



УКРАЇНА

(19) **UA** (11) **47705** (13) **U**  
(51) МПК (2009)  
A61L 27/00

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИ

ДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ

## ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

видається під  
відповідальність  
власника  
патенту

### (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ ОСТЕОІНТЕГРАТИВНИХ ЯКОСТЕЙ МАТЕРІАЛІВ

1

(21) u200906904

(22) 01.07.2009

(24) 25.02.2010

(46) 25.02.2010, Бюл.№ 4, 2010 р.

(72) КУЦЕВЛЯК ВАЛЕРІЙ ІСАЙОВИЧ, КУЦЕВЛЯК  
ВАЛЕНТИНА ФЕДОРІВНА, ЛЮБЧЕНКО ОЛЬГА  
ВАЛЕРІЇВНА, МІКУЛІНСЬКИЙ ЮРІЙ ЮХИМОВИЧ

(73) КУЦЕВЛЯК ВАЛЕРІЙ ІСАЙОВИЧ, КУЦЕВЛЯК  
ВАЛЕНТИНА ФЕДОРІВНА, ЛЮБЧЕНКО ОЛЬГА  
ВАЛЕРІЇВНА

(57) 1. Спосіб визначення остеоінтегративних яко-  
стей матеріалів для імплантатів, згідно з яким ви-  
діляють і культивують мезенхімальні стовбурові  
клітини, переносять їх на носій, визначають цито-  
токсичність носія по життєздатності зазначених

2

стовбурових клітин, біологічну сумісність носія з  
кістковою тканиною з подальшим визначенням  
стадії регенерації кісткової тканини, який **відріз-  
няється** тим, що носій вибирають з групи матеріа-  
лів, таких як біоколаген або колапан, або біоген,  
або остеоapatит, або кергап.

2. Спосіб визначення остеоінтегративних якостей  
матеріалів для імплантатів за п. 1, який **відрізня-  
ється** тим, що регенерацію здійснюють шляхом  
транспортування стовбурових клітин в зону дефек-  
ту на вибраному носії.

3. Спосіб визначення остеоінтегративних якостей  
матеріалів для імплантатів за пп. 1, 2, який **відріз-  
няється** тим, що стадію регенерації визначають  
на 30 та 60 добу.

Корисна модель стосується медицини а саме  
щелепно-лицьової хірургії, ортопедії травматології  
і призначена для визначення остеоінтегративних  
якостей матеріалів, призначених для відновлення  
природної структури і функції кісток щелепи і тка-  
нин пародонту.

В останній час все більше місце в стоматоло-  
гічній практиці і щелепно - лицевій хірургії займа-  
ють різні методи клітинної та тканинної терапії.

Розробка методів підвищення остеоінтеграти-  
вних якостей імплантатів, що виготовляються з  
різних пластичних нерезорбуючих матеріалів є  
важливою проблемою в щелепно-лицевій хірургії,  
пов'язаною з відновленням цілісності кісткової тка-  
нини.

Однією з складних проблем є вибір адекватно-  
го носія для культури клітин. Оскільки просте ін'єк-  
ційне введення суспензії клітин не дає потрібного  
утворення кісткової тканини, тому паралельно ро-  
зробці методів культивування проводять пошук  
оптимального носія для них.

При хірургічному лікуванні дефектів кістки і  
тканин пародонту для стимуляції остеогенезу за-  
стосовують різні остеопластичні матеріали в поєд-  
нанні з культурою диплоїдних фібробластів із емб-  
ріональної тканини людини (RU 2210352 С1, 20.  
08. 03; RU 2231986 С1, 10/07/04), а також з алло-  
фібробластами, які культивують на твердій мозко-  
вій оболонці (Туманов з співавтор., 1998), якими  
заповнюють анатомічні дефекти. Однак клінічні та

гістологічні результати після таких втручань вка-  
зують на суттєві недоліки, такі як порушення ске-  
летних функцій тканин, нерідко спостерігаються  
реакції на стороннє тіло, інкапсуляція гранул ім-  
плантованих матеріалів.

Відомий також спосіб визначення остеоінте-  
гративних якостей матеріалів для імплантатів, згід-  
но з яким виділяють і культивують мезенхімальні  
стовбурові клітини, переносять їх на носій, визна-  
чають цитотоксичність носія по життєздатності  
зазначених стовбурових клітин, біологічну суміс-  
ність носія з кістковою тканиною з подальшим ви-  
значенням стадії регенерації кісткової тканини (RU  
2259851, МПК А61L27/00).

