

Клиническое исследование применения ткане-инженерной конструкции на основе аутологичных стромальных клеток из жировой ткани у пациентов с дефицитом костной ткани в области альвеолярного отростка верхней челюсти и альвеолярной части нижней челюсти

А.Ю.ДРОБЫШЕВ, К.А.РУБИНА, В.Ю.СЫСОЕВА, Н.И.КАЛИНИНА, О.А.ГРИГОРЬЕВА, А.В.МЕЛЕРЗАНОВ, С.А.РУМЯНЦЕВ, И.Ю.ЧАУССКАЯ

Pilot clinical trial of tissue engineered constructs consisting of autologous stromal cells from adipose tissue in patients with bone tissue deficiency in the field of the alveolar process of maxilla and mandible

A.Yu.DROBISHEV, K.A.RUBINA, V.Yu.SYSOIEVA, N.I.KALININA, O.A.GRIGOR'EV, A.V.MELERZANOV, S.A.RUMYANTSEV, I.Yu.CHAUSSKAYA

Московский государственный медико-стоматологический университет

Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова

Федеральный научно-клинический центр детской гематологии, онкологии и иммунологии

ООО «Генная и клеточная терапия», г. Москва

Широко применяющиеся в челюстно-лицевой хирургии методы восполнения костного дефицита, основанные на принципах замещения костных дефектов различными материалами, часто оказываются неэффективны. В этой связи в настоящее время активно проводится разработка инновационных технологий на основе клеточных технологий и различных материалов. Синтетические остеопластические материалы не всегда обладают в должной степени остеиндуктивными свойствами, а собственная костная ткань, пригодная для трансплантации, может быть использована в ограниченном количестве. Представленные результаты клинического исследования свидетельствуют о положительном влиянии предложенных тканеинженерных конструкций на основе стромальных клеток из подкожной жировой клетчатки и синтетических остеиндуктивных материалов (ГАП и «КоллапАн-Г») на сроки заживления операционной раны и образование молодой костной ткани после трансплантации.

Ключевые слова: челюстно-лицевая хирургия, аутологичные стромальные клетки из жировой ткани, тканевая инженерия, синус-лифтинг, остеопластика

Despite the progress in conventional methods of maxillofacial surgery, which are based on the substitution of bone defects, alternative methods are being intensively developed. Recent studies focused on the use of a variety of matrices either inorganic or organic (autologous bone) have shown the limitations of these materials: inorganic matrices do not possess sufficient osteoinductive capacity and autologous bone cannot be obtained in large amounts. The presented results of the pilot clinical trial point to the fact that the introduction of tissue engineered constructs consisting of stromal cells from adipose tissue and osteoinductive materials have a beneficial effect on wound healing and formation of new bone tissue.

Key words: maxillofacial surgery, autologous stromal cells from adipose tissue, tissue engineering, sinus lifting, bone augmentation

Повреждения костной ткани занимают лидирующие позиции среди клинических и социальных проблем современного здравоохранения. В настоящее время перед стоматологией ставится приоритетная задача – скорейшая реабилитация пациентов, с применением современных методов в имплантации и протезировании.

«Золотым стандартом» восстановления дефектов челюстных костей считается пересадка собственной костной ткани [9, 18]. Преимуществом использования аутогенных костных трансплантатов является отсутствие иммунной реакции и высокий уровень остеointegrации. Однако наличие дополнительной операци-

онной раны, а так же достаточно быстрая резорбция аутокости ограничивают применение данного метода.

Недостатками костнопластических материалов биологического происхождения, таких как деминерализованная аллокость, считаются вероятность инфицирования и риск иммунного ответа [8].

Благодаря новым технологиям происходит активное внедрение синтетических материалов на основе гидроксипатита кальция (ГАП) и композиции на его основе. ГАП и биокомпозиционные материалы на его основе нетоксичны, биосовместимы и способны стимулировать репаративный остеогенез [4, 6, 1].

Для улучшения результатов использования биокомпозиционных материалов ранее было предложено их сочетание с аутологичными стромальными клетками из подкожной жировой клетчатки. Комбинированный клеточный трансплантат и метод его использования описаны в работе А.А.Кулакова с соавт. [5]. Авторами было предложено использовать мезенхимальные СКЖТ человека и «Биоматрикс» в виде крошки или блоков («Конектбиофарм») в качестве матрицы-носителя для получения тканеинженерной конструкции. При этом авторы сделали вывод о том, что трансплантация тканеинженерных конструкций для восстановления костных дефектов является безопасной процедурой, позволяющей в кратчайшие сроки добиться органотипического восстановления утраченной костной ткани.

В качестве носителей, в исследуемых нами тканеинженерных конструкциях, использовались ГАП или «КоллапАн-Г» [16,12,15].

Гидроксиапатит кальция (фирменное название «Гидроксиапол», сокращенно ГАП) - $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ является апатитом с соотношением Ca/P- 1,67, с содержанием воды 1,79% и теоретической плотностью 3,0 г/см³. Являясь структурным аналогом главной неорганической составляющей костной и зубной тканей организма, ГАП имеет тот же химический состав и обладает идеальной биологической совместимостью с тканями организма [7].

ГАП широко используется в пародонтологии, эндодонтии и в хирургической стоматологии, где применяется для заполнения послеоперационных дефектов челюстных костей. Отмечена высокая эффективность применения гидроксиапола в виде порошка (размер частиц 0,5- 1,0 мкм) и гранул (размером 0,25-0,5 мкм) при замещении дефектов кости, возникших после резекции корней зуба, гемисекции, цистэктомии, при дентальной имплантации, при хирургическом лечении пародонтита [7,3].

При использовании имплантационных материалов на основе ГАП происходит непосредственное соединение имплантата с костью без участия фиброзной соединительнотканной капсулы. Такой вид соединения свидетельствует о развитии процессов остеоинтеграции [2].

