

На правах рукописи

Ковынцев Андрей Николаевич

**МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ И РЕГИОНАРНЫЙ
ЛИМФАТИЧЕСКИЙ УЗЕЛ В ПРОЦЕССЕ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОЙ
ТКАНИ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

03.03.04 – клеточная биология, цитология, гистология

14.03.01 – анатомия человека

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Новосибирск – 2011

Работа выполнена в Государственном образовательном учреждении высшего профессионального образования «Новосибирский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» и в Учреждении Российской академии наук «Институт химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН» (Новосибирск)

Научные руководители:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, профессор

Машак Светлана Владимировна
Майбородин Игорь Валентинович

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор
доктор медицинских наук, профессор

Иванов Владимир Викторович
Горчаков Владимир Николаевич

Ведущая организация: Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Алтайский государственный медицинский университет Федерального агентства по здравоохранению и социальному развитию» (г. Барнаул)

Защита диссертации состоится "_____" 2011 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета Д 208.062.05 при Новосибирском государственном медицинском университете (630091, Новосибирск, Красный проспект, 52, тел.: (383) 229-10-83)

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

Автореферат разослан "_____" 2011 г.

Ученый секретарь диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

А. В. Волков

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. В настоящее время происходит постоянное увеличение числа больных с травматическими повреждениями и воспалительными заболеваниями челюстно-лицевой области. Успех восстановительного хирургического лечения травматических повреждений во многом определяется процессами репаративной регенерации костной ткани пациента. Анализ причин неудачного лечения таких больных свидетельствует о том, что пути их преодоления состоят как в усовершенствовании технологии самого хирургического вмешательства, так и в создании оптимальных условий для регенерации костной ткани.

Несмотря на развитие травматологии и ортопедии, полное восстановление костной и хрящевой ткани является проблемным, поскольку большие дефекты не могут спонтанно заживать. Использование стволовых клеток – это регенеративная биология и регенеративная медицина, являющиеся все более расширяющимися областями исследования с надеждой на успех терапевтических методов лечения ран и травм, на которые невозможно эффективно воздействовать современными хирургическими методами (Noël D. et al., 2002; Clines G.A., 2010; Galle J. et al., 2010; Chanda D. et al., 2010).

Красный костный мозг содержит прогениторные клетки (мезенхимальные стволовые клетки), способные к дифференцировке в кость, хрящ, сухожилия и другие виды соединительной ткани. Это позволяет широко применять такие клетки для ускорения регенерации костной ткани (Hong D. et al., 2010; Chanda D. et al., 2010; Goldschlager T. et al., 2010; Goepfert C. et al., 2010).

Использование мезенхимальных стволовых клеток приводит к ускорению регенерации поврежденных костей, увеличению их плотности, по сравнению с результатами при естественном течении репаративных процессов (Kallai I. et al., 2010; Kumar S. et al., 2010; Chang S.H. et al., 2010).

В литературе имеется множество данных об эффективности использования клеточных технологий в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Однако, применение мезенхимальных стволовых клеток как самостоятельно, так и в комбинации с другими препаратами и веществами имеет свои недостатки и преимущества и должно осуществляться только с учетом всех возможных показаний и противопоказаний. Следует отметить отсутствие в литературе сведений об изменениях регионарных лимфатических узлов после применения МСК для лечения поврежденных тканей, тогда как именно лимфатические узлы являются маркерами выраженности воспалительного процесса в тканях и по их изменениям можно точно оценивать результативность проведения тех или иных лечебных мероприятий.

Цель исследования. Оптимизировать репаративную регенерацию поврежденного участка кости нижней челюсти и установить структурные изменения субмандибулярных лимфатических узлов крыс в условиях введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения (МСК).

Задачи исследования:

1. Методами световой микроскопии и рентгеновской денситометрии изучить процессы репаративной регенерации участка поврежденной кости нижней челюсти крыс в различные сроки при естественном заживлении и после введения МСК.

2. Определить основные структурно-клеточные реакции (регионарных к участку повреждения кости нижней челюсти) субмандибулярных лимфатических узлов при самостоятельной регенерации и на фоне использования МСК.

3. Сравнить особенности регенерации кости нижней челюсти и изменений регионарных лимфатических узлов без применения клеточных технологий и после введения МСК.

Научная новизна. Впервые проведено сравнительное исследование процессов регенерации в участке повреждения кости нижней челюсти крыс при естественном заживлении и после применения МСК. Показано, что через 1 неделю в дефекте кости среди фрагментов кровяного сгустка и грануляций формируются отдельные островки молодой костной ткани, через 2 недели дефект в кости нижней челюсти полностью замещается слившимися островками молодой костной ткани. Спустя 3-4 недели начинается формирование красного костного мозга. После операции с последующим заполнением дефекта суспензией МСК в культуральной среде происходит резкое ускорение репаративных процессов и уже на 2-й неделе в костной мозоли присутствуют структуры красного костного мозга.

Впервые установлено, что плотность тканей в дефекте, по данным рентгеновской денситометрии кости нижней челюсти, спустя 4 и 5 недель после операции на фоне применения МСК меньше, чем при естественном ходе репаративного процесса. Такие различия обусловлены прогрессивным развитием полостей с красным костным мозгом.

