

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИКО-
СТОМАТОЛОГИЧЕСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. А.И. ЕВДОКИМОВА»
МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

На правах рукописи

ВОЛОЖИН ГРИГОРИЙ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО
ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОДХОДА
ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕЛЮСТЕЙ**

3.1.7 – Стоматология (медицинские науки)

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени доктора медицинских наук

НАУЧНЫЙ КОНСУЛЬТАНТ:

Заслуженный врач РФ
доктор медицинских наук, профессор
Базикян Эрнест Арамович

МОСКВА, 2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1. Стратегии тканевой инженерии для регенерации костной ткани	25
1.1.1 Генная терапия для регенерации костной ткани	26
1.1.2 Критерии проектирования каркасов для систем доставки генов	27
1.1.3 Биосовместимость и биологическая безопасность материалов для регенерации костной ткани. Будущие перспективы в клинической практике	30
1.2 Применение ангиогенных факторов для обеспечения васкуляризации костных трансплантатов	32
1.2.1 Преваскуляризация костных трансплантатов	33
1.2.2 Рекомбинантные факторы роста в регенерации костных дефектов	35
1.3 Применение стволовых клеток для создания костных моделей	37
1.3.1 Альтернативные источники стволовых клеток	39
1.4 Перспектива клинического применения внутриротовых стволовых клеток в хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии	43
ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1 Дизайн научного исследования	49
2.2 Методы работы <i>invitro</i> с культурами мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из внутриротовых тканей человека	49
2.2.1 Методика получения материала для исследования	49
2.2.2 Методика культивирования стволовых клеток	51
2.2.3 Методика иммунофенотипирования культур фибробластов десны и подсчет колониеобразующих единиц	52
2.2.4 Методика исследования активности щелочной фосфатазы в культурах стволовых клеток	53
2.2.5 Методика определения центров минерализации в культурах стволовых клеток	54
2.2.6 Методика получения изображения клеток	55
2.3 Методики проведения эксперимента на животных по созданию и имплантированию тканеинженерных конструкций	55
2.3.1 Методика получения биопсийного материала у экспериментальных животных для культурального исследования	56
2.3.2 Методика создания композитной тканеинженерных	57

	конструкции на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток	
2.3.3	Методика имплантации композитной тканеинженерной конструкции у экспериментальных животных	58
2.3.4	Методика получения аутопсийного материала для исследования	59
2.3.5	Методика проведения конусно-лучевой компьютерной томографии регенератов костной ткани опытных животных	59
2.3.6	Методика гистологического исследования регенератов костной ткани опытных животных	61
2.3.7	Методика создания тканеинженерной конструкции на основе обогащенного тромбоцитами фибрина и диоксида церия	61
2.3.8	Методика имплантации тканеинженерной конструкции на основе обогащенного тромбоцитами фибрина и диоксида церия у экспериментальных животных	63
2.3.9	Методика иммуногистохимического исследования	64
2.4	Методика исследования экспериментальных животных с имплантацией двухкассетной биоинженерной конструкции	65
2.4.1	Методика создания двухкассетной биоинженерной конструкции	66
2.4.2	Методика получения гистоморфометрических изображений	67
2.4.3	Методика проведения морфометрической оценки аутопсийных срезов костной ткани экспериментальных животных	69
2.5	Методы клинического исследования пациентов с дефектами костной ткани челюстей	70
2.5.1	Исследуемая популяция	71
2.5.2	Методика проведения хирургической операции с имплантацией остеозамещающего материала	73
2.5.3	Методики оценки эффективности проведения хирургической операции челюстей после имплантации остеозамещающего материала	76
2.5.4	Методика получения биопсийного материала на хирургическом этапе установки дентального имплантата	77
2.5.5	Методика иммуногистохимического исследования биопсийного материала	78
2.6	Методы статистической обработки результатов исследования	79

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Раздел 1. Экспериментальные исследования *in vitro*.

ГЛАВА III. АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛОНИРОВАНИЯ И ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В КУЛЬТУРАХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ВНУТРИРОТОВЫХ ИСТОЧНИКОВ 80

- 3.1 Исследование остеогенного потенциала культур клеток, выделенных из внутриротовых источников 80
- 3.2 Исследование иммунофенотипа фибробластоподобных клеток, выделенных из десны человека 88

Раздел 2. Экспериментальные исследования *in vivo*

ГЛАВА IV. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОГО ДЕФЕКТА 92

- 4.1 Результаты имплантации экспериментальным животным тканеинженерных конструкций на основе аутологичных мезенхимальных стромальных клеток 92
- 4.2 Результаты имплантации экспериментальным животным тканеинженерных конструкций на основе нанодисперсного диоксида церия с аутологичным фибриновым матриксом, обогащенного тромбоцитами 100
- 4.2.1 Результаты иммуногистохимического анализа костной ткани после имплантации тканеинженерной конструкции на основе нанодисперсного диоксида церия с аутологичным фибриновым матриксом, обогащенного тромбоцитами 104

ГЛАВА V. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЖИВОТНЫМ ДВУХКАССЕТНОЙ БИОИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ОКТАКАЛЬЦИЙФОСФАТА, АКТИВИРОВАННОГО ПЛАЗМИДНОЙ ДНК С ГЕНАМИ ФАКТОРОВ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ И СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК-1 α 109

- 5.1 Результаты гистологического исследования регенератов костной ткани животных в динамике 109
- 5.2 Результаты морфометрического исследования регенератов костной ткани экспериментальных животных после имплантации остеозамещающих материалов в динамике 120

Раздел 3. Результаты клинического исследования

ГЛАВА VI. ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕЛЮСТЕЙ ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ ОДНОКАССЕТНОЙ БИОИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ ОКТАКАЛЬЦИЙФОСФАТА, АКТИВИРОВАННОГО ПЛАЗМИДНОЙ ДНК С ГЕНОМ СОСУДИСТОГО ФАКТОРА РОСТА В СОЧЕТАНИИ С АУТОЛОГИЧНОЙ КОСТНОЙ СТРУЖКОЙ	130
6.1 Результаты гистологического и морфометрического исследования биоптатов костной ткани челюстей пациентов после имплантации однокассетной биоинженерной конструкции на основе октакальцийфосфата, активированного плазмидной ДНК с геном сосудистого фактора роста в сочетании с аутологичной костной стружкой	130
6.2 Результаты иммуногистохимического исследования биоптатов костной ткани челюстей пациентов	139
6.3 Результаты клинической оценки состояния костной ткани	145
ГЛАВА VII. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ	178
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	187
ВЫВОДЫ	189
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ	191
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	192
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	236

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Несмотря на значительный арсенал выпускаемых материалов и широкий диапазон предлагаемых методов для реконструкции кости, восстановление костных дефектов челюстей остается сложно решаемой проблемой в хирургической стоматологии [25, 63,88, 107,114]. С целью возмещения костной ткани в зоне дефекта, наряду с аутогенной костной тканью, считающейся «золотым стандартом» костной хирургии и широко используемой в костной трансплантологии, в практике хирургической стоматологии и имплантологии нашли применение синтетические полимерные и кальцийфосфатные остеопластические материалы, композитные остеозамещающие препараты, материалы ксеногенного и аллогенного происхождения [96, 118]. Низкая эффективность традиционных подходов с использованием имеющихся на рынке костнопластических материалов обусловлена в первую очередь тем, что в основе их функционирования лежит преимущественно пассивное взаимодействие между материалом и воспринимающим костным ложем, независимо от того, является этот материал синтетическим или имеет природное происхождение [90, 142]. В условиях «остеогенной недостаточности», связанной как с низкими остеогенными потенциями зоны дефекта, так и системными факторами, возможности костной пластики с применением общепринятых подходов выглядят еще менее обнадеживающими [134].

Перспективными направлениями в развитии медицинских технологий является создание тканеинженерных и биоинженерных биоматериалов. Тканеинженерные конструкции представляют собой клеточный продукт, совмещенный с биосовместимыми материалами природного или синтетического происхождения [1]. Биоинженерные конструкции включают применение инженерных принципов и концепций проектирования в медицине и биологии для целей здравоохранения [21, 137].

Первыми попытками активировать процессы остеорепарации в зоне дефектов челюстей стала технология применения обогащенной тромбоцитами плазмы крови, основанная на широком диапазоне биологических эффектов аутогенных тромбоцитарных факторов роста в заживлении тканей [2, 71, 84]. Данная технология нашла применение при выполнении регенеративных вмешательств в имплантологии, пародонтологии, а также в пластической хирургии, офтальмологии, сердечнососудистой хирургии, дерматологии и ортопедии [8, 10, 11, 26, 48, 77, 334]. Помимо факторов роста, тромбоцитарный концентрат содержит такие белки внеклеточного матрикса, как витронектин, суперфизиологический уровень фибронектина и фибрина, которые, как известно, являются молекулами клеточной адгезии и способствуют миграции и хемотаксису клеток, участвующих в репаративных процессах [107]. Использование собственной крови пациента говорит в пользу безопасности данной технологии, что подтверждается несколькими миллионами проведенных вмешательств, с привлечением описываемого метода [8].

Благодаря прогрессу в технологиях молекулярного клонирования, сегодня появилась возможность синтеза человеческих рекомбинантных факторов роста в нужном для клинического применения объеме [65, 109, 158]. Следует заметить, что в мировой практике уже наметилась определенная тенденция по использованию в регенеративной медицине данных регуляторных молекул, среди которых следует выделить те, которые способны комплексно воздействовать на процессы репаративной регенерации костной и других опорно-трофических тканей [154,239]. К этим факторам в первую очередь следует отнести тромбоцитарный фактор роста, костные морфогенетические белки, фактор роста фибробластов [5, 9, 22,237]. Запуская каскад реакций, данные сигнальные молекулы, относящиеся к суперсемейству трансформирующих факторов роста β , играют одну из ключевых ролей в остеогистогенезе, начиная от первичного тканевого ответа и до завершения вторичной перестройки. Обычно факторы роста

подразделяют по функции в зависимости от того, на какое звено репарации они воздействуют: на дифференцировку клеток или на их пролиферацию [253]. Данные многофункциональные молекулы способны вызывать эктопическое остеобразование *denovo* и модулировать экспрессию остеобластами некоторых белков, включая коллаген и щелочную фосфатазу [47, 58]. К ограничениям данного подхода можно отнести выраженную провоспалительную реакцию, ассоциированную с применением этих факторов, быструю инактивацию данных белков в тканях под воздействием лизосомальных ферментов, отличие в трехмерной конформации синтетических факторов роста от нативных белковых молекул.

С развитием технологий культивирования клеток, все большее распространение находят технологии с использованием полученных от взрослых людей прогениторных клеток различной степени зрелости [26, 39, 79, 206]. Наиболее частыми источниками их выделения являются костный мозг и подкожная жировая ткань, что связано с дополнительной хирургической инвазией для пациента [26, 65, 153,341]. Между тем, при санации ротовой полости в плане подготовки к операции по возмещению костного дефекта челюстей нередко возникает необходимость в удалении одного-двух и более зубов. При этом открывается доступ для получения материала, содержащего гистогенетически идентичные по отношению к тканям дефекта клетки-предшественники остеогенеза [76]. Существенным достоинством использования клеток, полученных из внутриротовых источников, является отсутствие для этих целей необходимости в проведении дополнительной хирургической процедуры, что позволяет отнести эту методику к категории малоинвазивных [78, 202].

Альтернативной стратегией для устранения дефектов костной ткани челюстей является потенциальное использование для терапевтического остеогенеза генно-терапевтических препаратов, позволяющих путем соединения химическим путем генной конструкции с тем или иным носителем, избирательно и пролонгировано воздействовать на клетки-

мишени, способствуя экспрессии ими необходимых остеогенных факторов. Технология получила название «ген-активированные матриксы» [gene-activated matrix, GAM] [22, 23, 55, 104,188].

Перечисленные стратегии открывают новую страницу в реконструктивной хирургии костной ткани, однако, исследований, направленных на сравнение эффективности и безопасности данных методов друг с другом, а также с традиционными подходами в костной пластике проведено не было, что и послужило причиной для проведения данного исследования.

Степень разработанности темы

В хирургической стоматологии важным моментом является восстановление нативных тканевых структур челюстно-лицевой области. В настоящее время ведутся разработки в области медицинского материаловедения для создания материалов, обладающих сродством к биологическим тканям и обеспечивающих их восстановление до исходного уровня. С этой целью внимание привлекли ген-активированные матриксы, которые широко начали изучать в доклинических исследованиях рядом авторов [22, 23, 55, 104,188], что позволило вывести на отечественный рынок биоматериалов однокассетной биоинженерной конструкции из синтетического октакальцийфосфата, активированного плазмидной дезоксирибонуклеиновой кислотой с генами сосудистого фактора роста под коммерческим названием. Однако, результаты эффективности использования данного остеозамещающего материала в клинической хирургической стоматологической практике не были представлены.

Исследования о остеосинтетических свойствах тканеинженерной конструкции на основе диоксида церия с аутологичным фибрином, обогащенного тромбоцитарными клетками, не проводились. Использование аутологичных стромальных клеток из внеротовых источников является перспективным направлением в восстановительной хирургии челюстно-

лицевой области. Все вышеописанные основные направления определили цель и задачи настоящего исследования.

Цель исследования: разработать и обосновать стратегию эффективности применения материалов, содержащих высокотехнологичные тканеинженерные и биотехнологические конструкции для реконструкции костной ткани челюстей.

Задачи исследования:

1. Провести сравнительный анализ остеогенного дифференцировочного потенциала аутологичных прогениторных клеток доноров, выделенных из десны, костной ткани и надкостницы челюстей, оболочки Гертвига.

2. Исследовать зависимость остеогенных свойств аутологичных мезенхимальных мультипотентных стволовых клеток, выделенных из биоптатов губчатой кости челюстей доноров от их возраста и расположения на челюсти.

3. Оценить способность аутологичных мультипотентных мезенхимальных стромальных фибробластов десны к дифференцировке в остеогенном направлении.

4. Провести гистологический анализ интенсивности индукции репаративного остеогенеза при использовании тканеинженерной конструкции, состоящей из минерализованного матрикса в комбинации с фибриновым гелем и аутологичными мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками десны в экспериментальной модели на лабораторных животных.

5. По результатам морфологического и иммуногистохимического анализа оценить влияние на репаративный остеогенез челюстных костей у экспериментальных животных тканеинженерной конструкции на основе нанодисперсного диоксида церия с аутологичным фибриновым матриксом, обогащенного тромбоцитами.

6. Изучить в эксперименте на животных влияние на гистогенез костной ткани двухкассетной биоинженерной конструкции из синтетического

октакальцийфосфата, активированного плазмидной дезоксирибонуклеиновой кислотой с генами сосудистого фактора роста и стромального фактора роста-1 α .

