

На правах рукописи

Шевела Александр Андреевич

**МОРФОЛОГИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
ФИБРИНОВОГО СГУСТКА С ПЛЮРИПОТЕНТНЫМИ
СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ ДЛЯ УСКОРЕНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ
КОСТИ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

14.01.14 – стоматология

Автореферат диссертации на соискание
ученой степени кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2014

Работа выполнена в Государственном бюджетном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор

Майбородин Игорь Валентинович

доктор медицинских наук, профессор

Железный Павел Александрович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук

Колмакова Ирина Анатольевна

(ООО "ДЕНТА", г. Новосибирск, заведующий отделением хирургической стоматологии и имплантации)

доктор медицинских наук

Логинов Александр Геннадьевич

(Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Новосибирской области "Новосибирская областная стоматологическая поликлиника", заведующий отделом инновационных технологий)

Ведущая организация: Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации (г. Барнаул)

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2014 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.05, созданного на базе Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, 52, тел.: (383) 229-10-83)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Новосибирского государственного медицинского университета (630091, Новосибирск, Красный проспект, д. 52)

Автореферат разослан «_____» _____ 2013 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

А.В. Волков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. Состояние репаративной регенерации костных тканей больных с переломами служит основой для их полного выздоровления. Необходимо обеспечение соответствующих условий для восстановления поврежденных органов и тканей. Это особенно актуально в современную эпоху, когда постоянно возрастает количество больных, обращающихся за помощью в связи с травмами тканей челюстно-лицевого региона.

Регенерация тканей – это ответ на травму, после которой сразу начинаются процессы заживления. Нарушение целостности кровеносных сосудов приводит к контакту тромбоцитов с коллагеном и активирует кровяные пластинки. Из фибрина образуется фибриноген после активации тромбина, таким образом начинается репаративный процесс. Введенные извне дериваты фибрина участвуют в ликвидации последствий повреждения тканей и помогают заживлению (Mankad P.S., Codispoti M., 2001; Jackson M.R., 2001; Laidmae I. et al., 2006; Valbonesi M., 2006).

Обширные тканевые дефекты не способны к полной естественной регенерации, существует так называемый «критический размер» дефекта тканей. Однако применение клеточных технологий дает возможность заживления обширных тканевых и костных дефектов без дополнительного хирургического вмешательства (Clines G.A., 2010; Galle J. et al., 2010; Chanda D. et al., 2010).

Более целесообразна доставка плюрипотентных стромальных клеток (ПСК) в тканевый дефект на различных матрицах. Следует отметить, что 3-мерные матрицы дают возможность клеткам взаимодействовать друг с другом (Tasso R. et al., 2010; Granchi D. et al., 2010; Burastero G. et al., 2010; Zippel N. et al., 2010).

Научная литература содержит данные о высокой результативности применения только фибриновых технологий и только ПСК для ускорения регенерации костных дефектов. Однако, вместе с многочисленными рекомендациями о применении ПСК на различных биodeградируемых подложках, в литературе явно недостаточно отражены результаты использования препаратов фибрина в качестве таких матриц для стромальных клеток.

Цель исследования. Изучить изменения структуры кости нижней челюсти крыс в процессе применения богатого тромбоцитами фибринового сгустка (БТФС) с адсорбированными аутологичными плюрипотентными стромальными клетками костномозгового происхождения (АПСККП) для ускорения регенерации.

Задачи исследования

1. При использовании световой микроскопии и рентгеновской

денситометрии исследовать строение поврежденной кости нижней челюсти в различные сроки при заживлении без воздействия на репарацию.

2. Изучить регенерацию поврежденной кости нижней челюсти на фоне использования БТФС.

3. Оценить восстановление строения кости нижней челюсти после введения АПСККП.

4. Определить особенности заживления кости нижней челюсти в условиях применения БТФС с адсорбированными АПСККП.

Научная новизна. Впервые проведено сравнение процессов регенерации поврежденной кости нижней челюсти крыс после использования БТФС, введения АПСККП и применения БТФС с адсорбированными АПСККП.

Впервые показано, что через 1 неделю дефект костной ткани нижней челюсти был до 3/4 диаметра заполнен сформированной костной тканью, так как образование кости в этих случаях начинается с середины дефекта, а не только с краев. По результатам денситометрии у животных этой группы отмечена максимальная плотность кости в участке повреждения к окончанию времени наблюдения.

Теоретическое и практическое значение работы. Получены новые теоретические знания об особенностях заживления кости нижней челюсти после применения БТФС, АПСККП и БТФС с адсорбированными АПСККП. Важное значение для практической работы имеет более интенсивное течение репарационных процессов при использовании БТФС с АПСККП. Через 1 неделю отверстие в кости нижней челюсти было на большом протяжении, до 3/4 диаметра, заполнено сформированной костной тканью. По результатам денситометрии у животных этой группы была отмечена максимальная плотность кости в участке повреждения к окончанию времени наблюдения. Также после применения БТФС с АПСККП наиболее быстро возвращаются к исходному уровню численная плотность клеточных элементов, относительная и абсолютная площадь сосудов на срезе поврежденной кости нижней челюсти. Полученные данные указывают о перспективности использования БТФС с АПСККП для ускорения регенерации костной ткани.

