

7. Панин А.М., Царев В.Н., Чувилкин С.А. [и др.]. Оценка эффективности применения фторхинолонов для профилактики воспалительных осложнений дентальной имплантации и синус-лифтинга // Российская стоматология. 2010. № 3. С. 17–22.
Panin A.M., Tsarev V.N., Chuvilkina S.A. [et al.]. Effectiveness evaluation fluoroquinolones usages for the prevention of inflammatory complications of dental implantation and sinus lifting // Russian Stomatology. 2010. No. 3. P. 17–22.
8. Страчунский Л.С., Козлов С.Н. Современная антимикробная химиотерапия: рук. для врачей [Электронный ресурс]. URL: <http://www.antibiotic.ru/books/mach/mac1001.shtml> (дата обращения: 01.11.2018).
Strachunskiy L.S., Kozlov S.N. Modern antimicrobial chemotherapy: med. guide [Internet source]. URL: <http://www.antibiotic.ru/books/mach/mac1001.shtml> (date of access: 01.11.2018).
9. Чувилкин В. И., Чувилкина Е. И., Царев В. Н. [и др.]. Антибактериальная профилактика при костно-пластических операциях и дентальной имплантации // Стоматология. 2013. № 3. С. 84–87.
Chuvilkina V.I., Chuvilkina E.I., Tsarev V.N. [et al.]. Antibacterial prophylaxis in osteoplastic operations and dental implantation // Stomatology. 2013. No. 3. P. 84–87.
10. Югай Ю.В. Анализ показателей матричных металлопротеиназ и их ингибиторов до и после дентальной имплантации // Тихоокеанский мед. журнал. 2014. № 3. С. 65–67.
Yugay Yu.V. Analysis of the indicators of matrix metalloproteinases and their inhibitors before and after dental implantation // Pacific Medical Journal. 2014. No. 3. P. 65–67.
11. Buccigrossi V., Nicastro E., Guarino A. Functions of intestinal microflora in children // Curr. Opin Gastroenterol. 2013. No. 29. P. 31–38.
12. Heitz-Mayfield L.J., Mombelli A. The therapy of peri-implantitis: a systematic review // International Journal of Oral and Maxillofacial Implants. 2014. Suppl. 29. P. 325–345.
13. Tillotson G.S. FDA and the safe and appropriate antibiotic use of fluoroquinolones // Lancet Infect. Dis. 2016. Vol. 16, No. 3. P. 11–20.

Поступила в редакцию 18.01.2019.

PROBLEMS OF ANTIBACTERIAL MEDICATIONS USE IN DENTAL IMPLANT PLACEMENT

I.V. Petruk, E.V. Eliseeva, E.A. Poddubny, A.V. Kropotov
Pacific State Medical University (2 Ostryakova Ave. Vladivostok 690002 Russian Federation)

Objective: is to analyze the use of antibacterial medications in dental implant placement.

Methods: The study was performed as a retrospective cross-sectional descriptive study which had been conducting from 2014 to 2017 in dental outpatient clinics of Vladivostok.

Results: We have analyzed 67 patient charts of 15 men and 52 women after dental implant placements and/or bone grafting. We defined 9 regimens of post-operative antibacterial therapy: "Amoxicillin+Clavulanic acid" was prescribed in 56 cases, Amoxicillin – in 3 cases, Ciprofloxacin – in 6 cases, Lincosamides – in 2 cases. The average duration of antibiotics use was 5.6 days.

Conclusions: It is necessary to work toward the reduction of duration of antibacterial therapy in dental implant placement with the possibility of the use of perioperative preventive antibiotics and more reasonable prescription of antibacterial medications.

Keywords: preventive antibiotics, antibacterial therapy, dental implant placement

Pacific Medical Journal, 2019, No. 2, p. 51–54.