7. Определить динамику репаративного остеогенеза по результатам гистоморфометрического и иммуногистохимического анализа у пациентов с дефектами челюстных костей различной конфигурации и протяжённости с имплантированной однокассетной биоинженерной конструкции на основе синтетического октакальцийфосфата, активированного плазмидной дезоксирибонуклеиновой кислотой с геном сосудистого фактора роста в комбинации с аутологичной костной стружкой.

8. Разработать и внедрить в клинику хирургической стоматологии новый алгоритм комплексного лечения утраченных костных структур челюстных костей с использованием высокотехнологичной биоинженерной остеопластической конструкции.

Научная новизна исследования

При исследовании остеогенных свойств культур аутологичных стволовых клеток, полученных из тканей ротовой полости человека, выявлен значительный остеоиндуктивный потенциал у культур стволовых клеток эпителия, выделенных из оболочки Гертвига, и клоногенные свойства у культур мезенхимальных стволовых клеток десны.

Показано, что эпителиальные клетки, выделенные из оболочки Гертвига нижней челюсти, обладают самым высоким остеобразующим потенциалом и способны формировать костный матрикс.

Проведена сравнительная характеристика аутологичных культур клеток костной ткани, выделенных у доноров молодого и пожилого возраста, которая установила активный дифференцировочный потенциал стволовых клеток у молодых доноров. Выявлено, что с возрастом снижается число стволовых клеток и подавляется их регенераторный потенциал.

Установлено, что фибробласты десны обладают плюрипотентными свойствами, то есть способностью дифференцироваться в хондрогенном, остеогенном и адипогенном направлении.

В эксперименте на животных по морфологическим и биохимическим характеристикам установлена остеогенная индукция тканеинженерных конструкций на основе трикальцийфосфата, аутологичных мультипотентных мезенхимальных клеток десны и нанодисперсного диоксида церия с аутологичным фибриновым матриксом, обогащенного тромбоцитами.

Экспериментальным путем доказан регенераторный потенциал и безопасность для биологических тканей при применении двухкасетной биоинженерной конструкции на основе синтетического октакальцийфосфата, активированного плазмидной дезоксирибонуклеиновой кислотой с генами сосудистого фактора роста и стромальных клеток-1 α .

Клинические исследования доказали остеогенный эффект на раннем этапе созревания кости у отечественного инновационного биоматериала, состоящего из однокассетной биоинженерной конструкции на основе синтетического октакальцийфосфата, активированного плазмидной дезоксирибонуклеиновой кислотой с геном сосудистого фактора роста в комбинации с аутологичной костной стружкой, что позволяет рекомендовать его при обширных дефектах костной ткани.

Теоретическая и практическая значимость

В основе методологии тканеинженерных технологий по анализу их дифференцировочного остеогенного потенциала, который обусловлен расположением тканей на челюстях и возрастом донора показана возможность создания банка аутологичных клеточных препаратов, выделенных из тканей ротовой полости. Изученные клеточные модели лежат в перспективе персонализированных способов лечения стоматологического пациента.

Создание тканеинженерных и биоинженерных конструкций позволила расширить линейку биоматериалов, обладающих остеорегенеративным потенциалом.

В практическое здравоохранение запатентован и внедрен метод создания тканеинженерной конструкции для регенерации костной ткани челюстей на основе диоксида церия с аутологичным фибриновым матриксом, обогащенного тромбоцитами [Патент RU № 2729365С1, от 21.05.2019]. Протестирован в клинике новый отечественный сертифицированный биоматериал «Гистографт», содержащий ген-активированный матрикс с фактором роста сосудистого эндотелия.

Материалы, полученные в ходе экспериментальных и клинических исследований, вошли в разделы монографического издания «Biosceramics and Biocomposites» [USA, 2019], основу учебного образовательного плана дисциплины «Хирургическая стоматология» по специальности 31.05.03 «Стоматология» ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России и главы учебника «Хирургия полости рта» [ГЭОТАР-Медиа, 2019].

Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием стандартных методик доказательной медицины, включающих клеточные технологии, морфологические, иммуногистохимические, цифровой микрофокусной рентгенографии, клинических, инструментальных и статистических методов исследования. Объектами для экспериментального исследования являлись аутологичные клеточные культуры, биопсийный биоматериал пациентов, аутопсийный биоматериал животных, работа с которыми велась согласно требованиям этического комитета, нормативов Международных рекомендаций по проведению медико-биологических исследований с использованием животных [ETS № 123 от 18.03.1986г.] и Федерального Закона РФ № 52 «О животном мире». Обработка цифровых файлов и данных

проводилась с использованием программного обеспечения Microsoft Word 10, Exsel 10, ImageJ, Paint, Statistica 10.0.

Положения, выносимые на защиту

1. Технология использования аутологичных стволовых клеток, выделенных из тканей ротовой полости, является перспективным персонафицированным направлением для регенерации костной ткани челюстей.

2. Снижение числа стволовых клеток тканей ротовой полости и подавление их регенераторного потенциала у пациентов старшей возрастной группы и у пациентов с остеогенной недостаточностью обуславливает необходимость использование остеопластических материалов с биологически активными компонентами.

3. Применение в клинической практике нового сертифицированного отечественного остеозамещающего биоматериала из синтетического октакальцийфосфата, активированного плазмидной дезоксирибонуклеиновой кислотой с генами сосудистого фактора роста продемонстрировало превосходную биосовместимость и остеоиндуктивность материала в биологической среде.

4. Создание тканеинженерных конструкций для направленной регенерации костной ткани челюстей с использованием аутологичных стволовых клеток, выделенных из тканей ротовой полости, нанодисперсного диоксида церия с аутологичным фибриновым матриксом, обогащенного тромбоцитами, создает перспективу их дальнейшего внедрения и применения в клинической практике.

Внедрение результатов исследования

Практические рекомендации выполненной работы внедрены в клиническую практику лечебных учреждений ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России: отделения хирургического профиля

клинического центра стоматологии, КЦЧЛПХ и стоматологии. Фундаментальные теоретические положения внедрены и используются в учебном процессе кафедр хирургии полости рта, пропедевтики хирургической стоматологии, челюстно-лицевой и пластической хирургии стоматологического факультета ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России при обучении студентов, ординаторов, аспирантов. Полученные результаты представлены в научных журналах, монографии, учебнике, лекциях, обучающих кейсах для студентов и курса усовершенствования врачей-стоматологов.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов определяется достаточным количеством проведенных экспериментальных и клинических исследований. Выделены клеточные суспензии из биопсийного материала 175 образцов тканей ротовой полости человека, полученные у 25 доноров и 24 образцов из ткани десны, выделенных у 24 кроликов. Проведены экспериментальные исследования на 101 кроликах породы Шиншила с имплантацией тканеинженерных и биоинженерных конструкций в искусственно созданные дефекты костной ткани. Клинические исследования по восстановлению костной ткани челюстей выполнены у 50 пациентов. Все исследования проводили с использованием современных методов: клеточных технологий, гистоморфологического и иммуногистохимического анализа, цифровой микрофокусной рентгенографии, инструментального обследования и статистического анализа.

Апробация работы

Основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на совместном заседании сотрудников кафедр хирургической стоматологии, хирургии полости рта, пародонтологии, лаборатории медицинской

кибернетики и цифровых медицинских технологий НИИ «ТЕХНОБИОМЕД» ФГБОУ ВО «МГМСУ им. А.И. Евдокимова» Министерства Здравоохранения РФ «10» мая 2023 года, а также доложены и обсуждены на 11 форумах научно-практических конференций:

- научно-практической конференции ЦФО России с международным участием «Социальные аспекты современной Российской стоматологии: опыт, проблемы, пути решения», 12-13 мая 2011 г., Тверь;

- XI Научно-практической конференции «Новые технологии в стоматологии и имплантологии», 1-2 октября 2013, Саратов;

- X Юбилейном всероссийском съезде травматологов-ортопедов, 16-19 сентября, 2014г., Москва;

- XXXI Всероссийской научно-практической конференции «Актуальные проблемы стоматологии», 23 апреля 2014г., Москва;

- Moscow International Forum on Bones and Joints Disorders, International School Conference “Interdisciplinary Approach to Osteoarticular Pathology and Bio-Rheumatology”, 18-21 апреля 2016, Moscow;

- III Национальном конгрессе по регенеративной хирургии, 15-18 ноября 2017г., Москва;

- XV Всероссийском стоматологическом форуме Дентал-Ревю «Стоматологическое образование. Наука. Практика», 12-14 февраля 2018г., Москва;

- XXXIX Всероссийской научно-практической конференции [СтАР] «Актуальные проблемы стоматологии», 23 - 25 апреля 2018 года, Москва;

- XLI Всероссийской научно-практической конференции СтАР «Актуальные проблемы стоматологии», 23 апреля 2019г., Москва;

- Научно-практической конференции с международным участием «Лазеры в медицине 2021», посвященная 35-летию ФГБУ «ГНЦ ЛМ им. О.К. Скобелкина ФМБА России», 15 октября 2021 г., Москва.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Диссертация соответствует паспорту научной специальности 3.1.7 – Стоматология (медицинские науки); группе научных специальностей: 3.1. Клиническая медицина, направлениям исследований – изучение проблем хирургической стоматологии с разработкой методов диагностики и лечения заболеваний челюстей и полости рта; разработка и совершенствование методов дентальной имплантации; изучение проблем профилактики, диагностики и лечения патологических состояний зубочелюстного аппарата с использованием зубных, челюстных, лицевых и имплантационных протезов для восстановления нарушенной функции жевания, а также эстетических норм лица; экспериментальные исследования по изучению этиологии, патогенеза, лечения и профилактики основных стоматологических заболеваний; разработка и совершенствование стоматологических материалов, инструментов и оборудования. Направления исследований согласно пунктам 3, 4, 7, 8, 9; отрасли наук: медицинские науки.

Публикации результатов исследования

По материалам диссертационного исследования опубликовано 42 печатные работы, в их числе из которых 22 публикаций – в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки РФ; 3 статьи в зарубежных журналах, входящих в международные реферативные базы данных и системы цитирования [Scopus, Web of Science], 3 патента на изобретения РФ

1. Воложин Г.А., Докторов А.А., Десятниченко К.С., Мкртчян Г.В. Тестирование *in vitro* остеогенных потенциалов недифференцированных клеток пародонтальных тканей// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Том 5, №3. – С.21-21.

2. Мкртчян Г.В., Десятниченко К.С., Докторов А.А., Курдюмов С.Г., Воложин Г.А. Тестирование *in vitro* остеопластического материала в

гелевой форме// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Том 5, №3. – С.42-42.

3. Мкртчян Г.В., Воложин Г.А., Докторов А.А., Десятниченко К.С. К вопросу о зависимости остеогенных потенциалов недифференцированных клеток из биоптатов губчатой кости челюстей от возраста донора //Пародонтология. – 2011. – Том 16, №1(58). – С.11-15.

4. Воложин Г.А., Панин А.М., Докторов А.А., Десятниченко К.С., Мкртчян Г.В. Остеогенные потенциалы недифференцированных клеток пародонтальных тканей//Cathedra – стоматологическое образование. – 2011. - №36. -С.16-19.

5. Зорин В.Л., Зорина А.И., Копнин П.Б., Воложин Г.А., Панин А.М. Изучение фенотипического профиля и остеогенных свойств фибробластов десны//Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Том 8, №3. – С.25-26.

6. Зорин В.Л., Зорина А.И., Воложин Г.А., Панин А.М. Изучение фенотипического профиля и остеогенных свойств фибробластов десны//Саратовский научно-медицинский журнал. - 2013. - Т. 9, №3. - С. 393-397.

7. Базикян Э.А., Тарба И.И., Воложин Г.А., Бозо И.Я., Деев Р.В., Дробышев А.Ю., Комлев В.С., Рожков С.И., Еремин И.И., Далгатова И.Г., Воложин Г.А., Грачев В.И., Федотов А.Ю., Исаев А.А. Эффективность ген-активированного остеопластического материала на основе октакальциевого фосфата и плазмидной ДНК с геном VEGF в восполнении "критических" костных дефектов//Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2015. - №1. – С. 35-42.

8. Еремин И.И., Бозо И.Я., Воложин Г.А., Деев Р.В., Рожков С.И., Еремин П.С., Комлев В.С., Зорин В.Л., Пулин А.А., Тимашков Д.А., Котенко К.В. Возможности применения тканеинженерных костных графтов в челюстно-лицевой хирургии//Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2015. - №4. – С.151-157.

9. Еремин И.И., Бозо И.Я., Воложин Г.А., Деев Р.В., Рожков С.И., Еремин П.С., Комлев В.С., Зорин В.Л., Пулин А.А., Тимашков Д.А., Витько Н.К., Котенко К.В. Биологическое действие тканеинженерных костных графтов из трикальцийфосфата и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в ортотопических условиях *in vivo*// Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2015. - №4. – С.144-150.

10. Панин А.М., Воложин Г.А., Баскова А.В., Десятниченко К.С., Басков Д.В. Лечение хронических форм пародонтита средней и тяжелой

степени с использованием остеопластических материалов//Пародонтология. – 2015. - №1(4). – С.50-60.

11. Базикян Э.А., Воложин Г.А., Зорин В.Л., Тарба И.И. Обогащенный тромбоцитами фибрин: Использование потенциала L-PRF для стимуляции репаративной регенерации костной ткани//Российский Вестник Дентальной Имплантологии. -2016. - № 2 (34). - С. 79-83.

12. Бозо И.Я., Майорова К.С., Дробышев А.Ю., Рожков С.И., Воложин Г.А., Еремин И.И., Комлев В.С., Смирнов И.В., Ризванов А.А., Исаев А.А., Попов В.К., Деев Р.В. Сравнительная оценка биологической активности ген-активированных остеопластических материалов из октакальциевого фосфата и плазмидных ДНК//Гены и клетки. – 2016. – Том 11, №4. – С. 34-42.

13. Бозо И.Я., Рожков С.И., Комлев В.С., Воложин Г.А., Еремин И.И., Смирнов И.В., Савва О.В., Исаев А.А., Попов В.К., Дробышев А.Ю., Деев Р.В. Сравнительная оценка биологической активности ген-активированных остеопластических материалов из октакальциевого фосфата и плазмидных ДНК, несущих гены VEGF и SDF: часть 2 – in vivo//Гены и клетки. – 2017. – Том 12, №4. – С.39-46.

14. Зорин В.Л., Зорина А.И., Еремин И.И., Деев Р.В., Копнин П.Б., Воложин Г.А., Пулин А.А. Десна, как источник стромальных клеток с высоким дифференцировочным и репаративным потенциалом//Гены и клетки. – 2017. – Том 12, №2. – С.37-51.