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. После применения БТФС регенерационные процессы начинаются интенсивнее: отверстие в кости нижней челюсти раньше и быстрее заполняется островками костной ткани.

2. Заполнение дефекта кости АПСККП способствует более быстрому появлению красного костного мозга.

3. При использовании БТФС с адсорбированными АПСККП уже через 1 неделю отверстие в кости нижней челюсти на большой площади заполнено сформированной костной тканью. Результаты денситометрии демонстрируют

максимальную плотность кости в участке повреждения к 5-й неделе.

Апробация материалов диссертации. Основные материалы, положения и выводы диссертации доложены на 4-й и 7-й межрегиональных конференциях, посвященных памяти акад. РАМН проф. Л.В. Полуэктова (Омск, 2010, 2013), на ежегодной научной конференции «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, 2010) и на заседании научного персонала лабораторий стволовой клетки, восстановительной медицины и персонализированной медицины Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск, 2013).

Внедрение результатов исследования в практику. Полученные результаты внедрены в научно-исследовательскую работу Центра новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН.

Публикации. По теме и материалам диссертации опубликованы 9 печатных работ, в том числе 5 статей в научных журналах и изданиях, которые включены в перечень российских рецензируемых научных журналов для публикаций материалов диссертации.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, собственных результатов, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций, списка литературы и приложений. Работа изложена на 147 страницах компьютерного текста, содержит 11 таблиц, иллюстрирована 31 многокомпонентным комбинированным рисунком. Список литературы включает 310 источников (35 отечественных и 275 иностранных).

Личный вклад автора. Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован лично автором.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Проведено сравнительное морфологическое исследование процессов заживления участка повреждения кости угла нижней челюсти крыс-самцов инбредной линии Wag в динамике естественного течения репаративного процесса, после заполнения искусственно созданного отверстия БТФС, на фоне введения АПСККП и после применения БТФС с адсорбированными АПСККП.

На работу получено разрешение Локального комитета по медицинской этике Центра новых медицинских технологий в Академгородке Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (протокол № 5 заседания Этического комитета от 04 февраля 2011 года).

Модель дефекта костной ткани в эксперименте. Под общим ингаляционным эфирным наркозом, в условиях чистой операционной, при соблюдении правил асептики и антисептики, после обработки кожи спиртом скальпелем производили разрез кожи длиной 1,5 – 2 см по нижнему краю

нижней челюсти. Тупым способом при помощи распатора отслаивали жевательную мышцу и обнажали поверхность кости нижней челюсти в области ее угла. Стоматологическим бором делали круглое отверстие диаметром 2 мм в кости угла нижней челюсти, с полостью рта дефект кости не сообщался. Затем послойно ушивали рану викрилом. Животных выводили из эксперимента передозировкой эфирного наркоза через 1, 2, 3, 4 и 5 недель после создания дефекта кости нижней челюсти.

Животные были разделены на 4 группы в зависимости от хода регенерации участка поврежденной кости нижней челюсти:

1-я группа – естественное течение репаративного процесса – 65 крыс;

2-я группа – репарация на фоне заполнения искусственного дефекта нижней челюсти подходящим по размеру БТФС, приготовленным *ex tempore* из крови крыс данной линии – 62 животных;

3-я группа – заживление после введения АПСККП – 70 крыс;

4-я группа – регенерация при использовании БТФС с адсорбированными АПСККП – 70 животных.

Методы морфологического анализа. Участок нижней челюсти с искусственно созданным дефектом фиксировали в 4 % растворе параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) не менее 24 часов. Для оценки результатов методом рентгеновской денситометрии использовали фиксированные и препарированные фрагменты нижней челюсти крыс с удаленной кожей, подкожной клетчаткой и жевательными мышцами. В компьютере радиовизиографа «Heliodont+» (Herona, Germany, 2010) установлена программа «Tomodent» (Anvisystem, Россия) по исследованию плотности костной ткани, которая представлена в условных единицах: отношение полученных данных плотности кости в участке повреждения к результатам исследования аналогичных неповрежденных участков на контралатеральной стороне. Далее фрагменты нижней челюсти декальцинировали в растворе «Биодек R» (Bio Optica Milano, Италия) в течение 24 часов, обезвоживали в градиенте этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в гистопласт. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Саркисов Д.С., Перов Ю.Л., 1996).

Для исследования относительной площади сосудов, численной плотности сосудов и клеточных элементов в искусственно созданном отверстии в кости нижней челюсти по мере его заживления применяли квадратную тестовую систему, совмещаемую на экране компьютера с изображением, полученным при помощи цифровой видеокамеры микроскопа. При использовании объектива с увеличением X5 конечная площадь тестового квадрата была равна 10000 мкм² (сторона квадрата 100 мкм) (Майбородин И.В. и др., 2007б, 2008а, 2009а). Статистическую обработку результатов проводили на прикладной

статистической программе MS Excel (Microsoft, USA), определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Различия между средними считали достоверными при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Регенерация кости нижней челюсти без внешнего воздействия на репаративный процесс. Через 1 неделю после повреждения кости нижней челюсти при спонтанной регенерации было найдено, что отверстие частично заполнено кровью, на некоторых участках в дефекте кости уже присутствовали фрагменты рыхлой волокнистой соединительной ткани и грануляции. Следует отметить начало образования кости в дефекте (формирование отдельных островков молодой кости и хряща среди грануляций).

