

На правах рукописи

Магомедов Раджаб Низамиевич

**КЛИНИКО-ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА
ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ
ПРИ ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ПАЦИЕНТОВ С
ВОСПАЛИТЕЛЬНО-ДЕСТРУКТИВНЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ
ПАРОДОНТА**

14.01.14 – стоматология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2019

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор

Зорина Оксана Александровна

Научный руководитель:

кандидат медицинских наук

Васильев Андрей Вячеславович

Официальные оппоненты:

Амхадова Малкан Абдрашидовна - доктор медицинских наук, доцент, Государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им.М.Ф. Владимирского», факультет усовершенствования врачей, заведующая кафедрой хирургической стоматологии и имплантологии.

Румянцев Виталий Анатольевич – доктор медицинских наук, профессор, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Тверской государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, заведующий кафедрой пародонтологии.

Ведущая организация:

Академия постдипломного образования Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства России».

Защита состоится «19» декабря 2019 г. в 10-00 часов на заседании Диссертационного совета (Д 208.111.01) при Федеральном государственном бюджетном учреждении «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 119021, Москва, ул. Тимура Фрунзе д. 16 (конференц-зал).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.cniis.ru Федерального государственного бюджетного учреждения «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно – лицевой хирургии» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Автореферат разослан _____ 2019г.

Ученый секретарь

Диссертационного совета,

кандидат медицинских наук

Гусева Ирина Евгеньевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования

На протяжении длительного времени восстановление дефектов костной ткани является задачей стоматологии, не теряющей своей актуальности [Грудянов А.И. и др., 2017]. Многочисленные научные публикации последнего десятилетия, посвященные поиску новых и совершенствованию известных остеопластических материалов для восстановления дефектов костной ткани, свидетельствуют о значимости и востребованности данного направления научных исследований [Бубнов А.С. и др., 2014; Кузнецова В.С. и др., 2017; Artzi Z. et al., 2019].

С целью стимуляции образования кости широко используются различные остеопластические материалы. В экспериментальных и клинических исследованиях показано, что основным критерием выбора наиболее подходящего материала для остеопластики является эффективность и качество его остеоинтеграции [Васильев А.В. и др., 2018; Кулаков А.А. и др., 2010; Ленев В.Н. и др., 2016; Ломакин М. и др., 2018].

Участие в регенерации костной ткани большинства остеопластических материалов основывается на их способности обеспечивать остеокондукцию, т.е. выполнять роль матрицы и опоры для остеогенных клеток, имеющих в ближайшем окружении костного дефекта. Однако большинство остеокондуктивных материалов не обладают достаточными способностями к прогнозируемой стимуляции неоостеогенеза, особенно у пациентов с воздействием различных неблагоприятных факторов, в том числе физиологических и наследственных [Бухарова Т.Б. и др., 2018; Kujmaoja, E. et al., 2016].

Таким образом, актуальной задачей стоматологии является оптимизация регенерации при устранении костных дефектов у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом (ХГП) на основе применения современных

остеопластических материалов. На этом основании была сформулирована цель исследования.

Степень разработанности темы исследования

Разработка биоматериалов, замещающих патологически измененные ткани, – одна из самых перспективных медицинских задач, а возможность закрытия костных дефектов при воспалительно-деструктивных процессах в тканях пародонта позволяет создать условия для заживления и стойкой ремиссии пародонтита [Павленко А.В. и др., 2015; Луцкая И.К. и др., 2016]. В настоящее время продолжается поиск материалов, с одной стороны имитирующих структуру гидроксиапатита костной ткани человека, а с другой – способствующих образованию нового костного матрикса. В пародонтологии применяются материалы на основе фосфатов кальция – аналогов минеральной составляющей костной ткани, и их эффективность неоднократно была проверена в независимых исследованиях [Araújo M.V. et al., 2010; Gomes N.R. et al., 2019; Xu A.T. et al., 2019]. В отечественной стоматологии относительно недавно появились различные формы костнопластических материалов, рекомендованных для восстановления костных дефектов. Их свойства еще мало изучены *in vitro* и *in vivo*, что может служить поводом для недоверия практикующих врачей к таким материалам и требует комплексных сравнительных исследований [Tattulo M., 2017].

Цель исследования: повышение эффективности хирургического лечения воспалительно-деструктивных заболеваний пародонта на основе применения современных костнопластических материалов.

Задачи исследования

1. Изучить цитотоксические свойства остеопластических материалов на основе ксеногенного гидроксиапатита, коллагенового гидрогеля, β -трикальцийфосфата, коллагеновой губки. Их влияние на клеточную пролиферацию и дифференцировку, способность к адгезии *in vitro* в культуре мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток.

2. Оценить клиническую эффективность хирургического лечения с применением различных остеопластических материалов в ближайшие и отдаленные сроки после оперативного вмешательства.

3. Изучить динамику остеотропных медиаторов в ротовой жидкости у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней и тяжелой степени в отдаленный период после остеогингивопластики с применением различных костнопластических материалов.

4. Изучить изменение баланса между маркерами остеорезорбции и остеосинтеза на системном уровне в сыворотке крови у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней и тяжелой степени в отдаленный период после остеогингивопластики с применением различных костнопластических материалов.

5. Обосновать выбор костнопластических материалов при проведении остеогингивопластики у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней и тяжелой степени с учетом стоматологического статуса и особенностей костного гомеостаза и факторов риска остеопороза.

Научная новизна

Впервые установлено, что костнопластические материалы на основе ксеногенного гидроксиапатита оказывают цитотоксическое воздействие на мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из пульпы выпавших молочных зубов по сравнению с клетками, выделенными из жировой ткани, где цитотоксического эффекта не наблюдалось.

Впервые доказано, что баланс между остеорезорбцией и остеогенезом на органном уровне смещается в сторону активации остеопластических процессов (повышение остеопротегерина и остеокальцина на фоне снижения sRANKL и β -CrossLaps в крови) у пациентов с ХГП независимо от тяжести заболевания и периода отдаленного наблюдения при использовании костнопластических материалов на основе ксеногенного гидроксиапатита.