15. Тарба И.И., Базикян Э.А., Воложин Г.А. Замещение костных дефектов челюстных костей посредством применения разработанной тканеинженерной конструкций//Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2017. – Том 62, №4. – С.239-240.

16. Базикян Э.А., Тарба И.И., Воложин Г.А. Результаты клинического применения тканеинженерной композиции и аутологичного фибрина, обогащенного лейкоцитами и тромбоцитами//Dental Forum. – 2018. - №4. – С.13-13.

17. Базикян Э.А., Воложин Г.А., Тарба И.И. Перспективы применения тканеинженерных костных графтов при реконструктивных вмешательствах на челюстных костях//Dental Forum. – 2019. - №3(74). – С.26-30.

18. Базикян Э.А., Тарба И.И., Воложин Г.А. Сравнительный анализ применения в клинической практике, обогащенного лейкоцитами и тромбоцитами фибринового сгустка при заполнении лунок удаленных зубов//Российская стоматология. - 2020. - Т.13, №1. - С.16-17.

19. Воложин Г.А., Базикян Э.А., Деев Р.В., Бозо И.Я., Пресняков Е.И. Оценка регенерации костной ткани пациентов после имплантации биоинженерного остеозамещающего материала на основе синтетического октакальцийфосфата, активированного плазмидной ДНК с геном сосудистого эндотелиального фактора роста// Эндодонтия Today. – 2021. - №19(4). – С.343-349.

20. Патент № 2729365 Тканеинженерная конструкция для восполнения объема костной ткани челюстно-лицевой области № 2019121653: заявлен 07.11.2019г., опубликован 08.06.2020г./Базикян Э.А., Тарба И.И., Чунихин А.А., Воложин Г.А., Иванов В.К., Баранчиков А.Е., Прокопов А.А.//Бюллетень «Изобретения. Полезные модели». – 2020. - №22. – 8 с.

21. Патент РФ на изобретение № 2793324 Нанодисперсная пластическая биоинженерная композиция на основе диоксида церия для восполнения объема костной ткани / Янушевич О.О., Базикян Э.А., Чунихин А.А., Воложин Г.А., Прокопов А.А., Иванов В.К., Абраамян К.Д. / заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России – заявка № 2021136649 от 13.12.2021, опубл. 31.03.2023 Бюллетень «Изобретения. Полезные модели» - 2023. - №10. – 10 с.

22. Патент РФ на изобретение № 2794464 Биоконплекс для стимуляции регенерации и ремоделирования тканей / Янушевич О.О., Базикян Э.А., Чунихин А.А., Воложин Г.А., Прокопов А.А., Иванов В.К., Абраамян К.Д. / заявитель и патентообладатель ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России – заявка № 2021136648 от 13.12.2021, опубл. 18.04.2023 Бюллетень «Изобретения. Полезные модели» - 2023. - №11. – 9 с.

23. Eremin I., Zorin V., Deev R., Volozhin G., Komlev V., Rozhkov S., Bozo I., Anisimov R., Panin A., Sidletsky A., Toropov E., Pulin A., Kotenko K. Autologous gingival multipotent mesenchymal stromal cells and adipose-derived regenerative cells for maxillofacial reconstruction: pilot study// J. of Tissue engineering and regenerative medicine. – 2014. - Vol. 8 (Suppl. 1): 439-439.

24. Iliа Bozo, Vladimir Komlev, Ilias Dalgatov, Sergey Rozhkov, GrigoriyVolozhin, Anton Mironov, Alexey Drobyshev, Artur Isaev, Vladimir Popov, Alexandr Fedotov, Igor Smirnov, Roman Deev. Gene-activated materials for bone regeneration: from standardized bone substitute to personalized 3D-printed blocks// European Cells and Materials. - 2017. - V. 33, Suppl. 2. - 0268.

25. Bazikyan E, Chunikhin A, Volozhin G, Abraamyan K, Ivanov V, Zudina MS. Morphological and immunohistochemical effect of cerium dioxide

nanoparticles on reparative osteogenesis of the jaw bones// Journal of applied pharmaceutical science. - 2022. – Vol. 12(02). – P.165–171.

26. Воложин Г.А., Мкртчян Г.В., Десятниченко К.С. Перспективы использования остеопластических материалов с факторами роста в хирургической стоматологии// в сборнике материалов 7-ой Всероссийской научно-практического форума «Дентал-Ревю 2010», Москва, 2010. – С. 33-34.

27. Воложин Г.А., Докторов А.А., Десятниченко К.С., Мкртчян Г.В. Альтернативный источник стволовых клеток для тканеинженерных технологий в стоматологии//в сб. мат-лов IV Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии», С.-Пб., 2010. – С.157-158.

28. Панин А.М., Мкртчян Г.В., Воложин Г.А., Десятниченко К.С., Курдюмов С.Г. Применение остеопластического материала нового поколения на основе тканеинженерных технологий в стоматологии// в сборнике материалов X Всероссийской научно-практической конференции «Новые технологии в стоматологии и имплантологии», Саратов, 2010. – С.112-114.

29. Мкртчян Г.В., Воложин Г.А., Панин А.М. Опыт применения остеопластического материала нового поколения на основе тканеинженерных технологий в хирургической стоматологии// в сборнике материалов 8-го Всеросс. научно-практического форума «Дентал Ревю 2011», Москва, 2011. - С.102-103.

30. Воложин Г.А., Докторов А.А., Курдюмов С.Г., Мкртчян Г.В. Перспективы использования недифференцированных мультипотентных клеток, полученных из внутриротовых источников в составе тканеинженерных конструкций для устранения внутрикостных дефектов челюстей// в сборнике материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Социальные аспекты современной российской стоматологии: опыт, проблемы, пути решения», Тверь, 2011. – С.99-100.

31. Климашина Е.С., Путляев В.И., Гаршев А.В., Проценко П.В., Юдин Д.К., Воложин Г.А. Влияние искусственной межтканевой жидкости на поверхность титановых имплантатов// в сборнике тезисов докладов «Всероссийское совещание «Биоматериалы в медицине»», 6 декабря 2013, ИМЕТ РАН, Москва, РФ. – С.24-25.

32. Воложин Г.А., Зорин В.Л., Еремин И.И., Бозо И.Я., Комлев В.С., Рожков С.И., Анисимов Р.С., Панин А.М., Сидлецкий А.Я., Торопов Е.Н., Пулин А.А., Деев Р.В., Котенко К.В. Опыт применения кальций-фосфатных остеопластических материалов, активированных аутогенными мультипотентными стромальными клетками из различных источников.

Пилотное исследование// в сборнике материалов X Юбилейного Всеросс. съезда травматологов-ортопедов, Москва, 16-19 сентября, 2014г. - С. 448-449.

33. Деев Р.В., Дробышев А.Ю., Бозо И.Я., Воложин Г.А., Комлев В.С., Еремин И.И., Анисимов Р.С., Рожков С.И., Глушко А.В., Гордина Г.С., Исаев А.А. Ген-активированные материалы для замещения протяженных костных дефектов// в сборнике материалов X Юбилейного Всероссийского съезда травматологов-ортопедов, Москва, 16-19 сентября, 2014г. - С. 450-451.

34. Vasilev Y., Egorov M.V., Volozhin G., Deev R., Eremin I., Bozo I., Rozhkov S., Anisimov R. Microfocus x-ray systems as the mean for examination of osseous tissue regeneration in animals with application of stem cells// Materials of European Congress of Radiology, 6-10 March, 2014, C-0085.

35. Bozo I., Drobyshev A., Deev R., Volozhin G., Rozhkov G. S., Anisimov R., Eremin I., Komlev V., Isaev A. Gene-activated bone grafts: challenges and opportunities for maxillofacial surgery// XXII Congress of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery, Prague 23-26 Sep 2014. Book of Abstracts.P.164-164.

36. Pulin A.A., Eremin I.I., Deev R.V., Bozo I.Y., Zorin V.L., Komlev V.S., Eremin P.S., Sidletskiy V.Y., Volozgin G.A., Rozhkov S.I., Panin A.A., Toropov E.N., Korsakov I.N., Lazareva N.L., Kopnin P.B., Astrelina T.A., Samchuk D.P., Kotenko K.V. Tissue-engineered bone grafts for maxillofacial surgery: from bench to bedside// ISSCR 2015 annual meeting abstract book. 24-27 June 2015, Stockholm, Sweden. W-1025

37. Бозо И.Я., Дробышев А.Ю., Рожков С.И., Воложин Г.А., Комлев В.С., Исаев А.А., Деев Р.В. Ген-активированные остеопластические материалы – новый тренд в регенеративной медицине// в сборнике материалов 2-й Национального конгресса по регенеративной медицине, М.: 3-5 декабря 2015 г. - С. 31-32.

38. Еремин И.И., Бозо И.Я., Воложин Г.А., Зорин В.Л., Деев Р.В., Рожков С.И., Еремин П.С., Торопов Е.Н., Сидлецкий В.Я., Пулин А.А., Дробышев А.Ю., Комлев В.С. Поисковое исследование различных вариантов тканеинженерных костных графтов из ММСК и СВФ-ЖТ: от эксперимента к клинике// в сборнике материалов 2-й Национального конгресса по регенеративной медицине, М.: 3-5 декабря 2015 г. - С. 66-67.

39. Базилян Э.А., Воложин Г.А., Тарба И.И. Перспективы применения Л-ДОП при выполнении реконструктивных вмешательств для замещения костных дефектов челюстных костей// в сборнике материалов «Актуальные вопросы современной стоматологии» - Москва, 2018. - С.59-59.

40. Воложин Г.А., Базилян Э.А., Чунихин А.А. Перспективы создания биоинженерных конструкций на основе нанокристаллических

диоксидов//в сборнике тезисов II Международной научно-практической конференции молодых ученых «Ученики учителям», ГБУЗ МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, 20 мая 2021, Москва. – С.11-13.

41. Воложин Г.А., Базикян Э.А. «Клиническая оценка регенерации костной ткани челюстей пациентов после имплантации тканеинженерной конструкции на основе октакальцийфосфата, активированного плазмидной ДНК с геном VEGF»//в сборнике тезисов IV Международного Конгресса стоматологов «Актуальные проблемы стоматологии и челюстно-лицевой хирургии» и VIII-Съезда стоматологов Узбекистана, Ташкент (Узбекистан), 10-11 декабря 2021 г. – С.244-246.

42. Iliia Y. Bozo, Grigory A. Volozhin, Vadim L. Zorin, Roman V. Deev et al. Bioceramics and Biocomposites: From Research to Clinical Practice 1st Edition (Chapter 12): of Editor(s): Iulian Antoniac, The American Ceramic Society, USA, 2019. – P.323-339.

Личный вклад автора в исследование

Автор лично участвовал в получении биопсийного материала из внутриротовых источников 175 у человека и 24 у кролика, и их клеточном суспензировании. Разрабатывал тканеинженерные и биоинженерные конструкции, методики проведения экспериментов на животных. Участвовал в работе с экспериментальными моделями на 101 кроликах, получении 202 образцов аутопсийного материала. Проводил описание гистологического материала и морфометрическую оценку регенератов костной ткани. Осуществлял клиническое ведение 50 хирургических пациентов, получении 150 образцов биопсийного материала для гистологического исследования, пред-и после операционное ведение и собственно ход оперативного вмешательства по реконструкции костной ткани челюстей. Подводил итог результатов исследования с применением статистического анализа, подсчета цифровых данных и анализа гистоморфологического и иммуногистохимического исследования образцов тканей человека и животных.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа содержит «Введение», главы «Обзор литературы», «Методология и методы исследования», «Результаты собственных исследований», «Обсуждение результатов исследований» и «Заключение», «Выводы», «Практические рекомендации», «Список сокращений» и «Список литературы». Обзор литературы включает 341 источник, в том числе 172 отечественных и 169 зарубежных авторов. Диссертация изложена на 237 страницах печатного текста и иллюстрирована 22 таблицами, 94 рисунками.

ГЛАВА I. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Существенная потребность в костной ткани во многих клинических ситуациях и ограниченная доступность биоэффективных костных трансплантатов стимулируют развитие тканевой инженерии для восстановления костных дефектов [6, 7, 56, 62, 66, 106]. В связи с этим появилась необходимость углубленного изучения механизмов регенерации костной ткани и заживления переломов, поскольку именно эти процессы должны определять выбор оптимальных условий для культивирования тканей и имплантации [10, 19, 91, 94, 159, 281].

1.1. Стратегии тканевой инженерии для регенерации костной ткани

Тканевая инженерия была определена как междисциплинарная область исследований, которая применяет принципы инженерии и наук о жизни для разработки биологических заменителей, которые восстанавливают, поддерживают или улучшают функцию тканей [12, 13, 115, 250]. Для успешного решения этой задачи клиницисты стали обращать внимание на биоинженерные конструкции, которые должны обладать целым рядом свойств: анатомическим сходством с костной тканью, высокой прочностью материала, обеспечивать быструю и надежную адгезию к тканям реципиента, проявлять иммуномодулирующие и остеоиндуктивные свойства материала и быть безопасным для тканей реципиента [30, 54, 65, 96, 137, 171].

За последние несколько десятилетий проведена идентификация ключевых молекул, участвующих в регенерации костной ткани - это факторы роста, цитокины и морфогены, что привело к созданию и внедрению биомиметических материалов в хирургическую стоматологию и имплантологию [65, 109, 158]. Установлено, что различные фазы регенерации костной ткани зависят от действия факторов роста, пролиферации и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток [МСК][154, 239]. Стратегии тканевой инженерии для регенерации кости включают доставку белков, генов [вирусная и невирусно-опосредованная доставка] и/или стволовых клеток в участок костного дефекта [22, 60].

1.1.1. Генная терапия, применяемая для регенерации костной ткани

Задачей генной терапии является обеспечение эндогенного синтеза необходимых белков в зоне дефекта костной ткани. Для проведения генной терапии требуется выбор остеогенного трансгена[ов], невирусных или вирусных векторов, а также стратегии доставки генов *ex vivo* или *in vivo* [23]. Одним из звеньев генной терапии является доставка активных компонентов костных матриц в зону повреждения [22, 23]. Это считается выполнимой технологией, за которой можно осуществлять контроль [245]. Кроме того, в участки регенерации возможна доставка нескольких генов, как было показано на примере доставки генов, кодирующих фактор роста фибробластов-2 [FGF-2] и костный морфогенетический белок-2 [BMP-2], трансфицированных в МСК жировой ткани [hADMSC] человека [182]. Синергетический эффект генов, кодирующих FGF-2 и BMP-2, был установлен по экспрессии остеогенных белков транскрипции Runx-2 и остеокальцина, нежели трансфекция рекомбинатной ДНК [pДНК] этих генов по отдельности.

