

УДК 616.314.18:611-018.26-078:612.014.2

**В.П. РУСАНОВ, Г.Т. ЕРМУХАНОВА, У.Р. МИРЗАКУЛОВА,  
К.С. БИМЕНОВ, Н. ТУРДЫЕВ, А. ХАЛМУРЗАЕВ**

Казахский национальный медицинский университет им. С.Д. Асфендиярова, г. Алматы

## **ИЗУЧЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ АУТОЛОГИЧНЫХ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК ЖИРОВОЙ ТКАНИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ ЛОКАЛЬНОГО ПАРОДОНТИТА**



Ермуханова Г.Т.

*Проблема лечения заболеваний тканей пародонта до настоящего времени остается весьма актуальной, что связано с довольно широкой распространенностью патологии и высокой встречаемостью тяжелых форм поражений, а также еще недостаточной эффективностью предлагаемых средств лечения. Хирургические методы с использованием остеотропных средств, оптимизирующих остеогенез, являются неотъемлемой частью комплексного лечения деструктивных процессов в пародонте. В последнее время для оптимизации регенеративных процессов в тканях пародонта часто используют культуры клеток и тканей – фибробласты, миобласты, эндотелиальные, а также стволовые клетки.*

**Цель работы.** Получение модели экспериментального локального пародонтита и выделение стволовых клеток из жировой ткани.

**Материал и методы.** Экспериментальное исследование произведено на 18 кроликах породы «Шиншилла» весом 3500 – 4000 граммов, которым воспроизводился локальный пародонтит. Животные разделены на две равные группы – контрольная и подопытная. У подопытных животных сразу после наложения проволочных лигатур забирался жир из брюшной полости и отправлялся в лабораторию для приготовления ММСК.

**Результаты и обсуждение.** Для получения экспериментального локального пародонтита на 18 кроликах вокруг шеек центральных резцов нижней челюсти фиксировались лигатуры из танталовой проволоки диаметром 0,2 мм.

Для изучения эффективности пластики воспроизведенного костного дефекта остеопластическим материалом на основе костного коллагена, гидроксилатапата и аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани создана модель экспериментального локального пародонтита и показана методика забора жировой ткани из брюшной полости кролика. Через две недели после наложения проволочных лигатур на центральные резцы нижней челюсти кроликов получена типичная картина локального пародонтита.

**Вывод.** Результаты экспериментальных исследований доказали, что для испытания остеопластического материала на основе костного коллагена, гидроксилатапата и аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани можно использовать модель локального пародонтита на кроликах.

**Ключевые слова:** экспериментальный пародонтит, костный коллаген, гидроксилатапатит, стволовые клетки, жировая ткань.

**П**роблема лечения заболеваний тканей пародонта до настоящего времени остается весьма актуальной, что связано с довольно широкой распространенностью патологии и высокой встречаемостью тяжелых форм поражений, а также еще недостаточной эффективностью предлагаемых средств лечения [1, 2]. Хирургические методы с использованием остеотропных средств, оптимизирующих остеогенез, являются неотъемлемой частью комплексного лечения деструктивных процессов в пародонте [3, 4]. В последнее время для оптимизации регенеративных процессов в тканях пародонта часто используют культуры клеток и тканей – фибробласты, миобласты, эндотелиальные, а также стволовые клетки. Основанием для их применения являются теоретические и экспериментальные предпосылки, что продуцируемые клетками биологически активные вещества

способствуют успешному восстановлению тканей в зонах повреждения, в том числе и тканей пародонта [5, 6].

Термин «стволовая клетка» определяет популяцию тканевых или циркулирующих в крови низкодифференцированных клеток-предшественников, обладающих способностью к самообновлению путем асимметричного деления и дифференцировке в клеточные компоненты различных тканей [7, 8].