Впервые получено теоретическое обоснование данных для разработки тактики выбора костнопластического материала при проведении

остеогингиволастики у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней и тяжелой степени с учетом исходной глубины пародонтальных карманов, числа стенок внутрикостного дефекта пародонта, наличия или отсутствия факторов риска (пола, возраста, постменопаузы у женщин) и изменений концентрации остеомаркеров β -CrossLaps и sRANKL в сыворотке крови.

Впервые установлены критические уровни и направленность изменений для маркеров остеорезорбции sRANKL (выше 0,48 пмоль/л) и β -CrossLaps (выше 0,795 нг/мл) в крови, свидетельствующих о высокой активности остеорезорбции костной ткани альвеолярного отростка (части).

Впервые доказана информативность определения концентрации в ротовой жидкости остеомедиаторов остеопротегерина, sRANKL, костной изоформы щелочной фосфатазы для сравнительного анализа эффективности различных костнопластических материалов при хирургическом лечении пародонтита.

Теоретическая и практическая значимость

В ходе эксперимента определены особенности восстановления костных дефектов различными остеопластическими материалами.

Для практического здравоохранения конкретизированы показания по применению остеопластических материалов при проведении хирургического лечения пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом.

На основании полученных цитологических, клинических и лабораторных методов определена эффективность костнопластических материалов при хирургическом лечении хронического генерализованного пародонтита.

Впервые на основании клинико-рентгенологических и биохимических исследований выявлены показания и разработаны практические рекомендации по применению различных остеопластических материалов при проведении хирургических вмешательств у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом.

Предложена математически обоснованная формула выбора костно-пластического материала при хирургическом лечении хронического генерализованного пародонтита в зависимости от индивидуальных показателей остеомаркеров. Даны практические рекомендации по её использованию.

Методология и методы исследования

Диссертация выполнена в соответствии с методическими принципами и правилами доказательной медицины. Работа включает экспериментальный и клинический разделы. Используются культуральные, клинические, рентгенологические, биохимические и статистические методы исследования.

Объектом при экспериментальном исследовании и оценке цитотоксичности и клеточной адгезии костнопластического материала были культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), полученные из подкожной жировой клетчатки - AD-MSC (adipose tissue-derived mesenchymal stem cells) - и пульпы выпавших молочных зубов - SHED (stem cells from human exfoliated deciduous teeth).

Предмет при клиническом исследовании – изучение костнопластических композиций, биохимических остеомаркеров ротовой жидкости пациентов с ХГП в возрасте 35-65 лет.

Для статистического анализа применяли точный критерий Фишера для небольших выборок при оценке различия долей, U критерий Манна–Уитни, t критерий Стьюдента, метод ранговой корреляции Спирмана, метод кросс-табуляции, одно- и многофакторный дисперсионный метод, ROC-анализ, метод логистической регрессии.

Положения, выносимые на защиту

1. Остеопластические материалы из ксеногенного гидроксиапатита оказывают цитотоксическое воздействие на мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК), выделенные из пульпы выпавших молочных зубов, и не вызывают гибели клеток, выделенных из подкожного липоасpirата. Наилучшая цитосовместимость отмечается у материалов на основе коллагенового гидрогеля.

2. При хроническом генерализованном пародонтите средней и тяжелой степеней положительные изменения клинических параметров и показателей костного метаболизма с ограничением активности остеокластов и повышением деятельности остеобластов максимально выражены при проведении остеогингивопластики с применением остеопластического материала «Индост Гранулы», менее выражены - при применении «Индост Гель» и не наблюдаются в случае применения «Индост Губка».

3. У пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней и тяжелой степени исходное состояние активности процессов остеорезорбции в организме определяет выбор костнопластического материала для остеогингивопластики.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов подтверждается достаточным количеством экспериментальных групп и сроков наблюдения *in vitro*, а также достаточным количеством пациентов группы исследования (n=105), использованием современных методов обследования пациентов (клинических, рентгенологических, биохимических), методов статистической обработки данных, адекватных поставленным задачам. Добровольное участие пациентов в исследовании подтверждалось их письменным согласием.

Основные положения диссертации доложены, обсуждены и одобрены на: XV Всероссийском стоматологическом форуме выставке-ярмарке «Дентал-Ревю» (г. Москва, 12 – 14 февраля 2018); IX научно-практической конференции молодых ученых «Современные научные достижения в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» (г. Москва, 25 мая 2018 г.); X Научно-практической конференции молодых ученых «Научные достижения современной стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» (г. Москва, 30 мая 2019 г.)

Апробация диссертационной работы состоялась «01» июля 2019 г. на заседании отделения хирургической стоматологии, отделения клинической и экспериментальной имплантологии, отделения терапевтической стоматологии, отделения пародонтологии, отделения профилактики стоматологических

заболеваний ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» Минздрава России.

Внедрение результатов исследования

Результаты настоящего исследования внедрены в клиническую практику отделения терапевтической стоматологии ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» Минздрава России и в лекционные курсы для ординаторов по специальности «Стоматология хирургическая» ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» Минздрава России.

Личный вклад автора в выполнение работы

Автором лично проведен подробный анализ современных литературных данных по теме исследования, определена актуальность проблемы, сформулированы цель и задачи исследования. Исследования *in vitro* на клеточных культурах о токсичности и совместимости материалов автор выполнял собственноручно. Автор самостоятельно разработал алгоритм отбора пациентов для участия в исследовании и проводил стоматологическое обследование пациентов, анализ динамики результатов клинических и биохимических исследований. Лично автором была проведена статистическая обработка результатов исследования, их систематизация, подготовка материалов диссертации, публикации научных материалов и докладов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует шифру и формуле паспорта научной специальности 14.01.14 – стоматология; области исследований согласно пунктам 2, 6; отрасли наук: медицинские науки.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 6 научных работ, из них 6 – в журналах, рекомендованных ВАК для защиты по специальности 14.01.14 - «Стоматология».

