### УДК 615.465:546.824.015.4:612.419.014.2.085.2.11

# РАЗРАБОТКА И ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ АУТОЛОГИЧНЫХ ЭКТОМЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ПОРИСТОГО ТИТАНА ДЛЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СУБАНТРАЛЬНОЙ ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНОЙ АУГМЕНТАЦИИ

### Кошель И. В.

ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет» Минздрава России, Ставрополь, е-mail: stgma@br.ru

В статье рассматриваются вопросы использования пористого титана в качестве основы тканеинженерной конструкции для субантральной верхнечелюстной аугментации. Экспериментальное исследование проведено на баранах. В ходе экспериментального и гистологического исследований установлено, что гранулы пористого титана биосовместимы с костной тканью, имеют оптимальные параметры микрорельефа поверхности, что создает хорошие условия для адгезии, экспансии и миграции остеообразующих клеток, имеют ничтожную кинетику резорбции, являются пористыми для обеспечения эффективной неоваскуляризации образующейся de почо костной ткани. Установлено, что пористый титан, используемый вместе с аутологичными эктомезенхимальными стволовыми клетками, является эффективной альтернативой материалам на основе фосфатов кальция и костного коллагена для субантральной аугментации кости верхней челюсти при дентальной имплантации и реконструктивнопластических операциях на верхнечелюстном синусе.

Ключевые слова: тканеинженерная конструкция, пористый титан, субантральная аугментация, дентальные имплантаты.

## DEVELOPMENT AND USE OF TISSUE-ENGINEERING STRUCTURES BASED ON EKTOMEZENHIMALNYH AUTOLOGOUS STEM CELLS AND POROUS TITANIUM FOR EXPERIMENTAL SUBANTRALNOY MAXILLARY AUGMENTATION

### Koshel I. V.

Stavropol State Medical University, Stavropol, e-mail: stgma@br.ru

This article discusses the use of porous titanium as a basis for tissue-engineering design subantralnoy maxillary augmentation. Experimental research conducted rams. During the pilot, and histological studies revealed that the granules of porous titanium is biocompatible with bone tissue, are the optimal parameters of microrelief surface, which creates good conditions for adhesion, expansion and migration osteoobrazuyuschih cells have negligible resorption kinetics, are porous to provide effective neovascularization formed de novo bone. It was found that the porous titanium, used in conjunction with autologous stem cells ektomezenhimalnymi is an effective alternative materials based on calcium phosphate and bone collagen subantralnoy bone augmentation in the upper jaw dental implantation and reconstructive plastic surgery on maxillary sinus.

Keywords: tissue-engineering design of porous titanium, subantralnaya augmentation, dental implants.

Вторичная адентия ускоряет атрофию боковых отделов верхней челюсти. Потеря зубов приводит к уменьшению объема костной ткани, что делает неблагоприятным прогноз дентальной имплантации на верхней челюсти [1, 6, 3]. Субантральная аугментация или синуслифтинг — один из способов повышения эффективности результатов дентальной имплантации при значительной атрофии в боковых отделах верхней челюсти [15,16,17]. Путем увеличения костной ткани в области синуса субантральная аугментация позволяет врачу-имплантологу использовать более длинные имплантаты, что создает оптимальные условия для адекватного сопротивления окклюзионным нагрузкам. Синуслифтинг показан,

когда недостаточная высота альвеолярного отростка верхней челюсти препятствует установке имплантата длинной более 10 мм [2, 4, 23].

Чаще всего хирурги для увеличения объема кости используют резорбируемый гидроксиапатит, деминерализованную лиофилизированную аллогенную кость и аутогенную кость [7, 8, 22]. Последняя наиболее предпочтительна, поскольку не вызывает реакции отторжения и обеспечивает оптимальные сроки остеоинтеграции с имплантатом [5, 12]. Вместе с тем объем донорской кости в полости рта ограничен, взятие аутотрансплантата внеротовым способом сопряжено с дополнительной операционной травмой и требует привлечения специалистов из смежных областей медицины [9, 10, 20]. К недостаткам аллогенных и синтетических остеопластических материалов относится иммунный ответ, инфицирование, низкие прочностные характеристики, длительный срок резорбции и недостаточная первичная стабильность дентальных имплантатов, устанавливаемых в области проведенного синуслифтинга [11, 15, 21]. Данные литературы и некоторые авторские исследования показали на возможность использования при субантральной аугментации тканеинженерной конструкции на основе аутологичных эктомезенхимальных клеток, иммобилизованных на пористом титане [13, 14, 24]. На современном этапе развития дентальной имплантологии и оториноларингологии актуальной является необходимость расширения показаний к использованию аутологичных эктомезенхимальных клеток, а также пористого титана в качестве матрицы-носителя данных клеток. Интересным представляется изучение возможности применения данной тканеинженерной конструкции с целью восстановлении целостности дна верхнечелюстного синуса при его перфорации и/или последующей дентальной имплантации.