Впервые изучено состояние регионарных лимфатических узлов в различное время при регенерации поврежденной кости после введения суспензии МСК. В субмандибулярных лимфатических узлах при естественном ходе заживления участка повреждения кости нижней челюсти расширяется корковое плато, увеличивается относительный объем лимфоидных фолликулов и мозговых синусов. Во всех структурных отделах лимфатических узлов сначала возрастает число иммуно- и плазмобластов, делящихся клеток и клеточных элементов с признаками деструктивных изменений, к концу наблюдения увеличивается содержание ретикулярных клеток и макрофагов. Различия в строении субмандибулярных лимфатических узлов при естественном ходе заживления дефекта нижней челюсти и после введения в участок повреждения МСК были отмечены в объемной плотности коркового плато, которая после применения клеток была меньше. При этом на 2-й, 3-й и 4-й неделях спонтанной репарации объем коркового плато еще статистически достоверно отличался от контроля, тогда как после использования МСК – нет. Кроме того, объем паракортекса на 4-й и 5-й неделях после операции оставался меньше исходного, тогда как после применения МСК величина значения этого показателя находилась в пределах нормы. На фоне использования МСК показатели численности иммуно- и плазмобластов, ретикулярных клеток, макрофагов и клеточных элементов с признаками деструктивных изменений в различных зонах регионарных лимфатических узлов изменяются в меньшей степени и раньше возвращаются к контрольному уровню, чем при естественной репарации.

Теоретическое и практическое значение работы. Получены новые знания об особенностях регенерации кости нижней челюсти после введения МСК. Важное значение для практической деятельности имеет выявление значительно более

интенсивного, чем при спонтанном заживлении, течения репарационных процессов: в дефекте костной ткани значительно раньше и быстрее формируются структуры красного костного мозга, менее выражены реактивные изменения регионарных лимфатических узлов. Полученные результаты свидетельствуют о целесообразности применения МСК для ускорения репаративных процессов в костных тканях.

На защиту выносятся следующие основные положения:

1. Введение суспензии МСК в участок повреждения кости нижней челюсти у крыс приводит к более раннему и быстрому формированию структур красного костного мозга.

2. В субмандибулярных лимфатических узлах при заживлении участка повреждения кости нижней челюсти расширяется корковое плато, увеличивается относительный объем лимфоидных фолликулов и мозговых синусов. В цитограмме структурных отделов данных органов сначала возрастает число иммуно- и плазмобластов, делящихся клеток и клеточных элементов с признаками деструктивных изменений, а к концу наблюдения увеличивается содержание ретикулярных клеток и макрофагов.

3. Особенности реакции субмандибулярных лимфатических узлов крыс после введения в дефект нижней челюсти МСК заключаются в меньшей выраженности реактивных изменений структурной организации и цитоархитектоники и быстром возвращении их к исходному уровню.

Апробация материалов диссертации. Основные положения диссертации доложены на Международной гистологической конференции «Морфогенезы в эволюции, индивидуальном развитии и эксперименте» (Тюмень, 2008), Международной конференции «Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии» (Новосибирск, 2008), Международной научной конференции «Вопросы морфологии XXI века» (Санкт-Петербург, 2008), Всероссийском симпозиуме «Челюстно-лицевая хирургия и стоматология: Новые технологии в стоматологии» (Новосибирск, 2008) и на объединенном заседании сотрудников кафедр Новосибирского государственного медицинского университета и Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН (Новосибирск, 2010).

Внедрение результатов исследования в практику. Результаты исследований внедрены в научно-исследовательскую работу Центра новых медицинских технологий Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, лечебную практику ООО «Дентал-Сервис» и ООО «Дента» (г. Новосибирск).

Публикации. По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, 7 из которых – в ведущих рецензируемых научных изданиях, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований.

Структура и объем диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 2 глав собственных результатов, обсуждения полученных результатов, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 178 страницах компьютерного текста, содержит 10 таблиц, иллюстрирована 39 многокомпонентными комбинированными рисунками. Список литературы включает 327 источников (57 отечественных и 270 иностранных). Весь материал, представленный в диссертации, получен, обработан и проанализирован лично автором.

Автор искренне благодарен научному руководителю д.м.н., профессору И. В. Майбородину и д.м.н., профессору С. В. Машак за научно-методическую помощь, ценные замечания и консультации в ходе выполнения работы.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа основана на результатах сравнительного морфологического исследования процессов заживления участка повреждения кости угла нижней челюсти и состояния субмандибулярных лимфатических узлов крыс-самцов породы Wag в различные сроки при естественном течении репарации и заполнения искусственно созданного отверстия суспензией МСК в культуральной среде.

Все манипуляции с животными осуществляли под эфирным наркозом в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». На работу получено разрешение Локального комитета по медицинской этике Института химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения РАН (протокол № 11 заседания Этического комитета Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН от 29.12. 2008 года).

МСК выделяли, вымывая костный мозг из эпифизов бедренных костей у крыс-самцов линии Wag. Полученную суспензию клеток помещали в пластиковые флаконы («Nunk», Дания), через 48 ч после эксплантации костного мозга неприкрепившиеся клетки сливали. Прикрепившиеся клетки культивировали в среде α -MEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки («Biolut», Россия) при 37 °C в CO₂ – инкубаторе с 5 % CO₂ в условиях насыщенной влажности. Смену среды производили каждые три дня. При субкультивировании монослойную культуру рассеивали в плотности 1000 – 5000 клеток/см² (в зависимости от ростовых свойств используемой эмбриональной сыворотки), используя стандартные растворы Версена и трипсина.

Модель дефекта костной ткани (Maiborodin I. et al., 2010) и применения МСК 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.

Животные были разделены на 2 группы в зависимости от хода регенерации участка поврежденной кости нижней челюсти:

1-я группа – естественное течение репаративного процесса – 70 крыс;

2-я группа – репарация на фоне введения в искусственный дефект нижней челюсти 100 мкл суспензии МСК в культуральной среде (1×10^6 клеток в 1 мл суспензии) – 70 животных.

Животных выводили из эксперимента через 1, 2, 3, 4 и 5 недель после операции. Участок нижней челюсти с искусственно созданным дефектом и расположенные под краем нижней челюсти субмандибулярные лимфатические узлы

фиксируют в 4 % растворе параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) не менее 24 часов.