Объем и структура работы

Диссертационная работа изложена на 165 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, включая обсуждение результатов исследований, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы. Список литературы содержит 237 источников, из них 55

отечественных и 182 зарубежных авторов. Диссертационная работа содержит 28 таблиц и иллюстрирована 45 рисунками.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Для проведения экспериментального исследования для оценки цитосовместимости были отобраны следующие материалы: «Bio-Oss» (Geistlich, Швейцария); «Индост Гранулы» (Полистом, Россия); «БиопластДент» (Владмива, Россия); «Индост Гель» (Полистом, Россия) «VISCOLL» (Viscoll-PC-100, ИМТЕК, Россия); «Трикафор» (Бионова, Россия) «Индост Губка» (Полистом, Россия). Для изучения цитотоксичности материалов использовали культуры мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток, полученные из подкожной жировой клетчатки – AD-MSC (adipose tissue-derived mesenchymal stem cells) и пульпы выпавших молочных зубов – SHED (stem cells from human exfoliated deciduous teeth). Культуры клеток были ранее получены и охарактеризованы в лаборатории генетики стволовых клеток ФГБНУ «Медико-генетический научный центр».

Для изучения цитотоксического действия образцов материала использовали МТТ-тест – метод оценки количества живых клеток в пробе, основанный на способности сукцинатдегидрогеназы митохондрий восстанавливать светло-желтый МТТ тетразолиум (3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолиум бромид) до нерастворимого темно-окрашенного формазана, а также метод окраски трипановым синим, основанный на способности трипанового синего проникать сквозь поврежденную мембрану некротизированных клеток. Фотосъемку осуществляли в проходящем свете на микроскопе Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с камерой AxioCam MRc 5 (D). Для изучения цитосовместимости материала анализировали адгезию клеток на поверхности носителей. Образцы матриц «заселяли» клетками, предварительно мечеными витальным флуоресцентным красителем РКН-26. Клетки на носителях культивировали при стандартных культуральных условиях, меняя ростовую среду каждые 3–4 суток. Для анализа использовали

люминесцентный инвертированный микроскоп Axio Observer.Z1 (Carl Zeiss, Германия) с камерой AxioCam MRc 5 (D).

Клиническое исследование проводили на базе ФГБУ «ЦНИИС и ЧЛХ» МЗ РФ в период с 2017 по 2019 год. Всего приняли участие 105 пациентов (58 женщин и 47 мужчин) в возрасте от 35 до 65 лет. Из них, в группу контроля вошли 15 практически здоровых лиц без патологии пародонта, у которых выявили значения нормальных показателей остеомаркеров. 90 пациентам был поставлен диагноз K05.31 (хронический генерализованный пародонтит) по МКБ-10. Критерии включения пациентов в группу: 1. Возраст 35-65 лет; 2. Диагноз хронический генерализованный пародонтит; 3. Глубина пародонтальных карманов (ПК) от 4 до 8 мм, что требовало реконструктивного хирургического вмешательства с целью стабилизации пародонтального комплекса. Критерии исключения: 1. Системные заболевания соединительной ткани; 2. Злокачественные заболевания, курсы химиотерапии и лучевой терапии в анамнезе; 3. Острые инфекционные и вирусные заболевания; 4. Поливалентная аллергия; 4. Беременность и лактация; 5. Лица, не понимающие цели исследования и не подписавшие добровольного информированного согласия.

Пациенты с ХГП были разделены на подгруппы со средней степенью – глубина ПК составляла от 4 до 6 мм (n=47) и тяжелой степенью – глубина ПК от 6 до 8 мм (n=43). Измерение глубины пародонтальных карманов проводили при помощи специального CPI металлического зонда в области каждого зуба в 6 точках. Для определения уровня гигиены использовали индекс гигиены Силнесса–Лоэ. Для оценки степени воспаления тканей пародонтального комплекса использовали индекс Мюллемана в модификации Коуэлл. Оценку степени подвижности зубов проводили по шкале Миллера–Флезара при помощи пинцета. Проводили цифровую ортопантомографию и компьютерную томографию на аппарате Orthophos XG 5 («Sirona», Германия), для установления типа деструкции костной ткани и количества сохранных костных стенок. Одностеночные дефекты в исследование включены не были,

поскольку такой дефект имеет самый неблагоприятный прогноз и вопрос о вмешательстве должен решаться индивидуально [Зорина О.А., 2014]. Повторное рентгенологическое исследование оперированной зоны осуществляли в сроки через 8 и 12 месяцев.

Операцию остеогингивопластики проводили по стандартной методике по Видман-Нейману или Рамфьорду. При проведении операции у пациентов 1 группы использовали костнопластический материал на основе коллагенового гидрогеля «Индост Гель», 2 группы – на основе коллагеновой губки «Индост Губка» и 3 группы – на основе ксеногенного гидроксиапатита (ГА) – «Индост Гранулы».

В ротовой жидкости и сыворотке крови определяли остеомаркеры, характеризующие активность остеогенеза и остеорезорбции. Ротовую жидкость собирали в объеме 20 мл утром натощак с 8 до 9 часов. Надосадочную жидкость получали центрифугированием (8000 об/мин в течение 15 мин.). Далее в смешанной слюне с помощью иммуноферментного анализа на анализаторе Lisa ("Эрба Лахема с.р.о.", Чехия) измеряли концентрацию лиганд растворимого активатора фактора нуклеации каппа В (sRANKL), остеопротегерина (ОПГ), костного изофермента щелочной фосфатазы (КЩФ). Концентрацию sRANKL определяли с помощью диагностикумов Ampli-sRANKL (Biomedica, Vienna, Austria), остеопротегерина набором Osteoprotegerin (Biomedica, Австрия), КЩФ с использованием моноканальных наборов Alkphase-B («Metra Biosystems», США). Для статистической обработки использована программа Statistica 12.0 (StatSoft, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Оценка цитосовместимости. По данным МТТ-теста культивирование AD-MSCs в присутствии всех исследуемых материалов сопровождалось отсутствием статистически значимого ($p=0,74$) негативного влияния на относительную выживаемость клеток. Напротив, было отмечено увеличение ($p=0,83$) относительной выживаемости ММСК из подкожного липоасpirата

(AD-MSCs), культивируемых в присутствии водного экстракта «Индост Гель» к концу 1-х суток. Материалы на основе коллагеновых гидрогелей оказывали наименьшую силу воздействия на снижение относительного количества клеток.

