Лечение воспалительных заболеваний пародонта с применением комбинированных трансплантатов на основе клеточных культур

И.А.Новикова
зав. терапевтическим отделением СП №7 г. Екатеринбурга

Проблема заболеваний пародонта в настоящее время приобрела особое значение, так как, по данным ВОЗ, пародонтитом страдает более 95% населения старше 45 лет. Это заставляет исследователей пристально заниматься разработкой вопросов диагностики, лечения и профилактики этой патологии. При решении задач комплексного лечения воспалительных заболеваний пародонта особое внимание уделяется хирургическим методам, так как у значительной части больных лишь их применение позволяет добиться ликвидации очагов воспаления, приостановить прогрессирование деструкции альвеолярной кости и, в конечном итоге, обеспечить длительную стабилизацию состояния пародонта. Несмотря на различные модификации и дополнения, сами по себе хирургические вмешательства на пародонте все же не создают достаточных условий для эффективного купирования патологических процессов и восстановления утраченных костных структур альвеолярного отростка. В связи с этим особую актуальность приобретает возможность использования при этих операциях средств, воздействующих на течение репаративного остеогенеза.

При выборе материала для трансплантации авторы, как правило, учитывают ряд факторов, каждый из которых следует рассматривать с позиции пригодности для остеопластики: остеоиндуктивный потенциал, доступность получения материала, безопасность, биологическая совместимость, иммунологическое соответствие, скорость васкуляризации (Edward S. Cohen 1994).

Разнообразие и многочисленность пластических материалов, используемых для восстановления костной ткани при заболеваниях пародонта, в значительной степени говорит скорее

об их недостатках, чем о положительных свойствах.

За последние два десятилетия появилось много сообщений об использовании различных культур клеток, чаще фибробластов, во многих областях медицины. Совершенствование техники культивирования клеток вне организма позволило использовать клеточные культуры в качестве модельных систем для различных фундаментальных и прикладных исследований.

Кроме традиционного применения в вирусологии (при изготовлении вакцин и диагностикумов) фибробласты используются в дерматологии и хирургии (для репарации сухожилий и связок, раневых дефектов и ускорения восстановления кожных покровов после ожогов большой площади). Применение клеточных структур в комбустиологии для ожоговых ран стало возможным вследствие разработки Rheinwald и H. Green (1975 г.) технологии серийного культивирования больших количеств кератиноцитов. Метод Грина получил заслуженное признание при лечении пострадавших с обширными ожогами, у которых имел место дефицит донорских ресурсов кожи.

Подтверждено и прямое положительное влияние выращенных в культуре фибробластов на заживление ран. Д.С. Саркисов и соавт. (1994 г.) успешно пересаживали аллогенные фибробласты человека на гранулирующие раны, образовавшиеся в результате ожогов или на донорских участках после аутодермопластики. При этом использовались методы выращивания клеток на биополимерных пленках (на носителях). Сейчас указанная методика наиболее распространена. Живой эквивалент кожи применяют для закрытия ран, образующихся после удаления невуса или татуировки, лечении буллезного эпидермолиза. Фибробласты применяют также для заживления трофических язв у пациентов с сахарным диабетом.

Механизм воздействия пересаженных аллогенных клеток на раневой процесс до конца не изучен, но в связи с успешным использованием в клинике выращенных аллогенных пластов для закрытия ожоговых ран было высказано предположение о том, что аллогенные кератиноциты могут включаться в состав

формируемого эпидермиса.

Аллогенные фибробласты оказывают непосредственное влияние на заживление ран (Ross, 1968) и на эпителизацию (Coulomb et el, 1989). Известно, что фибробласты могут продуцировать коллагены I и II типов (Varga et al., 1987) и компоненты внеклеточного матрикса: ламинин, нидоген, тинасцин, хондроитин-4-сульфат, протеогликан (Halfter et al., 1990), фибронектин (Matsura, Hakamori, 1985), некоторые факторы роста, а также другие вещества.