При оценке результатов методом рентгеновской денситометрии использовали фиксированные и препарированные фрагменты нижней челюсти крыс с удаленной кожей и подкожной клетчаткой. В компьютере радиовизиографа (Россия, 2004) установлена программа 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 контрлатеральной стороне).

Далее фрагменты нижней челюсти декальцинировали в растворе «Биодек R» (Bio Optica Milano, Италия) в течение суток. Весь материал обезвоживали в градиенте этанола возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафин. Срезы толщиной 5 – 7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином и по Романовскому (Саркисов Д. С., Перов Ю. Л., 1996).

Определение структурной организации исследуемых тканей проводили при увеличении светового микроскопа Axioimager M1 (Zeiss, Германия) до 1200 раз. Применяли квадратную тестовую систему, совмещаемую на экране компьютера с изображением, полученным при помощи цифровой видеокамеры микроскопа. Для изучения показателей структуры лимфатических узлов (использование объектива с увеличением $\times 5$) конечная площадь тестового квадрата была равна 10000 мкм^2 (сторона квадрата 100 мкм), при подсчете цитогаммы клеток (применение объектива с увеличением $\times 40$) – 144 мкм^2 (сторона квадрата 12 мкм) (Майбородин И. В. и др., 2007, 2008, 2009). 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 участка повреждения кости нижней челюсти на фоне использования аутологичных мезенхимальных стволовых клеток

Участок повреждения кости нижней челюсти в условиях естественной регенерации. Через 1 неделю после повреждения кости нижней челюсти при спонтанной регенерации было найдено, что отверстие частично заполнено кровью, на некоторых участках в дефекте кости присутствовали грануляции. Следует отметить начало формирования отдельных островков молодой кости и хряща среди грануляций.

Через 2 недели дефект кости нижней челюсти был полностью закрыт слившимися островками молодой костной ткани. Среди вновь образованных структур иногда присутствовала хрящевая ткань, особенно часто в центре искусственного отверстия.

На 3 неделе после повреждения кости нижней челюсти дефект был полностью замещен вновь образованной 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.

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

Участок повреждения кости нижней челюсти после введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток. На фоне введения МСК в культуральной среде спустя 1 неделю состояние тканей в дефекте кости 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 неделе после введения МСК 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, приведших к быстрому развитию или регенерации в костной мозоли гемопоэтической структуры – костного мозга.

На последующие сроки происходило дальнейшее слияние островков костной ткани с последующим формированием костной мозоли и прогрессирующее восстановление красного костного мозга.

Радиовизиографическое исследование репаративных процессов в участке повреждения кости нижней челюсти. Было обнаружено отсутствие достоверных различий плотности тканей в очаге между сравниваемыми группами животных на каждую точку исследования. Однако плотность тканей и при естественном ходе репаративных процессов и на фоне использования МСК статистически значимо отличалась от здоровой кости на 2-й неделе на 11 % и 10,7 %, соответственно, а через 5 недель – на 9,5 % и 16,8 %, также соответственно. То есть плотность тканей в участке повреждения на эти сроки была на уровне или даже меньше, чем спустя 1 неделю после операции. Кроме этого необходимо отметить, что на 4-й и 5-й неделях наблюдения плотность тканей в патологическом очаге после применения МСК была несколько меньше, относительно состояния при спонтанном заживлении, причем спустя 5 недель эти различия были более выраженными.

Субмандибулярные лимфатические узлы после введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток в участок повреждения кости нижней челюсти

Субмандибулярные лимфатические узлы при естественном заживлении участка повреждения кости нижней челюсти. Через 1, 2, 3, 4 и 5 недель после операции в *структурной организации* субмандибулярных лимфатических узлов объемная плотность коркового плато превосходила исходный уровень на 82,4 %, 82,4 %, 35,3 %, 25 % и 29,4 %, соответственно. На 1-й, 2-й, 3-й, 4-й и 5-й неделях относительная площадь паракортикальной зоны была меньше, чем в контроле, на 66,7 %, 71 %, 32,6 %, 28,9 % и 29,2 %, соответственно. Спустя 1 и 2 недели объемная плотность лимфоидных фолликулов без центров размножения на срезе органа превосходила исходный уровень на 51,8 % и 43,3 %, соответственно. В фолликулах с центрами размножения через 1 и 2 недели объемная плотность мантии превосходила контрольный уровень на 70,3 % и 63,5 %, соответственно. Объемная плотность мягкотных тяжей постепенно возрастала и на 4-й и 5-й неделях была больше

контрольной на 25,2 %. Процент мозговых синусов на срезе лимфатических узлов через 1 неделю был больше на 25,3 %, чем в контроле.

Относительное содержание иммуно- и плазмобластов в **корковом плато** лимфатических узлов через 1 и 2 недели было больше, чем в контроле, в 2,3 и 2,4 раза, соответственно. Процент ретикулярных клеток постепенно возрастал и на 4-й неделе был больше на 26,9 %, чем спустя 1 неделю, а к 5-й неделе превосходил значения аналогичных показателей на 1-й и 2-й неделях на 30,3 % и 29,1 %, соответственно. Численная плотность таких клеточных элементов также медленно увеличивалась и к 5 неделе была больше на 48,9 % и 45,9 %, соответственно, по сравнению с состоянием на 1-й и 2-й неделях. Относительное количество макрофагов медленно возрастало в течение всего времени наблюдения и к 5-й неделе было на 70,5 % больше исходного. Процент делящихся клеток в корковом плато был больше контроля на 1-й и 2-й неделях в 2,5 и 2,4 раза. Относительное число клеточных элементов с деструкцией ядра или цитоплазмы через 1 и 2 недели превосходило контрольный уровень в 4,1 и 4,9 раза, соответственно. Точно так же менялось и абсолютное содержание этих клеток, спустя 2 недели их было больше в 4,3 раза, чем в контроле.