Через 2 недели после создания дефекта кости нижней челюсти отверстие было полностью закрыто слившимися островками молодой костной ткани с большим числом полнокровных кровеносных сосудов по краю дефекта. Среди вновь образованных структур иногда присутствовала хрящевая ткань, особенно в центре искусственного отверстия.

На 3-й неделе после повреждения кости нижней челюсти отверстие было полностью закрыто вновь образованной молодой костной тканью. О месте операции можно было судить по оставшимся крупным сосудам и хаотично расположенным костным балкам (костная мозоль). К этому моменту появились полностью сформированные полости с костным мозгом. Иногда кость в дефекте практически не отличалась от окружающей ткани, только расположенные в некоторых участках структуры костной мозоли позволяли найти место хирургического вмешательства.

Через 4 и 5 недель в большинстве случаев самостоятельного заживления только по следам костной мозоли можно было найти место операции.

Регенерация костной ткани в условиях применения аутологичного богатого тромбоцитами фибринового сгустка. Спустя 1 неделю после повреждения кости и заполнения дефекта БТФС отверстие было полностью заполнено слившимися островками вновь сформированной кости. То есть регенерация кости после применения БТФС уже к 1-й неделе привела к полному заполнению искусственного дефекта.

В большинстве случаев через 2 недели после повреждения кости и заполнения дефекта БТФС отверстие было закрыто вновь образованной костной тканью с большим числом полнокровных кровеносных сосудов на периферии дефекта и хрящевой тканью в центре.

Спустя 3 недели после повреждения кости нижней челюсти и применения БТФС, также как и без использования фибрина, отверстие было полностью закрыто вновь образованной костной тканью с хаотично расположенными костными балками сформированной костной мозоли и полостями с костным

МОЗГОМ.

На 4-й и 5-й неделях после заполнения дефекта кости БТФС отверстие, так же как и при самостоятельном заживлении, было полностью заполнено костной тканью.

Регенерация нижнечелюстной кости после введения аутологичных плюрипотентных стромальных клеток. На фоне введения АПСККП в культуральной среде спустя 1 неделю дефект кости был полностью заполнен кровью, между кровяным сгустком и краем дефекта были найдены типичные грануляции. Необходимо отметить начало образования кости в дефекте (формирование отдельных островков молодой кости и хряща среди грануляций). То есть состояние тканей в дефекте кости на этот срок практически соответствует контролю, однако следует обратить внимание на значительно большее число кровеносных сосудов в структурах, заполняющих отверстие в кости, в том числе и в грануляциях.

На 2-й неделе после введения АПСККП отверстие в кости нижней челюсти было полностью замещено молодой костной и хрящевой тканью (множество слившихся островков) с большим содержанием полнокровных тонкостенных кровеносных сосудов. Необходимо отметить формирование структур красного костного мозга уже на этот срок. То есть к этому времени наблюдали резкое ускорение процессов, приведшее к быстрому развитию или регенерации в костной мозоли гемопоэтической структуры – костного мозга.

Через 3 недели после введения АПСККП в культуральной среде дефект кости был полностью замещен слившимися островками молодой костной ткани со сформированными структурами красного костного мозга между ними. На некоторых участках можно было найти отдельные небольшие фрагменты различных типов соединительной ткани с крупными тонкостенными кровеносными сосудами и большими многоядерными клетками, скорее всего, мегакариоцитами, что является признаком развития красного костного мозга.

На срок в 4 недели после введения АПСККП в культуральной среде дефект кости был полностью замещен слившимися островками молодой костной ткани с полностью сформировавшимися структурами красного костного мозга между ними.

На фоне введения АПСККП к 5-й неделе в большинстве случаев отверстие в кости было полностью закрыто костной мозолью.

Регенерация костной ткани на фоне использования фибринового сгустка с плюрипотентными стромальными клетками. На фоне использования БТФС с адсорбированными АПСККП через 1 неделю после операции в большинстве случаев дефект кости нижней челюсти был более чем на 2/3 заполнен молодой сформированной костной тканью. Однако эта ткань была отделена от края «старой» кости (край дефекта) соединительной тканью с

грануляциями. Не исключено, что образование кости в этих случаях начинается или идет быстрее с середины дефекта, а не с краев, и постепенно подходит к краям дефекта, где еще остаются грануляции. В месте самого дефекта, еще не заполненном молодой костной тканью, также присутствовали грануляции с большим числом кровеносных сосудов.

Спустя 2 недели после повреждения кости нижней челюсти при использовании БТФС с АПСККП в большинстве случаев дефект был полностью замещен молодой костной и хрящевой тканью с большим числом кровеносных сосудов.

В большинстве случаев после применения БТФС с АПСККП к 3-й, 4-й и 5-й неделям дефект кости нижней челюсти был полностью закрыт молодой костной тканью. Местонахождение отверстия можно определить только по структурам костной мозоли. Практически во всех наблюдениях, начиная с 3-й недели, были признаки формирования костного мозга.