**Цель исследования.** Повышение эффективности дентальной имплантации в условиях атрофии костной ткани в боковых отделах верхней челюсти за счет экспериментального обоснования использования тканеинженерной конструкции на основе аутологичных эктомезенхимальных клеток и пористого титана при субантральной верхнечелюстной аугментации.

Материал и методы исследования. Экспериментальное исследование проведено на 12 годовалых баранах. Выбор в качестве экспериментальной модели верхней челюсти барана обусловлен следующими причинами: большой объем доступной костной ткани в области исследования, простота содержания и низкий уровень агрессии животного, высокий регенераторный потенциал донорских зон, позволяющий не умерщвлять животное при заборе материала. Для операции, которую проводили с соблюдением правил асептики, использовали наружный доступ – операционное поле перед хирургическим вмешательством выстригали и обрабатывали растворами антисептиков.

Перед операцией внутримышечно вводили 2 % раствор ксилазина гидрохлорида и 2 % раствор кетамина гидрохлорида из расчета веса животного (0,15 мл на 1 кг), затем проводили инфильтрационную анестезию в зоне вмешательства sol. Lidocaini 2 % с адреналином 1:100000, послойно рассекали кожу и фасцию мышцы, получая оптимальный доступ к нужной области для препарирования кости. Шаровидным бором выпиливали фрагмент кортикальной кости диаметром 2 см в области передней стенки верхнечелюстного синуса. Полученный аутотрансплантат аккуратно отделяли ОТ слизистой оболочки верхнечелюстного синуса, поверх слизистой укладывали тканеинженерную конструкцию, состоящую из гидрогеля PuraMatrix/3DM с прекультивированными аутологичными ээктомезенхимальными клетками, иммобилизованными на пористом титане в виде гранул с размером гранул 0,7-1,0 мм и пористостью 80 %. Данная тканеинженерная конструкция представляет синтетический биодеградируемый матрикс-гель собой основе олигопептидных фрагментов, формирующий нанонити и предварительно культивированные эктомезенхимальные клетки барана, обработанные 5-азацитидином. Готовый тканеинженерный продукт получали путем механического смешивания геля прекультивированными мезенхиальными клетками и пористым титаном *in situ*.

Затем возвращали аутотрансплантат на место, рану ушивали и обрабатывали антисептиками, проводили рентгенологическое исследование. В ходе повторного хирургического вмешательства через 1, 2 и 3 месяца выпиливали костные фрагменты в оперированной ранее области вместе со слизистой оболочкой верхнечелюстного синуса. Выделенные костные блоки фиксировали в 10 % нейтральном формалине, декальцинировали в трилоне-Б и подвергали стандартной гистологической обработке с заливкой в парафин. Срезы толщиной 8–10 мм окрашивали гематоксилин-эозином, по Ван-Гизону, Бишу и Маллори.

Результаты и обсуждение. Особый интерес представляла визуальная оценка взаимодействия систем макропрепаратов «титан-надкостница-кость» и «кость-титан-слизистая» в каждый срок наблюдения. В срок 30 суток от начала эксперимента при визуальном исследовании костного фрагмента верхней челюсти с имплантированным пористым титаном хорошо видно, что гранулы титана начинают обрастать волокнами соединительной ткани.

Очевидно, что шероховатость поверхности, а также высокая пористость (до 80 %) гранул титана способствует активной миграции фибробластов с заселением отдельных их участков и формированием соединительной ткани уже через 4 недели после операции, кроме этого, пористость создает условия для эффективной васкуляризации. Гранулы на этом сроке

наблюдения достаточно плотно «впаяны» в надкостницу и при отслаивании отделяются вместе с ней.

На 60 сутки эксперимента основная часть внесенного в костный дефект пористого титана имеет характерные тенденции к консолидации в единый блок. При зондировании все гранулы хорошо прилегают друг к другу, и введение зонда в глубину выполняемого ими дефекта крайне затруднительно. При визуальной оценке макропрепаратов, полученных на 60 сутки эксперимента, установлено, что все внесенные в костный дефект гранулы титана плотно спаянны между собой, надкостницей и слизистой оболочкой синуса.