В настоящее время имеется значительное число работ, свидетельствующих о большой роли факторов роста в эпителизации ран. Факторы роста – это регуляторные пептиды (тканевые гормоны), вырабатываемые клетками различных типов, которые в значительной степени ускоряют регенераторный процесс. Многие факторы роста продуцируются фибробластами:

1. Основной фактор роста фибробластов (bFGF) положительно влияет на рост всех типов клеток в ране, стимулирует продукцию компонентов внеклеточного матрикса фибробластами (фибронектина и коллагена).

2. Трансформирующий ростовой фактор (TGF-бета) стимулирует хемотаксис фибробластов и продукцию ими коллагена и фибронектина (Kanc C. et al., 1991).

3. Трансформирующий ростовой фактор (TGF-альфа) влияет на ангиогенез (Chen J., et al., 1993). Продуцируемые фибробластами факторы роста могут ускорять восстановление пораженной дермы, что во многом объясняет стимулирующее воздействие аллогенных клеток на заживление ран.

В пародонтологии опыт применения клеточных структур незначителен.

О положительном эффекте лечения пародонтита с использованием культуры аллофибробластов, полученной из дермы плодов человека, недавно заявили отечественные исследователи (В.П. Туманов с соавт., 1998 г.). Данными авторами был разработан новый способ лечения воспалительно-деструктивной формы пародонтита с использованием культуры аллофиб-

робластов человека, заселенных на твердую мозговую оболочку.

В своей диссертационной работе "Использование культивированных аллофибробластов в комплексном лечении заболеваний пародонта" Г.С. Рунова на основании полученных экспериментальных данных убедительно показала эффективность разработанного оригинального метода лечения хронического пародонтита при использовании культивированных аллофибробластов и твердой мозговой оболочки.

Преимущество данного способа лечения пародонтита заключается в том, что в раневом ложе при имплантации ТМО и аллофибробластов не происходит так называемого процесса биодеградации плодного материала и культивированных аллофибробластов, а имплантант встраивается в костный дефект и трансформируется в дальнейшем в грубоволокнистую костную ткань альвеолярных отростков. Культивированные аллофибробласты постоянно выделяют основной фактор роста (в FGF), формируют экстрацеллюлярный матрикс, фибронектин и другие вещества, которые способствуют активации процессов ангиогенеза и дальнейшего остеогенеза.

Анализ экспериментальных и клинических данных, проведенных автором, позволил сделать заключение, что применение трансплантата твердой мозговой оболочки с аллофибробластами при лечении хронического генерализованного пародонтита средней и тяжелой степени имеет ряд преимуществ перед другими способами лечения: процессы регенерации тканей пародонта, в т.ч. костной происходят более интенсивно, чем при трансплантации синтетических материалов.

2. Данные клинических наблюдений продемонстрировали, что эффективность метода выше при лечении пародонтита с равномерной и лакунарной резорбцией, по сравнению с равномерной и горизонтальной атрофией альвеолярного отростка.

3. Доказано, что предложенные трансплантаты могут быть использованы при значительной протяженности дефекта (от 5

до 8 зубов) за счет эластичности и упругости материала.

4. Предложенная методика не приводит к увеличению ретракции десны в отдаленные сроки (до 3-х лет).

Вызывают интерес работы, проводимые в ЦНИИ стоматологии, в отделении пародонтологии, возглавляемом д.м.н., профессором А.И. Грудяновым.

Для хирургического лечения воспалительно-деструктивных форм пародонтита использовались препараты фирмы "Geistlich" Bio-OSS, Bio-Gide. В ходе оперативного лечения на этапе внесения остеопластического материала использовали взвесь клеток линии М-22 – линии диплоидных фибробластов кожи и мышц эмбриона человека.

