



ДЕРЖАВНА СЛУЖБА  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІ  
УКРАЇНИ

УКРАЇНА

(19) **UA**

(11) **105925**

(13) **U**

(51) МПК

**G09B 23/28** (2006.01)

## (12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

(21) Номер заявки: **u 2015 09613**

(22) Дата подання заявки: **05.10.2015**

(24) Дата, з якої є чинними  
права на корисну  
модель: **11.04.2016**

(46) Публікація відомостей **11.04.2016, Бюл.№ 7**  
про видачу патенту:

(72) Винахідник(и):

**Куцевляк Валентина Федорівна (UA),  
Куцевляк Валерій Ісайович (UA),  
Циганова Ірина Валеріївна (UA)**

(73) Власник(и):

**ХАРКІВСЬКА МЕДИЧНА АКАДЕМІЯ  
ПІСЛЯДИПЛОМНОЇ ОСВІТИ,  
вул. Корчагінців, 58, м. Харків, 61176 (UA)**

## (54) СПОСІБ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ МАТЕРІАЛУ ДЛЯ РЕГЕНЕРАЦІЇ КІСТКОВОГО ДЕФЕКТУ

### (57) Реферат:

Спосіб експериментального визначення кількості матеріалу для регенерації кісткового дефекту здійснюють шляхом його створення та підсадки матеріалу. При цьому для кісткового дефекту об'ємом 0,027 см<sup>3</sup> вводять 500 тис. од. стромальних клітин кісткового мозку з колапаном.

**UA 105925 U**



Корисна модель належить до медицини, зокрема способів дослідження регенеративних процесів при дефектах кісткової тканин альвеолярного відростка експериментальних тварин, та може бути використана для хірургічного лікування кісткових дефектів в щелепно-лицьовій хірургії, ортопедії, травматології.

Відома широка поширеність генералізованого пародонтиту як в Україні, так і в усьому світі, який займає одне з провідних місць серед стоматологічних захворювань. Це є не тільки медичною, але й соціальною проблемою, значимість якої визначається високою поширеністю, тяжкістю перебігу, негативним впливом на організм в цілому, і погіршенням якості життя людини.

За даними різних статистичних джерел, до 85 % дорослого населення страждають хворобами пародонту різних ступенів тяжкості. Сучасна стоматологічна наука припускає комплексний підхід до лікування, в якому найважливішу роль відіграють хірургічні методи. Однак відсоток невдач при використанні традиційної терапії потребує пошуку і розробки нових, більш ефективних методик.

Відомим є спосіб експериментального дослідження процесів регенерації кісткової тканини [Орлов А.А., Сабурин І.Н., Рєпін В.С., Новикова Н.І., Мурашов А.Н., Іванов Д.В., Горєлик Е.Н. Экспериментальное моделирование 3-D заданного остеогенеза костной ткани на базе аутологичных культур мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток крыс и остеопластических материалов для устранения дефектов кости // Вестник новых медицинских технологий. - 2011. - Т.ХVIII, № 1. - С. 7-11], за яким спрямовану остеоінтеграцію остеопластичного матеріалу "ХРОНОС" (3-D остеогенез кісткової тканини) здійснювали на базі аутологічної культури мультипотентних мезенхімальних стромальних клітин, вирощених на остеоіндуктивному матриксі. Ділянкою втручання в експериментальних тварин (щурі) вибрано кісткову тканину кута нижньої щелепи та міжфасціальний простір міжлопаткової області в межах субкутиса гіподерми.

Недоліком цього способу хірургічного втручання в ділянці кута нижньої щелепи є необхідність після розрізу шкіри для візуалізації кута, тіла і гілки нижньої щелепи відсепаровувати товстий прошарок м'язової тканини. Остеопластичний матеріал фіксували металевим дротом, після чого рану ушивали. Високий травматизм такого втручання суттєво позначається на перебігу післяопераційного процесу. Для оцінки шкірної реакції блок остеопластичного матеріалу розташовували у міжфасціальному просторі міжлопаткової області (область гіподерми), що також ослаблює організм тварини, оскільки є вимушеним додатковим втручанням і призводить до підвищеної смертності експериментальних тварин. Спосіб не дає інформації про необхідну кількість клітин для ефективного процесу.

Найбільш близьким та вибраним за прототип є спосіб створення штучного дефекту в кістковій тканині для підсадки матеріалів та дослідження регенераційних процесів [Ярова С.П., Брашкін А.П., Слюсарєв О.О. Экспериментальное обоснование эффективности метода оптимизации регенерации челюстной кости // Вісник стоматології. - 2006. - № 3. - С. 13-18], при якому проводять лінійний розріз у піднижньощелепній ділянці щура для розсікання покривних тканин. Гострим, частково тупим шляхом здійснюють доступ до нижнього краю нижньої щелепи в ділянці прикріплення жувального м'яза, який відсікають і відшаровують до верху, скелетуючи поверхню гілки нижньої щелепи. Твердосплавним бором кістку просвердлюють на всю товщину гілки щелепи для підсадки матеріалів "Остеопласт" та  $\beta$ -трикальційфосфат. Тварин виводять з експерименту на 30 добу. Аналогічну операцію, як контроль, без підсадки матеріалу проводять у тієї ж тварини з протилежного боку.