Трансплантируемые клетки, обеспечивающие непосредственное восстановление костной ткани, представляют собой культуру остеогенных клеток-предшественников, которые могут быть получены путем направленной дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) костного мозга, жировой ткани или других источников, таких как надкостница, селезенка,

**Контакты:** Ермуханова Гульжан Тлеумухановна, д-р мед. наук, профессор, заведующая кафедрой стоматологии детского возраста КазНМУ им. С.Д. Асфендиярова, г. Алматы. Тел.+7 701 9880760, e-mail: guljan.adab@mail.ru

**Contacts:** Gulzhan Tleumuhanova Ermuhanova, MD, Professor, Head of Department of Pediatric Dentistry KazNMU n.a. S.D. Asfendiyarov, Almaty c. Ph. +7 701 988 07 60, e-mail: guljan.adab@mail.ru

тимус, плацента и др. [9]. Одним из перспективных источников ММСК является жировая ткань (ЖТ). Исследования иммунофенотипа ММСК из жировой ткани и красного костного мозга показали, что они практически идентичны друг другу. Однако при этом они обладают значительными преимуществами, важными из которых являются сравнительная доступность, простота и безопасность их получения в сравнении с методиками забора стволовых клеток из других [10, 11, 12, 13].

Целью работы явилось получение модели экспериментального локального пародонтита и выделение стволовых клеток из жировой ткани.

#### Материал и методы

Экспериментальное исследование произведено на 18 кроликах породы «Шиншилла» весом 3500–4000 граммов, которым воспроизводился локальный пародонтит. Животные разделены на две равные группы – контрольная и подопытная. У подопытных животных сразу после наложения проволочных лигатур забирался жир из брюшной полости и отправлялся в лабораторию для приготовления ММСК.

#### Результаты и обсуждение

Для получения экспериментального локального пародонтита кроликам под внутривенным наркозом 2% раствором Рометара и инфильтрационной анестезией 2% раствора лидокаина вокруг шеек центральных резцов нижней

челюсти фиксировались лигатуры из танталовой проволоки диаметром 0,2 мм (рис. 1).

Кролики разделены на две группы по 9 животных (контрольная и подопытная).

У подопытных кроликов сразу после наложения проволочных лигатур проводился забор жировой ткани из брюшной полости. Для этой цели с соблюдением асептики производился разрез по средней линии живота с последующим послойным вскрытием стенок брюшной полости (рис. 2).

Выделялся большой сальник, располагающийся на передней поверхности поперечно-ободочной кишки кролика (рис. 3).

Исеченный фрагмент сальника помещался в раствор Хенкса и отправлялся в лабораторию «Антиген» для получения аутологичных ММСК (рис. 4).

Для выделения стромально-васкулярной фракции жировой ткани кролика гомогенизированная жировая ткань промывалась стерильным раствором Хенкса и инкубировалась в течение 45 минут с 0,075% раствором коллагеназы I типа (Sigma) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) при 37°C. Нейтрализация фермента проводилась равным объемом ФСБ, содержащего 10% эмбриональную телячью сыворотку. Суспензия клеток обрабатывалась лизирующим раствором для удаления эритроцитов в соотношении 1:10.



Рисунок 1 – Наложены проволочные лигатуры на шейки центральных резцов нижней челюсти кролика