Препарат Bio-OSS является неорганической матрицей из бычьей кости, из которой удалены практически все органические компоненты. Bio-Gide – это двухслойная мембрана, состоящая из свиного коллагена 1 и 3 типов, который отличается высокой степенью биосовместимости. В отличие от других резорбируемых барьеров, эта мембрана сохраняет эффективный клеточно-обтурирующий барьер в течение 4 месяцев. Это длительное время резорбции является определяющим фактором для завершения костной регенерации. Материал Bio-Oss в сочетании с мембраной Bio-Gide были использованы при хирургическом лечении пародонтальных дефектов глубиной 6-10 мм у 42 человек с пародонтитом умеренной и тяжелой степени. Перед применением гранулы Bio-Oss пропитывали взвесью клеток линии М-22 и помещали в костные дефекты. В дальнейшем, при клиническом наблюдении пациентов контрольной группы, в оперированном участке выявлялась стабильная ремиссия к сроку 3 мес. и сохранялась дальше до 6 мес. (максимальный срок наблюдения). Рентгенологически было выявлено формирование новых костных структур, исчезновение или резкое снижение остеопороза, увеличивалась четкость контуров кости. Глубина пародонтальных карманов уменьшалась в среднем на 5,3+0,6 мм при среднем исходном значении 8,7+1,3 мм. Рецессия прикрепленной десны в среднем не превышала 1,5+0,5 мм.

Применение в хирургической пародонтологии культивированных аллофибробластов в качестве оптимизаторов раневого заживления обусловлено высокой терапевтической эффективностью фибробластов: стимуляцией ими белкового синтеза, выделением факторов роста и усилением регенерации тканей. Влияние трансплантации аллофибробластов можно сравнить с действием основного фактора роста фибробластов (bFGF) на процессы регенерации – это ускорение процессов ангиогенеза, пролиферации эндотелиоцитов капилляров, их миграцию в коллаген.

В настоящее время существует следующая модель взаимодействия основного фактора роста фибробластов с клетками и матриксом. Фактор роста (bFGF) связывается с протеогликанами, содержащими гепарин-сульфат, последующий может диффундировать через строму к клеткам - мишеням и связываться со специфическими рецепторами клеток. В отличие от других факторов роста, таких как тромбоцитарный фактор роста, эпидермальный фактор роста, фактор роста фибробластов (bFGF) может стимулировать in vitro и in vivo пролиферацию всех типов клеточных элементов, вовлеченных в процесс заживления.

Нами была разработана технология лечения воспалительных заболеваний пародонта на основе клеточных культур. В качестве культуры фибробластов мы использовали авторский штамм диплоидных клеток легкого эмбриона человека ЛЭЧ-4 (81).

В связи с тем, что при хирургическом лечении заболеваний пародонта требуется применение остеопластических материалов для восстановления утраченных структур, нами была отобрана группа отечественных материалов. Мы остановили свой выбор на остеопластических препаратах, содержащих в своем составе коллаген и гидроксиапатит.

Выбор этих материалов не был случайным. Использование коллагеносодержащих материалов обусловлено последующим включением ксеногенного коллагена в строящийся костный матрикс. Применение гидроксиапатита является право-

мочным в связи с тем, что гидроксиапатит участвует в минеральном обмене организма, активируя механизм регенерации пораженной костной ткани.

Нами была проведена оценка способности фибробластов к росту и размножению на поверхности синтетических материалов отечественных фирм-производителей: 1).Колапол КП-2М, 2).Колапол КП-3, 3).Гапкол, 4).Гапкол-Л, 5).Гапкол-М, 6).Коллапан-Л(гранулы, пластины), 7).Стимул Осс, 8).Грантпласт (гранулы, пластины).

Испытуемый материал помещали в стерильный пенициллиновый флакон, затем туда же вносили суспензию культивируемых фибробластов человека ЛЭЧ-4 (81) в концентрации 60000-80000 клеток в 1 мл.

О качестве испытуемых образцов судили по динамике формирования клеточного монослоя, появлению дегенеративных изменений в клетках.