Недоліком цього способу є те, що спосіб не дає можливості визначити необхідну кількість матеріалу, достатнього для аналізу результатів. У процесі описаної операції значним чином травмуються жувальні м'язи з обох боків щелепи, докорінно порушуючи харчування, що унеможлиблює життєдіяльність тварини до 30 днів. Окрім того, строки біодеградації кісткового матеріалу "Остеопласт" починаються від 120 діб, а у кістково-пластичного матеріалу  $\beta$ -трикальційфосфату - через ще довший термін, тому не вдається достовірно та повною мірою оцінити отриманий результат.

В основу корисної моделі поставлено задачу удосконалення способу експериментального дослідження регенерації кісткового дефекту, в якому за рахунок використання різної кількості клітин та аналізу процесу заживання кісткових дефектів на експериментальних тваринах забезпечити оптимальну кількість матеріалу для відновлення структурних компонентів пародонту.

Поставлена задача вирішується в способі експериментального визначення кількості матеріалу для регенерації кісткового дефекту, який здійснюють шляхом його створення та

підсадки матеріалу, згідно з корисною моделлю, для кісткового дефекту об'ємом  $0,027 \text{ см}^3$  вводять 500 тис. од. стромальних клітин кісткового мозку з колапаном.

Завдяки застосуванню запропонованого способу досягається інформативність визначення кількості стромальних клітин кісткового мозку (СККМ), 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.

Проведення експериментальних досліджень і порівняння структури регенерату тканини, в залежності від кількості клітин при введенні 100 тис., 500 тис. и 1 млн., виявило, що більш оптимальною, фізіологічною, інтенсивною була стимуляція остеогенезу при введенні 500 тис. стромальних клітин кісткового мозку (СККМ) з колапаном для дефекту об'ємом  $0,027 \text{ см}^3$ , так як це створює найбільш сприятливі умови для інтенсивного розвитку остеогенезу, прискорення проліферативних процесів диференціації.

Спосіб, що заявляється, здійснюють таким чином.

Для експериментального підтвердження можливості використання методу тканинної терапії було проведено дослідження впливу аутологічних клітин кролика, отриманих з їх кісткового мозку на загоєння дірчастих дефектів альвеолярного відростка.

Всі тварини утримувались в стандартних умовах віварію Харківської медичної академії післядипломної освіти при відповідному освітленні, на стандартному раціоні харчування. Дослідження проводили згідно з "Загальними етичними принципами експериментів на тваринах", схвалених II Національним конгресом з біоетики (Київ, 2004 р.), які відповідають положенням "Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують для експериментальних та інших наукових цілей" (Страсбург, 1986 г) і нормам Комітету по біоетиці ІПК і КНАН України.

При отриманні первинної культури кісткомозкових стромальних клітин джерелом був кістковий мозок з клубових кісток кроликів. Клітини виділяли механічним шляхом, що полягало в їхньому подвійному вимиванні з кістки за допомогою розчину Хенкса і центрифугування отриманої суспензії при 1000 об./хв. протягом 10 хв. з подальшим видаленням супернатанту і ресуспензуванням осаду в живильному середовищі.

У відповідності з метою і задачами дослідження, експериментальні тварини були розподілені на 5 серійних груп по 4 кролика в кожній. Для отримання кісткового дефекту кроликам, під внутрішньовенним наркозом (0,5 мл тіопенталу), виробляли слизисто-надкисничний розріз в області кута нижньої щелепи, і кулястим бором № 1 проводився дефект кісткової тканини, на всю глибину кортикальної пластинки, розміром  $0,027 \text{ см}^3$ , який, в залежності від серії експерименту, заповнювався наступним чином:

Серія 1 - дефект плюс 100 000 од. СККМ плюс Колапан Л (4 кролі породи Шиншила);

Серія 2 - дефект плюс 500 000 од. СККМ плюс Колапан Л (4 кролі породи Шиншила);

Серія 3 - дефект плюс 1 млн. од. СККМ плюс Колапан Л (4 кролі породи Шиншила).

У кістковий дефект, що утворився, імплантують досліджувану композицію, після чого рану ушивають наглухо. Після оперативного втручання по створенню кісткового дефекту і заповнення його остеопластичною композицією вже через 2-3 доби тварини могли повноцінно брати корм. У всіх тварин відбувалося загоєння післяопераційної рани в області нижньої щелепи первинним натягом протягом 7-10 днів. Ускладнень м'яких тканин і кістки не спостерігалось як в ранньому (до двох тижнів), так і в пізньому (через місяць - півтора) післяопераційному періоді.