© Безушко А.В., Дубовиков А.С., Куликов А.Н., Чурашов С.В., Черныш В.Ф., Блинова М.И., Александрова О.И., Хорольская Ю.И., Гаврилюк И.О., Карпович В.В., Даниличев В.Ф., 2019

УДК 617.713–004.1–089.843:611.814.7–018.1

DOI: 10.17238/Pmj1609-1175.2019.2.54–57

Применение коллагенового скаффолда и амниотической мембраны с культивируемыми стволовыми клетками лимба для устранения лимбальной недостаточности: экспериментальное исследование

А.В. Безушко¹, А.С. Дубовиков¹, А.Н. Куликов¹, С.В. Чурашов¹, В.Ф. Черныш¹, М.И. Блинова², О.И. Александрова², Ю.И. Хорольская², И.О. Гаврилюк¹, В.В. Карпович¹, В.Ф. Даниличев¹

¹ Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова (194044, г. Санкт-Петербург, ул. Академика Лебедева, 6),

² Институт цитологии Российской академии наук (194064, г. Санкт-Петербург, Тихорецкий пр-т, 4)

Цель: сравнительный анализ применения коллагенового скаффолда (КС) и амниотической мембраны (АМ) с культивируемыми лимбальными стволовыми клетками (ЛСК) для устранения лимбальной недостаточности. **Материал и методы.** Исследование выполнено на 40 половозрелых кроликах (80 глаз) породы шиншилла. Все животные были разделены на четыре группы по 10 животных в каждой для проведения двух серий экспериментальных исследований с КС и АМ в качестве носителей ЛСК. После создания модели лимбальной недостаточности и поверхностной кератэктомии в экспериментальных группах применяли КС и АМ с культивированными ЛСК, в контрольных группах – КС и АМ, не содержавшие клеток. **Результаты.** На 90-й день после трансплантации в экспериментальных группах наблюдали заметное повышение прозрачности роговицы. Эпителиальный покров был гладкий, с блестящей поверхностью, не окрашивался флюоресцеином. В контрольных группах регистрировали выраженное помутнение стромы роговицы, ее васкуляризацию, персистирующие эрозии. По результатам импрессионной цитологии и гистологического исследования в экспериментальных группах обнаружен нормальный многослойный неороговевающий эпителий с базальной мембраной, не содержащий бокаловидных клеток. В контрольных группах эпителий содержал бокаловидные клетки, имел различное число рядов, встречались эрозии. **Заключение.** Трансплантация на поверхность роговицы носителей с культивированными ЛСК дает возможность создать их депо, достаточное для восстановления эпителия роговичного фенотипа.

Ключевые слова: лимбальные стволовые клетки, коллагеновый скаффолд, амниотическая мембрана, лимбальная недостаточность

Обновление эпителиального покрова роговицы происходит за счет пула лимбальных стволовых клеток (ЛСК), находящихся в складках палисада Vogt области лимба. Эти клетки также играют важную роль в регенерации роговицы и ее эпителия при повреждениях глазной поверхности [5, 6, 10]. Будучи естественным барьером между роговичным эпителием и конъюнктивой, зона лимба препятствует его нарастанию на роговицу. При снижении функциональной активности ЛСК, их дефиците или полном отсутствии, возникает патологическое состояние, получившее название лимбальной недостаточности. К ее развитию могут привести различные заболевания и повреждающие факторы, вызывающие частичную или полную гибель ЛСК [5, 10]. Клинически это проявляется хроническим воспалением роговицы с рецидивирующими эрозиями и нарастанием конъюнктивального эпителия (конъюнктивизации), помутнением и васкуляризацией роговичной стромы [10, 11]. Такие патологические изменения приводят к формированию фиброваскулярного паннуса (сосудистого бельма), что, в свою очередь, неизбежно связано с прогрессирующим снижением остроты зрения.

Зрительная реабилитация таких пациентов достигается, в основном, с помощью операции оптической кератопластики. Обязательное условие для выполнения этой операции на глазах с лимбальной недостаточностью – предварительное восстановление нормального эпителиального покрова роговицы. Восстановление роговичного фенотипа эпителия может быть достигнуто посредством операции лимбальной трансплантации со второго здорового глаза пациента [7, 11, 15]. При выборе данной методики лечения здоровый глаз-донор лишается достаточно большого сектора лимба, что нежелательно из-за возможности спровоцировать его ятрогенную лимбальную недостаточность.