«КоллапАн-Г» - материал на основе особо чистого ГАП, коллагена и гентамицина в терапевтической дозе, применяется для лечения заболеваний, связанных с патологией костной ткани. «КоллапАн-Г» обладает ярко выраженными остеогенными и противовоспалительными свойствами, его использование значительно усиливает репаративные процессы в повреждённых тканях. Препарат обладает биосовместимостью, не вызывает отторжения, нагноения, аллергических реакций. Гентамицин не обладает цитотоксическими свойствами.

Вторым компонентом тканеинженерной конструкции, использованной нами для замещения кост-

ных дефектов, является СКЖТ. В качестве источника для выделения стромальных клеток была использована собственная жировая ткань пациента. Известно, что в жировой ткани человека сконцентрирована популяция мультипотентных фибробластоподобных клеток мезенхимального происхождения [23].

Культивируемые СКЖТ представляют собой гетерогенную популяцию клеток, экспрессирующих маркеры CD44/Pgp-1, CD90/Thy-1, CD9, CD10, CD11b/integrin- α M, CD13, CD29/integrin- β 1, CD54/ICAM-1, CD55, CD91, CD105/endoglin, CD71/TfR, CD146/Muc-18, CD166/ALCAM, и не экспрессирующих (или с низким уровнем экспрессии) маркеры CD34, CD31 (PECAM-1), CD45 [23,25]. Наиболее важным преимуществом СКЖТ является то, что они могут быть выделены в большем количестве, с минимальными болезненными ощущениями для пациента [24]. СКЖТ хорошо пролиферируют в культуре, что позволяет при относительно небольшом сроке культивирования получить достаточное для трансплантации количество клеток.

СКЖТ секретируют ангиогенные и анти-апоптотические факторы, такие как фактор роста эндотелия (VEGF), фактор роста гепатоцитов (HGF), основной фактор роста фибробластов (bFGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и трансформирующий фактор роста бета (TGF β) [13,20,22,14,17,18], а при сокультивировании с эндотелиальными клетками СКЖТ поддерживают и стабилизируют капиллярно-подобные структуры, формирующиеся *in vitro* [22,8]. СКЖТ стимулируют ангио-артериогенез, улучшают перфузию окружающих тканей кровью и способны сами, в определенных условиях, дифференцироваться в остеогенном направлении [23, 25, 20].

Целью нашего исследования являлась оценка эффективности использования аутологичных СКЖТ, культивированных с ГАП и «КоллапАн-Г», для восстановления утраченного костного субстрата альвеолярного отростка верхней челюсти и альвеолярной части нижней челюсти.

Материалы и методы

Выделение и культивирование СКЖТ

Выделение клеток проводили согласно ранее опубликованному протоколу [24] с некоторыми модификациями. Для получения первичной культуры клеток СКЖТ человека использовали подкожный жир, полученный в результате липосакции по стандартной методике. Забирали 15 мл жировой ткани из передней брюшной стенки. Выделение клеток осуществляли в стерильных условиях ламинарного бокса. Ткань измельчали сосудистыми ножницами до консистенции суспензии мелких (размером не более нескольких кубических миллиметров) кусочков и смешивали с растворами ферментов коллагеназы I типа (Worthington Biochemical, США) и диспазы (Invitrogen Corporation, Германия) при соотношении объема ткани (в мл) к объему ферментативного раствора (в мл) 1:2. Образец ин-

кубировали при 37°C в течение 30 мин., далее добавляли равный объем среды AdvanceSTEMTM (HyClone) и центрифугировали при 200g в течение 10 мин.

Белесый поверхностный слой, представленный зрелыми адипоцитами и кусочками ферментативно необработанной ткани, удаляли, а осадок, состоящий из СКЖТ, а также остатков соединительной ткани и клеток крови суспендировали, в лизирующем буфере для эритроцитов. Полученную смесь инкубировали 2-3 мин. в 37°C, после чего к образцу добавляли равный объем среды AdvanceSTEMTM, фильтровали через нейлоновые мембраны с размером пор 40 мкм. Полученную суспензию клеток высаживали в количестве 1x10⁵ на чашку Петри в среде AdvanceSTEMTM/Antibiotic/Antimycotic Solution 100x (HyClone) с добавлением аутологичной сыворотки крови пациента (донора жировой ткани) и выращивали в CO₂-инкубаторе (5% CO₂; 95% воздуха) при 37°C. Среда AdvanceSTEMTM предназначена для поддержания роста недифференцированных мезенхимальных клеток человека. Смену среды проводили каждые 2-3 дня; при достижении монослоя клетки пассировали. Для получения популяции клеток, индуцированных в остеогенном направлении, клетки культивировали в остеиндуктивных условиях в течение 3-х недель.

Подготовка аутологичной сыворотки пациента

Забор крови в количестве 80 мл осуществляли в пробирки с гелем для получения сыворотки крови (Vacuette # 455071 BD, США). При формировании кровяного сгустка пробирки с кровью центрифугировали при 400 g в течение 10 мин.

Дальнейшее получение сыворотки осуществляли в стерильных условиях ламинарного бокса. Сыворотку (желтый супернатант) отбирали в пробирку и фильтровали через фильтры 0,45 мкм (Millipore) и 0,22 мкм (Millipore). Далее сыворотку использовали для культивирования СКЖТ или замораживали и хранили при температуре -20°C.

Подготовка тканеинженерной конструкции к трансплантации

Для стимуляции восстановления утерянного костного субстрата были использованы 3 варианта тканеинженерных конструкций: СКЖТ на носителе ГАП, СКЖТ на носителе «КоллапАн-Г», сочетание СКЖТ и СКЖТ, преддифференцированных в остеогенном направлении (в соотношении 1:1) на носителе «КоллапАн-Г».

