

## ОПТИМИЗАЦИЯ РЕПАРАТИВНОГО ДЕНТИНОГЕНЕЗА ПРИ БИОЛОГИЧЕСКИХ МЕТОДАХ ЛЕЧЕНИЯ ПУЛЬПИТА

Сирак С.В., Кобылкина Т.Л., Сирак А.Г.

*ГБОУ ВПО «Ставропольский государственный медицинский университет Минздрава России», Ставрополь, e-mail: stgmu@br.ru*

Сохранение жизнеспособной пульпы при эндодонтических вмешательствах обеспечивает нормальную трофику тканей зуба и предупреждает периапикальные осложнения. В настоящей статье представлены результаты проведенного анализа патофизиологических и гистохимических изменений пульпы зубов экспериментальных животных при биологических методах лечения пульпита. Экспериментальное исследование проведено на 12 двухлетних овцах, которые были разделены на 2 группы: основную и контрольную. В основной группе формировали экспериментальную модель остеопороза, в контрольной группе находились интактные животные. В качестве прокладки для закрытия корневого пульпы использовали гидрогель с эктомезенхимальными клетками, иммобилизованными на коллагеновую губку. Как показали результаты проведенного исследования, в ранние сроки наблюдения от 1 до 7 суток в корневой пульпе после витальной ампутации коронковой пульпы у экспериментальных животных основной и контрольной групп развивается асептическое воспаление. Разработанная конструкция оказывает оптимизирующее саногенетическое действие на каждом этапе процесса заживления и регенерации: защищает пульпу от инфицирования, уменьшает экссудацию, оказывает гемостатический эффект, а в отдаленные сроки способствует значительному ускорению образования заместительного дентина. Анализ активности C-kit - трансмембранного рецептора белка тирозина свидетельствует об участии в описанных эффектах клеточного состава предложенной конструкции.

Ключевые слова: эксперимент, биологический метод лечения, остеопороз

## OPTIMIZATION OF REPARATIVE DENTINOGENESIS IN BIOLOGICAL METHODS OF TREATMENT OF PULPITIS

Sirak S.V., Kobylkina T.L., Sirak A.G.

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

The preservation of viable pulp the endodontic treatment provides a normal trophic tissues of the tooth and prevents periapical complications. This article presents the results of the analysis of the pathophysiological and histological changes of the pulp of teeth of experimental animals in biological methods of treatment of pulpitis. Experimental study was performed on 12 two-year sheep, which were divided into 2 groups: study and control. In the main group formed the experimental model of osteoporosis, in control group were intact animals. As a seal for closing the root pulp was used ectomesenchymoma hydrogel with cells immobilized on collagen sponge. As shown by the results of the study, during the early observation periods from 1 to 7 days in the root pulp after vital amputation of the crown pulp in experimental animals of the main and control groups develops aseptic inflammation. The developed design provides an optimizing sanogenetic action at each stage of the healing process and regeneration: protecting the pulp from infection, reduces exudation, has a hemostatic effect and in long term contributes to a significant acceleration of education substitution of dentin. Activity analysis of C-kit transmembrane receptor protein tyrosine indicates the involvement in the described effects of cellular composition of the proposed design.

Keywords: experiment, biological method of treatment, osteoporosis

Учитывая высокий защитно-приспособительный потенциал, пульпа зуба является перспективным объектом для исследования в эксперименте и клинике [1; 2; 13]. Сохранение жизнеспособной пульпы при эндодонтических вмешательствах обеспечивает нормальную трофику тканей зуба и предупреждает периапикальные осложнения [4; 5]. В ряде исследований последних лет показано, что после витальной ампутации корневая пульпа сохраняет свою жизнеспособность, продуцируя репаративный дентин, а через 6-8 недель