Изучение особенностей регенерации дефекта нижней челюсти радиовизиографическими методами. После статистической обработки данных денситометрии процессов регенерации дефекта кости нижней челюсти крыс при естественном заживлении плотность кости в участке повреждения была меньше соответствующего здорового участка на контралатеральной стороне через 1, 2, 3 и 5 недели на 12,1 %, 11 %, 10,5 % и 9,3 %, соответственно. На срок в 4 недели достоверных отличий с другой стороной не было. То есть при естественном ходе репаративной регенерации происходит медленное и постепенное возрастание плотности костной ткани в участке повреждения, но даже к концу наблюдения (5 недель) не произошло нормализации плотности ткани в дефекте.

После использования БТФС плотность кости в дефекте была меньше относительно состояния на противоположной кости только через 1 и 2 недели на 9,5 % и 4,9 %, соответственно. При этом произошло резкое увеличение плотности тканей в патологическом очаге на срок в 1-2 недели после операции, по сравнению с состоянием при спонтанной регенерации. А далее, начиная с 3-й недели и вплоть до 5-й недели, плотность тканей медленно уменьшалась, практически сравниваясь с величинами значений данных показателей при естественном ходе репаративной регенерации.

На фоне введения АПСККП отличия с неповрежденным участком были обнаружены на 2-й и 5-й неделях: меньше на 10,7 % и 16,8 %, соответственно. Можно отметить, что через 1 неделю после операции плотность тканей в участке повреждения кости нижней челюсти после применения АПСККП была значительно больше, чем при спонтанном заживлении; ко 2-й неделе величина значения данного показателя несколько уменьшается, к 3-й – снова возрастает, а затем уже постепенно снижается все оставшееся время и к окончанию

эксперимента становится даже меньше, чем при естественном ходе репаративной регенерации. Можно отметить 2 максимума плотности костной ткани при заживлении дефекта на фоне использования АПСККП – через 1 и 3 недели после операции.

После применения БТФС с АПСККП статистически достоверные отличия от контралатерального участка нижней челюсти были найдены на 1-й и 4-й неделях: на эти сроки величина значения данного показателя была меньше на 9,1 % и 8,5 %, также соответственно. Кроме того, в этой группе животных спустя 5 недель после операции были отмечены достоверные различия плотности костной ткани: на 6,9 % больше, по сравнению с аналогичным сроком при естественном течении репаративных процессов. В этой группе животных после резкого подъема плотности костной ткани в участке повреждения через 1 неделю после операции ко 2-й неделе величина значения указанного показателя незначительно снижается. Далее следует плавное возрастание плотности, приводящее к концу эксперимента к максимальным значениям, уже практически достоверно не отличающимся от таковых на контралатеральном участке. На этот же срок были отмечены и самые значительные различия с состоянием при естественном течении регенераторных процессов.

Особенности васкуляризации в процессе заживления дефекта нижнечелюстной кости. При изучении относительной площади сосудов на срезе участка повреждения кости нижней челюсти крыс отдельно на каждый срок при различных способах воздействия на процессы репаративной регенерации было обнаружено, что на срок в 3 недели величина значения данного показателя после применения БТФС с адсорбированными АПСККП была статистически достоверно меньше на 41,1 %, чем при естественном заживлении. Кроме того, на 5-й неделе площадь сосудов на срезе дефекта костной ткани на фоне использования БТФС с АПСККП была также достоверно ниже на 13,2 % по сравнению с применением только БТФС.

При сравнении численной плотности сосудов было найдено, что на срок в 1 неделю величина значения данного показателя после использования БТФС была статистически достоверно ниже на 21,1 % и 34,4 % соответственно, чем при спонтанном заживлении и после введения АПСККП. После применения БТФС с АПСККП на этот срок сосудов было меньше на 37,4 %, относительно состояния после использования АПСККП.

Через 2 недели число сосудов на 10^5 мкм² площади среза участка повреждения костной ткани при спонтанной регенерации было больше на 50,2 %, 39,3 % и 66,2 % соответственно, чем после использования БТФС, после введения АПСККП и после применения БТФС с АПСККП.

На срок в 3 недели содержание сосудов на единице площади среза дефекта

кости нижней челюсти после использования БТФС было меньше на 42,5 % и 35,6 % соответственно, чем при спонтанном заживлении и после введения АПСККП. После применения БТФС с АПСККП на этот срок число сосудов было меньше на 65,2 % и 57,2 %, также соответственно и также относительно состояния при естественном регенераторном процессе и после введения АПСККП.

Изменения численной плотности клеток в оценке состояния поврежденного участка нижнечелюстной кости. При сравнении численной плотности всех клеточных элементов на 10^5 мкм² площади среза тканей в дефекте кости при различных способах воздействия на процессы репаративной регенерации было отмечено, что на срок в 1 неделю величина значения данного показателя после использования БТФС была статистически достоверно ниже в 6,7 и 4,7 раза соответственно, чем при спонтанном заживлении и после введения АПСККП. После применения БТФС с АПСККП на этот срок клеток было меньше в 6,9 и 4,8 раза, также соответственно и также относительно состояния при естественном течении репаративных процессов и после использования АПСККП. Кроме того, на фоне введения АПСККП количество клеток было ниже, чем при самостоятельной регенерации на 43,1 %.