Относительное содержание иммуно- и плазмобластов в **герминативных центрах лимфоидных фолликулов** через 1, 2 и 3 недели было больше на 51 %, 66,5 % и 51,9 %, соответственно, чем в контроле. Численная плотность бластов на 1-й и 2-й неделях была больше на 89,6 % и 94,1 %, соответственно, по сравнению с контролем. Относительное количество макрофагов у интактных животных было меньше на 95,4 %, в 2,3, в 2,1 раза, на 63,5 % и 63,5 %, соответственно, чем через 1, 2, 3, 4 и 5 недель. Абсолютное число этих клеток спустя 1, 2 и 3 недели было выше исходного в 2,4, в 2,7 и в 2,3 раза, соответственно. Процент митозов был выше контроля на 1-й и 2-й неделях на 87,3% и 93,6%, соответственно. Число фигур митозов на 10^5 мкм² площади среза центра фолликула через 1 и 2 недели было выше в 2,3 и 2,2 раза, соответственно, чем в контроле. Относительное содержание клеток с признаками деструктивных изменений спустя 1 и 2 недели было выше в 2,9 и 3,1 раза, соответственно, чем в контроле. Спустя 1, 2 и 3 недели абсолютное число клеток с деструктивными изменениями было больше в 3,6, в 3,6 и 2,9 раза, соответственно, по сравнению с контролем.

Относительное содержание иммуно- и плазмобластов в просвете **мозговых синусов** лимфатических узлов через 1 неделю было выше в 5,8 раза, чем в контроле. Численная плотность бластов спустя 1 неделю была больше исходной в 14,6 раза. Относительное число ретикулярных клеток постепенно возрастало и на 5 неделе стало больше на 26,6 %, 48,8 %, 51 % и 34,2 %, соответственно, относительно состояния в контроле и спустя 1, 2 и 3 недели. Численная плотность клеточных элементов стромы ко 2 неделе была выше в 2,7 раза, по сравнению с исходным значением. Через 1 и 2 недели относительное количество макрофагов было больше в 3,9 и 2,9 раза, соответственно, чем в контроле. Величина значения абсолютной численности макрофагов спустя 1 и 2 недели была выше в 12,2 и 7,2 раза, относительно контроля. Процент клеток с признаками деструктивных изменений через 1 и 2 недели был выше исходного в 2,4 и 2,1 раза, соответственно. На 1-й и 2-й неделях абсолютное число клеток с деструктивными изменениями было выше в 8 и

5,6 раза, соответственно, чем в контроле.

Субмандибулярные лимфатические узлы после введения аутологических мезенхимальных стволовых клеток в участок повреждения кости нижней челюсти. Различия в *структурной организации* субмандибулярных лимфатических узлов крыс со спонтанным заживлением дефекта нижней челюсти и после заполнения отверстия МСК в культуральной среде были отмечены в объемной плотности коркового плато. Величина значения этого показателя на 1-й, 2-й, 4-й и 5-й неделях после применения МСК была статистически достоверно меньше на 29,2 %, 35,5 %, 27,8 % и 36,4 %, соответственно, чем при спонтанной регенерации. При этом на 2-й, 3-й и 4-й неделях спонтанной репарации объем коркового плато достоверно отличался от контроля, тогда как после использования клеток на эти сроки достоверных различий с исходным состоянием нет. Кроме того, при спонтанном заживлении объем паракортекса на 4-й и 5-й неделях после операции оставался меньше исходного, однако после применения МСК величина значения этого показателя уже нормализовалась. Объем мозговых синусов на 3 неделе естественной регенерации отличался от состояния через 1 неделю, а после введения МСК таких различий не было.

Различия в цитограмме *коркового плато* между крысами со спонтанным заживлением участка повреждения кости нижней челюсти и репаративными процессами на фоне использования МСК были найдены в изменениях численности ретикулярных клеток, макрофагов, фигур митозов и клеточных элементов с признаками деструктивных изменений. При спонтанном заживлении нижней челюсти процент и абсолютное число ретикулярных клеток на 2-й неделе были достоверно больше, чем на 4-й и 5-й неделях. Кроме того, численная плотность таких клеток через 5 недель при самостоятельной регенерации достоверно была выше, относительно состояния на 1-й неделе. После введения МСК величины значений указанных показателей между собой статистически достоверно не различались, то есть изменения числа клеток стромы не были обнаружены. Относительное число макрофагов через 5 недель при спонтанном заживлении было достоверно больше, а после использования МСК не отличалось от исходного. Процент делящихся клеток на 2-й неделе при спонтанной репарации был достоверно выше, но на фоне введения МСК не отличался от состояния в контроле. Абсолютное и относительное число клеточных элементов с признаками деструктивных изменений при спонтанном заживлении были максимальными через 2 недели и превосходили соответствующие значения как в контроле, так и на все последующие точки наблюдения. Однако после использования МСК эти показатели были самыми большими спустя 1 неделю, а на 2-й неделе после операции достоверно не отличались от исходных и на последующие сроки эксперимента.