после операции вторичный дентин обнаруживается даже визуально [9; 10; 14]. Сегодня постоянно ведутся поиски наиболее эффективных средств, сохраняющих корневую пульпу и стимулирующих репаративный дентиногенез [6; 13]. Для защиты корневой пульпы некоторые авторы предлагают препараты, содержащие коллаген, мукополисахариды, антибиотики, антисептики, анестетики, гормоны [3; 7]. Особенностью коллагена считается его способность образовывать комплексы с лекарственными и биологически активными веществами, что дает возможность создания лекарственных препаратов пролонгированного действия, в которых коллаген играет роль депо. Перспективным также является использование коллагеновой губки в качестве матрицы-носителя для различных тканеинженерных конструкций [8; 15]. Особое значение приобретают в этой связи эктомезенхимальные стволовые клетки, дающие начало одонтобластам пульпы зуба. В настоящее время в основе идентификации данных клеток организма лежит оценка их морфологии с помощью поверхностных маркеров. Одним из наиболее перспективных маркеров стволовых клеток является C-kit (CD117), который является рецептором к фактору стволовых прогенеторных клеток StemCellsFactor – SCF, что характеризует его как рецептор, маркирующий «взрослые» или «способные к дифференциации» стволовые клетки. Молекула C-kit обладает свойствами тирозинкиназ. В результате связывания этих поверхностных молекул происходит активация C-kit, что влечет за собой усиление пролиферации и переход клеток-предшественников на более высокий, «продвинутый» уровень дифференцировки [11; 12]. В научных публикациях встречаются данные об обнаружении C-kit-позитивных клеток у человека в сердце, желудке и кишечнике, мочеточниках, а также единичные сведения об их идентификации в почках, поджелудочной железе и пульпе зуба.

**Цель исследования.** Исследование роли C-kit-позитивных клеток пульпы зуба в оптимизации репаративного дентиногенеза при биологических методах лечения пульпита в условиях экспериментального остеопороза.

**Материал и методы исследования.** Для покрытия корневой пульпы при биологическом методе лечения пульпита использовали тканеинженерную конструкцию, в состав которой входит гидрогель PuraMatrix/3DM с эктомезенхимальными клетками, иммобилизованными на коллагеновую губку. Данная тканеинженерная конструкция представляет собой синтетический биодеградируемый матрикс-гель на основе олигопептидных фрагментов, формирующий нанонити и предварительно культивированные эктомезенхимальные клетки барана, обработанные 5-азациитидином. Готовый тканеинженерный продукт получали путем механического смешивания геля с прекультивированными эктомезенхиальными клетками *in situ*, а затем иммобилизовали на стерильную коллагеновую губку, которую получали путем лиофилизации замороженных

растворов коллагена. Выбор губки в качестве матрицы-носителя тканеинженерной конструкции обусловлен тем, что, меняя параметры исходного раствора и режима лиофилизации, можно варьировать структуру губки, изменяя тем самым ее механическую прочность, эластичность, адсорбционную емкость, скорость ангио- и неогенеза в зависимости от цели применения. Кроме того, большая внутренняя поверхность, гидрофильность коллагеновых губок обуславливает хороший гемостатический эффект, и губка резорбируется быстрее, благодаря чему осуществляется наибольший контакт корневой пульпы с тканеинженерной конструкцией.

Экспериментальное исследование проведено на 12 двухлетних овцах, которые были разделены на 2 группы: основную и контрольную. В основной группе формировали экспериментальную модель остеопороза: под общим наркозом (Zoletil 50) выполняли овариэктомию, затем в течение 3 месяцев проводили внутримышечные инъекции дексаметазона (10 мг/кг массы по 4 инъекции в неделю). Забор материала производили в области нижних резцов, путем выделения зубоальвеолярных сегментов под общим наркозом через 1, 7, 14, 30, 60 и 180 суток после начала опыта. В контрольной группе исследовали соответствующие зубоальвеолярные сегменты у интактных животных.

Для получения экспериментальной модели острого пульпита применяли следующую методику. С язычной поверхности бором формировали полости по типу глубокого кариеса и инфицировали различными штаммами микроорганизмов, выделенных из кариозных зубов человека, после чего зубы пломбировались. Как показали гистологические исследования, такая методика вызывала серозно-гнойное воспаление коронковой пульпы. Через 1 сутки под местной анестезией sol. Ultracaini 4% с адреналином у животных производили витальную ампутацию пульпы. Гемостаз пульпы осуществляли стерильными ватными шариками. В основной группе животных на дно пульповой камеры в области устья корневого канала накладывали тканеинженерную конструкцию, состоящую из коллагеновой губки, гидрогеля PuraMatrix/3DM и прекультивированных эктомезенхимальных клеток с последующим пломбированием зуба. В контрольной группе в состав коллагеновых губок вводили гидрокортизон, фурацилин, хондроитинсульфат, анестезин (всего 8 различных прописей), а также использовали препараты, содержащие гидрат окиси кальция — кальцин-пасту и кальмецин, поскольку они, как известно, обладают выраженным дентиногенным действием. Зубы удаляли в сроки от 1 суток до 6 месяцев. Материал, взятый для гистологических исследований, фиксировали в 10%-ном растворе забуференного формалина, проводили через спирты возрастающей плотности и ксилол, а затем заливали в гистологическую среду «Гистомикс» с использованием гистологического процессора замкнутого типа Tissue-Tek VIP™ 5 Jr. производства Sakura (Япония). Идентификацию введенных в состав