СКЖТ снимали с подложки и инкубировали в течение суток в присутствии «КоллапАн-Г» и ГАП, в небольшом объеме среды для культивирования в CO₂-инкубаторе при 37°C

Гистологический анализ биопсий

Костные блоки, полученные в ходе операции установки имплантатов в месте трансплантации тканеинженерной конструкции, фиксировали 4% формалином в течение 1 суток, отмывали в фосфатно-солевом буфере и декальцинировали в 12% ЭДТА в течение 24-

30 дней до полной декальцинации. Затем образцы замораживали, получали криосрезы толщиной 8 микрон и окрашивали раствором гематоксилина и эозина по стандартной гистологической методике.

Иммуногистохимический анализ биопсий

Для оценки васкуляризации вновь сформированной костной ткани было проведено иммуногистохимическое окрашивание криосрезов биопсий антителами к CD31 человека (Dako) – маркеру эндотелиальных клеток. Для оценки пролиферации клеток в ткани было проведено иммуногистохимическое окрашивание криосрезов биопсий антителами к Ki-67 (BD) – маркеру пролиферирующих клеток. Окрашивание проводили в соответствии с протоколом производителя, с использованием станции для автоматического иммуногистохимического окрашивания AutostainerLink 48 (Dako). Окрашенные препараты анализировали при помощи микроскопа Axiovert 40 (Zeiss) и программы AxioVision 4.6.

Пилотное клиническое исследование

В 2008 г. было начато пилотное клиническое исследование, в которое были включены 18 пациентов (9 женщин, 9 мужчин; возраст — 30-65 лет). Все пациенты имели выраженную атрофию костной ткани в области ранее утраченных зубов. Такое состояние костной ткани не позволяло проводить внутрикостную имплантацию без увеличения утраченного объема кости. Всем пациентам устраняли дефекты костной ткани с помощью трансплантации тканеинженерной конструкции на основе СКЖТ.

Из 8 пациентов с односторонними дефектами альвеолярного отростка верхней челюсти и альвеолярной части нижней челюсти 2 пациентам проводилось замещение дефекта кости тканеинженерной конструкцией на основе СКЖТ и ГАП в качестве носителя, а тканеинженерная конструкция СКЖТ и «КоллапАн-Г» вводилась 6 пациентам.

4 пациентам с двухсторонними дефектами костной ткани с одной стороны вводили тканеинженерную конструкцию на основе ГАП, с другой стороны в качестве носителя использовали «КоллапАн-Г».

6 пациентам с дефектами альвеолярного отростка верхней челюсти и альвеолярной части нижней челюсти вводили тканеинженерную конструкцию на основе «КоллапАн-Г» и сочетания СКЖТ, культивированных в обычных условиях, с СКЖТ, культивированных в течение 3-х недель в остеиндуктивных условиях, в соотношении 1:1.

В соответствии с утвержденным протоколом включения пациентов в исследование от всех пациентов было получено письменное информированное согласие, а также всем пациентам проводили комплексное биохимическое, клинико-лабораторное и серологическое обследование крови (ВИЧ, HCV, HBV, реакция Васермана) и подтверждали отсутствие основных онкомаркеров (обследование на общий простатоспецифический антиген - ПСА, ПСА свободный,

раково-эмбриональный антиген, Са 19-9 — для мужчин; раково-эмбриональный антиген, Са 15-3, Са 19-9, Са-125 — для женщин).

Всем пациентам проводили дентальную объёмную томографию (ДОТ) верхней или нижней челюсти до начала лечения и через 1, 3, 6 месяцев после трансплантации тканеинженерной конструкции. Внутрикостные имплантаты устанавливали через 3-4 месяца после трансплантации. Во время установки имплантатов проводили забор костных блоков непосредственно с места введения тканеинженерной конструкции. Результат лечения оценивали через 1, 3 и 6 месяцев в соответствии с данными клинического осмотра, дентальной объёмной томографии и гистологическим подтверждением образования молодой костной ткани.

Результаты и обсуждение

Клетки СКЖТ, меченные прижизненным красителем РКН-26, сажали на носитель ГАП или «КоллапАн-Г», оценивали количество адгезировавших клеток на носителе и равномерность адгезии в условиях культивирования *in vitro*. Полученные с использованием флуоресцентного стереомикроскопа и сканирующего электронного микроскопа результаты свидетельствуют о том, что клетки адгезируют на ГАП, однако, большое их количество остается в суспензии даже после культивирования в течение суток в присутствии носителя (рис. 1 А, Б).

При использовании «КоллапАн-Г» в качестве носителя было показано, что клетки адгезируют существенно лучше, чем на ГАП, и равномерно распределяются по всей поверхности носителя (рис. 1 В, Г).

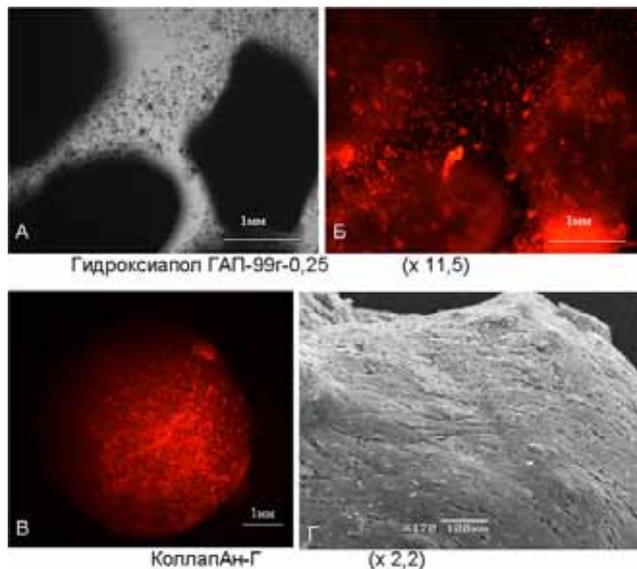


Рис. 1. Клетки СКЖТ, меченные прижизненным красителем РКН-26, на носителях ГАП и КоллапАн-Г. А - световая микроскопия, Б, В - флуоресцентная микроскопия, Г - сканирующая электронная микроскопия. Масштабный отрезок 1мм (А, Б, В) и 100µм (Г).