Рисунок 3 – Выделен большой сальник поперечно-ободочной кишки кролика



Рисунок 2 – Вскрыта стенка брюшной полости кролика

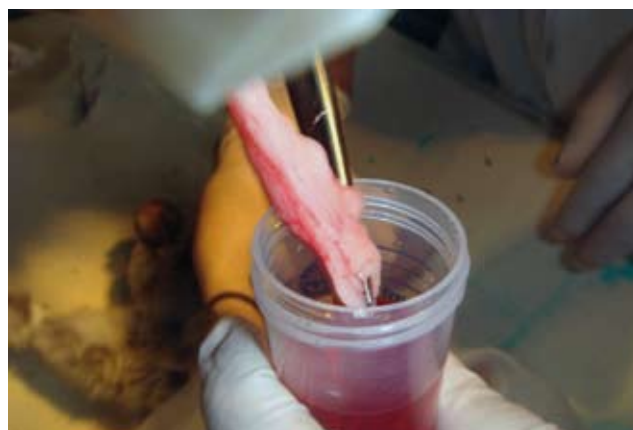


Рисунок 4 – Фрагмент сальника помещен в раствор Хенкса



Рисунок 5 – Суточная культура (ММСК) жировой ткани сальника кролика

Клетки отмывались центрифугированием, клеточный осадок ресуспендировался в 5 см<sup>3</sup> среды DMEM. Затем подсчитывали концентрацию клеток в см<sup>3</sup>. Полученную суспензию клеток отмывали раствором Хенкса центрифугированием при 1200 об/мин в течение 10 минут. Для выделения стромально-васкулярной фракции жировой ткани кролика гомогенизированная жировая ткань промывалась стерильным раствором Хенкса и инкубировалась в течение 45 минут с 0,075% раствором коллагеназы I типа (Sigma) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) при 37°C. Нейтрализация фермента проводилась равным объемом ФСБ, содержащего 10% эмбриональную телячью сыворотку. Суспензия клеток обрабатывалась лизирующим раствором для удаления эритроцитов в соотношении 1:10. Клетки отмывались центрифугированием, клеточный осадок ресуспендировался в 5 см<sup>3</sup> среды DMEM. Затем подсчитывали концентрацию клеток в см<sup>3</sup>. Полученную суспензию клеток отмывали раствором Хенкса центрифугированием при 1200 об/мин в течение 10 минут. Полученную суспензию клеток разводили раствором Хенкса до концентрации 1000 000 клеток/см<sup>3</sup> (рис. 5).

Через две недели после наложения проволочных лигатур на шейки центральных резцов у всех кроликов отмечалась картина локального пародонтита, выражающаяся наличием над- и поддесневого зубного налета. Слизистая оболочка десны в области нижних резцов была отечной и гиперемизированной. При пальпации в области маргинального края наблюдались выраженная кровоточивость десны и незначительное выделение гноя из пародонтальных карманов. Средняя глубина карманов в области резцов составляла 3-4 мм. Подвижность центральных резцов в зоне полученного экспериментального пародонтита I степени (рис. 6).

Таким образом, через две недели после наложения проволочных лигатур на центральные резцы нижней челюсти кроликов получена типичная картина локального пародонтита.

#### **Прозрачность исследования**

*Исследование не имело спонсорской поддержки. Авторы несут полную ответственность за предоставление окончательной версии рукописи в печать.*

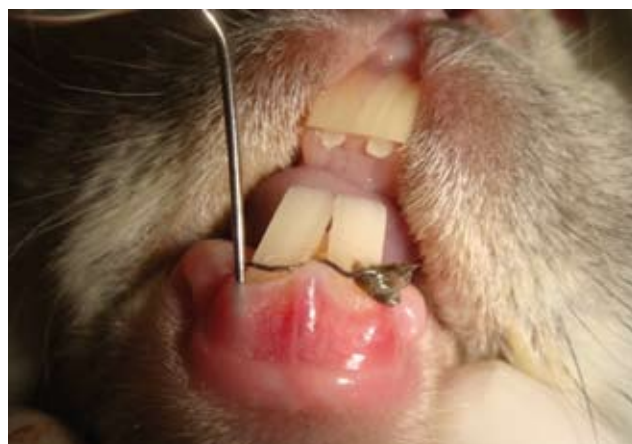


Рисунок 6 – Картина развившегося локального пародонтита кролика

#### **Декларация о финансовых и других взаимоотношениях**

*Все авторы принимали участие в разработке концепции статьи и написании рукописи. Окончательная версия рукописи была одобрена всеми авторами. Авторы не получали гонорар за статью.*