В литературе имеются сообщения об успешной реэпителизации роговицы посредством трансплантации культивированных ЛСК. Эта методика включает в себя выделение и культивирование *in vitro* аутологических или аллогенных клеток из лимбального биоптата площадью 1–2 мм² [6, 7, 15]. Установлено, что одним из подходящих носителей для культивирования ЛСК может служить амниотическая мембрана (АМ) человека [6, 12, 13]. Кроме того, в литературе описаны исследования по поиску альтернативных носителей культивированных клеток. В этом качестве рассматриваются и материалы на основе коллагена, в частности, коллагеновый скаффолд (КС) [7, 9, 15].

Несмотря на очевидную актуальность проблемы лечения пациентов с ЛН, в нашей стране вопросам культивирования ЛСК посвящены единичные работы. Цель настоящего исследования: сравнительный анализ применения КС и АМ с культивируемыми ЛСК для устранения лимбальной недостаточности.

животные были разделены на четыре группы по десять особей в каждой для двух серий экспериментов. Во всех случаях проводили операцию для создания механической модели лимбальной недостаточности по методике, описанной ранее [3]. На 30-й день после операции иссекали фиброваскулярный паннус (поверхностная кератэктомия) с захватом на 2–3 мм перилимбальной конъюнктивы. На обнаженную строму роговицы трансплантировали культивированные клетки на КС и АМ. Седацию животных выполняли с помощью подкожного введения 0,5 мл 2% раствора ксилазина гидрохлорида. Местная анестезия включала ретробульбарную инъекцию 0,3 мл 2% раствора лидокаина и инстилляцию в конъюнктивальную полость 0,5% раствора проксиметакаина.

Во время операции по созданию модели лимбальной недостаточности иссекали ткань в виде ленты шириной 4 мм (по 2 мм в роговичной и конъюнктивальной зонах лимба) и толщиной 0,2 мм. Выделение клеток из полученных биоптатов выполняли ферментативным способом по методу F. Sefat et al. [14] в собственной модификации [4]. Клетки культивировали в питательной среде ДМЕМ/F12 (Gibco, США), содержащей 10% FBS, при 37°C в атмосфере 5% CO₂ на протяжении одного-двух пассажей, после чего полученную культуру криоконсервировали по стандартной методике и сохраняли при температуре –196°C. Для идентификации выделенных и культивируемых клеток и подтверждения стволового статуса их популяцию фенотипировали до и после криоконсервации с использованием иммуноцитохимии. Идентификацию осуществляли методом непрямой иммунофлуоресценции, применяя антитела против стволовых маркеров (ABC5, ABCG2) и маркеров эпителиальной дифференцировки (цитокератины 3/12, 14). Клетки, использованные в исследовании, обладали высоким пролиферативным потенциалом, имели мезенхимальный фенотип, позитивно окрашивались на стволовые маркеры и цитокератины 3/12, отдельные элементы экспрессировали цитокератин 14. В работе использовали клетки первого пассажа после размораживания.

Для приготовления КС применяли препарат «Коллаген I типа желирующий» (раствор интактного нативного коллагена I типа). Препарат получали методом кислотной экстракции из сухожилий крысиного хвоста [8]. Для приготовления КС смешивали «Коллаген I типа желирующий», концентрированную (10[×]) среду 199 (Gibco, США) и стерильный 0,34N раствор NaOH (Sigma, США). В полученную смесь добавляли суспензию культивированных клеток с достижением конечной концентрации коллагена 2 мг/мл и переносили в лунки диаметром 15 мм в объеме 500 мкл геля на лунку. Гель инкубировали в CO₂-инкубаторе при 37°C в течение 30 мин. до полной полимеризации. После полимеризации в лунке формировался практически прозрачный КС в виде диска толщиной около 2 мм. В лунки добавляли питательную среду. Скаффолд готовили за сутки до имплантации животным.

Материал и методы

Исследование выполнено на 40 половозрелых кроликах (80 глаз) породы шиншилла, весом 2,5–3,5 кг. Все

Нативную АМ получали из плаценты после кесарева сечения в стерильных условиях при добровольном согласии роженицы. Из нее конструировали скаффолды в форме круга площадью 8,5 см² и помещали их на дно чашки Петри. На поверхность АМ высевали клетки в концентрации 6×10⁴ кл./см² и культивировали при 37°C в CO₂-инкубаторе в атмосфере 5% CO₂ в течение суток.