Однак в відомому способі вибрані носії не  
знайшли широкого застосування в медичній прак-  
тиці.

В основу корисної моделі поставлено задачу в  
способі визначення остеоінтегративних якостей  
матеріалів для імплантатів шляхом зміни матеріа-  
лів та аналізу процесу заживання кісткових дефек-  
тів на експериментальних тваринах забезпечити  
оптимальний вибір матеріалу-носія.

Поставлена задача вирішується тим, що в  
способі визначення остеоінтегративних якостей  
матеріалів для імплантатів, згідно з яким виділя-  
ють і культивують мезенхімальні стовбурові кліти-  
ни, переносять їх на носій, визначають цитотокси-  
чність носія по життєздатності зазначених  
стовбурових клітин, біологічну сумісність носія з

(13) **U**(11) **47705**(19) **UA**

кістковою тканиною з подальшим визначенням стадії регенерації кісткової тканини, згідно з корисною моделлю, носій обирають з групи матеріалів, таких як біоколаген, або колапан, або біо-ген, або остеоапатит, або кергап.

Регенерацію здійснюють шляхом транспортування стовбурових клітин в зону дефекту на обраному носії.

Стадію регенерації визначають на 30 та 60 добу.

Завдяки застосуванню запропонованого способу досягається інформативність визначення остеоінтегративних якостей матеріалів, одержання якісних показників поведінки стовбурових клітин на досліджуваному носії, що дозволяє якісно і повноцінно проводити регенерацію кісткової тканини як в губчатій так і в компактній кістці, досягається збільшення швидкості остеогенезу і формування нової кісткової тканини.

Спосіб здійснюють таким чином.

Експерименти *in vitro* проводять на двох групах кістково-пластичного матеріалу.

Ксеногенні (природний гідроксиапатит):

- Біо-Ген - кістково-пластичний матеріал кінського походження, що представляє собою мінеральний матрикс;

- Біоколаген - ліофілізована кінська колагенова мембрана для прямої тканинної регенерації.

Остеотропні з керамічного гідроксиапатиту та трикальційфосфату:

Періоглас - біоактивне скло;

Остеоапатит - порошок;

Кергап - блок;

Кергап - порошок.

Виділяють і культивують первинну культуру кістково-мозкових стромальних клітин криси та кролика. Кістковий мозок виділяють з стегнових кісток крис та клубових кісток кролика.

Кістково-мозкові стромальні клітини криси наносять на кістково-пластичний матеріал хімічної та біологічної природи для аналізу, на яких матеріалах проходить краще їх приживлення та розмноження, тобто які матеріали можуть бути використані як носії.

Як носій застосовують біоколаген, або колапан, або біо-ген, або остеоапатит, або кергап.

Експериментальні дослідження по порівняльному аналізу процесу заживання кісткових дефектів тіла нижньої щелепи проводять на 10 кроликах породи Шиншилла вагою 3 - 4кг. Під внутрішньовенним трипталовим наркозом скелетують тіло нижньої щелепи, порожнистою фрезою створюють дефект кортикальної пластинки на всю її товщу 3 - 4мм круглої форми діаметром 10мм.

Дефект заповнюють остеотропним матеріалом, який містить стовбурові клітини на носії і щоб не вросла слизова оболонка дефект закривають двохаровою мембраною, що розсмоктується. Операційну рану ушивають.

Стадію регенерації визначають на 30 та 60 добу.

Тварин виводили з експерименту на 30, 60 добу.

Схема експериментальних досліджень для аналізу процесів заживання кісткових дефектів представлена в таблиці 1.

Таблиця 1

№№пп	Чим заповнений дефект	Стоки
1	Дефект - кров'яний згусток + мембрана	30 діб
2	Дефект - кров'яний згусток + мембрана	60 діб
3	Дефект - колапан Л+150тис. стовбур, клітин + мембрана	30 діб
4	Дефект - колапан Л+150тис. стовбур, клітин + мембрана	60 діб
5	Дефект - Біо-Ген+150тис. стовбур, клітин + мембрана	30 діб
6	Дефект - Біо-Ген+150тис. стовбур, клітин + мембрана	60 діб
7	Дефект - колапан Л+ мембрана	30 діб
8	Дефект - колапан Л+ мембрана	60 діб
9	Дефект - стовбурові клітини в суміші з плазмою людини з кальцієм	30 діб
10	Дефект - стовбурові клітини в суміші з плазмою людини з кальцієм	60 діб

Експеримент на тваринах проводять відповідно до Міжнародних вимог про гуманне поводження з тваринами. Нижні щелепи вичленюють, фіксують в формаліні, декальцинують і проводять через целоїдин. Гістологічні зрізи товщиною 7-10мм фарбують гематоксиліном, еозином і пікрофуксином по Ван Гізону. Дослідження зрізів і фотографування проводять під мікроскопом "Carl Zeiss" з допомогою цифрової фотокамери "Canon".