В случае введения пациентам тканеинженерных конструкций, как состоящих из СКЖТ и ГАП, так и на основе СКЖТ и «КоллапАн-Г», на дентальных объёмных томографиях и при гистологическом анализе отмечалось выраженное формирование молодой кости. Однако при использовании тканеинженерной конструкции на основе СКЖТ и ГАП у нескольких пациентов была выявлена неоднородность сформированной кости, которая выявлялось при дентальной объёмной томографии (рис. 7 Б, В.) и визуализировалась во время установки имплантатов и забора костных блоков для гистологического исследования.

Из данных литературы известно, что при замещении костных дефектов с использованием ГАП этот остеопластический материал может до конца не резорбироваться и оставаться во вновь формирующейся кости продолжительное время, что снижает ее однородность и прочностные характеристики [5]. Полученные нами результаты ДОТ (рис.7 Б, В.) и гистологического анализа подтвердили данные литературы: при использовании тканеинженерной конструкции на основе СКЖТ и ГАП у нескольких пациентов в составе вновь сформированной кости действительно наблюдались нерезорбированные фрагменты ГАП (рис. 2А).

Однако у большинства пациентов все же отмечалась частичная или полная его резорбция (рис. 2Б), что свидетельствует о том, что присутствие СКЖТ в зоне формирующейся кости способствует резорбции ГАП. Помимо формирующейся костной ткани в зоне введения тканеинженерных конструкций на основе СКЖТ и «КоллапАн-Г», СКЖТ и ГАП наблюдался активный ангиогенез с формированием мелких капилляров и крупных зрелых сосудов (рис. 2, 3), что, по-видимому, обусловило быстрое заживление операционных ран во всех случаях.

Таким образом, при использовании в качестве носителя как ГАП, так и «КоллапАн-Г» гистологически и на ДОТ было отмечено формирование молодой костной ткани, сопровождающееся формированием сосудов и капилляров. Однако, поскольку в ряде случаев был обнаружен нерезорбированный ГАП при использовании тканеинженерной конструкции на основе СКЖТ и ГАП, для дальнейших исследований в качестве носителя был выбран «КоллапАн-Г».

Учитывая данные, полученные другими авторами [11], и базируясь на результатах собственных исследований, нами было установлено, что для улучшения стимуляции регенеративного процесса необходима предварительная дифференцировка СКЖТ в остеогенном направлении. В связи с этим было предложено использовать при создании тканеинженерной конструкции сочетание СКЖТ, обладающих, по нашим данным и данным других исследователей, выраженным ангиогенными и антиапоптотическими потенциалами, и СКЖТ, преддифференцированных в остеогенном направлении (в соотношении 1:1), на носителе «КоллапАн-Г».

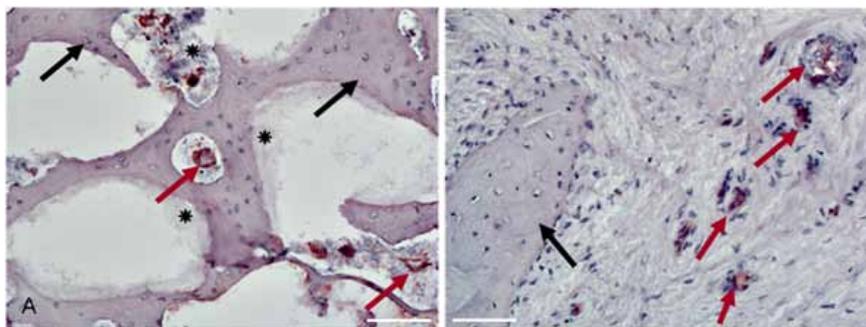


Рис. 2. Декальцинированные криосрезы биопсий, полученных после введения тканеинженерной конструкции на основе СКЖТ и ГАП пациенту для восстановления утраченного костного субстрата. Иммуногистохимическое окрашивание антителами CD31, выявляющими сосуды; препараты докрашены гематоксилином, эозином. На рис. А представлены срезы биопсийного материала с участками нерезорбированного ГАП, на рис. Б представлен биопсийный материал, в котором участков с нерезорбированным ГАП у того же пациента обнаружено не было. Звездочки указывают на нерезорбированный ГАП, черные стрелки указывают на вновь сформированные костные трабекулы, красные стрелки указывают на сосудистые структуры (коричневое окрашивание). Масштабный отрезок 100µm.

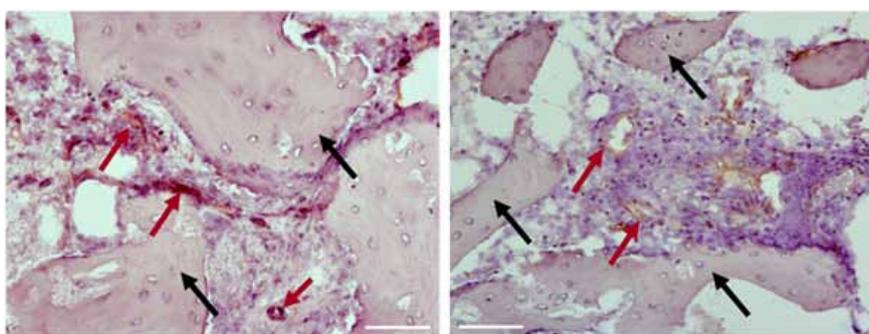


Рис. 3. Декальцинированные криосрезы биопсий, полученные после введения тканеинженерной конструкции на основе СКЖТ и «КоллапАн-Г» для восстановления утраченного костного субстрата. Иммуногистохимическое окрашивание антителами CD31, выявляющими сосуды; препараты докрашены гематоксилином, эозином. Черные стрелки указывают на вновь сформированные костные трабекулы, красные стрелки указывают на сосудистые структуры (коричневое окрашивание). Масштабный отрезок 100µm.