#### **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- 1 Грудянов А.И. Средства и методы профилактики воспалительных заболеваний пародонта. – М.: Медицинское информационное агентство, 2012. – 5-6 с.
- 2 Мусиенко А.И., Мусиенко С.И., Кушнир Д.В., Мусиенко А.А. Комплексный подход к планированию лечения заболеваний пародонта фактором роста // *Стоматология Казахстана*. – 2014. – № 3-4. – С. 67-68
- 3 Бисултанов Х.У. Сравнительная эффективность применения отечественных костнопластических материалов при лечении пародонтита: автореф. ... канд. мед. наук. – Саратов, 2013. – 24 с.
- 4 Ефимов Ю.В., Стоматов А.В., Иванов П.В. и др. Использование аутогенного тромбоцитарного геля при хирургическом лечении хронического пародонтита // *Медицинский алфавит. Стоматология*. – 2010. – № 1. – С. 26-27
- 5 Пальцев М.А., Иванов А.А., Смирнов В.Н. Стволовые клетки в современной медицине: настоящее и будущее // *Молекулярная медицина*. – 2006. – No. 2. – P. 5-9
- 6 Алексеева И.С., Волков А.В., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В. Клинико-экспериментальное обоснование использования комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных мезенхимных стромальных клеток жировой ткани у пациентов с выраженным дефицитом костной ткани челюстей // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2012. – № 1. – С. 97-105
- 7 Francis J. Hughes Mesenchymal Stem Cells and Periodontal Regeneration // *Hughes Curr Oral Health Rep*. – 2014. – No 1. – P. 1-8
- 8 Черняев С.Е., Киселева Е.В., Григорьян А.С., Воложин А.И. Влияние аллогенных и аутологичных мультипотентных стромальных клеток жировой ткани на регенерацию костной ткани дефекта угла нижней челюсти кролика // *Журнал Стоматология*. – 2010. – № 1. – С. 23-29

9 Бухарова Т.Б., Арутюнян И.В., Шустров С.А., Алексеева И.С., Федюнина И.А., Логовская Л.В., Волков А.В., Ржанинова А.А., Григорьян А.С., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В. Тканеинженерная конструкция на основе мультипотентных стромальных клеток жировой ткани и материала «Остеоматрикс» для регенерации костной ткани // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2011. – № 3. – С. 167-170

10 Алексеева И.С., Волков А.В., Кулаков А.А., Гольдштейн Д.В. Жировая ткань как перспективный источник получения мультипотентных стромальных клеток взрослого организма // Журнал «Пародонтология». – 2012. – № 2(63). – С. 21-25

11 Алексеева И.С. Применение комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани у пациентов с дефицитом костной ткани (клинико-экспериментальное исследование): автореф. ... докт. мед. наук. – М., 2012. – 37 с. www.geum.ru

#### REFERENCES

1 Grudyanov AI. *Sredstva i metody profilaktiki vospalitelnykh zabolevaniy parodonta* [Means and methods of inflammatory prevention periodontal]. Moscow: Medical News Agency; 2012. P. 5-6

2 Musienko AI, Musienko SI, Kushnir DV, Musienko AA. An integrated approach to the planning of the treatment of periodontal disease growth factor. *Stomatologiya Kazahstana = Kazakhstan Dentistry*. 2014;3-4:67-8 (In Russ.)

3 Bisultanov HU. *Sravnitel'naya effektivnost primeneniya otechestvennykh kostnoplachesticheskikh materialov pri lechenii parodontita*. Diss. ... kand. med. Nauk [Comparative efficacy of domestic osteoplastic materials in the treatment of periodontitis. Diss. ... Cand. Med. Sci.]. Saratov; 2013. 24 p.

4 Efimov UV, Stomatov AV, Ivanov PV, Muhaev HH. The use of autologous platelet gel in the surgical treatment of chronic periodontitis. *Meditsinskii alfavit. Stomatologiya = Medical alphabet. Dentistry*. 2010;1:26-7 (In Russ.)

5 Paltsev MA, Ivanov AA, Smirnov VN. Stem cells in modern medicine: present and future. *Molekulyarnaya medicina = Molecular medicine*. 2006;2:5-9(InRuss.)

6 Alekseeva IS, Volkov AV, Kulakov AA, Goldsheyn DV. Clinical and experimental study on the use of the combined cell transplant on the basid of multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue among patients with severe deficiency of bone tissue of the jaws. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya = Cell Transplantation and Tissue Engineering*. 2012;1:97-105 (In Russ.)