Существует два основных метода переноса генов для регенерации тканей: 1] трансфекция в МСК и их экспансия *ex vivo* и последующая трансплантация в участок дефекта; 2] прямая доставка генов остогенеза в участок дефекта *in vivo* [257]. Плазмиды, содержащие эквиваленты комплиментарной ДНК терапевтических генов, могут быть доставлены сами по себе, или могут быть объединены с поликатионами с образованием наноплексов ДНК. Эти комплексы предлагается использовать в сочетании с каркасами для улучшения регенерации кости [21, 22, 23].

Для эффективной доставки генов *in vivo* требуется высокая эффективность трансфекции клеток-реципиентов. При таком подходе трудно добиться направленной доставки гена к конкретным клеткам, поскольку клетки, окружающие интересующую ткань-мишень, также могут быть трансфицированы. При переносе гена *ex vivo* изолированные и выращенные в культуре клетки можно трансфицировать *in vitro* и затем имплантировать в

дефект. Генная терапия *ex vivo* может нацеливаться на конкретные представляющие интерес популяции клеток и позволяет осуществлять отбор, контроль и изучение генетически измененных клеток [41]. На сегодняшний день генные подходы *ex vivo* пока еще технически сложны и дороги, что нивелирует их возможность для клинического применения. Поэтому растет интерес к разработке каркасов для систем доставки вирусных или невирусных векторов с более высокой эффективностью трансфекции, которые могут доставлять один или несколько генов, кодирующих рДНК *in vivo*.

1.1.2. Критерии проектирования каркасов для систем доставки генов

Одной из ключевых задач инженерии костной ткани является создание трехмерных каркасов таким образом, чтобы можно было сконструировать *in vitro* клинически применимые костные конструкции [75]. Появились данные, что тканеинженерные конструкции обладают способностью к остеогенезу, остеокондукции, остеоиндукции, остеоинтеграции и обеспечивают функциональную связь между костной тканью реципиента и трансплантатом [9, 68, 123, 150]. Исследования на животных подтвердили способность модифицированных трансплантатов формировать кость и интегрировать в ткань реципиента [8, 22, 23]. Однако, васкуляризация зоны дефекта остается главным препятствием, которое требует дальнейшего изучения [207].

Для заживления ран исследуются и применяются генно-активированные матрицы [GAM], представляющие собой инертные каркасные системы и содержащие векторы доставки вирусных или невирусных генов [55, 188]. Являясь временными трехмерными матрицами, GAM способствует активному росту костной ткани в заданном направлении [136]. Остеокондуктивный компонент GAM инкапсулирует и удерживает ген в матриксе в течение длительного времени, тем самым улучшая формирование нативного внеклеточного матрикса и образование кровеносных сосудов в развивающейся костной ткани [231]. Трехмерные

GAM по своей природе обычно обладают высокой степенью пористости и могут быть изготовлены различной конфигурации для полноценного восполнения дефекта костной ткани [136, 302].

Биоматериалы, используемые как каркасы для активных компонентов костнопластических материалов, должны обладать остеокондуктивными свойствами, механической совместимостью и способностью интегрировать с окружающей естественной костью во время репарации [16, 190]. J. Bonadio [2000] показал, что локальная доставка GAM в костные дефекты не сопровождается системными неблагоприятными эффектами. После доставки гена в зону костного дефекта, *in situ* начинается экспрессия белков внеклеточного матрикса [189]. В тоже время было показано, что непосредственная инъекция гена в зону дефекта вызывает короткую клеточную экспрессию, и это не успевает оказывать значительного влияния на формирование ткани [309].

Основу остеокондуктивного каркаса, входящего в состав GAM составляют биоразлагаемые, биосовместимые полимерные материалы, которые также применяются как одинарные материалы при имплантации в костные дефекты *in vivo* [21, 55, 104]. Создан ряд полимерных каркасов, которые способствуют клеточной адгезии, миграции и восстановлению структурной целостности тканей. Биосовместимый каркас также должен обеспечивать удаление продуктов деградации параллельно с формированием новой костной ткани, постепенно замещающей каркас; миграцию и прикрепление клеток-предшественников из окружающей ткани к каркасу; содержать легенды, подходящие для конкретных популяций МСК клеток; иметь достаточный размер пор, чтобы обеспечить максимальное проникновение и миграцию клеток, сохранять высокую удельную поверхность для прикрепления клеток и диспозиции матрикса, эффективный транспорт метаболитов и питательных веществ [336, 337]. Иницирование процесса регенерации кости включает взаимодействие между каркасами и инфильтрирующими клетками с участием структурных, механических и

биологических сигналов [16]. При этом адгезивная способность полимерных матрицсов различается. Полимерные конструкции могут быть изготовлены из синтетических полиэфиров, например полигликолид [PGA], полилактид [PLA], полилактик-когликолевая кислота [PLGA][26, 111, 183, 223, 226, 260, 284, 311],поли-L-лактат [PLLA][104, 255],поликапролактон [PCL][162, 255]; из природных полимеров, таких как хитозан, альгинат [52, 131, 170, 312], гидроксиапатит, коллаген [21, 43, 44, 49, 51, 176, 177, 212, 291, 283], карбонатный апатит [51], оксид церия [112, 224, 299, 308, 310] гликозаминогликаны [32, 282, 290, 322], октакальцийфосфат и трикальцийфосфат [9, 14, 21, 50, 53, 68, 191], гиалуроновая кислота [122, 192, 258, 261, 303].

Для решения различных медико-биологических задач также предлагается использование комбинаций различных костнозамещающих графтов на основе кальций-фосфатных паст, композиций из термопластичных биodeградируемых полимеров и нетканых волокнистых материалов [56, 103, 104, 151, 152, 167, 168, 197]. Описано применение GAM, представляющего собой коллагеновый каркас, инъецированный полиэфиримид/рДНК, кодирующим PDGF-B, комплексом для регенерации кости [201]. *In vivo* регенеративная способность GAM на дефектах свода черепа диаметром 5 мм у крыс по сравнению с имплантированными пустыми каркасами была оценена на 44% выше, чем в контроле [201]. В эксперименте на животных показана остеоиндуктивная способность GAM, состоящая из каркаса на основе коллагена с гидроксиапатитом, ксеногенного костного матрикса, октакальциевого фосфата и инъецируемой плазмидной ДНК, несущей ген VEGF-A, по сравнению с матриксами-носителями без плазмидной ДНК [21]. При применении генных векторов с иммобилизованным коллаген-желатиновым матриксом, кодирующих FGF-2 или FGF-6, удалось восстановить скелетные мышцы [198]. Для инженерии хряща были использован матрикс из пористого хитозано-желатинового каркаса, содержащего ДНК, кодирующей трансформирующий фактор роста-

1 β [TGF- β 1][219]. Это показывает, что GAM может быть использован для доставки генов для регенерации мягких тканей [325].

Преимущество использования синтетических полимеров в качестве депо-систем GAM состоит в том, что они могут быть специально адаптированы со свойствами, благоприятными для регенерации костной и других тканей челюстно-лицевой области [149]. Эти модификации обеспечивают контроль над количеством рДНК, и таким образом, можно модулировать временные рамки экспрессии гена. GAM также могут содержать терапевтические гены, инкапсулированные или заключенные в полимерные наносферы/микросферы для дальнейшей оптимизации кинетики их высвобождения и поглощения. В эти наносферы при составлении рДНК можно включить неконденсированную [голую] или конденсированную форму [с поликатионами][338].

В качестве альтернативы лиофилизированная рДНК либо может быть смешана с полимерными частицами, либо предварительно инкапсулирована в полимерные микросферы перед переработкой полимерных частиц или микросфер в пористые каркасы [196].

Последний подход способствует более равномерному распределению рДНК в матрице, поскольку высвобождение генов регулируется деградируемыми микросферами. Эти два подхода могут быть объединены для обеспечения доставки нескольких генов [кодирующих разные факторы роста], каждый из которых имеет различную скорость высвобождения и кинетику доставки из одной и той же структурной единицы каркаса.

1.1.3. Биосовместимость и биологическая безопасность материалов для регенерации костной ткани. Перспективы для клинической практики

Имплантированные в зону костного дефекта GAM в течение длительного периода времени обеспечивают экспрессию генов и синтез белка, стимулируя тем самым остеогенез для восстановления утраченной ткани. Локализованная генная терапия благодаря саморегуляции уменьшает

системную токсичность, чего не может обеспечивать непосредственная терапия белками [249, 320]. Производство рДНК осуществляется *in vitro*, что позволяет синтезировать его сравнительно недорого и в больших количествах по сравнению с лабораторным синтезом белка [225]. Было показано, что локализованная доставка генов с использованием GAM обеспечивает направленный синтез эндогенных нативных белков, и, следовательно, являющихся менее иммуногенными, управляемыми и контролируемыми в участке имплантации. Производство белков *in vivo* трансфицированными клетками в костной ткани обеспечивает эффективное связывание с рецепторами на клеточной поверхности. Долгосрочный лечебный эффект достигается благодаря относительно устойчивой экспрессии трансгена *in vivo* [291]. Перенос генов из GAM в область дефекта кости заставляет определенные клетки со временем дифференцироваться в выбранные типы клеток и устраняет необходимость в повторной клеточной терапии [183]. Кроме того, включение генных векторов в пористый каркас обеспечивает защиту белков от протеолиза, поддерживая тем самым долгосрочную доступность трансгенов для клеток, инфильтрирующих GAM. Недостатками данного метода является отсутствие сведений о количестве белков, секретируемых трансфицированными клетками, и об их количестве, необходимом для терапевтического эффекта в индивидуальной клинической ситуации. В связи с этим необходимы дальнейшие исследования для определения оптимальных уровней и сроков экспрессии белка, требуемого в процессе заживления дефектов костей.

Генная терапия исследуется на доклинических моделях как способ лечения потери ткани и усиления регенеративного процесса. Перенос гена может быть выполнен с использованием множества вирусных и невирусных векторов в качестве носителей генов. С точки зрения безопасности невирусные векторы считаются предпочтительнее вирусных. В инженерии костной ткани технология GAM представляет собой весьма универсальный подход для воздействия на устойчивую локализованную доставку генов и

расширенную экспрессию факторов роста, инициирующих тканевые индукции. Конструкция полимерного каркаса GAM поддерживая высвобождение и достаточную доступность активного компонента к месту повреждения, может контролировать развитие ткани [183, 249, 320].

Таким образом, данные литературы показывают, что сочетание каркасов тканевой инженерии с генной терапией имеет огромный потенциал для воздействия на многие клеточные процессы, участвующие в стимуляции регенерации костной ткани [65], но необходима разработка надежных и воспроизводимых методов доставки генов и подтверждение их эффективности и безопасности уже на доклиническом этапе. С другой стороны, для установления эффективности генной терапии в заживлении костных дефектов особое внимание следует уделять таким факторам как возраст, пол, состояние здоровья пациентов, характер заболевания [93, 118, 123, 127, 281].

1.2. Применение ангиогенных факторов для обеспечения васкуляризации костных трансплантатов

Для выживания, интеграции и функциональности тканеинженерной конструкции решающее значение имеет процесс васкуляризации [193]. Кровоснабжение в очаге регенерации необходимо для обеспечения эффективного газообмена и метаболических процессов между клетками. На небольших расстояниях между клетками [не более 200 - 300 мкм] доставка кислорода осуществляется за счет молекулярной диффузии, тогда как большие расстояния ограничивают транспорт молекул, что приводит к гибели части клеток [210]. В более крупных остеинженерных каркасах [не более 5 мм] повышение выживаемости клеток может поддерживаться путем культивирования костных конструкций [266]. Поэтому для успешного результата выживаемости костного имплантата *in vivo* необходимо обеспечивать гармоничное взаимодействие процессов ремоделирования и ангиогенеза в образующейся костной ткани [90,124]. Это может

обеспечиваться за счет ангиогенных факторов и преваскуляризации [«внутренняя» васкуляризация][129, 283].

1.2.1. Преваскуляризация костных трансплантатов

Для инженерии костной ткани *in vitro* созданы преваскуляризованные скаффолд-конструкции с применением графтов, включающих пористый гидроксиапатит, пористый фосфат кальция, пористые никель-титановые и фибриновые сетки, которые засеивались эндотелиальными клетками из микрососудов кожи человека, первичными остеобластами или другими клеточными линиями [53, 71, 131]. Эндотелиальные клетки не только способствуют формированию сосудистой сети, обеспечивающей питательными веществами костный регенерат, но и также важны с точки зрения взаимодействия с остеопрогениторными клетками и их дифференцировкой [5, 124]. Показано, что совместное культивирование клеток эндотелия со стволовыми клетками костного мозга [BMSC] способствовало значительному усилению остеогенеза [109, 241, 273].

Было замечено, что продолжительность жизни эндотелиальных клеток увеличивается в случае их культивации с остеобластами [327]. Согласно полученным рядом авторов данным клетки эндотелия ускоряют экспрессию остеопрогениторных клеток в остеогенный фенотип [194, 240, 273, 305, 329] и могут ингибировать дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток человека в зрелые остеобласты [281].

В ряде работ были рассмотрены альтернативные подходы активации ангиогенеза в костных трансплантатах за счет преваскуляризации [246, 298]. В эксперименте *in vivo* для этого использовались фрагменты сонной артерии, яремной вены или подкожного пучка [243], участка артериовенозной петли [181], проходящих через центральную часть костного графта. Авторы в этом случае не получили полноценного формирования костной ткани, даже при добавлении стволовых клеток. Однако, *in vivo* было показано, что комбинация сосудистых компонентов и остеогенных клеток в

имплантатах усиливает неоваскуляризацию, а также вызывает усиление остеогенеза при имплантации во внутримышечные участки [293].

Благодаря этим исследованиям, была предложена методика посева и совместного культивирования эндотелиальных и остеогенных клеток в костных конструкциях *in vitro*. В качестве источника эндотелиальных клеток были культивированы взрослые клетки эндотелия сосудов, так как показано, что взрослые МСК обладают потенциалом дифференцироваться в клоны клеток эндотелия [274, 297, 328]. Также выявлено, что клетки сосудистого эндотелия могут образовывать новые сосуды внутри каркасов с образованием анастомозов с сосудистой сетью реципиента при имплантации *in vivo* [42].

Для образования функциональной сосудистой сети необходимо, помимо эндотелиальных клеток, присутствие других типов клеток таких как гладкомышечные клетки, перициты, фибробласты [15]. Также приводятся данные о применении эндотелиальных клеток, выделенных из пупочной вены человека [HUVES], выращенных на каркасах в виде гранул совместно с остеопрогениторными клетками человека. Данный гибрид обеспечил образование трехмерных преваскулярных сетей. Однако при имплантации данной конструкции *in vivo* имелись ограничения в образовании анастомозов с сосудистой сетью реципиента [305]. Подобные исследования позволили сделать вывод, что сконструированные *in vitro* капиллярно-подобные структуры могут образовывать анастомозы с сосудистой сетью реципиента [323] и обеспечивают высокую выживаемость трансплантата [254].