По закінченні досліджень тварин виводять з експерименту методом повітряної емболії на 42 і 90 добу.

Виділяють фрагменти щелеп із зоною регенерату. Препарати фіксують в 10 % розчині нейтрального формаліну, проводять декальцинацію в розбавленому в 70 % етиловому спирті мурашиної кислоти, знежирюють і зневоднюють в ацетонах і спиртах наростаючої міцності (від 60 до 96°) і в розчині суміші етилового спирту з діетиловим ефіром (1:1), і заливають в целоїдин. Гістологічні зрізи в сагітальній площині (6-10 мкм) виготовляють на санному мікротомі "Reichert", фарбують гематоксиліном Вейгерта та еозіном, пікрофуксином за Ван-Гизоном.

Мікроскопічні дослідження проводять на світловому мікроскопі "AXIO Star Plus" (Zeiss, Німеччина). На комп'ютерних зображеннях мікропрепаратів підраховують клітинні і тканинні компоненти кісткового дефекту на відрізу 165 мкм і вимірюють їх площі. Для морфометричних показників використовують окуляр і мікрометр "Reichert".

Після введення 100 тисяч од. аутологічних СККМ з колапаном на 42 добу, гістологічні дослідження свідчать про те, що в структурі регенерату починають переважати диференційовані компоненти, а вузькі ділянки некротично зміненої тканини визначаються, як наслідок недостатнього формування мікроциркуляторного русла.

На 90 добу гістологічні дослідження свідчать про збільшення обсягу проліферуючої тканини з переважанням у складі регенерату остеогенних клітинних елементів.

На 42 добу після введення 500 тисяч од. аутологічних СККМ з колапаном процеси перебудови в зоні дефекту нижньої щелепи мають виражений характер. На 42 добу мікроскопічно спостерігається значне збільшення клітинних елементів остеогенного характеру за рахунок періостального остеоутворення, у експериментальних тварин гістотопографічно визначається більш виражений потенціал загоєння дефекту.

На 90 добу після введення 500 тисяч од. аутологічних СККМ з колапаном розвиток остеогенезу має більш виражений характер. Це виражалось в інтенсивному остеоутворенні і відновленні цілісності кістки нижньої щелепи, але з наявністю тих компонентів, які будуть піддаватися остаточній перебудові ще протягом тривалого періоду часу.

На 42 добу після введення 1 млн. од. аутологічних СККМ з колапаном гістологічні дослідження свідчать про уповільнення відновного процесу, пов'язаного із зменшенням обсягу проліферуючої тканини і нерівномірним розподілом клітинних елементів в зоні регенерату, порівняно з цим же терміном при введенні дози 500 тисяч од. СК.

На 90 добу відзначають незначні деструктивні зміни і резорбцію альвеолярного відростка. На окремих ділянках спостерігається активна проліферація камбіальних клітинних елементів періостальної зони і диференціювання їх в остеобласти. У структурі регенерату визначають ділянки з дрібнопетлістою і крупнопетлістою мережею кісткових трабекул, а також добре васкуляризована клітинно-волокниста тканина, що свідчить про інтенсифікацію ангиогенезу.

Але регенерація кісткової тканини при введенні 1 млн. од. СК відбувалася менш фізіологічно, ніж при введенні 500 тисяч од. СК.

Таким чином, введення аутологічних СК з кісткового мозку в кількості 500 тисяч од. в поєднанні з колапаном на 90 добу в зоні регенерату створюють умови для більш інтенсивного розвитку остеогенезу і на цій основі призводить до інтенсифікації проліферативних процесів і процесів диференціації за остеогенним типом.

Найбільш доцільним для відновлення кісткових дефектів об'ємом  $0,027 \text{ см}^3$  є введення аутологічних СК з кісткового мозку в кількості 500 тисяч од. в поєднанні з колапаном, так як це створює найбільш сприятливі умови для більш інтенсивного розвитку остеогенезу, інтенсифікації проліферативних процесів і процесів диференціації в порівнянні з введенням 100 тисяч од. і 1 млн. од. СККМ.

#### ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

Спосіб експериментального визначення кількості матеріалу для регенерації кісткового дефекту, що здійснюють шляхом його створення та підсадки матеріалу, який **відрізняється** тим, що для кісткового дефекту об'ємом  $0,027 \text{ см}^3$  вводять 500 тис. од. стромальних клітин кісткового мозку з колапаном.

---

Комп'ютерна верстка Л. Бурлак

---

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Василя Липківського, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

---

ДП "Український інститут інтелектуальної власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601