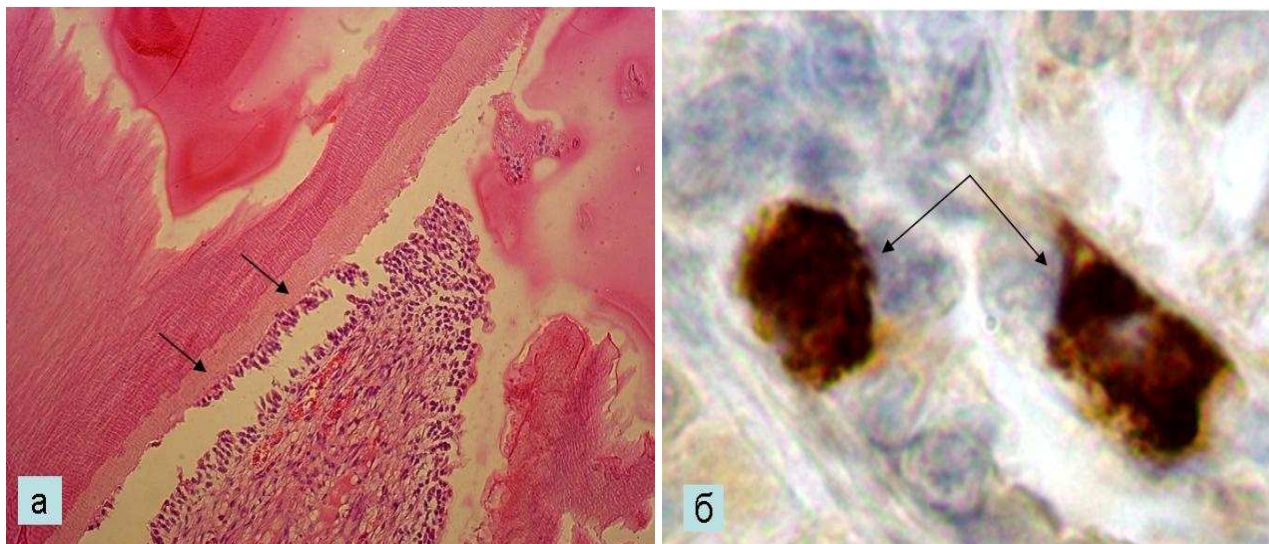
тканеинженерной конструкции прекультивированных клеток и собственных клеток пульпы проводили с использованием гистохимических методов оценки, включая анализ активности C-kit - трансмембранного рецептора белка тирозина.

Эксперимент на животных проводили в соответствии с принципами надлежащей лабораторной практики (Национальный стандарт «Принципы надлежащей лабораторной практики» ГОСТ Р 53434-2009) и положительным заключением этического комитета СтГМУ.

**Результаты и обсуждение.** Используя коллаген в комбинации с другими препаратами при витальной ампутации пульпы зуба в эксперименте, мы исходили из принципов патогенетической терапии ран: закрытие раневой поверхности от вторичной инфекции; ускорение дентиногенеза за счет стимуляции его образования на поверхности тканеинженерной конструкции из коллагена с прекультивированными эктомезенхимальными клетками и гидрогелем PuraMatrix/3DM; стимуляция заживления раны и отложения солей кальция путем комплексообразования с хондроитинсульфатом, являющимся естественным активатором фибриллогенеза и связывающим ионы кальция; ускорение регенерации действием продуктов лизиса. Предполагалось, что коллаген в составе тканеинженерной конструкции может стать основой для образования новой ткани и, рассасываясь, постепенно будет замещаться дентином, образуя, таким образом, дентинный мостик, прикрывающий вход в корневые каналы.