Наблюдаемые различные эффекты совместного культивирования клеток могут быть связаны с разными стадиями дифференцировки клеток или разными условиями их культивирования, что подразумевает необходимость дальнейших исследований для понимания и достижения хороших систем и условий совместного культивирования клеток [281]. Кроме того, могут иметь особое влияние на дифференцировку клеток различные сигналы окружающей среды. Так, *in vitro* показано, что ангиогенез стимулируется в

условиях гипоксии [296]. В то же время некоторыми авторами отмечается, что при недостатке кислорода отсутствует ряд эффектов, оказывающих негативное влияние на остеогенную дифференцировку МСК [205, 214, 269, 333].

1.2.2. Рекомбинантные факторы роста в регенерации костных дефектов

Неоангиогенез в участке имплантированного трансплантата может быть ускорен за счет локальной доставки факторов роста, таких как фактор роста эндотелия [VEGF], фактор роста тромбоцитов [PDGF] и фактор роста фибробластов [FGF] [5, 8, 21, 22, 237]. Показана перспективность свойств гепарина для адресной доставки факторов роста [110], так как гепарин обладает высоким сродством к VEGF, основному FGF- β и костному морфогенетическому белку изоформа 2 [253]. Включение этих факторов роста в биоинженерные каркасы, осуществление контроля за скоростью их высвобождения и режимом доставки, обеспечивают возможность для ускорения роста сосудов *in vivo*.

Установлено, что полимерные каркасы, включающие рДНК, кодирующую VEGF или PDGF, обеспечивают увеличение грануляционной ткани и сосудистого русла [47, 58, 238, 309]. В биоинженерную конструкцию факторы роста включены двумя способами. В первом способе, при котором происходит смешивание факторов роста с полимерными частицами самого каркаса, происходит быстрое их высвобождение. При использовании второго способа, который заключается в инкапсулировании факторов роста в микросферы, наблюдается их высвобождение в течение более длительного периода времени. [251]. Поскольку развитие любых тканей управляется скоординированным взаимодействием множества факторов роста по пространственным и временным градиентам, особую важность приобретает доставка комбинации факторов роста с разной кинетикой высвобождения. Применив этот подход в доставке VEGF-165 и PDGF-BB в участки регенерации кости, исследователи получили быстрое формирование

зрелой сосудистой сети [304]. Показано, что усиление процессов васкуляризации и формирование минерализованной ткани было достигнуто при применении VEGF-содержащего каркаса из полилактидгликолида [PLGA], которые были имплантированы в дефекты черепа крыс, по сравнению с биоматериалом без VEGF [281]. Было получено образование сосудистой сети в течение недели при введении VEGF-содержащих каркасов из полигликолида [PLG] в сочетании с клетками эндотелия у мышей с экспериментальным алимфоцитозом [295]. Значительное увеличение костного регенерата было обеспечено комбинацией остеогенных [морфогенетический белок кости, BMP-4] и ангиогенных [VEGF] факторов вместе со стромальными клетками костного мозга [163, 231]. В России был создан и экспериментально апробирован препарат «Неоваскулген», действующим веществом которого является плазмидная ДНК, несущая ген VEGF-A [57, 165]. Экспериментальные исследования на животных показали, что активный ангиогенез в костных дефектах обеспечивает биоинженерная конструкция на основе октакальцийфосфата в сочетании с плазмидной ДНК, несущей ген VEGF-A [21, 58].

Применение митогенных факторов может иметь преимущества перед костным морфогенетическим белком, поскольку они шире воздействуют на процессы тканевой регенерации, запуская их по более естественному пути [169]. В клеточных культурах костного мозга было установлено, что экспрессия фактора стромальных клеток-1 α [SDF-1 α] способствует активации остеогенеза и ангиогенеза [335]. Это было подтверждено дальнейшими экспериментальными исследованиями, в которых добавление SDF в тканеинженерные скаффолды, имплантируемые в область костной регенерации, значительно усиливает ангиогенез и остеогенез в целевой зоне [21].

Таким образом, несмотря на большое количество разработок, до сих пор нет общепринятых рекомендаций по определению минимальных

требований [структурных и функциональных] для инженерных костных трансплантатов или стандартных клинических моделей [289]. Это может быть связано с большим разнообразием типов наблюдаемых клинических дефектов, которые, в свою очередь, могут влиять на выбор материала каркаса, источника клеток, способов доставки и терапевтических агентов [105, 136].

1.3. Применение стволовых клеток для создания костных моделей

В стоматологии для создания костных моделей *in vivo* рассматривается использование стволовых клеток [15, 121, 147, 155, 156]. По определению L.A.Fortier[2005] стволовые клетки – это уникальный тип живых клеток, которые обладают способностью к самообновлению и дифференцировке [206]. Они могут давать начало одному, а иногда и множеству различных типов клеток [113]. Стволовые клетки обнаружены во всех многоклеточных организмах и характеризуются способностью обновляться посредством деления митозом, сохраняя при этом недифференцированное состояние [18, 41, 120, 132].

Биология стволовых клеток стала важной областью для понимания регенерации тканей и внедрения в регенеративную медицину[16, 98, 108, 148]. Терапия стволовыми клетками включает манипуляции *in vitro* для замены и/или восстановления органов и тканей, и они при этом должны обладать адгезивной способностью, пролиферативной активностью и иммуномодулирующими свойствами [86, 156, 162]. После открытия и характеристики мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток [МСК] из костного мозга [КМ], МСК-подобные популяции из других тканей теперь охарактеризованы на основе критериев «золотого стандарта», установленных для МСК [216]. МСК, полученные из костного мозга [BM-MSC], способны давать начало различным линиям клеток, таким как остеогенные, хондрогенные, адипогенные, миогенные и нейрогенные [116, 130]. Также могут происходить от BM-MSC другие клоны такие как миогенные и нейрогенные [75, 83]. В последние двадцать лет проводится поиск МСК-

подобных клеток в конкретных тканях, что привело к открытию множества этих клеток в каждом органе и тканях млекопитающих [59, 108, 184, 247, 300].

Классическая стволовая клетка должна обладать двумя свойствами, а именно самообновлением и эффективностью [3, 70, 133].

- Самообновление - способность клетки претерпевать многочисленные циклы клеточного деления, поддерживая недифференцированное состояние [209]. Идеальная стволовая клетка должна обладать способностью к самообновлению, превышающей предел Ханусфилда [способность клетки пролиферировать до ~ 40-60 удвоений популяции, прежде чем она достигнет апоптоза][222].

- Эффективность - способность стволовых клеток к дифференцировке [220].

Все стволовые клетки делятся на:

1. Эмбриональные
2. Зрелые
 - Гемопоэтические
 - Мезенхимальные
3. Индуцированные плюрипотентные

Эмбриональные стволовые клетки способны к мультипотенциальной дифференцировке, но клиническое их внедрение ограничено из-за этических проблем, возможного онкогенеза и иммунного отторжения [17, 331]. Для формирования линий эмбриональных клеток используется внутренняя клеточная масса, то есть та часть, которая будет формировать эмбрион [321]. Особенностью эмбриональных стволовых клеток является то, что они обладают потенциалом дифференцироваться в зародышевые листы, а именно в эктодерму, энтодерму и мезодерму [244].

Зрелые стволовые клетки - мультипотентные стволовые клетки, выделяемые из костного мозга, пуповины, околоплодных вод, ткани мозга, печени, поджелудочной железы, роговицы глаза, жировой ткани, пульпы

зуба, десны и др. [26, 39, 79, 206]. Зрелые стволовые клетки сравнительно легче изолировать, у них редко встречается иммунное отторжение и образование тератом [135].

Индукцированные плюрипотентные стволовые клетки[IPS] – были открыты в 2006 году Кадзутоси Такахаси и Синъя Яманака[125]. Это развивающаяся концепция, подразумевающая перепрограммирование биологических задач клеток с внедрением в них 4 генов. Экспериментально это было сделано с эмбриональными стволовыми клетками путем трансфицирования их в донорские клетки с использованием соответствующих векторов [1]. Принципиальным отличием таких стволовых клеток является «обнуление» профиля метилирования ДНК [144, 315].

1.3.1. Альтернативные источники стволовых клеток

Для регенерации тканей полости рта и челюстно-лицевой области используются следующие источники стволовых клеток:

1. Костный мозг
2. Жировая ткань
3. Ткани ротовой полости и челюстно-лицевой области

Стволовые клетки костного мозга[BM-MSC] выделяют из грудины или гребня подвздошной кости [8, 10, 11, 334]. Костный мозг состоит из гемопоэтических и мезенхимальных стволовых клеток [67, 130]. Так как большая часть тканевых структур челюстно-лицевой области сформированы из мезенхимального зародышевого листка, то преимущество костного мозга заключается в том, что он имеет большой объем стволовых клеток, которые могут дифференцироваться в различные типы клеток, в том числе и остеогенные [87, 119, 157, 161]. Для регенерации кости предлагается использовать комбинацию из стволовых клеток костного мозга и эмбриональных тканей [100]. Недостатком получения этого клеточного материала является необходимость в наркозе при получении донорского материала и послеоперационная боль [116, 275].

Стволовые клетки жировой ткани[ADSC] выделяют из материала, полученного путём липэктомии или липосакции [65]. Они содержат группу плюрипотентных МСК, которые демонстрируют многолинейную дифференцировку [26, 341]. Преимущество жировой ткани состоит в том, что она имеется у большинства людей в большом количестве и легко доступна[153]. В челюстно-лицевой хирургии СК-подобные популяции из жировой ткани оказались многообещающими альтернативными источниками мультипотентных МСК.[4, 26, 30, 46, 65, 172, 204, 265, 341].

Согласно данным А. Alhadlaq с соавт. [2005] МСК. человека при воздействии адипогенной индуцирующей среды могут превращаться в жировые клетки [адипоциты] [174], что позволило их применять с каркасом соответствующей формы для реконструкции мягких тканей человека [4, 26, 29, 30, 31, 252]. Эти МСК способны давать начало, по крайней мере, 3 клеточным линиям: остеогенным, хондрогенным и адипогенным [39, 204].

А.В. Волков [2019] и А.С. Григорьян с соавт. [2015] показали, что у человека трансплантация тканеинженерной конструкции из аутогенной фракции жировой ткани происходит в остеогенном направлении, и это не зависит от источника происхождения клеточной культуры [30, 46].

Если стволовые клетки костного мозга и жировой ткани являются общеизвестными и хорошо изученными, то *стволовые клетки тканей полости рта* [внутриротовые стволовые клетки] рассматриваются как альтернативный вариант их применения [340].

Установлено, что внутриротовые стволовые клетки, полученные из эпителия резцового сосочка, небных складок [330], с поверхности бугров верхней челюсти [276], десны [78, 79, 270, 316], обладают способностью к множественной дифференцировке и могут давать начало, по крайней мере, трем различным клеточным линиям: остео/одонтогенным, адипогенным и нейрогенным [77, 145].

Сравнение между популяциями внутриротовых стволовых клеток и BMMSC показало, что внутриротовые стволовые клетки более склонны к

остеогенному развитию [78]. Внутриротовые стволовые клетки обладают качествами, подобными мезенхимальным стволовым клеткам, включая способность к самообновлению и потенциал к многолинейной дифференцировке [229]. Однако межклеточные взаимодействия между этими разными популяциями стволовых клеток остаются неизученными [272].

В ряде исследований стволовые клетки-предшественники, полученные из тканей зуба, использовались в тканевой инженерии на крупных животных для оценки их потенциала в доклинических исследованиях [262, 314].

Исследователи выделили и охарактеризовали целый ряд внутриротовых клеток-предшественников, представленных в таблице 1.

Таблица 1 - Внутриротовые стволовые клетки-предшественники

Ткань-донор	Общепринятые сокращения	Авторы
Пульпа постоянного зуба	DPSC [Dental Pulp Stem Cells]	[28, 217, 230]
Пульпа молочных зубов в стадии резорбции	SHED [Stem Cells From Human Exfoliated Deciduous Teeth]	[277]
Периодонтальные волокна	PDLSC [Periodontal Ligament Stem Cells]	[307]
Апикальный сосочек	APSC [Stem Cells From The Apical Papilla]	[313, 314]
Зубной фолликул	DFPC [Dental Follicle Precursor Cells]	[278, 279]
Слизистая оболочка рта	OESC [Oral Epithelial Stem Cell]	[81, 82, 187, 332]
Десна	GMSC [Gingival Mesenchymal Stem Cells]	[78, 79, 80, 270]
Альвеолярный сосочек		[228, 285]
Бугор верхней челюсти	GMSCs [Availability Of Gingival Mesenchymal Stem Cells]	[276]
Периапикальная киста	hPCy-MSCs [Human Periapical Cyst-Mesenchymal Stem Cells]	[267, 268, 317, 318]
Небные складки	pNC-SC [Palate-Derived Neural Crest Stem Cells]	[330]
Кератинизированная зона слизистой рта	H-GMSC [Human Hyperplastic Gingival Tissues]	[316]

Преимущество внутриротовых зрелых стволовых клеток состоит в том, что они: 1] обладают высокой пластичностью; 2] их можно замораживать на длительный период [идеально для банка стволовых клеток]; 3] показывают хорошее взаимодействие с графтами и факторами роста; 4] имеют легкий хирургический доступ и низкую болезненность донорского участка [215]. Показано, что стволовые клетки -предшественники волокон периодонта [PDLSC], экспрессируют маркеры эмбриональных стволовых клеток [Oct4, Sox2, Nanog и Klf4] и нервной ткани [Nestin, Slug, p75 и Sox10] [227].

Мезенхимальные стволовые клетки/клетки-предшественники десны [GMSC] содержат две субпопуляции - G-MSC: 90% происходящих из нервной ткани [N-GMSC], и 10% происходящих из мезодермы [M-GMSC], где N-GMSC больше способны дифференцироваться в нервные клетки, чем M-GMSC [332]. Нейродермальные стволовые клетки [N-GMSC], выделенные из слизистой оболочки полости рта, обладают превосходной иммуномодуляцией, демонстрируя ряд уникальных свойств, подобных стволовым клеткам, включая повышенную пролиферативную способность [82, 187, 332].

Стволовые клетки-предшественники пульпы [DPSC] и стволовые клетки-предшественники резорбированных молочных зубов человека [SHED] происходят из пульпы зуба взрослых и временных зубов соответственно [40, 64].

Стволовые клетки-предшественники апикального сосочка [SCAP] находятся в апикальном сосочке несформированных зубов. Из третьих моляров человека выделены стволовые клетки-предшественники зубного фолликула [DFSC][279].