Первая серия экспериментов была направлена на изучение эффективности применения культивированных ЛСК на КС. В этой серии 20 животных были разделены на две группы: экспериментальную и контрольную по 10 особей (20 глаз). После подготовки глазной поверхности в экспериментальной группе КС с культивированными ЛСК трансплантировали на обнаженную строму роговицы (двукратно с интервалом в три дня). В контрольной группе применили КС, не содержащий клеток (также двукратно с интервалом в три дня). После размещения КС фиксировали с помощью бандажной мягкой контактной линзы, а также наложения дополнительно фиксирующей линзы крестообразного шва. Всем животным выполняли простую блефарорафию на 7 дней одним П-образным провизорным швом.

Вторая серия экспериментов была посвящена изучению эффективности трансплантации культивированных ЛСК на нативной АМ. 20 животных были разделены на две группы по 10 особей (20 глаз): экспериментальную с трансплантацией на нативной АМ культивированных ЛСК и контрольную, где применялась только нативная АМ. На подготовленную для трансплантации роговицу укладывали АМ, захватывая на 2–3 мм обнаженную перилимбальную склеру, с фиксацией по краям узловатыми швами 8–0 к эписклере. После этого делали простую блефарорафию на 7 дней одним П-образным провизорным швом.

В послеоперационном периоде всем животным выполняли инстилляцию бесконсервантного 0,3% раствора нетилмицина четыре раза в день в течение 14 дней. Выбор препарата был основан на результатах исследования цитотоксичности глазных капель на клеточных культурах [1, 2]. Клинические изменения, эпителизацию и состояние стромы роговицы оценивали при помощи биомикроскопии. С целью определения фенотипа эпителия роговицы на 90-й день после операции проводили гистологический анализ роговицы и цитологическое исследование методом импрессионной цитологии.

Результаты исследования

На 90-й день после трансплантации культивированных ЛСК в экспериментальных группах отмечали следующие клинические изменения: роговицы были практически прозрачны, регистрировались единичные врастания сосудов в строму. Эпителиальный покров представлялся гладким, с блестящей поверхностью и не окрашивался флюоресцеином. В контрольных группах наблюдали выраженное помутнение стромы роговицы и ее васкуляризацию. Эпителий был шероховат, умеренно отечен

и неравномерно окрашивался флюоресцеином, наблюдались персистирующие эрозии.

Импрессионная цитология показала наличие бокаловидных клеток в роговичном эпителии в контрольных группах у всех животных. В экспериментальных группах бокаловидные клетки обнаружены не были. Гистологическое исследование также не выявило бокаловидных клеток в экспериментальных группах и подтвердило их наличие в контроле. В экспериментальных группах гистологически обнаружен нормальный многослойный неороговевающий эпителий с базальной мембраной, строма имела упорядоченные слои коллагеновых волокон без признаков воспаления. В контрольных группах гистоархитектоника роговиц была нарушена, эпителий на протяжении имел различное число рядов, встречались эрозии. В поверхностных и глубоких слоях стромы наблюдались новообразованные сосуды, тканевый отек и воспалительная инфильтрация.

Обсуждение полученных данных

В нашем исследовании применена общая модель ЛН, при этом использовали различные подложки для трансплантации культивированных ЛСК. В первой серии применяли КС, изготовленный из коллагенового геля, во второй – нативную АМ.

Вышеописанные методы выделения и культивирования клеток области лимба позволяют получить культуру, содержащую ЛСК и способную восстановить эпителий роговичного фенотипа при трансплантации на поверхность роговицы у животных со сформированной лимбальной недостаточностью в эксперименте. Полученные данные сопоставимы с результатами работ Т. Nakamura (2004), V.S. Sangwan (2006), Т. Inatomi (2006) и других исследователей, которые успешно культивировали клетки лимба для использования в лечении пациентов с ЛН [6, 15].

Трансплантация на поверхность роговицы носителей с культивированными ЛСК дает возможность создать их депо, достаточное для восстановления эпителия роговичного фенотипа. Такая методика показала себя эффективной в восстановлении эпителиального покрова роговицы с повышением ее прозрачности и снижением васкуляризации стромы в течение 90 дней. Полученные данные подтверждают результаты экспериментов наших зарубежных коллег, где применялись культивированные ЛСК на различных носителях: амниотической мембране, силикон-гидрогелевой контактной линзе, материалах на основе коллагена и фибрина и др. [1, 2, 7, 8]. В отличие от них мы применяли в качестве носителей не только АМ, но и КС другой конфигурации.