На 90-е сутки конгломерат «титан-кость» очень плотно прилегает к стенкам дефекта и визуальной границы между ними не наблюдается. При отслаивании слизистой оболочки синуса хорошо просматриваются соединительнотканные волокна, мелкие и средние кровеносные сосуды, проросшие сквозь поры титановых гранул как со стороны слизистой оболочки синуса, так и со стороны стенок костного дефекта. Промежутки между гранулами заполнены полупрозрачным молодым новообразованным костным веществом.

При гистологическом исследовании через 1 месяц после начала эксперимента пористый титан приобретал вид как крупных конгломератов, так и мелких глыбок, расположенных рядом друг с другом. В местах расположения гранул титана наблюдались скопления моноцитов, макрофагов и фибробластов соединительной ткани. Признаков воспалительного процесса вокруг пористого титана не отмечено. При большом увеличении вокруг пористого титана наблюдались признаки прорастания и даже организации материала по периферии тонкими соединительнотканными волокнами. Костные трабекулы к данному сроку наблюдения приобретали более зрелое и структурированное строение. Процессы формирования пучков коллагеновых волокон в параллельные ряды приобретали симметричный однонаправленный характер.

К 60-м суткам в непосредственной близости от основной массы пористого титана видны множественные внутри- и межклеточные кристаллические и балочные включения в межгранулярных соединительнотканных депозитах, по периферии – различного размера полости и остатки мелких гранул пористого титана между остеонами. В изучаемых препаратах отчетливо видны явления разрастания соединительной ткани и формирования пролифератов активных фибробластов в межтрабекулярном пространстве с активным ангиогенезом микрососудистого русла. Характерно стабильное количество макрофагов и нейтрофилов и, как следствие, низкий уровень резорбции новообразованной костной ткани, что в свою очередь обусловлено отсутствием клеточной активности коллагенолитических ферментов (коллагеназы, кетапсина, металлпротеиназ). Через 3 месяца костные трабекулы приобретали более упорядоченное строение, прослеживалось формирование пучков

коллагеновых волокон в параллельные ряды с формированием трабекул в виде тонких дуг, анастомозирующих между собой.

Вблизи от остеонов просматривалась выраженная исчерченность коллагеновых волокон, что является одним из признаков проникновения клеточных элементов и новообразованного костного вещества внутрь гранул пористого титана. Новообразованные остеоны имели различные размеры, чаще они были крупные, или неправильной формы, с широкими гаверсовыми каналами. В местах, где костная основа пазухи была сильно повреждена, наблюдались картины формирования трабекул путем активного врастания коллагеновой соединительной ткани и кровеносных сосудов в поврежденный матрикс трабекул.

Таким образом, к 3 месяцам наблюдения в области компактизирующейся ткани хорошо видны запаянные в костное вещество гранулы титана, при этом новообразованная кость в эти сроки наблюдения отличается достаточной зрелостью, а характер костной регенерации имеет все признаки активного ангио- и остеогенеза.

Растровая электронная микроскопия показала, что уже через 60 суток после внесения в область дефекта вокруг пористого титана наблюдается прорастание и организация материала по периферии тонкими соединительнотканными волокнами (рис. 1).

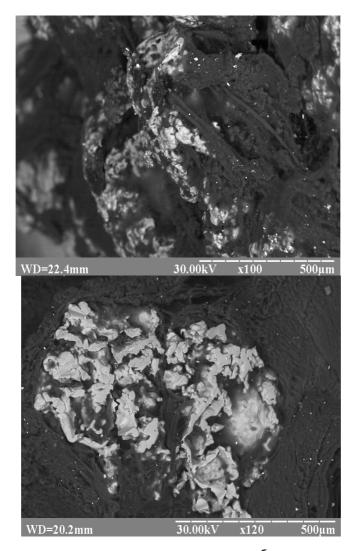


Рис. 1. Растровая электронная микроскопия гранул нерезорбируемого пористого титана через 60 суток после внесения в костный дефект

Заключение. Гранулы пористого титана, введенного в состав тканеинженерной конструкции вместе с прекультивированными аутологичными эктомезенхимальными клетками, биосовместимы с костной тканью верхнечелюстного синуса, имеют оптимальные параметры микрорельефа поверхности, что создает хорошие условия для адгезии, экспансии и миграции остеообразующих клеток, имеют ничтожную кинетику резорбции, являются пористыми для обеспечения эффективной неоваскуляризации образующейся de novo костной ткани. Пористый титан является эффективной альтернативой материалам на основе фосфатов кальция и костного коллагена в качестве матрицы-носителя тканеинженерной конструкции для субантральной аугментации кости верхней челюсти при дентальной имплантации и реконструктивно-пластических операциях на верхнечелюстном синусе.