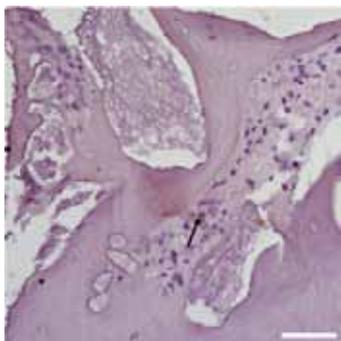


Рис. 4. Декальцинированный криосрез биопсии, полученный после введения тканеинженерной конструкции на основе СКЖТ и «КоллапАн-Г», для восстановления утраченного костного субстрата. Иммуногистохимическое окрашивание антителами Ki67, выявляющими клетки, находящиеся в клеточном цикле; препараты докрашены гематоксилином, эозином. Черная стрелка указывает на единственную присутствующую на срезе Ki67 позитивную клетку (коричневое окрашивание). Масштабный отрезок 100µm.

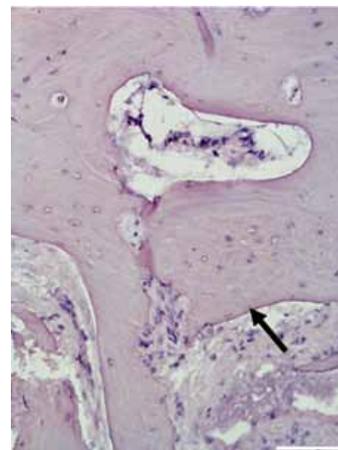


Рис. 6. Декальцинированный криосрез биопсии, полученный из контрольного участка. Гистологическое окрашивание гематоксилином, эозином. Черная стрелка указывает на участок здоровой кости. Масштабный отрезок 100µm.

Мы предположили, что данная комбинированная тканеинженерная конструкция способна увеличить количество сосудов в тканях, за счет присутствия СКЖТ, что в свою очередь должно приводить к улуч-

шению кровотока и уменьшению или исчезновению симптомов ишемии, а так же будет обладать выраженными остеогенными свойствами за счет наличия преддифференцированных в остеогенном направлении

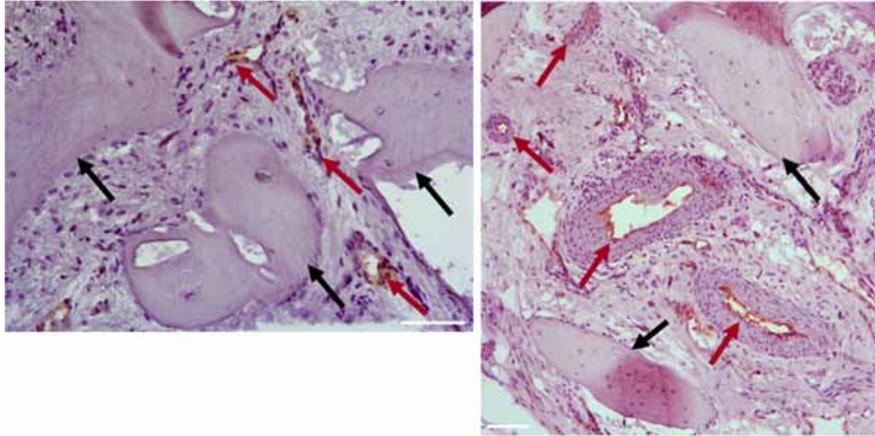


Рис. 5. Декальцинированные криосрезы биопсий, полученных после введения ткане-инженерной конструкции на основе сочетания СКЖТ и СКЖТ, преддифференцированных в остеогенном направлении (в соотношении 1:1), на носителе «КоллапАн-Г» для восстановления утраченного костного субстрата. Иммуногистохимическое окрашивание антителами CD31, выявляющими сосуды; препараты докрашены гематоксилином, эозином. Черные стрелки указывают на вновь сформированные костные трабекулы, красные стрелки указывают на сосудистые структуры (коричневое окрашивание). Масштабный отрезок 100µm.

СКЖТ, что должно оказывать благоприятное влияние на вторичную стадию остеогенеза и формирование молодой кости.

При использовании тканеинженерных конструкций, полученных на основе «КоллапАн-Г» и сочетания СКЖТ, культивированных в обычных условиях с СКЖТ, культивированных в остеоиндуктивных условиях в течение 3-х недель, уже через 3 месяца при гистологическом исследовании и на ДОТ (рис.8В) было зафиксировано формирование молодой костной ткани и образование мелких капилляров, артериол и круп-

ных стабильных сосудов, состоящих из всех трех слоев, включая интиму, медию и адвентицию (рис. 4).

Избыточной пролиферации в зоне введения тканеинженерных конструкций обнаружено не было: на криосрезях, окрашенных Ki67, маркером, выявляющим пролиферирующие клетки, обнаруживались лишь единичные позитивные клетки (рис. 5).