Собственно, альвеолярная кость также содержит МСК. костного мозга [BM-MSC]. Примечательно, что МСК., выделенные в ходе хирургического удаления периапикальной кисты, были названы периапикальными цист-мезенхимальными стволовыми клетками человека [hPCy-MSC]

[267]. Несмотря на то, что они считаются «биологическими отходами», они более эффективно дифференцируются в направлении нейрогенеза и остеогенеза [318] и применялись при таких нейродегенеративных заболеваниях как болезнь Паркинсона, а также при регенерации костей [268, 318].

Однако до сих пор отсутствуют доказательства подтверждающие иммуномодулирующие свойства hPCy-MSC [319]. С другой стороны, А.В. Корель с соавт. [2019] показали, что остеогенные клетки обладают более выраженной резорбтивной способностью, нежели хондрогенные клетки [95].

1.4. Перспектива клинического применения внутриротовых стволовых клеток в хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии

Применение стволовых клеток для реконструкции тканей челюстно-лицевой области относится к числу сложных задач современной восстановительной медицины, что обуславливается многообразием функции этих тканей, связанных с воспроизведением мимики лица, артикуляции нижней челюсти, акта жевания и глотания и другими не менее важными функциями [85, 99, 186]. К тому же, сложная архитектура тканей ротовой полости и челюстно-лицевой области требует подбора комбинаций стволовых клеток и скаффолдов [трёхмерных структур, матрица, каркас], а также других факторов, оказывающих влияние на рост и дифференцировку клеток, и организацию внеклеточного матрикса [61, 102]. Скаффолды или матрицы - это трехмерные пористые или волокнистые структуры, представляющие собой механический каркас для клеток [101]. Они имеют сходство с внеклеточным матриксом костной ткани [27], позволяют равномерно распределять нагрузку на соседние ткани, повышают остеоинтеграцию с костной тканью реципиента и обеспечивают транспорт нутрицевтиков [66, 143]. Однако, несмотря на имеющиеся трудности по восстановлению дефектов челюстно-лицевой области с применением

стволовых клеток, клинические исследования в этом направлении в последнее время набирают значительные обороты [102, 141, 147].

Известно, что зубные ткани обладают низкой способностью к регенерации, либо таковой совсем не обладают [117, 164]. Поэтому исследователей интересует восстановительная способность следующих тканей зубов - дентина, пульпы зуба, цемента, периодонтальной связки, а также других тканей челюстно-лицевой области - черепно-лицевых костей, компонентов височно-нижнечелюстного сустава, связок, скелетных мышц, сухожилий, кожи, подкожных мягких тканей и слюнных желез [139, 140, 147]. В связи с этим ряд исследователей обратили пристальное внимание на МСК., полученные из тканей полости рта, благодаря простоте их получения и значительному потенциалу к мультипотентной дифференцировке [78, 203].

Стволовые клетки находят применение в восстановлении кости и мягких тканей при обширных черепно-лицевых дефектах, вызванных кистами челюстей, различными травмами, сопровождающимися образованием дефектов челюстно-лицевой области, послеоперационными деформациями. [8, 73, 92, 140]. Вместе с тем, наиболее часто используемыми методиками костной реконструкции, являются технологии использования аутологичной костной ткани [160], что имеет ряд существенных недостатков, таких как невозможность восстановления функции утраченной части, болезненность донорского участка, рубцевание и инфицирование [2, 74, 195].

Хорошим источником для новообразования костной ткани являются стволовые клетки, выделенные из пульпы зуба, которые обладают способностью дифференцироваться в остеобласты [27, 174, 175]. Многочисленные исследования показали, что выделенные из пульпы зуба [DPSC] стволовые клетки, обладают мощным плюрипотентным потенциалом [64, 326]. Важной их особенностью является способность синтезировать минерализованный матрикс, структурно сходный с дентином [218, 228, 234]. Авторами исследования [195], изучалась возможность регенерации более крупных дефектов челюстно-лицевой области при использовании

комбинации внутриротовых стволовых клеток со стволовыми клетками костного мозга. Было выполнено восстановление костной ткани с использованием коллагенового каркаса и стволовых клеток пульпы зуба, выделенных из третьих моляров у этого же пациента и клеток костного мозга[195].

Стволовые клетки, выделенные из волокон периодонта [PDLSC], обладают способностью *in vivo* образовывать альвеолярную кость, периодонтальную связку и цемент [128, 242]. Для регенерации дефектов костной ткани пародонта применяют аутологичные МСК., полученные из гребня подвздошной кости, в сочетании с плазмой крови, обогащенной тромбоцитами или фибринового сгустка, обогащенного лейкоцитами и тромбоцитами [8, 26, 48, 71, 77, 84, 334]. Экспериментальные исследования показали, что клетки PDLSC могут усиливать регенерацию тканей пародонта [286, 287]. Для восстановления пародонтальных тканей в эксперименте на собаках были апробированы трехмерные конструкции, включающие клетки PDLSC, полигликолид [PGA] в сочетании с β -трикальцийфосфатом [236]. Успешная колонизация клетками PDLSC биоразлагаемых графтов и их регенераторный потенциал были подтверждены в ряде экспериментальных исследований на животных [262, 324]. Также для восстановления тканей пародонта у животных были применены титановые имплантаты с нанесенными аутологичными стволовыми клетками костного мозга [157, 264].

Была описана процедура, согласно которой использовали микросферы, насыщенные клетками, дифференцированные по остеогенной линии. Это имело дополнительное преимущество, поскольку позволяло трансплантировать больше клеток и обеспечивать лучшую их целостность по сравнению с клеточными суспензиями или гелями. Так, F. Lagenbach с соавт. [2010] в исследованиях *in vitro* у лысых мышей для закрытия дефектов кости критического размера применили стволовые клетки, выделенные из резорбированных молочных зубов [SHED] [248]. Это позволило Y. Nishino с

соавт. [2011] рекомендовать дальнейшее исследование тканеинженерных конструкций с SHED-клетками для заживления хронических костных ран в челюстно-лицевой области [288].

Для восстановления тканей височно-нижнечелюстного сустава с помощью оцифрованных клинических изображений были созданы графты из децеллюляризованной кости в форме мышечков. Стволовые клетки засеивали в полученную форму и помещали в камеру биореактора, содержащую культуральную среду [213]. Благодаря подобным исследованиям, могут быть созданы тканеинженерные конструкции для восстановления суставных мышечков с использованием зрелых МСК и остеоподобных графтов [173, 175, 263].

По сравнению с другими мезенхимальными стволовыми клетками, МСК, полученные из тканей ротовой полости, более чувствительны к воспалительным процессам, в основном из-за адаптации этих клеток к скоплению бактерий в среде обитания. Сложная микросреда в десневом кармане является идеальным депо для колонизации разнообразных видов бактерий и это сообщество достаточно устойчиво и сбалансировано [292]. Возникновение экологического дисбаланса приводит к заболеванию тканей пародонта с выраженным бактериальным дисбактериозом, увеличению популяций различных патогенов и сдвигу состава бактериальной микрофлоры от грамположительной аэробной к грамотрицательной анаэробной [221].

В патогенных условиях внутриротовые МСК могут участвовать в противовоспалительных реакциях. При воспалении пародонта и образовании пародонтальных карманов, МСК опосредуют образование новой костной ткани и периодонтальных волокон подобной структуры [48, 203] Это происходит на фоне уменьшения количества тартрат-резистентных клеток, содержащих кислую фосфатазу, специфического гистохимического маркера остеокластов, и уровня провоспалительных цитокинов - фактора некроза опухоли- α [TNF- α] и интерлейкина-17 [IL-17], с одновременным

увеличением количества противовоспалительного цитокина IL-10 и сменой фенотипа макрофагов из M1 в M2 [200, 208, 232].

При применении стволовых клеток-предшественников резорбированных молочных зубов человека [SHED] и МСК костного мозга [BM-MSC] было продемонстрировано уменьшение утраты костной ткани пародонта путем подавления синтеза провоспалительных цитокинов TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , IL-17 и интерферона- γ [IFN- γ], и повышения уровня противовоспалительного IL-10 [200, 208, 232, 339]. Еще больше этот эффект усиливала предварительная обработка BM-MSC ацетилсалициловой кислотой [339]. В воспаленных тканях пародонта SHED также значительно увеличивает количество макрофагов CD206⁺ [M2] и способствует превращению макрофагов M1, секретирующих оксид азота [NO], реактивные формы кислорода [ROS] и TNF- α , в макрофаги CD206⁺ M2, которые высвобождают IL-10, TGF- β и аргиназу-1 [199, 208, 211]. Показано, что среда, состоящая из клеток BM-MSC, подавляет экспрессию матричной рибонуклеиновой кислоты [мРНК] IL-1, IL-6 и TNF- α , меняет соотношение IL-6/IL-10 [178]; способствует экспрессии альвеолярных остеобластов, фибробластов десны и клеток периодонтальных волокон [301]. В свою очередь, клетки BM-MSC оказывают влияние на соотношение рецептор лиганда ядерного фактора/остеопротегерин [RANKL/OPG], ответственных за процесс ремоделирования костной ткани [232, 339]. Это было показано в исследованиях при применении клеток BM-MSC, трансфицированных плазмидами OPG, при ортодонтической нагрузке на зубы. В этом случае подавлялся синтез RANKL и циклооксигеназы-2 [COX-2], вызывающих образование костных лакун [179].

Исходя из вышеизложенного можно сделать вывод, что за счет регенеративного и паракринного иммуномодулирующего действия внутриротовые МСК способствуют регенерации тканей пародонта и снижают резорбцию костной ткани. Они уменьшают уровень воспалительных компонентов, меняют соотношение RANKL/OPG в сторону

OPG, регулируя тем самым деятельность остеокластов. Поэтому внутриротовые МСК могут применяться в качестве иммунорегуляторов не только при заболеваниях полости рта, но и системной патологии. Эффект достигается в основном за счет уменьшения синтеза провоспалительных цитокинов и ингибирования резорбции костной ткани [256].

Итак, регенерация костной ткани представляет собой сложный процесс, включающий работу генетических и молекулярных триггеров, морфогенов, сигнальных молекул и регуляторов транскрипции, которые согласованно действуют на всех этапах заживления [72, 93, 166].

Необходимы дальнейшие исследования по налаживанию быстрого функционального кровотока через имплантированный трансплантат за счет не только факторов роста, но и определенных белков, участвующих в ангиогенезе. С другой стороны, важно установить каким образом стволовые клетки будут дифференцироваться до соответствующих типов клеток при использовании их в клинической практике.

Таким образом, клеточные технологии и биоинженерия являются важнейшим направлением персонализированной регенеративной медицины. Однако, они мало изучены для их применения в практической медицине, что и определяет актуальность настоящего исследования.

ГЛАВА II. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящая глава, согласно задачам, разделена на 3 части. В первой и второй частях изложены методики экспериментальных исследований *invivo* и *invitro*. В третьей части описаны методы клинических исследований в условиях амбулаторного хирургического приема пациентов с вторичными дефектами по высоте и ширине челюстей.

2.1. Дизайн научного исследования

Экспериментальная часть исследования была проведена *invivo* на 101 животных и *invitro* на 175 образцах клеточных культур человека и 24 клеточных культур кролика, полученных из внутриротовых источников. Клиническая часть содержит методики и материалы работы с 50 пациентами, которые имели дефекты костной ткани челюстей. Им проводилось восполнение объема кости остеозамещающими материалами для устранения вторичных дефектов челюстей [рис.1].

2.2. Методы работы *invitro* с культурами стволовых клеток, выделенных из внутриротовых тканей человека

В представленном исследовании проводилась работа *invitro* с клеточными культурами, полученными из внутриротовых источников человека - десны, слизистой оболочки рта, оболочки Гертвига, надкостницы из бугра верхней челюсти и костной ткани альвеолярного отростка. Изучали фенотипирование, дифференцировку и плюрипотентность клеток в зависимости от возраста донора, расположения на челюсти и тканевой принадлежности.

2.2.1. Методика получения материала для исследования

Было получено 175 образцов тканей ротовой полости у 25 пациентов [22 женщины и 3 мужчины] в возрасте от 19 до 61 года, которым проводилось хирургическое вмешательство в полости рта по поводу удаления ретинированных дистопированных третьих моляров верхней и нижней челюсти.

РАЗРАБОТКА И ВНЕДРЕНИЕ КОМПЛЕКСНОГО ТКАНЕИНЖЕНЕРНОГО И БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКОГО ПОДХОДА ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕЛЮСТЕЙ



Рисунок 1. Схема дизайна научного исследования

Получение образцов тканей осуществляли без дополнительной хирургической процедуры, не усугубляя тяжесть операционной травмы. После удаления третьих верхних моляров из бугра верхней челюсти из фрагментов отломков ткани выделяли биоптаты губчатой кости [КО] и надкостницы [НК] размером 1 см². После удаления третьего нижнего моляра из лунки со стороны наружной поверхности тела нижней челюсти острыми кюретами извлекали оболочку Гертвига [ОГ]. Забор биоптатов десны проводился во время формирования лунки после удаления третьего моляра, отсекая излишки повреждённых тканей размером 5x5 мм стерильным одноразовым скальпелем.

2.2.2. Методика культивирования стволовых клеток

Выделенные 175 тканевых биоптатов помещали в среду для транспортировки [DMEMF12, 2% FBS [Bioind.], 2 mM L-глутамин [StemCell Technology, США], 200 ед/мл пенициллина и 200 мг/мл стрептомицина [StemCell Technology, США], 200 ед/мл амфотерицин, 100 ед/мл гентамицин], и затем инкубировали при +4⁰С не менее 8 часов. Биоптат мелко диспергировали при помощи одноразовых стерильных скальпелей. Полученный гомогенат инкубировали в 1 мл 0,25% раствора трипсин+ЭДТА при 37⁰С в течение 1 часа. Реакцию останавливали в 10 мл отмывочной среды, гомогенат центрифугировали при 300 оборотах в течение 10 минут. Полученную суспензию инкубировали в 1 мл 0,15% раствора коллагеназы II типа [Sigma, США] при 37⁰С в течение 2 часов.

Полученный осадок ресуспендировали в 10 мл рабочей среды MesenCult [StemCell Technology, США] и подсчитывали количество жизнеспособных клеток. После этого суспензию переносили в культуральный флакон [150 см²], из расчета 3*10⁵ клеток на см². Культуры инкубировали 7 дней при 37⁰С и 5% CO₂, смену культуральной среды производили каждые 3 суток. Экспансию клеток проводили по стандартной методике культивирования СК: при достижении монослоем 70-80% конфлуэнтности клетки двукратно отмывали стерильным раствором фосфатно-солевого буфера, снимали с

поверхности флаконов 0,05% раствором трипсин+ЭДТА [инкубация в течение 2-3 минут], активность трипсина блокировали добавлением 3-5 мл отмывочной среды. Открепившиеся СК собирали в стерильные пробирки, центрифугировали при 300 оборотах в течение 10 минут и пересеивали с плотностью около 10^4 клеток на см^2 . СК культивировали до достижения необходимого количества, но не более 4 пассажей.