Через 2 недели число клеток на 10^5 мкм² площади среза участка повреждения костной ткани после использования БТФС было статистически достоверно ниже в 8,2 и 4,8 раза соответственно, чем при спонтанном заживлении и после введения АПСККП. После применения БТФС с АПСККП содержание клеточных элементов было меньше в 9,8 и 5,7 раза, также соответственно и также относительно состояния при естественном течении репаративных процессов и после использования АПСККП. Следует отметить, что на фоне введения АПСККП клеток было меньше, чем при самостоятельной регенерации, на 71,9 %.

На срок в 3 недели содержание клеточных элементов на единице площади среза дефекта кости нижней челюсти после применения БТФС с АПСККП было меньше на 51,6 % относительно состояния при естественном регенераторном процессе.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

При повреждении кости нижней челюсти и естественном течении репаративной регенерации (в контроле) отверстие сразу после травмы заполняется кровью и там формируется сгусток из фибрина с большим числом эритроцитов. Через 1 неделю, при отсутствии инфекции и гнойно-воспалительных осложнений, в дефекте кости среди фрагментов кровяного сгустка, участков рыхлой волокнистой соединительной ткани и грануляций уже присутствовали отдельные островки молодой костной ткани.

Через 2 недели в контрольной группе отверстие в кости нижней челюсти

было полностью закрыто островками молодой костной ткани с большим числом полнокровных кровеносных сосудов по краю дефекта.

На все последующие сроки после повреждения кости нижней челюсти в контроле отверстие было полностью замещено вновь образованной костной тканью. В некоторых случаях на 3-й неделе, в других – к четырем неделям в кости на месте дефекта появились полностью сформированные полости с красным костным мозгом.

По данным денситометрии процессов регенерации дефекта кости нижней челюсти крыс, при естественном заживлении плотность кости в участке повреждения постепенно нарастала и приближалась к таковой у здоровой кости, но даже на срок в 5 недель было еще достоверное отличие плотности костной ткани в участке повреждения от соответствующего места на контралатеральной стороне.

Спустя 1 неделю **после операции с последующим заполнением отверстия в кости нижней челюсти БТФС** не происходит замещения полости дефекта кровяным сгустком, нет необходимости тратить время на лизис и элиминацию эритроцитов посредством фагоцитоза. В большинстве случаев уже к этому сроку весь дефект костной ткани был заполнен слившимися островками вновь сформированной кости. Регенерация кости после применения БТФС уже к 1-й неделе привела к практически полному заполнению искусственного дефекта.

То есть начало репарационных процессов при повреждении кости нижней челюсти и применении БТФС проходит интенсивнее, чем при спонтанном заживлении. Отверстие раньше и интенсивнее заполняется островками костной ткани, скорее всего, формирование костной ткани начинается сразу после операции без потери времени на лизис и удаление кровяного сгустка с большим числом эритроцитов. Костные островки раньше сливаются и формируют молодую костную ткань. Однако эти различия практически нивелируются к 3-й неделе после операции, и далее регенерация идет практически одинаково.

Фибрин в тканях, согласно литературным данным, уменьшает выраженность воспалительного процесса (Voiculescu D. et al., 1968; Pop M. et al., 1969; Romanos G.E., Strub J.R., 1998; Колесников И.С., 2006; Майбородин И.В. и др., 2007а, 2008б, 2009б; Рагимова Т.М., 2009; Maiborodin I. et al., 2010; Ковынцев Д.Н., 2010) и ограничивает распространение инфекции (Dohan D.M. et al., 2006в; Choukroun J. et al., 2006б). При введении фибринового сгустка в полость раны, видимо, можно защитить окружающие ткани как от распространения микроорганизмов, так и от излишнего воздействия лизосомальных ферментов фагоцитов. Происходит ограничение деструкции и, в связи с этим, раньше начинаются регенераторные процессы, в тканях оказывается меньший объем антигенов и детрита, происходит более быстрое

очищение раны.

Кроме этого, фибриновый сгусток является матрицей, по которой мигрируют лейкоциты (нейтрофилы), эндотелиоциты и фибробласты (Anitua E. et al., 2004, 2005, 2006a, 2006б; Hokugo A. et al., 2005; Yamazaki S. et al., 2005; Schmidt M.B. et al., 2006; Kaijzel E.L. et al., 2006; McDougall S. et al., 2006; Schwartz-Arad D. et al., 2007).

Фибробласты, располагаясь в фибриновой сети (Anitua E., 2006; Anitua E. et al., 2006a, 2006б; Schmidt M.B. et al., 2006; McDougall S. et al., 2006; Schwartz-Arad D. et al., 2007), начинают синтез коллагена не только со дна раны, но и из ее полости: таким образом значительно быстрее на месте формируется рубцовая ткань.

Можно заключить, что применение БТФС способствует более быстрой регенерации поврежденного участка кости нижней челюсти.