7 Francis J. Hughes Mesenchymal Stem Cells and Periodontal Regeneration. *Hughes Curr Oral Health Rep*. 2014;1:1-8

8 Chernyaev SE, Kiseleva EV, Grigoryan AS, Volozhin AI. Effect of autologous and allogenic multipotent adipose tissue stromal cells for regeneration of bone tissue defect of rabbit's lower jaw angle. *Zhurnal Stomatologiya = Dental Journal*. 2010;1:23-9 (In Russ.)

9 Bukharova TB, Arutyunyan IV, Shustrov SA, Alekseeva IS, Fedyunina IA, Logovskaya LV, Volkov AV, Rzhaniyeva AA, Grigoryan AS, Kulakov AA, Goldshtein DV. Tissue-engineering based construction on multipotent adipose tissue stromal cells

and "Osteomatrix" material for regeneration of bone tissue. *Kletochnye tekhnologii v biologii i medicine = Cell techniques in biology and medicine*. 2011;3:167-70 (In Russ.)

10 Alekseeva IS, Volkov AV, Kulakov AA, Goldsheyn DV. Adipose tissue as a promising source of multipotent stromal cells of an adult organism. *Zhurnal "Parodontologiya" = Journal "Periodontics"*. 2012;2(63):21-5 (In Russ.)

11 Alekseeva IS. *Primenenie kombinirovannogo kletchnogo transplantata na osnove multipotentnykh mezenhimalnykh stromalnykh kletok zhirovoi tkani u pacientov s deficitom kostnoi tkani (kliniko-eksperimentalnoe issledovanie): Diss... dokt. med. nauk.* [The use of combination cell transplant based on multipotent mesenchymal stromal cells of adipose tissue among patients with deficiency of bone tissue (clinical and experimental study). Diss ... Doctor. Med. Sci.]. Moscow; 2012. 37 p.

#### ТҰЖЫРЫМ

**В.П. РУСАНОВ, Г.Т. ЕРМҰХАНОВА, У.Р. МЫРЗАҚҰЛОВА, К.С. БИМЕНОВ, Н. ТҰРДЫЕВ, А. ХАЛМУРЗАЕВ**

С.Ж. Асфендияров атындағы Қазақ Ұлттық медицина университеті, Алматы қ.

#### МЕЗЕНХИМАЛЬДІ СТРОМАЛЬДІ АУТОЛОГИЯЛЫҚ МУЛЬТИПОТЕНТТІ МАЙЛЫ ТІН ЖАСУШАЛАРЫНЫҢ ТИІМДІЛІГІН ЗЕРТТЕУ МАҚСАТЫНДА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬДІ ОШАҚТЫ ПАРОДОНТИТТІҢ МОДЕЛІН ДАМУ

Пародонт ауруларын емдеу мәселелері патологияның жеткілікті түрде кең таралуымен және зақымдалулардың ауыр түрлерінің жоғары жиілікте кездесуімен, сонымен қатар ұсынылатын емдік заттардың әсерлілігінің жеткіліксіздігімен байланысты қазіргі таңға дейін өзекті болып қала береді. Остеогенезді ынталандырушы остеотропты заттарды қолданумен жүргізілетін хирургиялық әдістер пародонттағы деструктивті үрдістерді кешенді емдеудің ажырамас бөлігі. Соңғы уақытта пародонт тіндеріндегі регенеративті үрдістерді оңтайландыру үшін жасушалар және тіндер өсіріндісі жиі қолданылады – фибробласттар, миобласттар, эндотелиальді, сонымен қатар бағаналы жасушалар.

**Зерттеудің мақсаты** тәжірибелік ошақтық пародонт қабынуының мүсінін алу және май тінінен бағаналы жасушаларды бөлу болып табылған.

**Материал және әдістері.** Тәжірибелік зерттеу «Шиншилла» тұқымының 3500-4000 грамм салмақтағы 18 қоянына ошақтық пародонт қабынуы жасалынып жүргізілді. Жануарлар теңдей екі топқа бөлінді – бақылаушы және тәжірибе жүргізілуші. Лигатуралы сымды орнатқаннан кейін тәжірибе жүргізілетін жануарлардың құрсақ қуысынан бірден май алынып, ММСЖ дайындау үшін зертханаға жіберілді.