Отличия в цитограмме *герминативных центров лимфоидных фолликулов* между животными со спонтанным заживлением участка повреждения кости нижней челюсти и репаративными процессами на фоне использования МСК были найдены в изменениях численности иммуно- и плазмобластов, ретикулярных клеток, макрофагов, фигур митозов и клеточных элементов с признаками деструктивных изменений. При спонтанном заживлении нижней челюсти процент ретикулярных клеток, относительное и абсолютное число иммуно- и плазмобластов на 3-й неделе

был достоверно выше, чем в контроле. После введения МСК к этому времени уже произошла нормализация численности данных клеточных элементов. Относительное число макрофагов при спонтанной регенерации на все точки наблюдения было выше исходного, а после использования МСК на срок в 4-5 недель не отличалось от контроля. Абсолютное число таких клеток при самостоятельной репарации к 1-й неделе возросло настолько, что достоверно отличалось от состояния на 4-й и 5-й неделях, после введения МСК такие изменения на указанные даты найдены не были. Процент делящихся клеток через 2 недели после операции и естественном ходе заживления был достоверно выше исходного, а на фоне введения МСК отличий на этот срок с контролем не было. Численная плотность фигур митозов на 1-й и 2-й неделях при спонтанной репарации были достоверно больше, чем на 4-й и 5-й неделях, но на фоне использования МСК величины значений данных показателей на эти сроки достоверно не различались. Относительное число клеточных элементов с признаками деструктивных изменений возросло в первые сроки при спонтанном заживлении более значительно, соответственно, на последующие сроки возвращение к норме происходило более выражено и были найдены достоверные отличия между состоянием на 2-й неделе и 5-й неделе наблюдений, этого не было отмечено после использования МСК. Абсолютное число клеток с явлениями деструкции при самостоятельной регенерации на 3-й неделе достоверно отличалось от контроля, а на фоне введения МСК численная плотность таких клеток к этому сроку уже не отличалась от исходной.

Отличия в цитограмме содержимого *мозговых синусов* между животными со спонтанным заживлением участка повреждения кости нижней челюсти и репаративными процессами на фоне использования МСК были найдены в изменениях содержания иммуно- и плазмобластов, ретикулярных клеток, макрофагов и клеточных элементов с признаками деструктивных изменений. Численная плотность макрофагов при самостоятельной регенерации была выше контроля на 1-й и 2-й неделях, тогда как после введения МСК уже на 2-й неделе величина значения указанного показателя достоверно не отличалась от исходной. При спонтанном заживлении нижней челюсти процент иммуно- и плазмобластов к 1-й неделе возрос более выражено, чем после использования МСК, в связи с этим при последующей нормализации этого показателя у животных без МСК были найдены достоверные отличия между состоянием на указанный срок и точки в конце наблюдения. Показатели относительного содержания ретикулярных клеток при спонтанной регенерации в конце наблюдения были достоверно выше контроля, абсолютное количество клеток стромы при самостоятельном заживлении на 1-й неделе было больше исходного. После использования МСК достоверные отличия от контроля процента и численной плотности этих клеточных элементов отсутствовали на все точки наблюдения. Численная плотность и относительное количество клеток с признаками деструкции достоверно увеличились на 1-й и 2-й неделях при спонтанном заживлении, в связи с этим затем возвращение к норме происходило более выражено и были найдены достоверные отличия между состоянием на 2-й и 4-й неделях. После применения МСК эти показатели уже на 2-й неделе статистически достоверно не отличались от контроля и также не было различий между состоянием на 2 неделе и на последующие сроки.

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Через 1 неделю после повреждения кости нижней челюсти в эксперименте на крысах и спонтанном заживлении 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 слившимися 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. О месте операции можно было судить по оставшимся крупным сосудам и хаотично расположенным костным балкам (костная мозоль). В некоторых случаях на 3-й неделе, в других – к 4-м неделям в кости на месте дефекта появились полностью сформированные полости с красным костным мозгом.

На фоне введения МСК в культуральной среде спустя 1 неделю состояние тканей в дефекте кости 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 МСК необходимо отметить формирование 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.

На последующие сроки происходило дальнейшее слияние островков костной ткани с последующим формированием костной мозоли и прогрессирующее восстановление красного костного мозга.

Согласно литературным данным, мезенхимальные 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).

Введение в модели на грызунах суспензии МСК и деминерализованного костного матрикса в пустую костномозговую полость трубчатой кости привело к образованию трабекул и стромы, поддерживающей гематопоэз (Gurevitch O. et al., 2003). После применения графта из композиции гидроксиапатита и коллагенового геля с МСК для замещения средней трети бедренной кости у кроликов, кроме формирования новой костной ткани с постепенной биодеградацией искусственного материала, были найдены структуры костного мозга (Chang S.H. et al., 2010).

По результатам денситометрии дефекта кости нижней челюсти крыс при естественном заживлении и после применения МСК было обнаружено, что плотность тканей статистически значимо отличалась от здоровой кости на 2-й и 5-й неделях. При этом спустя 4 и 5 недель после операции плотность кости в дефекте на фоне применения МСК была меньше, чем при естественном ходе репаративного

процесса.

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

Скорее всего, падение плотности в очаге по данным денситометрии на 2-й и 5-й неделях после операции в обеих группах связано с развитием красного костного мозга. На 1-й неделе идет активное развитие кости и было отмечено повышение плотности, далее формируется красный костный мозг, который расположен в полостях и, соответственно, плотность костной ткани падает. После введения МСК костный мозг образуется быстрее и более выражено, поэтому более значительно уменьшается плотность костной ткани в участке повреждения и становится даже ниже, чем при заживлении без использования клеток.

После индукции воспалительного процесса созданием отверстия в кости нижней челюсти и при естественном течении регенерации и после применения МСК в субмандибулярных лимфатических узлах расширяется корковое плато и сужается паракортикальная зона. Эти изменения были зарегистрированы уже на 1-й неделе после начала эксперимента, далее они постепенно возвращались к исходному уровню, но в некоторых случаях все равно достоверно отличались от контроля даже на 5-й неделе.

Также к 1-й неделе увеличивается объемная плотность лимфоидных фолликулов без центров размножения, увеличивается площадь на срезе органов структур мозгового вещества: мягкотных тяжей и мозговых синусов. Однако величины значений этих показателей нормализуются к 3-й – 4-й неделе и затем остаются на уровне контроля до конца времени наблюдения.