Эти данные косвенно свидетельствуют о безопасности введения тканеинженерных конструкций на основе СКЖТ: несмотря на активную пролиферацию

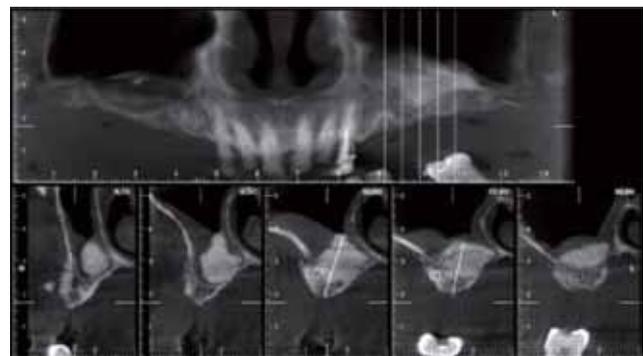
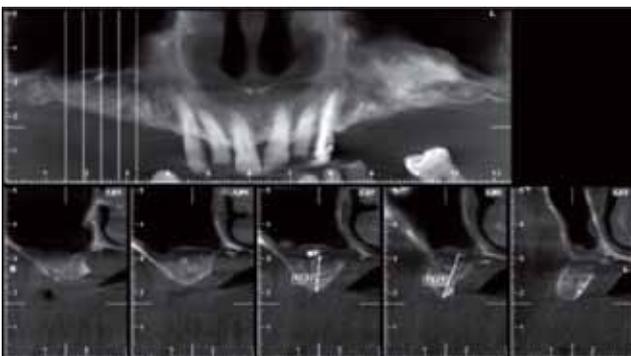
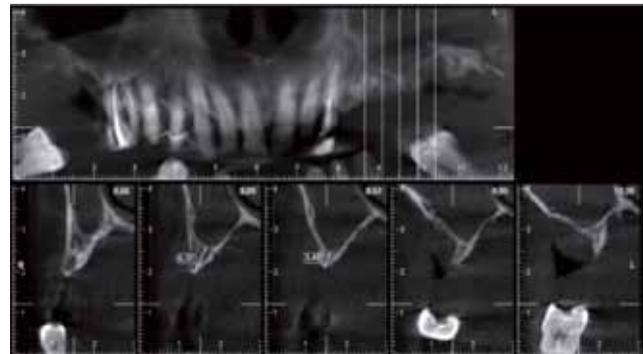
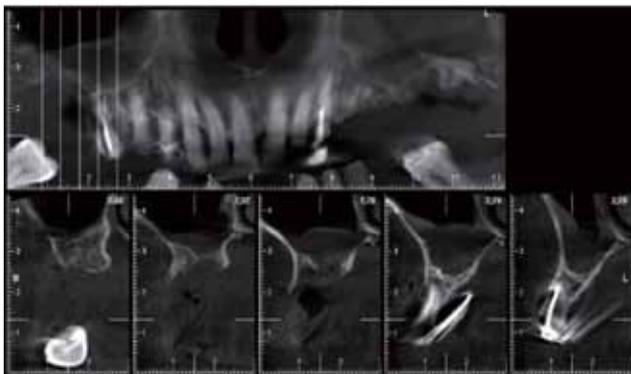
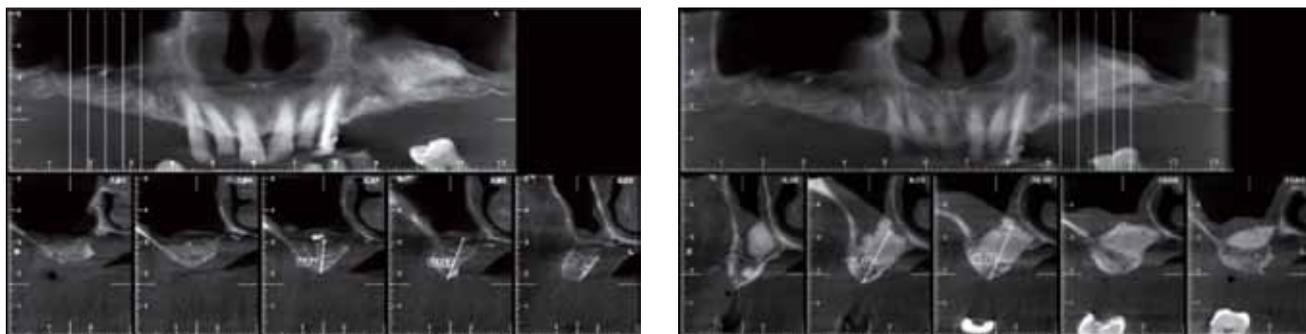


Рис. 7. Описание на следующей странице.



Слева увеличение высоты костной ткани произведено за счет подсадки СКЖТ на носителе-ГАП, справа с использованием СКЖТ на коллапане. Послеоперационный отек незначительный, рана заживала первичным натяжением с ранней эпителизацией. Швы сняты на 7-е сутки, слизистая оболочка розового цвета. Не наблюдалось воспалительных осложнений, некроза лоскут

А. ДОТ до операции Отмечалась выраженная деформация альвеолярного отростка верхней челюсти справа и слева, уменьшение высоты.

Б. ДОТ 1 месяц после операции двухсторонний синуслифтинг. В левом верхнечелюстном синусе в нижних отделах определяется плотный костно-пластический материал мелкозернистой, неоднородной структуры, с четкими бугристыми контурами. В правом верхнечелюстном синусе в нижних отделах визуализируется плотный костно-пластический материал более однородной структуры, с четкими бугристыми контурами.

В. ДОТ 3 месяца после операции. По сравнению с исследованием 1 месяц после операции положительная динамика. В правом и левом верхнечелюстных синусах в областях введения тканеинженерных конструкций определяются отдельные костные балки, исходящие из кортикальной пластины и распространяющиеся на костнопластический материал, структура которого стала более однородной с начальными признаками остеоинтеграции