**Нәтижелері және талқылауы.** 18 қоянда тәжірибелік ошақтық пародонт қабынуын алу үшін төменгі жағының орталық күрек тістерінің мойын аймағында диаметрі 0,2 мм болатын танталды сымнан лигатура бекітілді.

Жасалған сүйек кемістігіне пластика әсерін зерттеу үшін сүйектік коллаген, гидроксилпатит және май тінінің аутологиялық мультипотентті мезенхимальді стромалық жасушалары негізіндегі остеопластикалық материалмен тәжірибелік ошақтық пародонт қабынуының мүсіні жасалынды және қоянның құрсақ қуысынан май тінін алу әдісі көрсетілді. Қояндардың төменгі жағының орталық күрек тістеріне сымды лигатура орнатқан соң екі аптадан кейін ошақтық пародонт қабынуының әдеттегі түрі алынды.

**Қорытынды.** Тәжірибелік зерттеу нәтижелері сүйектік коллаген, гидроксилпатит және май тінінің аутологиялық мультипотентті мезенхимальді стромалық жасушалары негізіндегі остеопластикалық материалмен бақылау үшін қояндарда ошақтық пародонт қабынуының мүсінін қолдануға болатынын дәлелдеді.

**Негізгі сөздер:** экспериментальді пародонтит, сүйек-тікколлаген, гидроксилпатит, бағаналы жасушалар, майлы тін.

#### SUMMARY

V.P. RUSSANOV, G.T. YERMUKHANOVA,  
U.R. MIRSAKULOVA, K.C. BIMENOV, N. TURDIEV,  
A. CHALMURSAEV

*Kazakh National Medical University n.a. S.D. Asfendiyarov,  
Almaty c.*

#### STUDYING THE EFFECTIVENESS OF AUTOLOGOUS MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS OF ADIPOSE TISSUE IN AN ANIMAL MODEL OF LOCAL PERIODONTITIS

The problem of the treatment of periodontal tissues diseases to date remains highly relevant, due to the relatively high prevalence of disease and a high incidence of severe lesions, and even lack of efficacy of the proposed treatments. Surgical methods using osteotropic tools that optimize bone formation are an integral part of complex treatment of destructive processes in the periodontium. Recently, in order to optimize regenerative processes often use periodontal tissues and tissue culture cells – fibroblasts, myoblasts, endothelial, as well as stem cells. The aim of the study was to obtain the model of experimental periodontitis and local release of stem cells from adipose tissue.

**Material and methods.** An experimental study made on 18 rabbits “Chinchilla”, weighing 3500–4000 grams, which reproduces the local periodontitis. Animals are divided into two equal groups – control and experimental. In experimental animals immediately after the imposition of wire ligatures climbed fat from the abdomen and sent to the laboratory for preparation of ITCs.

**Results and discussion.** For experimental periodontitis local 18 rabbits around the necks of the central incisors of the lower jaw fixed ligature of tantalum wire of 0.2 mm in diameter.

To study the effectiveness of plastics reconstituted bone defect with osteoplastic material on the basis of bone collagen, hydroxyapatite and autologous multipotent mesenchymal stromal cells, adipose tissue is created a model of experimental periodontitis local and the technique of sampling adipose tissue from the abdominal cavity of a rabbit. Two weeks after the imposition of wire ligatures on the central incisors of the lower jaw rabbits received a typical picture of the local periodontitis.

**Conclusions.** The results of experimental studies have shown that testing osteoplastic material on the basis of bone collagen, hydroxyapatite and autologous multipotent mesenchymal stromal cells, adipose tissue, you can use the local model of periodontitis in rabbits.

**Key words:** *experimental periodontitis, bone collagen, hydroxyapatite, stem cells, adipose tissue.*

---

Для ссылки: Русанов В.П., Ермуханова Г.Т., Мирзакулова У.Р., Бименов К.С., Турдыев Н., Халмурзаев А. Изучение эффективности аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани на экспериментальной модели локального пародонтита // *Medicine (Almaty)*. – 2016. – № 4 (166). – P. 63-67

Статья поступила в редакцию 18.03.2016 г.

Статья принята в печать 12.04.2016 г.