Для мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток из пульпы молочных зубов (SHED) было выявлено статистически значимое снижение относительного количества клеток при добавлении к питательной среде водных экстрактов материалов, содержащих ксеногенный гидроксиапатит (Рисунок 1). Так, «Bio-Oss» и «Индост Гранулы» способствовали снижению относительного количества клеток на 1-е, 4-е и 7-е сутки эксперимента, а «Биопласт» – на 7 сутки (Рисунок 1). В то же время, другие материалы без ксеногенного гидроксиапатита не оказывали значимого воздействия на относительную выживаемость SHED (Рисунок 1).

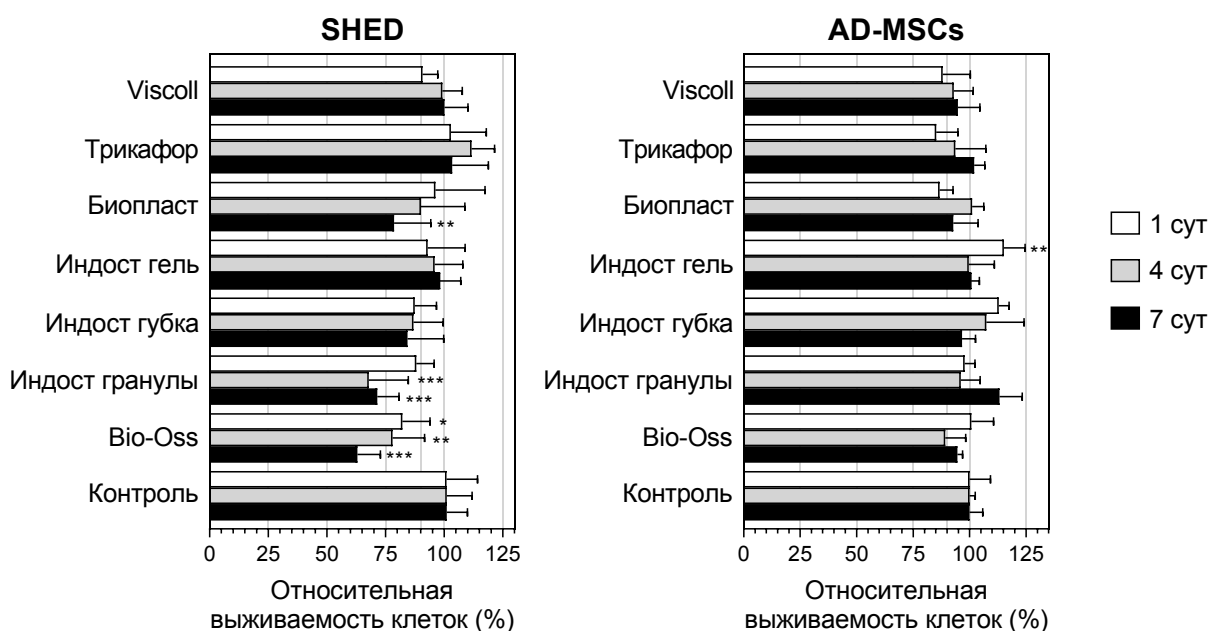


Рисунок 1 – Относительная выживаемость ММСК из пульпы зуба (SHED) и жировой ткани (AD-MSCs) в процессе культивирования с водным экстрактом из исследуемых материалов. МТТ-тест.

Окраска клеточных культур трипановым синим наглядно подтвердила цитотоксическое воздействие содержащих ксеногенный гидроксиапатит костнопластических материалов на SHED. При витальной окраске и РКН-26 было показано, что все исследуемые материалы способствовали клеточной

адгезии, несмотря на выявленный цитотоксический эффект содержащих ксеногенный гидроксиапатит костнопластических материалов на SHED. С первых суток эксперимента клетки распластывались и равномерно распределялись по поверхности материалов, изменяя свою форму с полигональной до вытянутой веретеновидной к 7-м суткам. На твердых материалах в виде гранул и губок к концу 7 и 14 суток наблюдали более выраженное распластывание клеток.

Таким образом, костнопластический материал из ксеногенного гидроксиапатита оказывают цитотоксическое воздействие на мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки, выделенные из пульпы выпавших молочных зубов, и не вызывают гибели клеток, выделенных из подкожного липоаспирата. Наилучшую цитосовместимость показали материалы на основе коллагенового гидрогеля.

По результатам клинического обследования пациентов после операции в сроки через 8 и 12 месяцев наиболее благоприятная ситуация вне зависимости от степени тяжести ХГП отмечалась в подгруппе пациентов с использованием «Индост Гранулы». На втором месте – «Индост Гель», на третьем – «Индост Губка» (Таблицы 1,2).

Таблица 1 - Глубина ПК ($M \pm m$) при ХГП средней степени исходно и через 8 и 12 месяцев с использованием различных остеопластических материалов.

Сроки наблюдения	Глубина ПК у пациентов с ХГП средней степени (мм)		
До операции	4,7 \pm 0,5		
После операции	«Индост Гель»	«Индост Губка»	«Индост Гранулы»
Через 8 месяцев	3,3 \pm 0,2	3,5 \pm 0,3	2,6 \pm 0,1
Через 12 месяцев	2,8 \pm 0,1	3,1 \pm 0,2	2,2 \pm 0,1

Таблица 2 - Глубина ПК ($M \pm m$) при ХГП тяжелой степени исходно и через 8 и 12 месяцев с использованием различных Osteo-пластических материалов.