Скорее всего, поступление антигенов (из собственных поврежденных тканей) из места операции и создания искусственного костного дефекта приводит к пролиферации В-лимфоцитов коркового плато, за счет этого, видимо, и расширяется эта зона. Кроме пролиферации в клетках коркового плато стимулируется дифференцировка. Активно делящиеся и созревающие лимфоциты формируют лимфоидные фолликулы без герминативных центров. Далее в таких узелках, по мере дифференцировки клеток, образуются светлые центры. Так как клетки по периферии продолжают делиться, в данных узелках процент периферии (мантийной зоны) более высок, относительно самих центров размножения.

По мере дифференцировки лимфоцитов в фолликулах, относительно зрелые клеточные элементы мигрируют в мягкотные тяжи, по-видимому, вследствие этого и происходит гипертрофия этих структур.

Расширение коркового плато, лимфоидных фолликулов, мягкотных тяжей и мозговых синусов, скорее всего, и приводит к сокращению процента паракортикальной зоны на срезе лимфатических узлов.

В корковом плато, центрах размножения лимфоидных фолликулов и в просвете мозговых синусов лимфатических узлов крыс с естественным протеканием репаративных процессов на 1-й – 2-й неделях возросло число иммуно- и плазмобластов, делящихся клеток и клеточных элементов с признаками деструктивных изменений. Затем численность указанных клеток нормализовалось,

но к концу наблюдения увеличилось содержание ретикулярных клеток и макрофагов.

Поступление антигенов из разрушенных в результате хирургического вмешательства тканей вызывает пролиферацию и дифференцировку В-клеток коркового плато и герминативных центров, из-за этого в данной зоне возрастает число фигур митозов и содержание незрелых клеточных элементов – иммунобластов и плазмобластов.

Увеличение численности клеток с признаками деструкции мы связываем в данном случае, во-первых, с активацией собственных лизосом в результате возрастания митотической активности и стимуляции дифференцировки лимфоцитов, иммуно- и плазмобластов; во-вторых, также не исключено, что на процессе увеличения числа клеток с необратимыми изменениями сказывается и возрастание прямого воздействия антигенных и токсических веществ из места воспалительной реакции.

При массивном поступлении клеточного и тканевого детрита, часть его может оседать в просвете синусной системы. Такие крупные фрагменты детрита или постепенно лизируются фагоцитами или сначала инкапсулируются, а потом полностью замещаются соединительной тканью.

Развитие склероза в различных структурах лимфатических узлов, согласно литературным данным, начинается именно с «огрубления» их ретикулярной стромы (Поликар А., 1965; Kinmonth J. B., Wolfe J. H., 1980; Rada I. O. et al., 1983; Tudose N., Rada O., 1984; Бородин Ю. И. и др., 2000).

То есть увеличение численности в различных структурах лимфатических узлов ретикулярных клеток и макрофагов, которые являются неотъемлемым компонентом соединительной ткани, к концу времени наблюдения, скорее всего, связано с постепенной склеротической трансформацией этих зон.

Практически такие же однонаправленные изменения той или иной степени выраженности произошли и в субмандибулярных лимфатических узлах после применения МСК для лечения повреждения кости нижней челюсти. Поэтому на одинаковых реакциях данных органов останавливаться не будем, а рассмотрим достоверные отличия между сравниваемыми группами животных.

Различия в строении субмандибулярных лимфатических узлов крыс со спонтанным заживлением дефекта нижней челюсти и после введения в отверстие МСК были отмечены в объемной плотности коркового плато, которая после применения клеток была меньше, чем при спонтанной регенерации. При этом на 2-й, 3-й и 4-й неделях спонтанной репарации объем коркового плато еще достоверно отличался от контроля, тогда как после использования МСК -- нет. Кроме того, при спонтанном заживлении объем паракортекса на 4-й и 5-й неделях после операции оставался достоверно меньше исходного, тогда как после применения МСК величина значения этого показателя находилась в пределах нормы. Объем мозговых синусов на 3-й неделе естественной регенерации отличался от состояния через 1 неделю, а после введения МСК таких различий не было.

Введение МСК в участок поврежденной кости, согласно литературным данным, приводит к ускорению регенераторных процессов как за счет непосредственного участия и дифференцировки в клетки растущей кости, так и за

счет выработки ими различных факторов, также усиливающих репарацию (Кругляков П. В. и др., 2005; Фатхудинов Т. Х. и др., 2005; Shao Z. et al., 2007; Wongchuensoontorn C. et al., 2009; Jiang X. et al., 2010; Kallai I. et al., 2010).

Видимо, более быстрая регенерация тканей после применения МСК, что проявляется более интенсивным заживлением дефекта кости нижней челюсти и ускоренным формированием структур красного костного мозга, приводит к меньшему объему детрита и антигенных веществ, поступающих в субмандибулярные лимфатические узлы. Вследствие этого меньше выражена гипертрофия данной зоны. Так как корковое плато расширяется менее значительно, также меньше происходит сокращение относительной площади на срезе органов паракортикальной зоны.

Различия в цитограмме различных зон лимфатических узлов между крысами со спонтанным заживлением участка повреждения кости нижней челюсти и репаративными процессами на фоне использования МСК были найдены в изменениях численности иммуно- и плазмобластов, ретикулярных клеток, макрофагов и клеточных элементов с признаками деструктивных изменений. После применения МСК величины значений показателей указанных клеточных элементов изменялись не так выражено и раньше возвращались к контрольному уровню.

Такие отличия изменений клеточного состава паренхимы В-зависимых структур лимфатических узлов, скорее всего, также обусловлены ускорением процессов репарации костной ткани после использования МСК. В результате такого более интенсивного заживления, как уже было отмечено выше, значительно уменьшен объем клеточного и тканевого детрита, поступающего в лимфатические узлы. Вследствие менее значительной антигенной стимуляции также меньше выражены процессы активации пролиферации и дифференцировки иммунокомпетентных клеток, что проявляется в снижении степени изменений или более ранней нормализации показателей численности, прежде всего, иммуно- и плазмобластов, то есть пролиферирующих и созревающих клеточных элементов.