После заполнения отверстия в кости АПСККП через 1 неделю в месте хирургического вмешательства были обнаружены грануляции и отдельные островки молодой костной ткани. То есть состояние тканей в дефекте кости на этот срок практически соответствует контролю, однако следует отметить значительно большее число кровеносных сосудов в структурах, заполняющих отверстие в кости, в том числе и в грануляциях.

На 2-й неделе после введения АПСККП в участок повреждения необходимо отметить формирование структур красного костного мозга. То есть к этому времени наблюдали резкое ускорение процессов, приведшее к быстрому развитию или регенерации в костной мозоли гемопоэтической структуры – костного мозга.

Согласно литературным данным, плюрипотентные стромальные (стволовые) клетки формируют строму костного мозга, а гемопоэтические стволовые клетки участвуют в регенерации красного костного мозга. Поэтому не происходит образования костного мозга при введении только гемопоэтических клеток в различные участки тела (Patt H.M., Maloney M.A., 1975). Однако в последнее время появились данные о возможности трансдифференцировки гематопоэтических клеток костного мозга в тканеспецифичные стволовые клетки и обратно (Ratajczak M.Z. et al., 2004).

Так как в данном эксперименте были использованы ПСК костномозгового происхождения, не исключено присутствие среди них небольшого числа гемопоэтических клеток. По-видимому, за счет действия этих клеточных элементов и объясняется быстрая и ранняя регенерация гемопоэтической структуры – красного костного мозга.

По результатам денситометрии дефекта кости нижней челюсти крыс после применения АПСККП было обнаружено, что плотность тканей статистически значимо отличалась от здоровой кости на 2-й и 5-й неделях. При этом спустя

5 недель после операции плотность кости в дефекте на фоне применения АПСККП была меньше, чем при естественном ходе репаративного процесса.

На основании данных литературы мы ожидали ускорения регенерации поврежденной кости и, соответственно, большей ее плотности, по сравнению с результатами денситометрии челюсти при естественном течении репаративных процессов (Yamasaki T. et al., 2008; Jiang X. et al., 2010; Kallai I. et al., 2010; Kumar S. et al., 2010; Chang S.H. et al., 2010; Zhang Z.Y. et al., 2010).

Скорее всего, падение плотности в очаге, по данным денситометрии, на 2-й и 5-й неделях после операции связано с развитием красного костного мозга. На 1-й неделе идет активное развитие кости и было отмечено повышение плотности костной ткани, далее формируется красный костный мозг, который расположен в полостях, и, соответственно, плотность падает. После введения АПСККП костный мозг образуется быстрее и более выражено, поэтому заметно уменьшается плотность костной ткани в участке повреждения и становится даже ниже, чем при заживлении без использования клеток. Следует учитывать возможность снижения прочностных свойств восстановленной кости из-за присутствия больших полостей, заполненных костным мозгом.

После применения БТФС с адсорбированными АПСККП уже через 1 неделю дефект кости нижней челюсти был на большом протяжении заполнен молодой сформированной костной тканью. Скорее всего, образование кости в этих случаях начинается с середины дефекта, а не только с краев. В участках дефекта, еще не заполненных костной тканью, присутствовали грануляции с большим числом кровеносных сосудов.

Спустя 2 недели после начала эксперимента дефект кости нижней челюсти был полностью закрыт молодой костной тканью. На следующие сроки местонахождение искусственного отверстия можно было определить только предположительно по структурам костной мозоли.

Согласно литературным данным, хорошие результаты были получены при совместном применении ПСК и обогащенной тромбоцитами плазмы для ускорения регенерации костной ткани и остеоинтеграции имплантатов. Такая плазма сама поддерживает рост костной ткани и также служит матрицей для роста кости из ПСК (Pieri F. et al., 2009; Nair M.B. et al., 2009b; Yoshimi R. et al., 2009; Yamada Y. et al., 2010; Niemeyer P. et al., 2010a). Это основано на том, что цитокины мегакариоцитов влияют на дифференцировку ПСК, кроме того, взаимодействие тромбопоэтических структур и ПСК способствует эндохондральной оссификации (Sumiyoshi K. et al., 2010). ПСК с плазмой или тромбоцитами возможно доставлять в участки регенерируемых костных и хрящевых тканей инъекционным путем (Yoshimi R. et al., 2009).

Скорее всего, после применения БТФС с адсорбированными АПСККП суммируется или даже потенцируется влияние и фибрина, и клеточных

технологий на репаративную регенерацию участка повреждения кости нижней челюсти. Стволовые клетки в фибриновом сгустке располагаются в объеме и более-менее равномерно выполняют весь дефект, эти клетки не мигрируют из места введения (активно или пассивно, как при введении АПСККП). Содержащиеся в БТФС цитокины, в частности факторы мегакариоцитов и тромбоцитов, стимулируют как пролиферативную активность, так и дифференцировку АПСККП в остеогенном направлении. Таким образом достигается максимально быстрое и успешное восстановление дефекта костной ткани.