При исследовании гистологических препаратов контрольной группы в сроки 7-14 суток установлена вакуолизация одонтобластов, гиперемия периферических отделов пульпы, появление внутрипульпарных кист, кровоизлияний в пульпе и слое одонтобластов, серозный отек плащевого дентина и частичное его отторжение (рис. а). На гистологических препаратах в основной группе в эти же сроки после витальной ампутации и наложения коллагеновой губки с тканеинженерной конструкцией также выявлены воспалительные изменения, выражающиеся в незначительном полнокровии сосудов корневой пульпы, отеке, диапедезных кровоизлияниях. К 30-м суткам эксперимента в контрольной группе серозно-фибринозная экссудация сменяется диффузной нейтрофильной, а затем лимфоидно-макрофагальной инфильтрацией. Резорбция инокулированной коллагеновой губки в основном осуществляется макрофагами, которые к данному сроку наблюдения местами формируют макрофагальный «барьер» между губкой и корневой пульпой с эктазией дентинных канальцев и некрозом отростков одонтобластов. В основной группе процессы регенерации пульпы протекают значительно быстрее, и к сроку 1 месяц развитие соединительной ткани на месте лизированной коллагеновой губки идет не только с периферии, но и из центра корневой пульпы. Гистохимическими методами установлено, что

в резорбции тканеинженерной конструкции активно участвуют многоядерные гигантские клетки, появляющиеся позднее макрофагов вокруг нерезорбированных фрагментов коллагеновой матрицы. Через 2 месяца после начала опыта в контрольной группе наблюдаются фрагменты новообразованного дентина, расположенные на периферии корневого канала, но не смыкающиеся в центре; описанная картина на некоторых препаратах имела вид «прерванного моста».



*Микропрепараты - гистологические срезы биоптатов пульпы зубов экспериментальных животных на 7-е (а) и 14-е (б) сутки после начала опыта; а - серозный отек плащевого дентина и его отторжение. Окраска гематоксилином и эозином. Об. 20, ок. 10; б - многоядерные гигантские клетки (отмечены стрелками), имеющие более темное окрашивание вокруг ядра по всей цитоплазме. Гистохимическая реакция на C-kit (CD117) маркер (рецептор фактора стволовых клеток). Ок. 100, об. 40*

К данному сроку в основной группе во всех исследуемых препаратах отмечается четко сформированный дентинный мостик, по структуре схожий с дентином, отделяющий корнеую пульпу от пульповой камеры. Новообразованный дентин с хорошо выраженными, параллельно расположенными дентинными канальцами образуется от стенок корневого канала и, смыкаясь, формирует четкий барьер. Корневая пульпа полностью сохранена, иногда отмечается полнокровие сосудов. Слой одонтобластов также хорошо выражен, на некоторых препаратах при сформированном дентинном мостике в корневой пульпе отмечаются склеротические изменения и очаги лимфо-гистиоцитарной инфильтрации.

Гистохимические методы исследования показали, что активизация пролиферации в основной группе обеспечена клеточным составом использованной тканеинженерной конструкции. В основной группе животных произошла активизация клеток как эктомезенхимального, так и мезенхимального стволовых компартментов пульпы зуба: прекультивированные эктомезенхимальные клетки из тканеинженерной конструкции

реализовали свое участие в процессе регенерации пульпы на каждом этапе межклеточного взаимодействия по регуляции большинства биологических процессов в клетке, таких как пролиферация, дифференцировка, адгезия клеток и миграция (рис. б). За счет реакции окислительного фосфорилирования тирозина тирозинкиназой обеспечивается связывание трансмембранного рецептора C-kit с лигандом SCF, что позволило оценить антиапоптотические события в прогениторных клетках на каждом из этапов репаративного дентиногенеза.

Таким образом, в контрольной группе при использовании коллагеновой губки в комбинации с различными препаратами, призванными стимулировать регенерацию корневой пульпы после витальной ампутации, образование дентинного мостика протекает значительно медленнее, чем в основной группе. Намечающийся дентинный мостик в контрольной группе мы наблюдали только к сроку трех месяцев; напротив, в основной группе репаративный дентиногенез завершался построением дентинного моста к сроку двух месяцев. В ряде случаев корневая пульпа под дентинным мостиком в контрольной группе вообще не регенерировала, и на большинстве препаратов наблюдались явления ее фиброзного превращения.