Сроки наблюдения	Глубина ПК у пациентов с ХГП тяжелой степени(мм)		
До операции	6,9 \pm 0,5		
После операции	«Индост Гель»	«Индост Губка»	«Индост Гранулы»
Через 8 месяцев	5,5 \pm 0,2	5,9 \pm 0,5	4,5 \pm 0,3
Через 12 месяцев	4,8 \pm 0,1	5,1 \pm 0,5	3,4 \pm 0,3

На основании рентгенологических данных до оперативного вмешательства и после него, наиболее выраженную величину по высоте и степени наполненности костных дефектов наблюдали у пациентов с использованием «Индост Гранулы». У пациентов с «Индост Гель» величина по высоте и степени наполненности костных дефектов была менее выражена, отмечались неплотные очаги вновь образованного костного субстрата. У пациентов с материалом «Индост Губка» величина по высоте и степени наполненности костных дефектов была наименее выражена – отмечалась незначительная высота воссозданных стенок, неплотная их композиция на КТ.

Наибольший эффект от материала «Индост Гранулы» в клиническом исследовании, вероятно, был связан с высокими прочностными свойствами гранул гидроксиапатита, что благоприятно влияло на остеокондукцию, по сравнению с менее прочной губкой и гелем. Также это могло быть связано с превалирующим заселением прогениторами остеобластов из окружающей альвеолярный отросток жировой клетчатки, что соотносится с результатами исследования *in vivo* на клеточных культурах.

По результатам биохимического исследования у пациентов при ХГП до операции на системном и местном уровне наблюдались сдвиги костного метаболизма в сторону активации остеокластической резорбции. В работе были установлены точки cut-off или разделительные уровни концентраций остеомаркеров крови, позволяющие определить эффективность дальнейшего лечения. По результатам ROC анализа установлено, что при превышении в сыворотке крови пациентов с ХГП средней и тяжелой степени концентрации sRANKL более 0,48 пмоль/л с диагностической чувствительностью 80% и диагностической специфичностью 85% можно говорить о неэффективности оперативного лечения ХГП. Для концентрации β -CrossLaps в сыворотке крови критический уровень составлял 0,795 нг/мл. Так, при превышении в сыворотке крови пациентов с ХГП концентрации β -CrossLaps более 0,795 нг/мл с чувствительностью 97,5% и специфичностью 75% также существовал риск неэффективности оперативного лечения ХГП.

В первой группе пациентов с костнопластическим материалом «Индост Гель» в ротовой жидкости при исходной средней степени ХГП было выявлено статистически значимое повышение остеопротегерина через 8 и 12 мес. после операции, соответственно, в среднем на 42,1% ($p>0,001$) и 80,4% ($p>0,001$) (Рисунок 2). При этом содержание sRANKL в ротовой жидкости было снижено в среднем на 23,5% ($p=0,05$) и 32,4% ($p=0,017$) (Рисунок 2), что приводило к повышению относительного показателя ОПГ/sRANKL и свидетельствовало о снижении интенсивности резорбции костной ткани. Повышение активности КЩФ в ротовой жидкости после операции через 8 мес. на 36,1% ($p=0,0001$) и 12 мес. на 43,9% ($p<0,0001$) (Рисунок 2) явилось отражением повышения активности остеобластов. Таким образом, проведение остеогингивопластики с костнопластическим материалом на основе коллагенового гидрогеля у пациентов с ХГП средней степени сопровождалось активацией остеогенеза и ограничением активности остеокластов. При тяжелой степени ХГП у пациентов первой группы через 8 мес. после операции активность остеокластической резорбции в пародонте была высокой: после остеогингивопластики ожидаемого прироста остеопротегерина для ограничения активности остеокластов не произошло и активность КЩФ не повышалась (Рисунок 2). Только через 12 мес. произошло благоприятное изменение костного метаболизма: по сравнению с исходными значениями остеопротегерин в ротовой жидкости повысился на 45,2% ($p=0,02$), ограничив концентрацию sRANKL на 36,2% ($p=0,001$), активность КЩФ возросла на 15% ($p=0,005$) (Рисунок 2).

В группе пациентов с применением костнопластического материала «Индост Гранулы» в ротовой жидкости при ХГП средней степени происходило статистически значимое повышение остеопротегерина через 8 мес. и 12 мес. после операции, соответственно, в среднем на 61,8% ($p<0,0001$) и 51,3% ($p=0,0001$) (Рисунок 2). При этом содержание sRANKL в ротовой жидкости снижалось на 30,6% ($p=0,003$) и 36,1% ($p=0,011$) (Рисунок 2), что приводило к 2,5 кратному повышению относительного показателя ОПГ/sRANKL и выраженному ограничению активности остеокластов. Однако при тяжелой

степени ХГП через 8 мес. после операции с использованием гидроксиапатита остеорезорбтивная активность по-прежнему была высокой: несмотря на прирост ОПГ на 33,1% ($p=0,0003$) ограничения активности остеокластов не происходило (Рисунок 3), активность КЩФ не повышалась. Повышение активности КЩФ в ротовой жидкости при средней и тяжелой степени ХГП после операции через 8 мес. в среднем на 12,3% ($p=0,034$) с последующим снижением через 12 мес. на 38,9% ($p=0,001$) (Рисунок 3) свидетельствовало о превалирующей активности остеобластов, которая сменялась нормализацией и сбалансированностью процессов костного метаболизма. Таким образом, проведение остеогингиволастики с костнопластическим материалом на основе гидроксиапатита у пациентов со средней и тяжелой степенью ХГП сопровождалось эффективной активацией остеогенеза и ограничением активности остеокластов, максимально выраженной через 8 мес. после операции (Рисунок 2). Эффективное ограничение остеодеструктивных процессов в полости рта наблюдалось только через 12 мес. после операции.

При использовании в качестве костнопластического материала коллагеновой губки «Индост Губка» происходили менее выраженные изменения костного метаболизма при средней и тяжелой степени ХГП как на 8, так и на 12 мес. после операции, по сравнению с группами, где использовали «Индост Гель» и «Индост Гранулы» (Рисунок 2).

Таким образом, наиболее выраженное ограничение остеокластической резорбции пародонта наблюдались при использовании в качестве костнопластического материала «Индост Гранулы».