По результатам изучения относительной площади и численной плотности сосудов, а также численной плотности клеточных элементов на срезе участка повреждения кости нижней челюсти крыс при различных способах влияния на регенераторные процессы было найдено, что самое быстрое возвращение к норме указанных показателей происходит у животных после применения БТФС с адсорбированными АПСККП, к концу времени наблюдения только в этой группе произошла нормализация васкуляризации и содержания клеток в дефекте костной ткани. На фоне применения БТФС и после использования БТФС с АПСККП на срок с 1-й по 3-й неделями численная плотность сосудов и клеток в поврежденной кости была статистически достоверно меньше, чем при естественном ходе регенерации и после введения АПСККП.

Сразу после операции при естественном ходе репаративного процесса кровяной сгусток постепенно замещается сначала грануляциями, а потом молодой костной тканью. В грануляционной ткани очень много кровеносных сосудов, фибробластов, непосредственно участвующих в формировании этих грануляций, и лейкоцитов, лизирующих как сам сгусток, так и тканевой детрит, оставшийся в дефекте кости после моделирования травмы. Поэтому в первые сроки после операции очень высоки значения показателей, характеризующих относительную площадь сосудов на срезе ткани, численную плотность сосудов и клеточных элементов на единицу площади среза. По мере заполнения дефекта островками молодой костной ткани и формирования костной мозоли количество сосудов и клеточных элементов быстро уменьшается, но даже к 5-й неделе значения указанных показателей еще статистически достоверно отличались от интактного контроля.

По-видимому, такая же картина наблюдается после введения в искусственно созданный дефект АПСККП. Также образуются грануляции, характеризующиеся большим числом сосудов и клеток, также происходит постепенная замена грануляций молодой костной тканью и костной мозолью. Однако все эти процессы идут быстрее, чем при естественном заживлении, что и обуславливает несколько лучшие результаты. Вместе с этим, быстрое формирование полостей с красным костным мозгом приводит к некоторому

возрастанию численности сосудов и количества клеточных элементов, что, в свою очередь, замедляет нормализацию значений указанных показателей.

После применения БТФС и после использования БТФС с АПСККП дефект кости заполняется фибриновым сгустком, там не образуются (или образуются в значительно меньшем объеме – между краем дефекта и фибринового сгустка) грануляции. Поэтому даже уже на срок в 1 неделю после операции есть достоверные отличия выраженности васкуляризации и содержания клеточных элементов в этих группах от состояния при естественном течении репаративных процессов.

Постепенно и БТФС и БТФС с АПСККП лизируются лейкоцитами (Anitua E., 2006; Anitua E. et al., 2006a, 2006б; Schmidt M.B. et al., 2006; Schwartz-Arad D. et al., 2007) и быстро замещаются молодой костной тканью, и далее, костной мозолью (Niemeyer P. et al., 2010a; Sumiyoshi K. et al., 2010; Lucarelli E. et al., 2010). Эти процессы идут гораздо быстрее, чем при самостоятельном заживлении. Но все-таки даже после применения БТФС не происходит возвращения к норме показателей численности сосудов к 5-й неделе после операции. Только после использования БТФС с АПСККП в конце эксперимента (на 5-й неделе) было найдено возвращение к исходному уровню показателей васкуляризации, а численная плотность клеточных элементов у животных этой группы не отличалась от контроля уже спустя 4 недели.

ВЫВОДЫ

1. При повреждении кости нижней челюсти у крыс и спонтанном заживлении отверстие сразу после травмы заполняется кровью, где формируется кровяной сгусток. Через 1 неделю в дефекте кости начинается формирование отдельных островков молодой костной ткани. Через 2 недели отверстие в кости нижней челюсти полностью закрыто слившимися островками молодой костной ткани. На 3–4 неделе в костной мозоли на месте дефекта появляются структуры красного костного мозга. По данным денситометрии отмечено постепенное возрастание плотности костной ткани в участке повреждения до 92 % от нормы.

2. После применения БТФС отверстие в кости нижней челюсти раньше и интенсивнее заполняется островками костной ткани. Дефект кости нижней челюсти уже к 1-й неделе полностью замещен островками костной ткани. На 2-й неделе отмечены признаки формирования костной мозоли. К 3-й неделе образуются полости с красным костным мозгом. Денситометрические результаты статистически достоверно не отличаются от таковых интактной кости.

3. После заполнения искусственного отверстия в кости АПСККП происходит более быстрое (ко 2-й неделе) восстановление структур красного костного мозга. По результатам денситометрии было обнаружено, что спустя

5 недель после операции плотность кости в дефекте на фоне применения АПСККП была меньше, чем при естественном ходе репаративного процесса, это связано с прогрессивным развитием больших полостей, заполненных костным мозгом.

4. При использовании БТФС с адсорбированными АПСККП для замещения дефекта кости нижней челюсти через 1 неделю отверстие было до $\frac{3}{4}$ диаметра заполнено сформированной костной тканью. У животных этой группы максимально быстро возвращаются к исходному уровню численная плотность клеточных элементов, относительная площадь и количество сосудов на единицу площади среза участка повреждения кости нижней челюсти. По результатам денситометрии отмечена максимальная плотность кости в дефекте к 5-й неделе наблюдения (нормализация в 70 % случаев).