Также меньшая степень поступления антигенов в лимфатические узлы способствует снижению миграции макрофагов в данные органы или уменьшению процессов дифференцировки их на месте из моноцитов. Уменьшение объема токсических веществ, образование которых всегда сопровождает асептический или септический воспалительный процесс, приводит к сокращению численности клеток с деструктивными изменениями ядра или цитоплазмы.

Видимо, со снижением антигенной и токсической нагрузки на лимфатические узлы связана меньшая степень увеличения численности ретикулярных клеток. В данном случае можно заключить, что использование МСК при повреждении кости нижней челюсти сопровождается меньшей степенью реакции стромальных клеточных элементов регионарных лимфатических узлов и, следовательно, меньшей вероятностью развития склеротических процессов в данных органах.

Большая сохранность структуры и citoархитектоники регионарных лимфатических узлов после применения МСК позволяет улучшить дренаж тканей в области травмы и таким образом, в свою очередь, способствует ускорению процессов репаративной регенерации поврежденной кости нижней челюсти.

ВЫВОДЫ

1. После повреждения кости нижней челюсти у крыс и естественном ходе репаративной регенерации через 1 неделю в дефекте кости среди фрагментов кровяного сгустка и грануляций формируются отдельные островки молодой костной ткани, через 2 недели дефект в кости нижней челюсти полностью замещается молодой костной тканью. Спустя 3-4 недели начинается формирование красного костного мозга.

2. После операции с последующим заполнением дефекта кости нижней челюсти суспензией МСК в культуральной среде происходит ускорение репаративных процессов и уже на 2-й неделе в костной мозоли присутствуют структуры красного костного мозга.

3. Согласно результатам денситометрии кости нижней челюсти крыс спустя 4 и 5 недель после операции плотность тканей в дефекте на фоне применения МСК меньше, чем при естественном ходе репаративного процесса, что обусловлено прогрессивным развитием полостей со структурами красного костного мозга.

4. В субмандибулярных лимфатических узлах при заживлении участка повреждения кости нижней челюсти расширяется корковое плато, увеличивается относительный объем лимфоидных фолликулов и мозговых синусов. Во всех структурных отделах лимфатических узлов сначала возрастает число иммуно- и плазмобластов, делящихся клеток и клеточных элементов с признаками деструктивных изменений, к концу наблюдения увеличивается содержание ретикулярных клеток и макрофагов.

5. Различия в строении субмандибулярных лимфатических узлов крыс при естественном ходе заживления дефекта нижней челюсти и после введения в участок повреждения МСК были отмечены в объемной плотности коркового плато, которая после применения клеток была меньше. При этом на 2-й, 3-й и 4-й неделях спонтанной репарации объем коркового плато еще статистически достоверно отличался от контроля, тогда как после использования МСК – нет. Кроме того, объем паракортекса на 4-й и 5-й неделях после операции оставался меньше исходного, тогда как после применения МСК величина значения этого показателя находилась в пределах нормы.

6. На фоне применения МСК для ускорения регенерации участка повреждения кости нижней челюсти показатели митотической активности, численности иммуно- и плазмобластов, ретикулярных клеток, макрофагов и клеточных элементов с признаками деструктивных изменений в различных зонах регионарных лимфатических узлов изменяются в меньшей степени и раньше возвращаются к контрольному уровню, чем при естественном заживлении.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. В связи с тем что после использования клеточных технологий в меньшей степени выражены признаки воспалительного процесса в участке повреждения кости нижней челюсти – о чем свидетельствуют более интенсивная регенерация дефекта, прогрессивное формирование структур красного костного мозга и менее значительные изменения регионарных лимфатических узлов – целесообразно применение МСК, выделенных из аутологичной крови или костного мозга, для

ускорения репаративных процессов в костных тканях в стоматологии, хирургии, травматологии и ортопедии.

СПИСОК РАБОТ, ОУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Майбородин И. В., Колесников И. С., Шеплев Б. В., Рагимова Т. М., Шевела А. И., **Ковынцев А. Н.**, Колмакова И. А., Притчина И. А., Козлова Е. В., Войтович А. Б., Ковынцев Д. Н. Гранулематозное воспаление после применения препаратов фибрина // **Морфологические ведомости.** – 2007. – № 3-4. – С. 116-118.

2. Майбородин И. В., Шевела А. И., Колесников И. С., Шеплев Б. В., Рагимова Т. М., **Ковынцев А. Н.**, Ковынцев Д. Н. Гранулематозное воспаление после применения фибрина для дентальной имплантации // **Вестн. Новосибирского гос. ун-та: Сер. биол., клин. мед.** – 2008. – Т. 6. – № 2. – С. 85-89.

3. Майбородин И. В., Колесников И. С., Шеплев Б. В., Рагимова Т. М., **Ковынцев А. Н.**, Ковынцев Д. Н., Колмакова И. А., Притчина И. А., Козлова Е. В., Войтович А. Б. Морфология десны после реконструктивных операций с применением препаратов фибрина // **Морфология.** – 2008. – Т. 133. – № 3. – С. 68.

4. Майбородин И. В., Колмакова И. А., Притчина И. А., Козлова Е. В., Войтович А. Б., **Ковынцев А. Н.**, Колесников И. С., Шеплев Б. В., Рагимова Т. М., Ковынцев Д. Н. Возрастные изменения эпителия десны здоровых людей и пациентов с деструктивным хроническим периодонтитом // **Морфология.** – 2008. – Т. 133. – № 3. – С. 68-69.