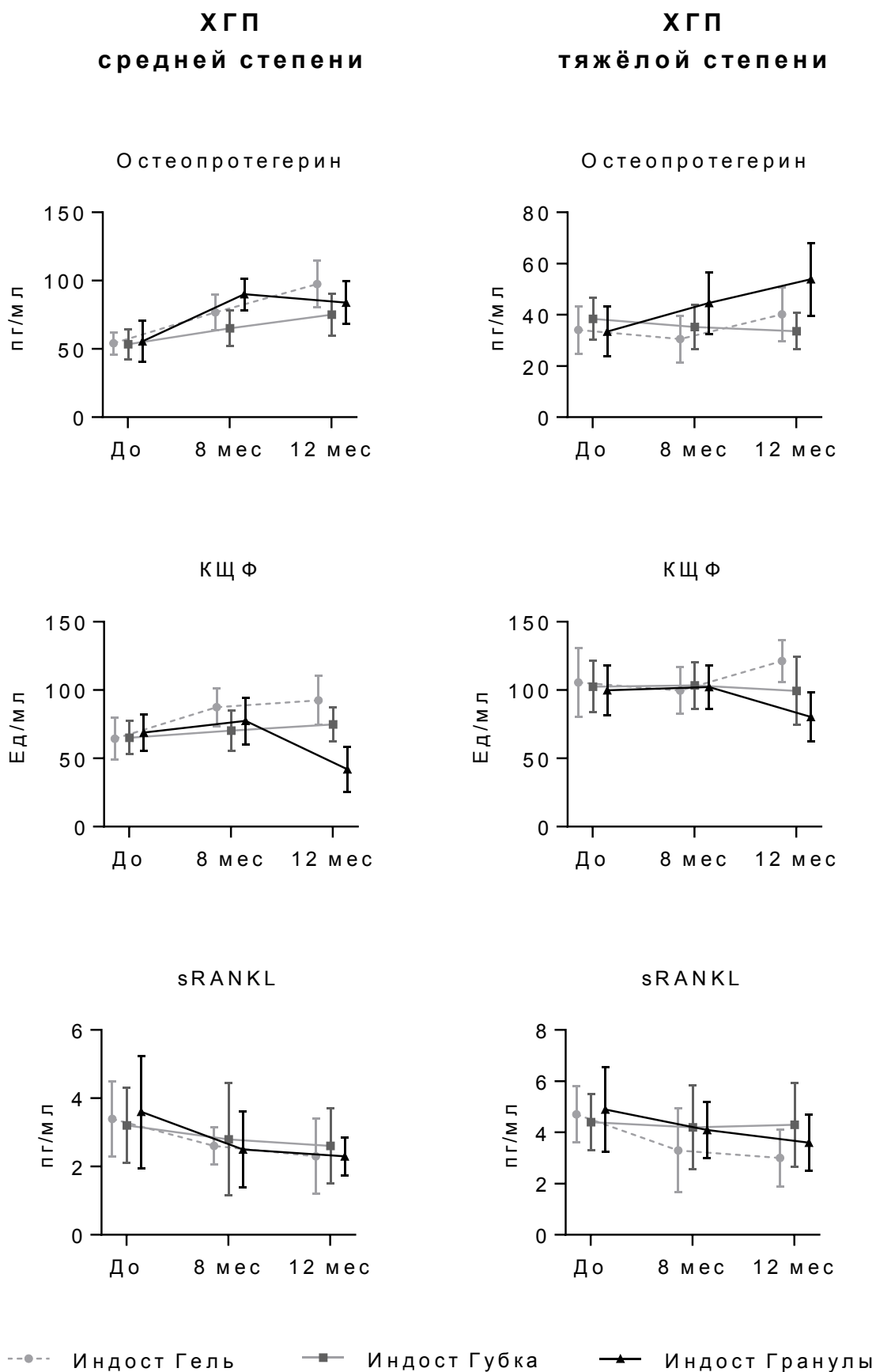


Рисунок 2 - Динамика изменений остеомаркеров ($M \pm SD$) в ротовой жидкости через 8 и 12 мес. после операции относительно исходного уровня при ХГП средней степени и ХГП тяжёлой степени при использовании различных форм костнопластических материалов.

У пациентов исследуемых групп концентрация остеоимедиаторов определялась также и в сыворотке крови. Исходно выраженное снижение остеопротегерина в сыворотке крови при ХГП средней (на 88%) и тяжелой (на 91%) степени наряду с двух- и трехкратным повышением sRANKL по сравнению со здоровыми лицами свидетельствовало об активации остеокластов и усилении остеодеструктивных процессов. Учитывая, что у здоровых лиц возраст и пол, коморбидная соматическая патология не отличались от клинических групп можно сделать заключение, что весомый вклад в нарушение соотношения между остеогенезом и остеорезорбцией в сторону последнего вносило именно воспалительное остеодеструктивное поражение пародонта.

β -CrossLaps представляет собой С-терминальный белковый фрагмент, образовавшийся в результате деградации коллагена I типа и является маркером остеорезорбции [Chen X. et al., 2017]. Концентрация β -CrossLaps в сыворотке крови повышалась как при средней (на 44%), так и при тяжелой (на 56%) степени ХГП. Таким образом, у больных с ХГП до операции на системном уровне наблюдались сдвиги костного метаболизма в сторону активизации остеокластических процессов.

Остеокальцин (ОК) - это неколлагеновый витамин-К-зависимый протеин, участвующий в костеобразовании. Высвобождается остеобластами при остеосинтезе [Kylmaja E. et al., 2016]. При средней степени ХГП концентрация ОК не отличалась от уровня здоровых лиц, а при тяжелой степени снижалась, что свидетельствовало о низкой активности остеобластов при тяжелом поражении пародонта.

При тяжелой степени ХГП по сравнению со средней в крови наблюдалось статистически значимое повышение маркеров остеодеструкции – sRANKL, β -CrossLaps наряду со снижением отношения ОПГ/sRANKL, свидетельствующего о снижении активности механизма, сдерживающего остеорезорбцию. При этом маркер активности остеобластов остеокальцин был снижен в среднем на 32% ($p=0,008$). Повышение КЩФ в крови в среднем на 58% ($p=0,002$) при тяжелом ХГП, по всей видимости, свидетельствовало о повышении активности остеобластов в условиях разрушения кости.

