogenically induced adipose tissue-derived precursor cells in 2-dimensional and 3-dimensional environments. // *Cells Tissues Organs* 2006; 182: 1 — 11.
91. Li L. Improvement in autologous human fat transplant survival with SVF plus VEGF-PLA nano-sustained release microspheres /L. Li [et al.] // *Cell Biol. Int.* – 2014 – Vol. 38, no. 8 – P.962-970.
92. Lin K. Characterization of adipose tissue-derived cells isolated with the Celution system /K.Lin [et al.]// *Cytotherapy*. – 2008 – Vol. 10, no. 4 – P. 417-426.
93. Loh KM, Lim B. A precarious balance: Pluripotency factors as lineage specifiers. *Cell Stem Cell.* 2011;8(4):363-369. doi:10.1016/j.stem.2011.03.013
94. Maitra B., Szekely E., Gjini K. et al. Human mesenchymal stem cells support unrelated donor hematopoietic stem cells and suppress T-cell activation. *Bone Marrow Transplant* 2004; 33: 597—604.

95. Man as living bioreactor: fate of an exogenously prepared customized tissue – engineered mandible / P.H. Wamke [et al.] // *Biomat.* – 2006. – Vol. 27, N 17. – P. 3163-3167.
96. Martin GR. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1981;78(12):7634-7638.
97. Matsumoto D. Influences of preservation at various temperatures on liposuction aspirates /D. Matsumoto [et al.]// *Plast. Reconstr. Surg.* – 2007 – Vol. 120, no. 6 – P. 1510-1517.
98. Matsumoto, D. Cell-assisted lipotransfer: supportive use of human adipose-derived cells for soft tissue augmentation with lipoinjection /D. Matsumoto [et al.]// *Tissue Eng.* – 2006 – Vol. 12, no. 12 – P. 3375-3382.
99. Mauney, J.R. Role of adult mesenchymal stem cell in bone tissue engineering applications: current status and future prospects / J. R. Mauney, V. Volloch, D. L. Kaplan // *Tissue Eng.* -2005. - Vol. 11 (5-6). - P. 787-802.
100. McIntosh K, Zvonic S., Garrett S. et al. The immunogenicity of human adipose derived cells: temporal changes in vitro. *Stem Cells* 2006; 24: 1245—1253.
101. Minguell J.J., Erices A. and Conget P. Mesenchymal stem cells // *Exp. Biol, and Med.* - 2001 - Vol. 226 - p. 507-520.
102. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for cellular therapy position statement / M. Dominici [et al.] // *Cytherapy* - 2006. - Vol. 8, N 4. - P. 315-317.
103. Mizuno H. Concise review: adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine /H. Mizuno [et al.]// *Stem Cells.* – 2012 – Vol. 30, no. 5 – P. 804-810. Le blanc K., Frassoni F., Ball L. et al. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-

- versus-host disease: a phase II study. *Lancet* 2008; 10 – 371: 9624; 1579 – 1586.
104. Modification of Ti6A14V surfaces using collagen I, III, and fibronectin—I: biochemical and morphological characteristics of the adsorbed matrix. // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2003. - Vol. 67. - No 2. -pp.421-430.
105. Mosna [et al.]// *StemCellsDev.* – 2010 – Vol. 19, no. 10 – 1449-1470.
106. Niemyer P., Komacker M., Comparison of immunological properties of bone marrow stromal cells and adipose tissue-derived stemcells before and after osteogenetic differentiation in vitro. *Tissue Eng* 2007; 13: 111-121.
107. Oedayrajsingh-Varma M.J. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure / M.J. Oedayrajsingh-Varma [et al.]// *Cytherapy.* – 2006 – Vol. 8, no. 2 – P. 166-177.
108. Ricci J.L., Grew J.C., Alexander H. Connective-tissue responses to defined biomaterial surfaces. I. Growth of rat fibroblast and bone marrow cell colonies on microgrooved substrates.// *J Biomed Mater Res A*. 2008/ - Vol. 85 – No 2. – pp:313-25.
109. Srijaya TC, Pradeep PJ, Zain RB, Musa S, Abu Kasim NH, Govindasamy V. The promise of human induced pluripotent stem cells in dental research. *Stem Cells Int*. 2012;2012:423868.
110. Stenderup K., Justesen J., Clausen C., Kassem M. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone* 2003; 33: 6: 919 – 926.
111. Takahashi K, Yamanaka S. A decade of transcription factor-mediated reprogramming to pluripotency. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2016;17(3):183-193. doi:10.1038/nrm.2016.8

112. Tesar PJ, Chenoweth JG, Brook FA, et al. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*. 2007;448(7150):196-199.
113. Thomson JA, Kalishman J, Golos TG, et al. Isolation of a primate embryonic stem cell line. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995;92(17):7844-7848.
114. Van Harmelen V, Rohrig K, Hauner H. Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism* 2004; 53: 5: 632-637.
115. Warnke, P.H. Growth and transplantation of a custom vascularised bone graft in a man / P.H. Warnke, I.N. Springer, J. Wiltfang // *Lancet*. – 2004. – Vol. 364, N 9436. – P. 766-770.
116. Zhao Q, Gregory CA, Lee RH, et al. MSCs derived from iPSCs with a modified protocol are tumor-tropic but have much less potential to promote tumors than bone marrow MSCs. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(2):530- 535. doi:10.1073/pnas.1423008112
117. Zou X-Y, Yang H-Y, Yu Z, Tan X-B, Yan X, Huang GT-J. Establishment of transgene-free induced pluripotent stem cells reprogrammed from human stem cells of apical papilla for neural differentiation. *Stem Cell Res Ther*. 2012;3(5):43
118. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P. e tal. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell* 2002; 13: 4279-4295.