В результаті дослідження виявлена цитотоксичність одного з матеріалів - Періо-Гласу. Після нанесення на нього культури стовбурових клітин, останні швидко дегенерували та зпливали, а рН середовища зростає і ставав лужним.

В присутності інших субстратів, які досліджувалися, клітини нормально ділилися і по морфо-

логії і кількості не відрізнялися від контрольних клітин.

Таким чином, з 6 субстратів, які досліджувалися, - 5, а саме : Біо-Ген, Біоколаген, остеоапатит, кергап-порошок, кергап-блок не виявляють цитотоксичної дії на кістково-мозкові стромальні клітини і можуть бути використані як носії в клітинній терапії.

В результаті дослідження остеоінтегративних процесів одержані наступні результати. При заповненні дефекту кров'яним згустком + мембраною.

Мікроскопічно на 30 добу виявили в тілі щелепи дефект круглої форми, заповнений фіброретикулярною тканиною, остеоїдом та губчатою кістковою тканиною. Серед тканин регенерату переважала фіброретикулярна тканина з високою

щільністю клітин фібро пластичного і остеобластичного диферонів.

На 60 добу область дефекту була заповнена губчатою кістковою тканиною крупноплетистою по організації з тонкими рідко розташованими кістковими трабекулами. В міжтрабекулярних просторах розташована пухка з'єднувальна тканина, яка по клітинному складу була представлена фібропластами і лімфоцитами. Щільність клітин низька. Клітини остеобластичного диферону були локалізовані лише на невеликих територіях по периметру кісткових трабекул. В пухкій з'єднувальній тканині виявлено велику кількість тонкостінних кровоносних судин з розширеними просвітами.

Таким чином, особливості організації кісткової тканини в області дефекту показують низькі міцності якості структури регенерату.

При заповненні дефекту колапаном Л + мембраною.

На 30 добу область дефекту в щелепі кролика була заповнена в основному губчатою кістковою тканиною з невеликими ділянками пухкої з'єднувальної тканини з високою щільністю остеобластів.

На 60 добу в області дефекту виявлена в основному компактна і губчата кісткова тканина. Виявлені невеликі стрічковидні островки фібро ретикулярної тканини з обширними вогнищами остеїду.

Таким чином, при заповненні області дефекту колапаном Л і мембраною в травмованій області на 30 добу формується губчата кісткова тканина мілкоплетиста по організації, а на 60 добу область пошкодження заповнена в основному компактною і губчатою тканиною. Колапан Л в регенераті знаходиться в вигляді одиничних невеликих фрагментів, замуrowаних в кісткову

тканину. Подібна структура регенерату свідчить про його високі міцності характеристики.

При заповненні дефекту колапаном Л + стромальними клітинами + мембраною.

При заповненні дефекту колапаном в поєднанні зі стовбуровими клітинами і мембраною на 30 добу область дефекту була заповнена в основному губчатою кістковою тканиною мілкоплетистою по організації. Кісткові трабекули характеризуються високою щільністю остеоцитів на поверхні. По периферії кісткових трабекул в вигляді частоколу розташовуються остеобласти. Міжтрабекулярні простори заповнені фіброретикулярною тканиною з перевагою клітин остеобластичного диферону.

На 60 добу в області дефекту виявили в основному компактну і губчасту кістки. В області розташування компактної кістки розміщені мілкі фрагменти залишків колапану, замуrowані в кісткову тканину без формування з'єднувальної капсули. Виявили невеликі ділянки грубоволокнистої кісткової тканини, що розташовані між генераціями компактної кістки.

Таким чином, відрізняльною особливістю від попереднього дослідження на 30 добу є формування щільної сітки кісткових трабекул з високою щільністю остеоцитів на їх поверхні і виражена остеобластичне диференціювання клітин. На 60 добу в тканинах регенерату переважає компактна кістка.

Таким чином, стовбурові клітини, що введені в область дефекту, кісткової тканини на носіїві, забезпечують якісну повноцінну регенерацію кісткової тканини і запропонований спосіб може бути рекомендований до клінічного застосування.