### Список литературы

- 1. Будзинский Н. Э., Сирак С. В., Максимова Е. М., Сирак А. Г. Определение антимикробной активности мирамистина, иммобилизованного на композиционном полисорбе, на микрофлору корневых каналов при остром и обострившемся хроническом периодонтите и процесс остеофикации в эксперименте на животных // Фундаментальные исследования. 2013. № 7-3. C. 518-522.
- 2. Григорьянц Л. А., Сирак С. В., Зекерьяев Р. С., Арутюнян К. Э. Показания и эффективность использования различных хирургических вмешательств при лечении больных с одонтогенным гайморитом, вызванным выведением пломбировочного материала в верхнечелюстной синус // Стоматология. 2007. Т. 86. № 3. С. 42-46.
- 3. Григорьян А. А., Сирак С. В., Сирак А. Г., Ханова С. А. Разработка и клиническое применение нового ранозаживляющего средства для лечения заболеваний слизистой оболочки полости рта у детей и подростков // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 2; URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=8700.
- 4. Слетов А. А. Внеротовое устройство для анатомического позиционирования фрагментов челюстных костей /А. А. Слетов, С. В. Сирак, А. Б. Давыдов, А. В. Арутюнов, Р. А. Аванесян, А. Г. Сирак, Р. А. Можейко, И. А. Копылова, Т. Т. Мебония, Ю. И. Никитина, И. Э. Казиева // Патент на изобретение RUS 2541055 от 28.01.2014.
- 5. Слетов А. А., Переверзев Р. В., Ибрагимов И. М., Кодзоков Б. А., Сирак С. В. Экспериментальное определение регенераторного потенциала клеток костного мозга // Стоматология для всех. 2012. N 2. C. 29-31.
- 6. Сирак А. Г., Сирак С. В. Морфофункциональные изменения в пульпе зубов экспериментальных животных при лечении глубокого кариеса и острого очагового пульпита с использованием разработанных лекарственных композиций // Современные проблемы науки и образования. 2013. № 2; URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=8715.
- 7. Сирак С. В., Слетов А. А., Мартиросян А. К., Ибрагимов И. М., Перикова М. Г. Использование пористого титана для субантральной аугментации кости при дентальной имплантации (экспериментальное исследование) // Медицинский вестник Северного Кавказа. -2013.-T.~8.-N = 3.-C.~42-44.
- 8. Сирак С. В., Казиева И. Э., Мартиросян А. К. Клинико-экспериментальное использование остеопластических материалов в сочетании с электромагнитным излучением для ускорения регенерации костных дефектов челюстей // Фундаментальные исследования. 2013. № 5-2. С. 389-393.