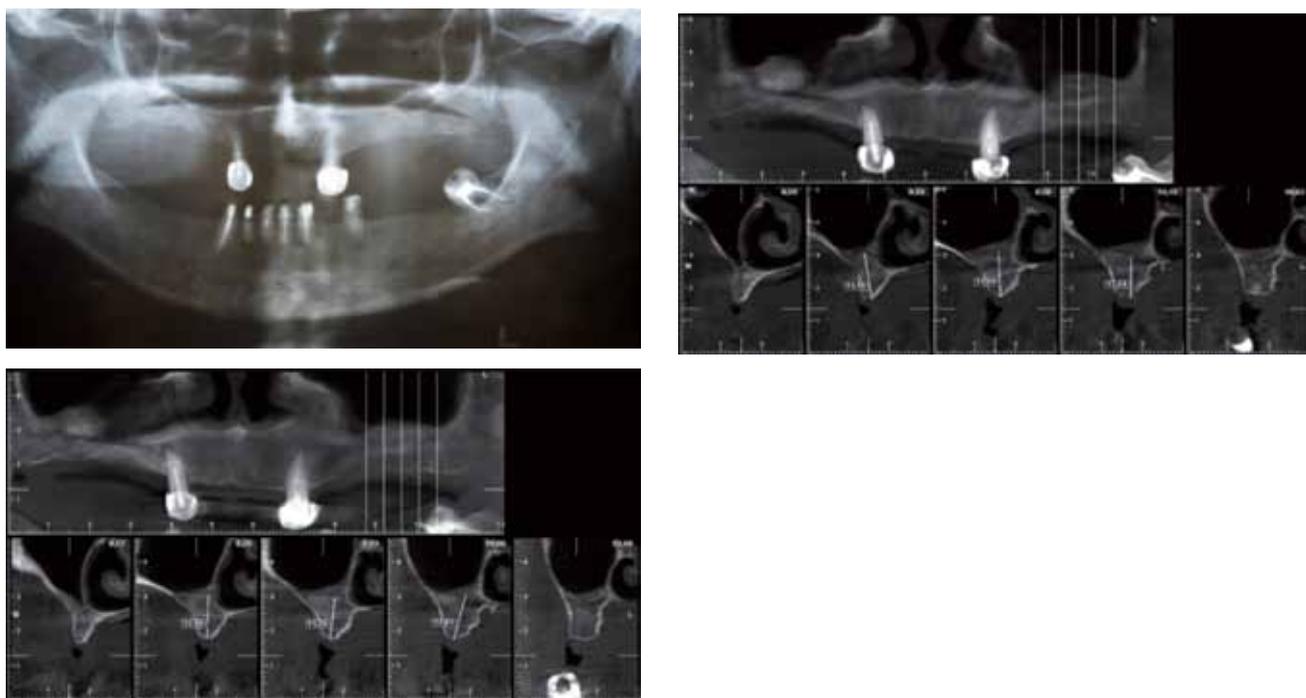


Рис. 8. А, Б, В. Слева увеличение высоты костной ткани произведено за счет введения тканеинженерной конструкции на основе «Коллапан-Г» и сочетания СКЖТ, культивированных в обычных условиях, с СКЖТ, культивированных в течение 3-х недель в остеиндуктивных условиях, в соотношении 1:1. Послеоперационный отек незначительный, рана заживала первичным натяжением с ранней эпителизацией. Швы сняты на 5-е сутки, слизистая оболочка розового цвета. Не наблюдалось воспалительных осложнений, некроза лоскута. А. Ортопантограмма до операции Отмечалась деформация альвеолярного отростка верхней челюсти справа и слева, уменьшение высоты. Б. ДОТ 1 месяц после операции левосторонний синуслифтинг В левом верхнечелюстном синусе в нижних отделах визуализируется плотный костно-пластический материал однородной структуры, с четкими бугристыми контурами. Определяются отдельные костные балки, исходящие из кортикальной пластины и распространяющиеся на костнопластический материал, структура которого однородная с начальными признаками остеоинтеграции. В. ДОТ 3 месяца после операции В левом верхнечелюстном синусе костно-пластический материал рентгенологически не дифференцируется от губчатого вещества собственной кости.

клеток СКЖТ в культуре, в присутствии остеоиндуктивного носителя и при остеогенной индукции, сколько-нибудь значительной пролиферации клеток в ткани при введении пациентам на момент забора биопсийного материала обнаружено не было. Для сравнения в качестве контроля приведены результаты гистологического окрашивания здорового участка кости после декальцинации (рис. 6).

Заключение

Представленные клинические наблюдения и гистологический анализ свидетельствуют об отсутствии негативной реакции ложа трансплантата, слизистой оболочки полости рта на трансплантированную тканеинженерную конструкцию на основе СКЖТ, «КоллапАн-Г» или ГАП. Выявлено быстрое заживление операционной раны, которое протекало практически без отеков, без боли и температурных реакций со стороны организма. Ни у одного пациента не выявлено микробно-воспалительных осложнений, обнажения материала или некроза слизистых лоскутов. По данным рентгенологических исследований, через 3 месяца

в области трансплантатов определяется костная ткань. При гистологическом исследовании образцов ткани из центра регенерата при использовании тканеинженерных конструкций на основе СКЖТ и ГАП или СКЖТ и «КоллапАн-Г» обнаружено формирование молодой, недостаточно минерализованной костной ткани, окруженной мелкими капиллярами и сосудами; использование остеопластического материала («КоллапАн-Г») в сочетании со смешанной популяцией СКЖТ и СКЖТ, индуцированных в остеогенном направлении, позволяет улучшить характеристики формируемой молодой кости.

Таким образом, представленные в данном исследовании результаты свидетельствуют о том, что трансплантация тканеинженерных конструкций для восстановления костных дефектов является безопасной процедурой, позволяющей решить ряд сложных клинических задач челюстно-лицевой хирургии. Трансплантация в зону костного дефекта тканеинженерной конструкции позволяет в кратчайшие сроки добиться органотипического восстановления утраченной ткани у пациентов.