2.2.3. Методика иммунофенотипирования культур фибробластов десны и подсчет колониеобразующих единиц

Культуры фибробластов десны двукратно отмывали стерильным раствором фосфатно-солевого буфера, снимали с поверхности флаконов раствором трипсина в течение 3-х минут. Активность трипсина ингибировали разведением в стерильном растворе фосфатно-солевого буфера, клетки переносили в стерильные пробирки и центрифугировали при 300 оборотах в течение 10 минут. В аликвоте суспензии производили подсчет клеток при количестве $1 \cdot 10^5$ - $5 \cdot 10^5$ клеток в 100 мкл фосфатного буфера и проводили окрашивание мечеными антителами по инструкции производителя. Фенотипирование выполняли на проточном цитометре BD FACS Canto II [США]. Для идентификации и характеристики культивируемых клеток использовали набор моноклональных антител (CD) 14, 13,34,44, 45, 54, 73,90, 105, 116, 117 [BD Bioscience, США], которые являются маркерами, характерными для СК-предшественников. В качестве изотипического контроля к антителам использовали FITC-, APC-, PerCp- и PE-меченые IgG соответствующего класса. Для оценки эффективности колониеобразования СК первого пассажа высевали с клональной плотностью 3-4 клетки на см^2 поверхности чашек Петри и культивировали в течение 14 суток. Эффективность колониеобразования рассчитывали по формуле:

$\text{Эффективность колониеобразования} = \text{Nкол} / \text{Ткл} * 100\%, \text{ где}$

Nкол – число образовавшихся колоний;

Nкл – число эксплантированных клеток.

При подсчете учитывали колонии, содержащие не менее 50 клеток.

2.2.4. Методика исследования активности щелочной фосфатазы в культурах стволовых клеток

Активность щелочной фосфатазы в культурах клеток определяли по методу J.McGadey[271]. Внеротовые клетки высаживали в чашки Петри [«Corning», США] диаметром 3 см, содержащие культуральную среду без основного фактора роста фибробластов с плотностью 10 000 клеток на 1 см². Через 3 дня клетки промывали раствором фосфатно-солевого буфера [PM16, Serva, Германия] и фиксировали 3,7% раствором формальдегида на фосфатно-солевом буфере в течение 20 мин при комнатной температуре. Для этого 5 мг ВСР [5- бром-4-хлоро-3-индолил-фосфата] и 10 мг NBT [тетразолий нитро-голубой] отдельно растворяли в 0,1 мл диметилформамида. Оба раствора при помешивании добавляли к 30 мл буфера, содержащего 0,2 M Tris-HCl [pH=9,5] и 10 mM MgCl₂ [Sigma, США]. Раствор фильтровали через бумажный фильтр. Фиксированные формальдегидом клетки инкубировали при комнатной температуре в полученном растворе в течение 30 мин. После этого чашки промывали дистиллированной водой и фотографировали [рис.2].

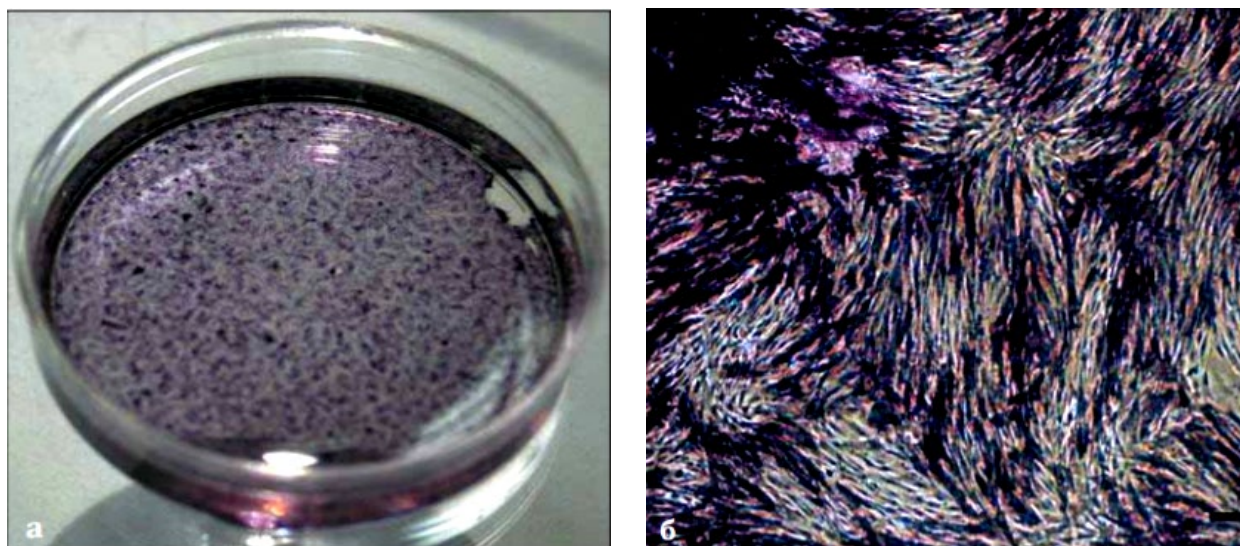


Рисунок 2. Определение активности щелочной фосфатазы в культуре клеток: а - колонии клеток, окрашенные по J. McGadey; б - микроскопия колонии [фазовый контраст]. Бар – 500 мкм. Цифровое контрастирование

2.2.5. Методика определения центров минерализации в культурах стволовых клеток

Образование центров минерализации, содержащих кальций, определяли у внеротовых клеток после остеогенной дифференцировки. Их выявляли с помощью окрашивания ализариновым красным по методу http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/alizarin_red_s.htm.

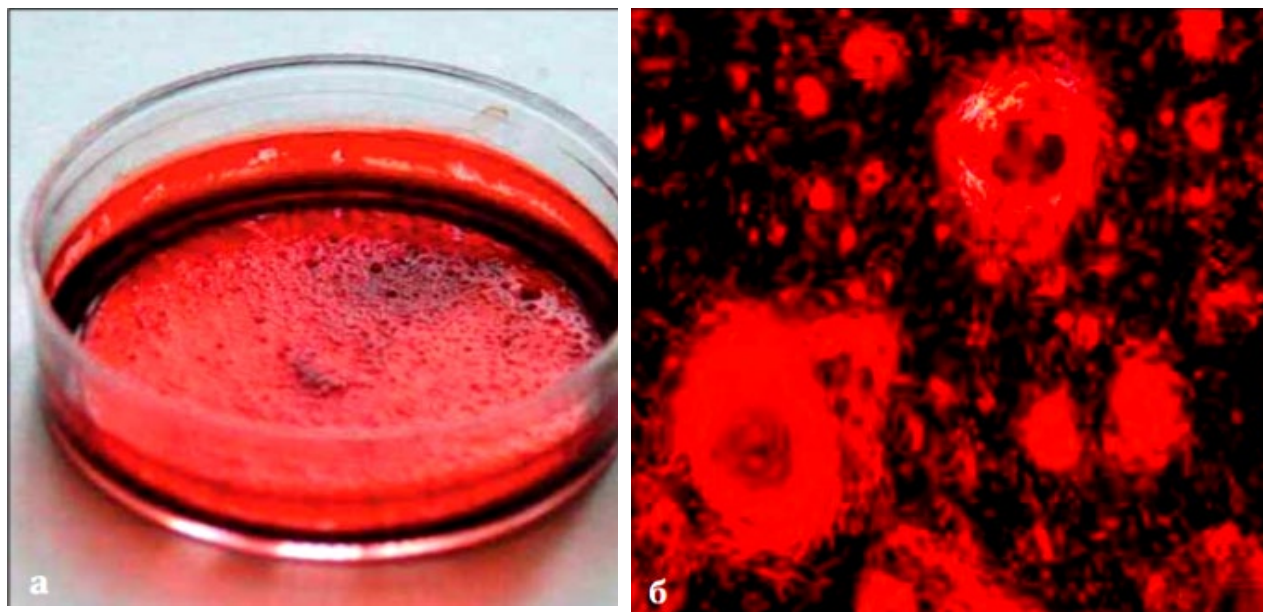


Рисунок 3. Определение образования центров минерализации в культуре клеток: а - колонии, окрашенные ализариновым красным; б - микроскопия колонии с выявлением минерализованных узелков. Бар – 500 мкм. Цифровое контрастирование

Для этого 2 г ализаринового красного растворяли в 100 мл дистиллированной воды. Через 30 мин доводили рН раствора до 4,1- 4,3 с помощью 10% раствора гидроксида аммония. Раствор фильтровали через бумажный фильтр. Окраску фиксированных клеток проводили в течение 10 мин при комнатной температуре [рис.3].

2.2.6. Методика получения изображения клеток

Культуры клеток наблюдали с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Diavert [Nikon, Япония]. Фотографии делали цифровой камерой NikonD70. Цифровое усиление контраста проводили с помощью программы ImageJ.

2.3. Методики проведения эксперимента на животных по созданию и имплантированию тканеинженерных конструкций

Все экспериментальные работы на животных проводились в соответствии с нормативами, предусмотренными «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» [ETS № 123 от 18.03.1986г.] и Федеральным Законом № 52 «О животном мире» от 24.04.1995г. Животных содержали в стандартных условиях вивария при температуре 25°C, с искусственным освещением и доступом к питьевой воде. Животные были доставлены из специализированных питомников, в соответствующих нормативам транспортных клетках. Каждая партия животных сопровождалась ветеринарным свидетельством. Исследования были проведены в соответствии с методическими рекомендациями по содержанию лабораторных животных в вивариях научно-исследовательских институтов и учебных заведений РД-АПК 3.10.07.02-09, а также в соответствии с требованиями ГОСТа Р от 01.03.2010 N 534343-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики».

В рамках экспериментальной части *in vivo* исследования была изучена разработанная нами композитная тканеинженерная конструкция [ТИК] на основе трикальцийфосфата [ТКФ], аутологичных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток десны [ММСК] и фибринового клея [ФК].

В эксперименте использовали 27 кроликов самцов породы Шиншилла со средней массой 2,5-3,0 кг, которые были разделены на 3 группы в зависимости от имплантируемого материала. Животных выводили из эксперимента на сроках, представленных в таблице 2. Для проведения

эксперимента у животных, которым имплантировали ТИК проводилась поэтапная методика:

- 1 этап - забор биоптатов [десна], культивирование клеток [2-3 недели];
- 2 этап - внесение ТИК в искусственно смоделированный дефект черепа;
- 3 этап - выведение кроликов из эксперимента и исследование аутоптатов. Имплантацию остеопластического материала животным выполняли по разработанному лабораторному протоколу.

Таблица 2 - Количество животных и сроки исследования

Всего животных	Группы (n)	Правая сторона	Левая сторона	Сроки исследования (сутки)
27	1-ая (n=9)	ТКФ+ММСК	ТКФ	30, 60, 120
	2-ая (n=9)	ТКФ+ФК		
	3-я (n=9)	ТКФ+ФК+ММСК		

2.3.1. Методика получения биопсийного материала у экспериментальных животных для культурального исследования

У кроликов, после тщательной антисептической обработки операционного поля раствором хлоргексидина биглюконата 0,12% в течение 45 секунд, под местным обезболиванием раствором Ultracain DS-forte 0,8 ml, со стороны преддверия полости рта, стерильным одноразовым скальпелем отслаивали слизистый лоскут и иссекали соединительнотканый участок десны размером 5x5 мм. Проводили репозицию слизистого лоскута, ушивали нитками викрил 5,0 и накладывали мазевую повязку (паста солкосерил). Аутотрансплантат помещали в стерильную герметичную пробирку объемом 10мл с питательной средой (ДМЕМ), антибиотиками и антимикотиками (пенициллин 100 ед./мл, стрептомицин 100 мкг/мл, гентамицин 200 мкг/мл, амфотерицин В 25 мкг/мл в среде). Биоптату десны в пробирке присваивали уникальный номер в соответствии с кодом опытного животного.

Дополнительно после забора биоптата у кролика с соблюдением правил

асептики из кубитальной вены однократно отбиралось 2 мл крови в сухие стерильные пробирки для последующего использования при подготовке композитной тканеинженерной конструкции. После забора биоптат и пробирки с кровью помещали в термоконтейнер и транспортировали в лабораторию Центра биомедицинских технологий ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И.Бурназяна ФМБА России.

2.3.2. Методика создания композитной тканеинженерной конструкции на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток

Исследуемая композитная ТИК состояла из *трикальцийфосфата* в виде гранул размером 150 -250 мкм [ЗАО «Полистом», регистрационный №ФСР 2011/11988 от 04.03.2013], *фибринового клея* [Тиссукол Кит, Baxter, Австрия] и *аутологичных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток фибробластов десны*, которые выделяли и культивировали у экспериментальных животных аналогично описанной выше методике [см. методику в разделе 2.2., п.п 2.2.2]

Гранулы синтетического трикальцийфосфата помещали в стерильную чашку Петри [d=94] таким образом, чтобы они образовали линию. Клеточную суспензию [1 мл] по каплям переносили по линии на гранулы из расчета 2×10^7 клеток на 1 г носителя. Затем через 5 минут в чашку Петри добавляли культуральную среду в объеме 1,5 мл, содержащую аутологичную сыворотку кролика, и затем инкубировали при 37°C в 5% среде CO_2 в течение 24 часов.

После инкубации композитную ТИК, состоящую из матрикса-носителя [ТКФ] и аутологичных ММСК, трижды отмывали от культуральной среды стерильным раствором фосфатно-солевого буфера и ресуспендировали в 0,5 мл физиологического раствора, содержащего 5% аутологичной сыворотки реципиента, и помещали в стерильные пробирки с номером, соответствующим коду донора. Для обеспечения оптимальной жизнеспособности клеток тканеинженерную конструкцию использовали в течение 12 часов с момента приготовления.

2.3.3.Методика имплантации композитной тканеинженерной конструкции у экспериментальных животных

Оперативное вмешательство проводилось строго по алгоритму. Всем животным внутримышечно осуществляли премедикацию раствором атропина сульфата из расчета 0,04 мг/кг, раствором цефазолина из расчета 25 мг/кг и раствором золетил-100 из расчета 30 мг/кг. Затем под инфильтрационной анестезией раствором Ульттракаина в объеме 1,7 мл проводили асептическую обработку операционного поля, поверхность кожи безопасным лезвием освобождали от шерстяного покрова. После в проекции сагиттального шва от бугра затылочной кости кпереди производился линейный разрез мягких тканей длиной 2-2,5 см. Распатором обнажали поверхность теменных костей и при помощи трепана формировали костные дефекты диаметром 10 мм без повреждения твердой мозговой оболочки, [рис.4].