- 9. Сирак С. В. Стоматологическая заболеваемость детского населения ставропольского края до и после внедрения программы профилактики / С. В. Сирак, И. А. Шаповалова, Е. М. Максимова, С. Н. Пригодин // Стоматология детского возраста и профилактика. 2009. Т. 8. N = 1. C. 64-66.
- 10. Сирак С. В. Стоматологическая заболеваемость взрослого населения основных климатогеографических зон Ставропольского края / С. В. Сирак: дис. ... канд. мед. наук / Ставропольская государственная медицинская академия. Ставрополь, 2003.
- 11. Сирак С. В. Опыт использования местных ранозаживляющих средств при лечении вульгарной пузырчатки с локализацией на слизистой оболочке полости рта и губах / С. В. Сирак, В. В. Чеботарев, А. Г. Сирак, А. А. Григорьян // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2013. Т. 8. № 1. С. 59-62.
- 12. Сирак С. В. Влияние пористого титана на остеогенный потенциал клеток костного мозга in vitro/ С. В. Сирак, А. А. Слетов, И. М. Ибрагимов, Б. А. Кодзоков // Медицинский вестник Северного Кавказа. − 2012. − Т. 27. − № 3. − С. 22-25.
- 13. Сирак С.В. Использование поликомпонентной адгезивной мази в сочетании с иммуномодулирующим препаратом в комплексной терапии пузырчатки / С. В. Сирак, И. А. Копылова, В. В. Чеботарев, Ф. М. С. Аль-асфари // Пародонтология. 2012. Т. 17. № 2. С. 62-65.
- 14. Сирак С.В. Диагностика, лечение и профилактика верхнечелюстного синусита, возникающего после эндодонтических вмешательств / С. В. Сирак, А. А. Слетов, М. В. Локтионова, В. В. Локтионов, Е. В. Соколова // Пародонтология. 2008. № 3. С. 14-18.
- 15. Сирак С. В. Способ лечения радикулярной кисты челюсти / С. В. Сирак, А. В. Федурченко, А. Г. Сирак, Т. Г. Мажаренко // Патент на изобретение RUS 2326648 09.01.2007.
- 16. Сирак С. В. Способ субантральной аугментации кости для установки дентальных имплантатов при атрофии альвеолярного отростка верхней челюсти / С. В. Сирак, И. М. Ибрагимов, Б. А. Кодзоков, М. Г. Перикова // Патент на изобретение RUS 2469675 09.11.2011.
- 17. Радзиевская Н. Г., Сирак С. В., Щетинин Е. В., Ходжаян А. Б., Арутюнов А. В., Аванесян Р. А., Петросян Г. Г. Профилактика и лечение альвеолита после сложного удаления третьего моляра нижней челюсти // Современные проблемы науки и образования. 2014. № 4; URL: http://www.science-education.ru/ru/article/view?id=14442.
- 18. Щетинин Е. В. Патофизиологические аспекты регенерации лунки удаленного зуба в эксперименте / Е. В. Щетинин, С. В. Сирак, А. Б. Ходжаян, Н. Г. Радзиевская, Г. Г. Петросян // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2014. Т. 9. № 3 (35). С. 262-265. DOI: 10.14300/mnnc.2014.09073.

- 19. Grimm, W. D. Translational research: palatal-derived ecto-mesenchymal stem cells from human palate: a new hope for alveolar bone and cranio-facial bone reconstruction / W. D. Grimm, A. Dannan, B. Giesenhagen, I. Schau, G. Varga, M. A. Vukovic, S. V. Sirak // International Journal of Stem Cells. 2014. 7(1). P.23-29.
- 20. Grimm, Dr. W.-D. Complex, three-dimensional reconstruction of critical size defects following delayed implant placement using stem cell-containing subepithelial connective tissue graft and allogenic human bone blocks for horizontal alveolar bone augmentation: a case report as proof of clinical study principles / Dr. W.-D. Grimm, M. Ploger, I. Schau, M. A. Vukovic, E. V. Shchetinin, A. B. Akkalaev, R. A. Avanesian, S. V. Sirak // Medical news of North Caucasus. − 2014. − T. 9. − № 2. − P. 125-127. DOI: 10.14300/mnnc.2014.09037.
- 21. Grimm W. D. Prefabricated 3d allogenic bone block in conjunction with stem cell-containing subepithelial connective tissue graft for horizontal alveolar bone augmentation:a case report as proof of clinical study principles / Grimm W. D., Plöger M., Schau I., Vukovic M. A., Shchetinin E., Akkalaev A. B., Arutunov A. V., Sirak S. V. // Медицинский вестник Северного Кавказа. 2014. Т. 9. № 2 (34). С. 175-178.
- 22. Mikhalchenko D. V. Influence of transcranial electrostimulation on the osseointegration of dental implant in the experimen / Mikhalchenko D. V., Poroshin A. V., Mikhalchenko V. F., Firsova I. V., Sirak S. V. // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. -2014. T. 5. N = 5. C.705-711.
- 23. Sirak S. V. Microbiocenosis of oral cavity in patients with dental implants and over-dentures / Sirak S. V., Avanesyan R. A., Akkalaev A. B., Demurova M. K., Dyagtyar E. A., Sirak A. G. // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. − 2014. − T. 5. − № 5. − C.698-704.
- 24. Sirak S. V. Clinical and morphological substantiation of treatment of odontogenic cysts of the maxilla / Sirak S. V., Arutyunov A. V., Shchetinin E. V., Sirak A. G., Akkalaev A. B., Mikhalchenko D. V. //Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences.  $2014. T.5. N_{\odot} 5. C.682-690.$