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В связи с тем что после применения БТФС с адсорбированными АПСККП в эксперименте на крысах происходит самая интенсивная регенерация дефекта кости нижней челюсти, целесообразно применение препаратов фибрина, приготовленных из аутологичной крови, совместно со аутологичными стволовыми клетками из костного мозга для ускорения репаративных процессов костных тканей в стоматологии, хирургии, травматологии и ортопедии.

2. При невозможности использования БТФС совместно с АПСККП вследствие недоступности стволовых клеток, этических предпочтений или требований закона, предпочтение должно быть отдано препаратам фибрина.

3. Так как после введения АПСККП происходит более интенсивное формирование красного костного мозга, возможно применение аутологичных стволовых клеток для восстановления кроветворения после воздействия противоопухолевых препаратов и ионизирующего излучения. Необходимо учитывать вероятность уменьшения прочностных свойств костных тканей после образования полостей с красным костным мозгом.

4. По данным денситометрии с получением точных численных результатов возможно слежение за процессами регенерации поврежденных костных тканей и определение эффективности воздействия на этот процесс различных методов.

5. Изменение количества сосудов и клеток в участке повреждения костной ткани позволяет оценивать скорость репарации и предсказывать сроки появления островков костной ткани, их слияния и формирования костной мозоли.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Применение биodeградируемых полигидроксиалканоатов после повреждения кости нижней челюсти в эксперименте / И.В. Майбородин,

А.И. Шевела, Б.В. Шеплев, И.С. Колесников, В.А. Матвеева, М.Н. Дровосеков, **А.А. Шевела**, Д.М. Козодий, М.С. Выборнов // **Клиническая стоматология**. – 2010. – № 4. – С. 54-57.

2. Особенности реакции тканей крыс на внутрибрюшинные имплантаты из биodeградируемого полигидроксикапраната / И.В. Майбородин, А.И. Шевела, В.В. Анищенко, В.А. Матвеева, **А.А. Шевела**, Дровосеков М.Н., В.В. Власов // **Морфология**. – 2011. – Т. 139, № 2. – С. 62-66.

3. Особенности применения стволовых клеток для регенерации костной и хрящевой ткани / И.В. Майбородин, А.И. Шевела, И.С. Колесников, М.Н. Дровосеков, М.С. Тодер, **А.А. Шевела**, А.И. Бромбин, Е.А. Береговой // **Клеточные технологии в биологии и медицине**. – 2011. – № 3. – С. 123-131.

4. Peculiarities of using stem cells for regeneration of the bone and cartilage tissue / I.V. Maiborodin, A.I. Shevela, I.S. Kolesnikov, M.N. Drovosekov, M.S. Toder, **A.A. Shevela**, A.I. Brombin, E.A. Beregovoy // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine**. – 2011. – Vol. 152. – № 3. – P. 112-119.

5. Фибриновые технологии в ускорении регенерации поврежденной кости в эксперименте / И.В. Майбородин, Б.В. Шеплев, М.Н. Дровосеков, И.С. Колесников, М.С. Тодер, **А.А. Шевела** // **Бюллетень сибирской медицины**. – 2012. – № 4. – С. 49-56.

6. Ускорение регенерации тканей в условиях применения аутологичного фибринового сгустка / И.В. Майбородин, А.И. Шевела, В.А. Матвеева, Л.В. Артемьева, И.С. Колесников, Б.В. Шеплев, Д.М. Козодий, М.С. Выборнов, **А.А. Шевела** // Актуальные вопросы хирургии: Сб. науч. тр. 4 межрегион. конф., посвященной памяти акад. РАМН проф. Л.В. Полуэктова: 4 вып. – Омск, 2010. – С. 399-400.

7. Ангиогенез у крыс после введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения / И.В. Майбородин, В.А. Матвеева, Н.В. Якимова, А.И. Шевела, А.Н. Бабко, В.В. Морозов, **А.А. Шевела** // **Фундаментальные науки – медицине: Сб. тез. ежегод. науч. конф.** – Новосибирск, 2010. – С. 50.

8. Результаты использования полигидроксикапранатов при повреждении кости нижней челюсти в эксперименте / И.В. Майбородин, А.И. Шевела, **А.А. Шевела**, Б.В. Шеплев, И.С. Колесников, М.Н. Дровосеков, М.С. Тодер, М.И. Баранник, С.В. Марчуков // **Хирургия, морфология, лимфология**. – 2011. – Т. 8. – № 15. – С. 69-74.

9. Лимфатические узлы крыс после имплантации мезенхимальных стромальных клеток, адсорбированных на полимере / И.В. Майбородин, В.В. Морозов, Я.В. Новикова, А.И. Шевела, **А.А. Шевела**, Н.В. Оноприенко // Актуальные проблемы хирургии : Сб. науч. тр. 7 межрегион. конф., посвященной памяти акад. РАМН проф. Л.В. Полуэктова: 7 вып. – Омск, 2013. – С. 383-385.

Автор искренне благодарен научным руководителям д-ру мед. наук, проф. И.В. Майбородину и д-ру мед. наук, проф. П.А. Железному за научно-методическую помощь, ценные замечания и консультации в ходе выполнения работы.

Ссылка *на сайт организации*, где размещена основная информация о защите (пункт 26 Положения):

<http://www.ngmu.ru/dissertation/323>