**Заключение.** Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ранние сроки наблюдения от 1 до 7 суток в корневой пульпе после витальной ампутации коронковой пульпы у экспериментальных животных основной и контрольной групп развивается асептическое воспаление. В последующие сроки наблюдения в основной группе разработанная тканеинженерная конструкция оказывает наиболее выраженное влияние на каждом этапе процесса заживления и регенерации: защищает пульпу от инфицирования, уменьшает экссудацию, оказывает гемостатический эффект, а в отдаленные сроки способствует значительному ускорению образования дентинного мостика.

### Список литературы

1. Будзинский Н.Э. 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 / Н.Э. Будзинский, С.В. Сирак, Е.М. Максимова, А.Г. Сирак // *Фундаментальные исследования*. - 2013. - № 7-3. - С. 518-522.
2. Быков И.М. Апробация нового зубного эликсира для профилактики кариеса зубов в условиях эксперимента / И.М. Быков, А.Г. Сирак, С.В. Сирак // *Современные проблемы науки и образования*. - 2013. - № 4. - С. 128.

3. Сирак С.В. Изучение морфологических изменений в пульпе зубов экспериментальных животных при лечении глубокого кариеса и острого очагового пульпита / С.В. Сирак, А.Г. Сирак, И.А. Копылова, А.К. Бирагова // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2011. - Т. 23. - № 3. - С. 29-33.
4. Сирак А.Г. Морфофункциональные изменения в пульпе зубов экспериментальных животных при лечении глубокого кариеса и острого очагового пульпита с использованием разработанных лекарственных композиций / А.Г. Сирак, С.В. Сирак // Современные проблемы науки и образования. - 2013. - № 2. - С. 44.
5. Сирак С.В. Комбинированная лекарственная паста для консервативного лечения острого очагового пульпита / С.В. Сирак, А.В. Арутюнов, А.Г. Сирак, Е.В. Щетинин, Л.А. Паразян : патент на изобретение RUS 2546003 от 20.05.2014.
6. Сирак А.Г. Динамика репаративного дентиногенеза после лечения глубокого кариеса и острого очагового пульпита разработанной поликомпонентной лечебной пастой / А.Г. Сирак, С.В. Сирак // Фундаментальные исследования. - 2013. - № 5-2. - С. 384-388.
7. Сирак А.Г. Профилактика кариеса зубов и воспалительных заболеваний пародонта с использованием зубных эликсиров / А.Г. Сирак, С.В. Сирак // Современные проблемы науки и образования. - 2013. - № 4. - С. 110.
8. Сирак С.В. Паста для пломбирования корневых каналов зубов при лечении пульпита / С.В. Сирак, А.В. Арутюнов, А.Г. Сирак, Е.В. Щетинин, Л.А. Паразян : патент на изобретение RUS 2546003 от 20.05.2014.
9. Сирак С.В. Субантральная аугментация пористым титаном в эксперименте и клинике / С.В. Сирак, Е.В. Щетинин, А.А. Слетов // Стоматология. - 2016. - Т. 95, № 1. - С. 55-58.
10. Lee Y.-H. The survival role of peroxisome proliferator-activated receptor gamma induces odontoblast differentiation against oxidative stress in human dental pulp cells / Y.-H.Lee, Y.-M.Kang, M.-J.Heo, G.-E.Kim, G.Bhattarai, N.-H.Lee, M.-K.Yu, H.-K.Yi // Journal of Endodontics. - 2013. – 39 (2). – P. 236-241. doi: 10.1016/j.joen.2012.11.006.
11. 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.
12. 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. 131-133. DOI: 10.14300/mnnc.2014.09037.

13. Grimm Dr.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.

14. Shchetinin E.V. Pathogenetic aspects of dental pulp pathology / E.V.Shchetinin, S.V.Sirak, A.B.Khodzhayan, O.V.Dilekova, A.G.Sirak, M.Y.Vafiadi, L.A.Parazyan, A.V.Arutyunov // Medical News of North Caucasus. – 2015. – 10 (2). –P. 187-191. DOI: 10.14300/mnnc.2015.10044.

15. Sirak S.V. Clinical and morphological substantiation of treatment of odontogenic cysts of the maxilla / S.V.Sirak, A.V.Arutyunov, E.V.Shchetinin, A.G.Sirak, A.B.Akkalaev, D.V.Mikhailchenko // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. - 2014. - T. 5. - № 5. - P. 682-690.