АМ, забираемая из плаценты во время кесарева сечения у здоровых доноров, – наиболее часто используемая подложка при лечении пациентов с ЛН, имеющая ряд преимуществ, включая противовоспалительные, антимикробные и антиангиогенные свойства, которые снижают интенсивность рубцевания [13]. Также АМ

индуцирует выработку нейромедиаторов и факторов роста, которые подавляют неоваскуляризацию роговицы и способствуют регенерации роговичного эпителия. Однако ее применение не лишено недостатков. Получение материала для трансплантации сопровождается дорогостоящими обследованиями доноров на наличие микробных инфекций, а также расходами на его хранение. АМ достаточно трудно подготовить и хирургически манипулировать ею в сравнении с искусственными подложками. Также АМ может быть причиной иммунологического отторжения трансплантированных клеток. По сравнению с АМ искусственные подложки на основе коллагена имеют такие важные свойства, как высокая биосовместимость [9], большая коммерческая доступность, независимость от донора, а также стандартизация изготовления скаффолда. К их недостаткам можно отнести более слабые механические свойства из-за высокого содержания воды, а также достаточно быструю резорбцию за счет действия протеаз. В настоящее время АМ – наиболее часто используемый субстрат в клинических испытаниях на людях, типичные показатели ее долгосрочного успеха варьируются от 60 до 100% [6]. Применение КС в офтальмологии, в свою очередь, не настолько изучено и требует больше исследований *in vivo* и клинических испытаний.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература / References

1. Александрова О.И., Околов И.Н., Хорольская Ю.И. [и др.]. Возможности клеточных технологий для рациональной фармакотерапии глазных патологий // Современные технологии в офтальмологии. 2017. Т. 20, № 7. С. 5–7.
Aleksandrova O.I., Okolov I.N., Khorolskaya J.I. [et al.]. Possibilities of cellular technologies for rational pharmacotherapy of ocular pathologies // Modern Technologies in Ophthalmology. 2017. Vol. 20, No. 7. P. 5–7.
2. Александрова О.И., Хорольская Ю.В., Майчук Д.Ю. [и др.]. Исследование общей цитотоксичности антибиотиков аминокликозидного и фторхинолонового ряда на клеточных культурах // Вестник офтальмологии, 2015. Т. 131, № 5. С. 39–48.
Aleksandrova O.I., Khorolskaya J.V., Maychuk D.Y. et al. Study of the total cytotoxicity of aminoglycoside and fluoroquinolone antibiotics on cell cultures // The Russian Annals of Ophthalmology. 2015. Vol. 131, No. 5. P. 39–48.
3. Безушко А.В., Дубовиков А.С., Куликов А.Н. [и др.]. Модификация механической модели лимбальной недостаточности // Офтальмология. 2018. Т. 1, № 15. С. 51–57.
Bezushko A.V., Dubovikov A.S., Kulikov A.N. et al. Modification of mechanical limbal stem cell deficiency model // Ophthalmology in Russia. 2018. Vol. 1, No. 15. P. 51–57.
4. Колобов К.А., Дубовиков А.С., Конкиева А.В. [и др.]. Об успешном культивировании лимбальных эпителиальных клеток роговичного эпителия в эксперименте // Невские горизонты – 2016: мат. науч. конф. СПб., 2016. С. 497–499.
Kolobov K.A., Dubovikov A.S., Konkieva A.V. [et al.]. About the successful cultivation of corneal epithelium limbal epithelial cells in the experiment // Neva Horizons 2016: Materials of the scientific conference of ophthalmologists. St. Petersburg, 2016. P. 497–499.
5. Черныш В.Ф., Бойко Э.В. Ожоги глаз. Состояние проблемы и новые подходы. СПб.: Бастион, 2008. С. 11–17.
Chernish V.F., Boiko E.V. Eye burns. State of the problem and new approaches. St. Petersburg: Bastion, 2008. P. 11–17.
6. Baylis O., Figueiredo F., Henein C. [et al.]. 13 years of cultured limbal epithelial cell therapy: a review of the outcomes // J. Cell. Biochem. 2011 Vol. 112, No. 4. P. 993–1002.
7. Chae J.J., Ambrose W.M., Espinoza F.A. [et al.]. Regeneration of corneal epithelium utilizing a collagen vitrigel membrane in rabbit models for corneal stromal wound and limbal stem cell deficiency // Acta Ophthalmologica. 2015. Vol. 93, No. 1. P. e57–e66.
8. Chandrakasan G., Torchia D.A., Piez K.A. Preparation of intact monomeric collagen from rat tail tendon and skin and the structure of the nonhelical ends in solution // Journal of Biological Chemistry. 1976. Vol. 251, No. 19, P. 6062–6067.
9. Glowacki J., Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering // Biopolymers 2008. Vol. 89, No. 5. P. 338–344.
10. Haagdorens M., Van Acker S.I., Van Gerwen V. [et al.]. Limbal stem cell deficiency: current treatment options and emerging therapies // Stem Cells International. 2016. Vol. 2016, No. 4. 22 p.
11. Kim K.H., Mian S.I. Diagnosis of corneal limbal stem cell deficiency // Current Opinion in Ophthalmology. 2017. Vol. 28, No. 4, P. 355–362.
12. Meller D., Pires R.T.F., Tseng S.C.G. Ex vivo preservation and expansion of human limbal epithelial stem cells on amniotic membrane cultures // Br. J. Ophthalmol. 2002. Vol. 86, No. 4. P. 463–471.
13. Niknejad H., Peirovi H., Jorjani M. [et al.]. Properties of the amniotic membrane for potential use in tissue engineering // Eur. Cells Mater. 2008. Vol. 15, No. 15. P. 88–99.
14. Sefat F., McKean R., Deshpande P. [et al.]. Production, sterilisation and storage of biodegradable electrospun PLGA membranes for delivery of limbal stem cells to the cornea // Procedia Engineering. 2013. No. 59. P. 101–116.
15. Shortt A.J., Secker G.A., Notara M.D. [et al.]. Transplantation of ex vivo cultured limbal epithelial stem cells: a review of techniques and clinical results // Surv. Ophthalmol. 2007. Vol. 52, No. 2. P. 483–502.