Таким образом, исследование остеомаркеров сыворотки крови при воспалительных деструктивных процессах пародонта информативно отражает тяжесть стоматологического заболевания.

Полученные результаты в динамике позволили установить, что наиболее эффективные изменения костного метаболизма с ограничением активности остеокластов и повышением сывороточных маркеров усиления остеогенеза в организме наблюдались при использовании в качестве костнопластического материала ксеногенного гидроксиапатита «Индост Гранулы» (Таблица 3).

Таблица 3 - Динамика маркеров костного метаболизма в сыворотке крови у пациентов 3 группы «Индост Гранулы» с ХГП после операции

Показатель	До операции	Через 8 мес.	Через 12 мес.
ХГП средней степени			
Остеопротегерин, пмоль/л	1,71±0,5	2,5±0,2*	3,2±0,3* [#]
sRANKL, пмоль/л	0,29±0,02	0,22±0,01*	0,17±0,04*
ОПГ/sRANKL	5,9±0,6	11,2±0,7*	18,6±0,9* ["]
Остеокальцин, нг/мл	27,8±1,1	34,7±1,5*	35,6±2,6*
β-CrossLaps, нг/мл	0,738±0,005	0,587±0,007*	0,549±0,009*
КЩФ, Ед/мл	43,7±1,6	55,1±2,2*	40,3±2,4 [#]
ХГП тяжелой степени			
Остеопротегерин, пмоль/л	1,27±0,2	2,4±0,3*	2,9±0,2* [#]
sRANKL, пмоль/л	0,52±0,04	0,35±0,05*	0,31±0,03*
ОПГ/sRANKL	2,4±0,3	6,9±0,7*	9,2±0,8* [#]
Остеокальцин, нг/мл	20,8±0,4	25,6±1,5*	27,9±1,3*
β-CrossLaps, нг/мл	0,785±0,005	0,684±0,007*	0,636±0,008*
КЩФ, Ед/мл	55,1±1,6	59,8±2,0*	44,2±2,8* [#]

Примечание: * - статистически значимые различия по сравнению с исходными данными при уровне значимости $p=0,05$, установленные с помощью критерия Вилкоксона; ["] - статистически значимые различия между выборочными средними значений через 8 и 12 мес после операции при уровне значимости $p=0,05$, установленные с помощью критерия Вилкоксона

С помощью дискриминантного анализа была разработана модель для индивидуального определения тактики выбора костнопластического материала при хирургическом лечении ХГП средней и тяжелой степени.

В каждое из полученных трех уравнений для функций F1, F2, F3 нужно внести индивидуальные значения показателей пациента и рассчитать три значения F:

$$F1 (\text{губка}) = -1,9 \cdot \text{ПК} + 26,5 \cdot \text{ЧСт} + 0,103 \cdot \text{ФР} + 0,021 \cdot \text{ОРез} - 35,9$$

$$F2 (\text{гидрогель}) = 5,7 \cdot \text{ПК} + 7,6 \cdot \text{ЧСт} - 1,21 \cdot \text{ФР} - 1,32 \cdot \text{ОРез} - 28,6$$

$F3 (GA) = 13,3 * ПК - 11,4 * ЧСт + 1,03 * ФР + 1,04 * ОРез - 39,7$,

где ПК – это глубина пародонтального кармана в мм,

ЧСт – число стенок внутрикостного пародонтального кармана,

ФР – наличие (1) или отсутствие (0) одного или нескольких факторов риска (возраст старше 60 лет, женский пол, постменопауза),

ОРез - наличие (1) или отсутствие (0) превышения концентрации одного или двух маркеров остеорезорбции: β -CrossLaps выше 0,795 нг/мл либо концентрации sRANKL выше 0,48 пмоль/л.

При этом F1 соответствует заключению о рекомендации использования при остеогингивопластике костнопластического материала на основе коллагеновой губки «Индост Губка» (Полистом, Россия), F2 - на основе коллагенового гидрогеля «Индост Гель» (Полистом, Россия) и F3 - основе ксеногенного гидроксиапатита – «Индост Гранулы» (Полистом, Россия).

Полученные значения трех классификационных функций сравнивают между собой и делают вывод в пользу той функции и заключения, при которой полученный F имеет максимальное значение, т.е. дискриминантная мощность является наиболее высокой.

Общая дискриминантная мощность разработанной модели была высокой, поскольку значение F-статистики составило 40,986 при $p < 0,0001$.

Для автоматизированного расчета классификационных функций и выбора стратегии лечения в программе Microsoft Excel был создан файл со встроенными математическими функциями, рабочая область которого представлена на Рисунке 3.

Вносить данные пациента только в желтую область							Заключение :
ПК, мм	Число стенок ПК	ФР	ОРез	Const	F		
-1,9	26,5	0,103	0,021	-35,9			
5,7	7,6	-1,21	-1,32	-28,6			
13,3	-11,4	1,03	1,04	-39,7		Рекомендован КПМ на основе ГА	
7	2	1	1				
-13,3	53,0	0,103	0,021	-35,9	3,9	F1 (губка)	
39,8	15,1	-1,210	-1,320	-28,6	23,8	F2(гидрогель)	
92,7	-22,7	1,030	1,040	-39,7	32,4	F3 (ГА)	
Статистическая значимость модели $F(8,212)=40,986$ $p < 0,00001$							

Рисунок 3 – Рабочая область файла для автоматизированного расчета классификационных функций F1, F2 и F3.

Таким образом, проведенное экспериментальное, клиническое и лабораторное исследование позволило конкретизировать для практического здравоохранения показания по применению остеопластических материалов при проведении хирургического лечения пациентов с ХГП.