5. Майбородин И. В., Колесников И. С., Шеплев Б. В., Рагимова Т. М., **Ковынцев А. Н.**, Ковынцев Д. Н., Шевела А. И. Морфология подлежащих тканей десны после дентальной имплантации с применением препаратов фибрина // **Стоматология.** – 2009. – Т. 88. – № 1. – С. 9-13.

6. Майбородин И. В., Войтович А. Б., Козлова Е. В., Колмакова И. А., Притчина И. А., Ковынцев Д. Н., Колесников И. С., Шеплев Б. В., **Ковынцев А. Н.** Формирование плазмочитарных инфильтратов в десне пациентов с хроническим верхушечным периодонтитом // **Морфология.** – 2009. – Т. 135. – № 2. – С. 43-47.

7. Майбородин И. В., Гаврилова В. В., Колмакова И. А., Притчина И. А., Козлова Е. В., Войтович А. Б., **Ковынцев А. Н.**, Шевела А. И., Колесников И. С., Шеплев Б. В., Рагимова Т. М., Ковынцев Д. Н. Возрастно-половые особенности тканей десны в норме и при хроническом верхушечном периодонтите // **Стоматология.** – 2009. – Т. 88. – № 2. – С. 29-33.

8. Майбородин И. В., Козлова Е. В., Колмакова И. А., Ковынцев Д. Н., Колесников И. С., Шеплев Б. В., **Ковынцев А. Н.** Особенности плазмочитарной инфильтрации слизистой оболочки десны при хроническом верхушечном периодонтите // **Хирургия, морфология, лимфология.** – 2009. – Т. 6. – № 11. – С. 96-101.

9. Майбородин И. В., Колесников И. С., Шеплев Б. В., Шевела А. И., **Ковынцев А. Н.**, Колмакова И. А., Ковынцев Д. Н. Применение препаратов фибрина в стоматологии и развитие гранулематозного воспаления на аутофибрин // **Хирургия, морфология, лимфология.** – 2009. – Т. 6. – № 11. – С. 101-105.

10. Майбородин И. В., Колесников И. С., Шеплев Б. В., Ковынцев Д. Н., **Ковынцев А. Н.** Структурная организация тканей десны после дентальной

имплантации с использованием фибринового сгустка // Вопросы морфологии XXI века: Вып. 1: сб. науч. тр., посвящ. 100-летию каф. мед. биол. СПбГМА им. И.И.Мечникова. – СПб.: СПбГМА им. И.И.Мечникова: Изд-во ДЕАН, 2008. – С. 181-182.

11. Майбородин И. В., Колмакова И. А., Притчина И. А., Козлова Е. В., **Ковынцев А. Н.**, Ковынцев Д. Н. Возрастная морфология десны в норме и при деструктивном хроническом периодонтите // Вопросы морфологии XXI века: Вып. 1: сб. науч. тр., посвящ. 100-летию каф. мед. биол. СПбГМА им. И. И. Мечникова. – СПб.: СПбГМА им. И.И.Мечникова: Изд-во ДЕАН, 2008. – С. 182.

12. Майбородин И. В., Козлова Е. В., Колмакова И. А., **Ковынцев А. Н.**, Ковынцев Д. Н., Шеплев Б. В., Колесников И.С. Лимфоидные фолликулы слизистой оболочки десны при хроническом воспалении // Морфология, лимфология, клиника: сб. науч. работ, посвященных 80-летию акад. Ю.И.Бородин. – Новосибирск: Сибмедиздат НГМУ, 2009. – С. 192-198.

13. Майбородин И. В., Колесников И. С., Шеплев Б. В., **Ковынцев А. Н.**, Ковынцев Д. Н., Шевела А. И., Колмакова И. А. Гранулематозное воспаление, как реакция на фибрин в тканях // Морфология, лимфология, клиника: сб. науч. работ, посвященных 80-летию акад. Ю.И.Бородин. – Новосибирск: Сибмедиздат НГМУ, 2009. – С. 207-211.

14. Майбородин И. В., Шевела А. И., Колесников И. С., Шеплев Б. В., Рагимова Т. М., Ковынцев Д. Н., **Ковынцев А. Н.** Особенности лимфотока и гемомикроциркуляции в десне при лечении острого гнойного периостита челюсти с применением фибринового сгустка // Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии: мат. междунар. конф.: – Т. 2 (М-Я). –Новосибирск, 2008. – С. 5-7.

15. Майбородин И. В., Козлова Е. В., Притчина И. А., Колмакова И. А., Войтович А. Б., **Ковынцев А. Н.**, Ковынцев Д. Н. Особенности лимфотока в десне при течении периодонтита на фоне артериальной гипертензии // Фундаментальные проблемы лимфологии и клеточной биологии: мат. междунар. конф.– Т. 2 (М-Я). – Новосибирск, 2008. – С. 7-9.

16. Майбородин И. В., Колмакова И. А., Притчина И. А., Козлова Е. В., **Ковынцев А. Н.**, Колесников И. С., Шеплев Б. В., Ковынцев Д. Н., Рагимова Т. М. Реакция десны при сочетании периодонтита с артериальной гипертензией // Челюстно-лицевая хирургия и стоматология: Новые технологии в стоматологии: мат. II съезда гигиенистов стоматологических Росс. III Сибирского конгр. и Всеросс. симп. – Новосибирск, 2008. – С. 104-109.

17. Майбородин И. В., Колесников И. С., Шеплев Б. В., Ковынцев Д. Н., Колмакова И. А., Притчина И. А., Козлова Е. В., **Ковынцев А. Н.**, Рагимова Т. М. Ускорение репарации тканей при дентальной имплантации с применением фибрина // Челюстно-лицевая хирургия и стоматология: Новые технологии в стоматологии: мат. II съезда гигиенистов стоматологических Росс. III Сибирского конгр. и Всеросс. симп. – Новосибирск, 2008. – С. 109-112.