Список литературы

1. Агапов В.С., Аснина С.А., Воложин А.И., Малько Е.В., Халед Аль Хинди Применение препаратов колапол и гидроксиапол для заполнения полостей после удаления радикулярных кист. Медицинская консультация. 1996; 3: 44-45.
2. Агапов В.С., Аснина С.А., Воложин А.И., Белозеров М.Н., Мазур Л.Г., Малько Е.В. Анализ ближайших и отдаленных результатов применения остеопластических материалов гидроксиапол и колапол в поликлинической хирургической практике. Юбилейный список работ, посвященный 60-летию кафедры госпитальной хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. Москва: ММСИ. 1998; 25-27.
3. Белозеров М.Н. Оценка остеопластических свойств различных биоконпозиционных материалов для заполнения дефектов челюстей (экспериментально-клиническое исследование). Дис. ...канд. мед. наук. М. 2004; 147.
4. Воложин А.И., Попов В.К., Краслов А.П. и др. Физико-механические и морфологические характеристики новых композитов на основе сверхмолекулярного полиэтилена и гидроксиапатита. «Новое в стоматологии». 1999; 8: 35-43.
5. Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В., Григорян А.С. и др. Клиническое исследование эффективности применения комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани у пациентов с выраженным дефицитом костной ткани в области верхней и нижней челюсти. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2008; 4: 206-210.
6. Дробышев А.Ю. Экспериментальное обоснование и практическое применение отечественных биоконпозиционных материалов при костнореставрационных операциях на челюстях. Дисс. Док-ра мед. наук. М. 2001; 237.
7. Максимовский Ю.М., Чуркова Т.Д., Воложин А.И. Новый отечественный препарат гидроксиапол при хирургическом лечении пародонтита. Зубоврачебный вестник. 1993; 3: 19-22.
8. Рубина К.А., Калинина Н.И., Ефименко А., Лопатина Т., Мелихова В., Цоколаева З.И., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А., Парфенова Е.В. Механизм стимуляции ангиогенеза в ишемизированном миокарде с помощью стромальных клеток жировой ткани. Кардиология. 2010; 2: 58-66.
9. Савельев В.И., Корнилов Н.В., Калинин А.В., Булатов А.А. Технологии изготовления и экспериментально-клинического применения деминерализованных костных трансплантатов. Симпозиум по проблемам тканевых банков с международным участием. Санкт-Петербург: Россия. 2001; 27.
10. Chiapasco M., Drusati R., Ronchi P. Clin Oral Implants Reg. 2007; 18: 1: 74-85.
11. Dudas J.R., Marra K.G., Cooper G.M. et al. The osteogenic potential of adipose-derived stem cells for the repair of rabbit calvarial defects. Ann. Plast. Surg. 2006; 56: 543-548.
12. Fang B., Song Y., Lin Q. et al. Pediatr Transplant. 2007; 11: 7: 814-817.
13. Gronthos S., Franklin D.M., Leddy H.A. et al. Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. J. Cell Physiol. 2001; 189: 54-63.
14. Kinnaird T., Stabile E., Burnett M.S. et al. Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. Circ Res. 2004; 94: 678-685.
15. Lendekel S., Jödicke A., Christophis P. et al. J. Craniomaxillofac Surg. 2004; 32: 6: 370-373.

16. Li X., Jin L., Balian G. et al. *Biomaterials*. 2006; 27: 11: 2426-2433.
17. Martin-Rendon E., Hale S.J., Ryan D. et al. Transcriptional profiling of human cord blood CD133+ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to hypoxia. *Stem Cells*. 2007; 25: 1003-1012.
18. Ohnishi S., Yasuda T., Kitamura S. et al. Effect of hypoxia on gene expression of bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mononuclear cells. *Stem cells*. 2007; 25: 1166-1177.
19. Rah D.K. Art of replacing Craniofacial bone defects. *Yonsi Med. J.* 2000; 41: 756-765.
20. Rehman J., Traktuev D., Li J. et al. Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation*. 2004; 109: 1292-1298.
21. Rubina K., Kalinina N., Efimenko A., Lopatina T., Melikhova V., Tsokolaeva Z., Sysoeva V., Tkachuk V., Parfyonova Y. Adipose Stromal Cells Stimulate Angiogenesis via Promoting Progenitor Cell Differentiation, Secretion of Angiogenic Factors and Enhancing Vessel Maturation. *Tissue Eng. Part A*. 2009; 15: 8: 2039-2050.
22. Sadat S., Gehmert S., Song Y.-H. et al. The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Com.* 2007; 363, 674.
23. Stashower M., Smith K., Willams J., Skelton H. *Dermatol Surg.* 1999; 25: 5: 945
24. Weinzierl K., Yemprich A., Frerich B.J. *Cranio-maxillofac Surg.* 2006; 34: 8: 466-471.
25. Zuk P.A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D.A., Huang J.I., Mizuno H., Alfonso Z.C., Fraser J.K., Benhaim P., Hedrick M.H. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*. 2002; 13: 4279.

Поступила 21.08.2011 г.

Информация об авторах

1. Дробышев Алексей Юрьевич – д.м.н., проф., зав. кафедрой госпитальной хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Московского государственного медико-стоматологического университета; e-mail: dr.drobyshev@gmail.com
2. Рубина Ксения Андреевна – к.б.н., доцент, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории постгеномных технологий в медицине Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова; e-mail: rkсениya@mail.ru
3. Сысоева Вероника Юрьевна – старший преподаватель кафедры медицинской биохимии и молекулярной медицины Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова; e-mail: veroniks@mail.ru
4. Калинина Наталья Игоревна – доцент, старший научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории генных и клеточных технологий Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова; e-mail: n_i_kalinina@mail.ru
5. Григорьева Ольга Александровна – аспирант кафедры медицинской биохимии и молекулярной медицины Московского государственного университета им. М.В.Ломоносова; e-mail: o_grigorieva@list.ru
6. Мелерзанов Александр Викторович – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории информатики и биофизики Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии; e-mail: m83071@gmail.com
7. Румянцев Сергей Александрович – д.м.н., проф., врач-педиатр высшей категории, руководитель отдела молекулярной и экспериментальной гематологии Федерального научно-клинического центра детской гематологии, онкологии и иммунологии; e-mail: s_roumiantsev@mail.ru
8. Чаусская Ирина Юрьевна – аспирант кафедры госпитальной хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Московского государственного медико-стоматологического университета; e-mail: dr.chausskaya@mail.com