ВЫВОДЫ

1. Костнопластические материалы из ксеногенного гидроксиапатита оказывают цитотоксическое воздействие на мезенхимальные стромальные клетки, выделенные из пульпы выпавших молочных зубов, и не вызывают гибели клеток, выделенных из подкожного липоасpirата, в то время как наилучшей цитосовместимостью обладают материалы на основе коллагенового гидрогеля.
2. Выявлена высокая клиническая эффективность хирургического лечения пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом при применении «Индост Гранулы», что подтверждается уменьшением глубины пародонтальных карманов при средней степени с $4,7 \pm 0,5$ мм до $2,6 \pm 0,1$ мм (в среднем на 45%) и $2,2 \pm 0,1$ мм (в среднем на 53%), при тяжелой степени с $6,9 \pm 0,5$ мм (в среднем на 34,%) до $4,5 \pm 0,3$ мм и $3,4 \pm 0,3$ мм (в среднем на 50%) через 8 и 12 месяцев после операции, соответственно. Менее выраженное снижение глубины пародонтальных карманов наблюдается при применении «Индост Гель» и «Индост Губка».
3. Изменения биохимических маркеров костного метаболизма в ротовой жидкости более выражены при лечении ХГП средней степени по сравнению с тяжелой. Среди костнопластических материалов наибольшую способность ограничивать остеокластическую резорбцию показывает материал «Индост Гранулы», который через 12 мес. после операции у пациентов с ХГП средней степени снижает концентрацию sRANKL в ротовой жидкости в среднем на 30,6% наряду с повышением остеопротегерина на 61,8%. Менее выраженные изменения маркеров костного метаболизма в ротовой жидкости выявляются при применении коллагенового гидрогеля «Индост Гель» и наименьшие сдвиги при использовании коллагеной губки «Индост Губка».
4. По данным биохимических исследований сыворотки крови установлен положительный сдвиг баланса между маркерами остеогенеза и остеорезорбции у пациентов с ХГП после хирургического лечения с применением костнопластического материала на основе ксеногенного гидроксиапатита «Индост Гранулы» независимо от степени тяжести заболевания и сроков наблюдения, при применении «Индост Геля» только при средней степени

заболевания и через 8 мес после операции. При использовании костнопластического материала «Индост Губка» изменения остеомаркеров в сыворотке крови после операции отсутствуют.

5. Разработана дискриминантная модель по тактике выбора костнопластического материала при проведении остеогингивопластики у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом средней и тяжелой степени в зависимости от глубины пародонтальных карманов, числа стенок внутрикостного дефекта пародонта, факторов риска (пола, возраста, постменопаузы у женщин), изменений концентрации остемаркеров β -CrossLaps и sRANKL в сыворотке крови.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Для формирования дифференцированного клинического заключения о выборе костнопластического материала при проведении остеогингивопластики у пациентов с хроническим генерализованным пародонтитом необходимо определить глубину и число стенок внутрикостного пародонтального кармана, возраст и пол больного, наличие или отсутствие постменопаузы у женщин, измерить в сыворотке крови концентрации маркеров остеорезорбции β -CrossLaps в нг/мл и sRANKL в пмоль/л.
2. У пациентов с ХГП при глубине пародонтального кармана 5-6 мм, трехстеночных костных дефектах, отсутствии факторов риска (возраст старше 60 лет, женский пол, постменопауза) и превышении в сыворотке крови β -CrossLaps выше 0,795 нг/мл и sRANKL выше 0,48 пмоль/л возможно использование коллагеновой губки в качестве костнопластического материала при остеогингивопластике.
3. У пациентов с ХГП при глубине пародонтального кармана 5-8 мм, двухстеночных костных дефектах, наличии факторов риска и превышении в сыворотке крови β -CrossLaps выше 0,795 нг/мл и концентрации sRANKL выше 0,48 пмоль/л рекомендуется использование при остеогингивопластике костнопластического материала на основе гидроксиапатита.
4. У пациентов с ХГП при глубине пародонтального кармана 7-8 мм, трехстеночных костных дефектах, отсутствии факторов риска и превышении в сыворотке крови β -CrossLaps выше 0,795 нг/мл и концентрации sRANKL

выше 0,48 пмоль/л рекомендуется использование при остеогингивопластике коллагенового гидрогеля.

5. Для оценки эффективности применения костнопластического материала у пациентов с хроническим пародонтитом определение маркеров костного метаболизма необходимо проводить не ранее 8 мес. при средней степени и не ранее 12 мес. при тяжелой степени.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

1. Бухарова, Т.Б. Морфометрические критерии регенерации тканей пародонта / Т.Б. Бухарова, А.В. Васильев, Е.В. Галицына, **Р.Н. Магомедов**, В.С. Кузнецова, О.В. Махнач, О.А. Зорина, Д.В. Гольдштейн // **Клиническая и экспериментальная морфология**. – 2018. – № 4(28). – С. 38-42
2. Васильев, А.В. Цитосовместимость различных костно-пластических материалов с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, полученными из пульпы выпавших «молочных» зубов и подкожного липоасpirата / А.В. Васильев, О.А. Зорина, **Р.Н. Магомедов**// **Стоматология**. –2018. –Т. 97. – № 6-2. – С. 69.
3. Васильев, А.В. Различия цитосовместимости костно-пластических материалов из ксеногенного гидроксиапатита с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, полученными из пульпы выпавших молочных зубов и подкожного липоасpirата / А.В. Васильев, О.А. Зорина, **Р.Н. Магомедов**, Т.Б. Бухарова, Н.Л. Фатхудинова, Е.О. Осидак, С.П. Домогатский, Д.В. Гольдштейн // **Стоматология** – 2018. – №3. – с. 7-13
4. Зорина, О.А. Профилактика послеоперационных осложнений при восстановительных операциях на пародонте у пациентов с хроническим пародонтитом / О.А. Зорина, И.С. Беркутова, А.В. Васильев, **Р.Н. Магомедов**, М.В. Салтовец // **Стоматология для всех**. – 2018. – №4. – С. 6 – 13
5. Зорина, О.А. Диагностическая информативность определения остеомаркеров в сыворотке крови при хроническом генерализованном пародонтите средней и тяжелой степени/ О.А. Зорина, З.М. Абаев, **Р.Н. Магомедов**, В.А. Проходная, Е.С. Максюкова // **Стоматология**. – 2019. - №1. – С. 17 – 20.
6. Магомедов, Р.Н. Изучение динамики показателей костного метаболизма у пациентов с хроническим пародонтитом тяжелой степени. / **Р.Н. Магомедов** // **Стоматология**. – 2019. - №3. – С. 142