Поступила в редакцию 13.02.2019.

THE USE OF COLLAGEN SCAFFOLD AND AMNIOTIC MEMBRANE WITH LABORATORY-REARED STEM CELLS TO MANAGE LIMBAL DEFICIENCY: EXPERIMENTAL STUDY

A.V. Bezushko¹, A.S. Dubovikov¹, A.N. Kulikov¹, S.V. Churashov¹, V.F. Chernysh¹, M.I. Blinova², O.I. Aleksandrova², Yu.I. Khorolskaya², I.O. Gavrilyuk¹, V.V. Karpovich¹, V.F. Danilichev¹
¹ S.M. Kirov Military Medical Academy (6 Akademika Lebedeva St. Saint Petersburg 194044 Russian Federation), ² Institute of Cytology of the Russian Academy of Science (4 Tikhoretsky Ave. Saint Petersburg 194064 Russian Federation)

Objective: comparative analysis of the use of collagen scaffold (CS) and amniotic membrane (AM) with laboratory-reared limbal stem cells (LSC) to manage limbal deficiency.

Methods: The study was performed on 40 adult rabbits (80 eyes), Chinchilla breed. All animals were divided into four groups of 10 animals each to run two set of experiments with CS and AM as LSC carriers. After creation of a model of limbal deficiency and superficial keratectomy we used CS and AM with laboratory-reared LSC in experimental groups experimental groups, and CS and AM without cells in control groups.

Results: On the 90th days after transplantation we observed a significant increase of corneal transparency in experimental groups. Epithelial surface was smooth, glossy, not stained with fluorescein. In control groups we registered pronounced corneal stroma opacity, its vascularization, persistent abrasions. According to the results impression cytology and histological study we detected normal multilayer non-squamous epithelium with basal membrane not containing goblet cells in experimental groups. In control groups epithelium contained goblet cells, had different number of ranges, abrasions were detected.

Conclusions: Transplantation of carriers with laboratory-reared LSC on the surface of cornea enables to create its repository sufficient to recover epithelium of corneal phenotype.

Keywords: limbal stem cells, collagen scaffold, amniotic membrane, limbal deficiency