Анализ результатов проведенного экспериментального исследования активности фибробластов, культивируемых in vitro с различными видами остеопластических материалов, показал, что наиболее пригодными для создания композиции являются препараты “Гапкол” и “Коллапан”, которые мы использовали в качестве носителей аллофибробластов.

Следующая задача, которую мы решали при разработке условий получения комбинированного тканевого трансплантата, – это исключение цитотоксического воздействия на клеточный субстрат антисептических препаратов, используемых при хирургическом лечении заболеваний пародонта. Клеточные культуры высоко чувствительны к применяемым в практике местного лечения ран антисептикам. Наиболее токсичными для культивируемых клеточных пластов являются галогенсодержащие антисептики и окислители (Б.А. Парамонов). Мы провели определение токсичности используемых антисептических препаратов – 0,05% р-ра хлоргексидина биглюконата и 0,5% раствора метронидазола.

Для этого остеопластический подсадочный материал (“Гап-

кол", "Коллапан") замачивали в растворе антисептика, после чего раствор сливали, отмывали свежими порциями среды Игла три раза по 10 минут. Отмытый остеопластический препарат помещали в стерильный культуральный сосуд, куда вносили подготовленную взвесь клеток фибробластов. В качестве среды роста использовали среду Игла-МЕМ с добавлением 10% эмбриональной сыворотки крови крупного рогатого скота. pH среды роста =7,2-7,4. Сосуд помещали в термостат при температуре 35-37° С на 48-72 часа. Было установлено, что данные антисептические препараты не оказывали токсического действия на клеточную культуру. Отмечено прикрепление клеток к субстрату и их хороший рост.

Полученные экспериментальные данные позволили нам разработать технологию лечения воспалительных заболеваний пародонта на основе клеточных культур. Данную методику использовали для пластики пародонтальных костных карманов при хирургическом лечении воспалительных заболеваний пародонта, что позволило обеспечить лечебный эффект за счет стимулирующей активности клеточного компонента, способствующего сокращению сроков заживления раневой поверхности, подавления воспалительных реакций; снизить выраженность постоперационной ретракции десны и обеспечить увеличение сроков ремиссии хронического заболевания.

Для оперативных методов лечения заболеваний тканей пародонта под проводниковым или инфильтрационным обезболиванием рассекали межзубные сосочки, отслаивали слизисто-надкостничный лоскут с последующей его деэпителизацией. Удаляли зубные отложения, грануляции, сглаживали альвеолярный отросток, рану промывали антисептическим раствором(0,05% р-ром хлоргексидина, либо 0,5% р-ром метронидазола). Костный дефект полностью заполняли комбинированным клеточным трансплантатом. Слизисто-надкостничный лоскут укладывали на место. Лоскут фиксировался в каждом межзубном промежутке. В послеоперационный период пациентам назначали противовоспалительные, десенсибилизирующие, антигистаминные, общеукрепляющие препараты. Швы снимали

на 5-7 сутки. Перед проведением операции каждому пациенту производилась санация ротовой полости, по показаниям антибактериальная терапия, местная противовоспалительная терапия, функциональное пришлифовывание, временное шинирование, индивидуальное обучение гигиене полости рта. У всех больных, которым применяли хирургическое лечение с использованием комбинированного аллотрансплантата в сроки до 30 дней уменьшались пародонтальные карманы, прекращалась кровоточивость десен, слизистая оболочка приобретала бледно-розовый цвет. Стабильная ремиссия в оперированном участке выявлялась к сроку 3 месяца и сохранялась дальше. Результаты, полученные в процессе хирургического лечения пациентов с воспалительно-деструктивными заболеваниями пародонта с применением комбинированного клеточного трансплантата выглядят многообещающими, поэтому мы считаем целесообразным провести более длительные исследования по данному препарату и оценить его эффективность в комплексном лечении пародонтита.