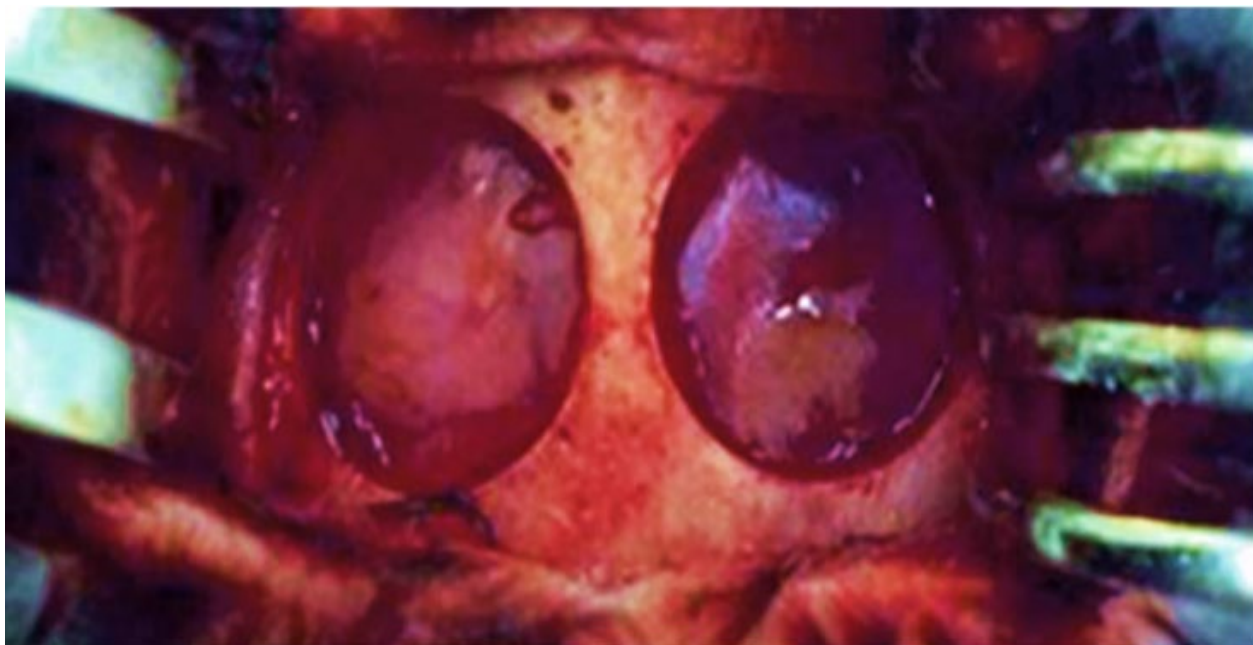


Рисунок 4. Дефекты теменных костей черепа кроликов после остеотомии трепаном

В дефекты теменных костей с правой стороны имплантировали экспериментальные остеопластические материалы [табл.2], а в дефект,

сформированный с левой стороны, вносили основной матрикс-носитель ТКФ.

Операционную рану ушивали послойно узловыми швами Vicryl 5,0 [надкостница, апоневроз], Monosyn 5,0 [кожа] и обрабатывали спиртовым 2% раствором бриллиантового зеленого. В динамике наблюдения за животными в течение 7 суток рану ежедневно обрабатывали 0,12% раствором хлоргексидина биглюконата и 2% спиртовым раствором бриллиантового зеленого.

2.3.4. Методика получения аутопсийного материала для исследования

После декапитации животных передозировкой препарата Золетил-100 [50 мг/кг] хирургическим режущим инструментом вдоль шва иссекали кожу животного от затылочной области, далее по средней линии до лобной, аккуратно обнажая крышу черепа до апоневроза и надкостницы. Острыми ножницами через большое затылочное отверстие от основания черепа отсекали крышу черепа, граничащую с затылочной, теменными и лобной костями.

После декальцинации в растворе Биодек R [«Biooptica», Италия] крыши черепов разделяли на две половины по сагиттальному шву. Затем выполняли разрез во фронтальной плоскости через середину ранее выполненного костного дефекта. Для анализа использовали дистальную половину теменной кости с регенератом. Избыток кости черепа отсекали.

2.3.5. Методика проведения конусно-лучевой компьютерной томографии регенератов костной ткани опытных животных

Аутопаты теменных костей черепа, содержащихся в 4% растворе нейтрального формалина не позднее 7 суток после фиксации, отправляли для исследования на конусно-лучевую компьютерную томографию на томографе J. Morita3D Accuitomo 170 [«J.Morita Corporation», Япония]. Каждый образец сканировался отдельно, без извлечения его из контейнера с фиксирующим

раствором, при одинаковых режимах и параметрах экспозиции: размер вокселя 0,08 мм, 80 кВ, 2 мА. Всего было изучено 54 образца из 1 эксперимента [раздел 2.3] и 108 образцов из 2 эксперимента [раздел 2.4].

Томограммы анализировали при помощи программного обеспечения Planmeca с Romexisviewer [«Planmeca Oy», Финляндия]. Плотность регенерата измеряли в аксиальной плоскости в относительных единицах, приближенных к единицам Хаунсфилда [HU] на трех уровнях: с наружной и внутренней сторон кортикальной пластинки, а также в срединной плоскости [уровень губчатого вещества]. Для измерений использовали инструмент ROI [region of interest] округлой формы, подбирая диаметр круга в 10 мм и точно позиционируя его в границах ранее выполненных костных дефектов [рис.5]. Из трех полученных значений плотности регенерата в области костного дефекта [на трех уровнях в аксиальной проекции] рассчитывали показатели для статистического анализа.

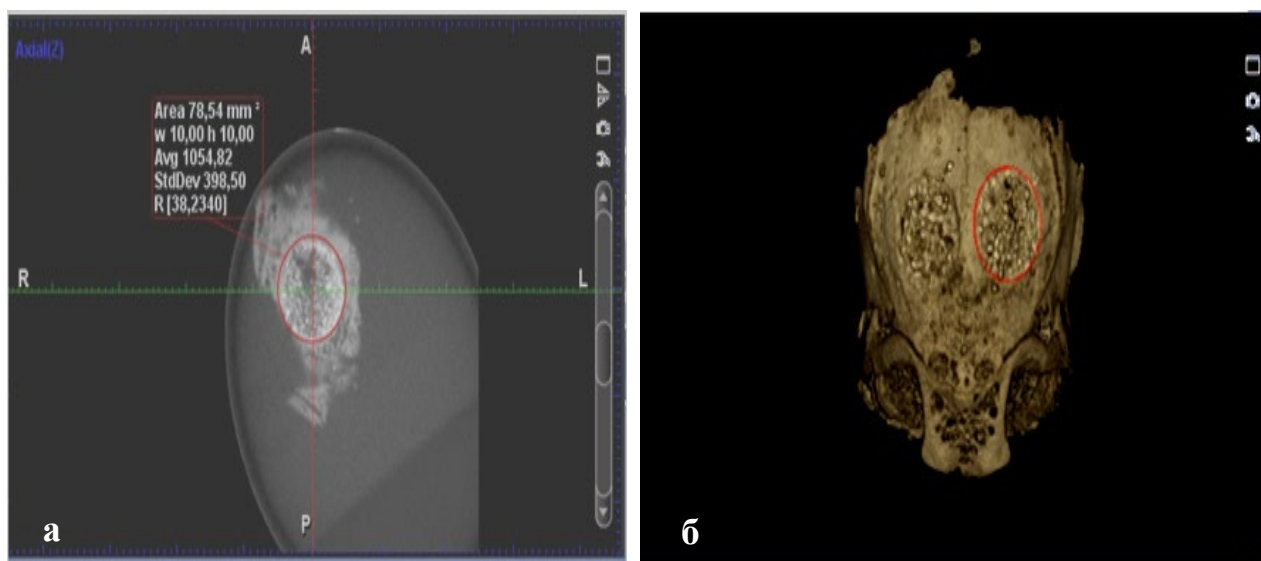


Рисунок 5.Рабочая область программы Planmeca Romexis Viewer при определении плотности регенерата. Красным кругом выделена область измерения, ROI диаметром 10 мм: а) вид в сагитальной проекции; б) вид в трансверзальной проекции – модель костной плотности.

2.3.6. Методика гистологического исследования регенератов костной ткани опытных животных

Микропрепараты изготавливали по стандартной методике от изготовления парафиновых блоков до получения шлифов. Образцы отделяли, фиксировали в 10% забуференном растворе формалина, выполняли декальцинацию по стандартной методике [реагент Биодек R, Италия], затем заливали в парафиновые блоки. Гистологические срезы, толщиной 4 мкм, были получены на микротоме HM355S [Thermo Scientific, Германия]. Описательный микроскопический анализ проводили с использованием микроскопа AxioLab A1 [Carl Zeiss Microscopy, Германия]. Окраску полученных срезов проводили гематоксилином и эозином по Мейеру, Папаниколау, Массон – Голднеру, серебрением по Гордону по методу [97, 146].

Все изготовленные препараты подвергали сканированию на «Mirax scanner» [Carl Zeiss]. Полученные при различных увеличениях цифровые изображения анализировали на микроскопе LeicaDM2500 с цифровой камерой Leica EC5.

В образцах выявляли наличие костных консолей, увеличение сосудистой сети, миграцию остеокластных клеток, зон лизиса кости, увеличение в размерах костного матрикса.

2.3.7. Методика создания тканеинженерной конструкции на основе обогащенного тромбоцитами фибрина и диоксида церия

В эксперименте использовали 20 половозрелых кроликов самцов породы Шиншилла весом 2,5-3,0 кг.

В работе использовался золь полимерных микрокапсул цитратного CeO_2 в физиологическом растворе Parg/DS/Parg/DS/Parg/цитратный CeO_2 /Parg/DS, где Parg – Поли-L-аргинин-гидрохлорид Mr 15-70 кДа; DS – декстран сульфата натрия Mr 40 кДа, полученный по методике [235]. Исследование проводили в соответствии с протоколом, рекомендованному ISO [стандарт ISO 7405: 1997][233].

Для получения фибрина 4 мл крови отбирали из боковой вены уха кролика при помощи шприца 5 мл и иглой 23G, предварительно смоченного в растворе цитрата натрия и в пробирки, содержащие 3,8% цитрата натрия. Стабилизированную цитратом кровь переносили в пробирки объемом 1,5 мл и 10 минут центрифугировали при 1000 об/мин. После центрифугирования образцы крови отбирали в новую пробирку, повторно 10 минут центрифугировали при 1500 об/мин. [рис.6А]. После повторного центрифугирования аккуратно удаляли плазму крови, и получали 0,5 мл смеси, обогащенной тромбоцитами [PRP].

К 0,5 мл PRP добавляли 50 мкл суспензии диоксида церия, аккуратно перемешивали. К плазме крови с диоксидом церия добавляли 100 мкл Тромбина в виде суспензии с концентрацией 2 мг/мл и 100 мкл Ренампласина, представляющий собой тромбопластин с фактором III и ионами кальция. Формирование сгустка происходило в течение 1 минуты, его контракция еще в течение 1 минуты. Фибриновый сгусток с тромбоцитарными клетками и диоксидом церия оттискивали в простерилизованной чашке Петри и имплантировали в искусственно сформированное костное ложе [рис.6Б].

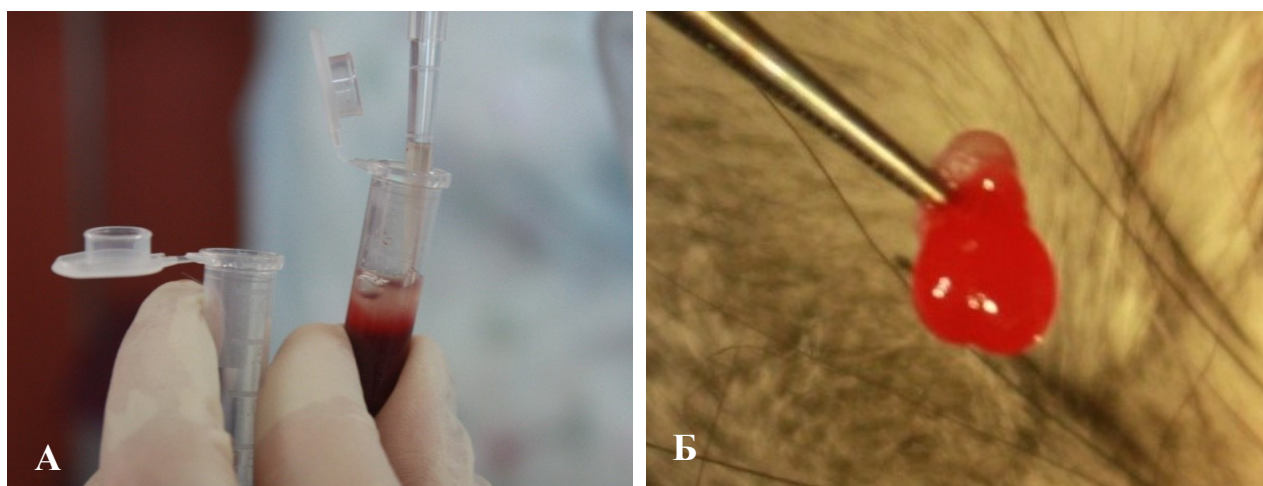


Рисунок 6. Получение тканеинженерной конструкции: А - отбор супернатанта PRF; Б - сформированный сгусток PRF-наноCeO₂ после добавления Тромбина и Ренампласина

2.3.8. Методика имплантации тканеинженерной конструкции на основе обогащенного тромбоцитами фибрина и диоксида церия у экспериментальных животных

Для проведения эксперимента животных обезболивали и наркотизировали внутримышечным введением препарата Ксилазин в дозе от 4 до 6 мг/кг Золетил-100 в дозе от 5 до 10 мг/кг. Дозировку препаратов подбирали в соответствии с весом животного. Затем проводили разрез мягких тканей по длине нижнего края нижней челюсти, отслаивали тканевой лоскут до обнажения кости. В костной ткани нижней челюсти с обеих сторон высверливали отверстие при помощи бора с водяным охлаждением на глубину 4 мм и внешним диаметром 5 мм [рис.7А, Б].

В правосторонний дефект [рис.8А]вносили тканеинженерную конструкцию на основе обогащенного тромбоцитами фибрина [PRF, Platelet-rich fibrin] и диоксида церия [CeO_2], в левосторонний дефект имплантировали материал из бычьей кости «Bio-oss» [рис.8Б].

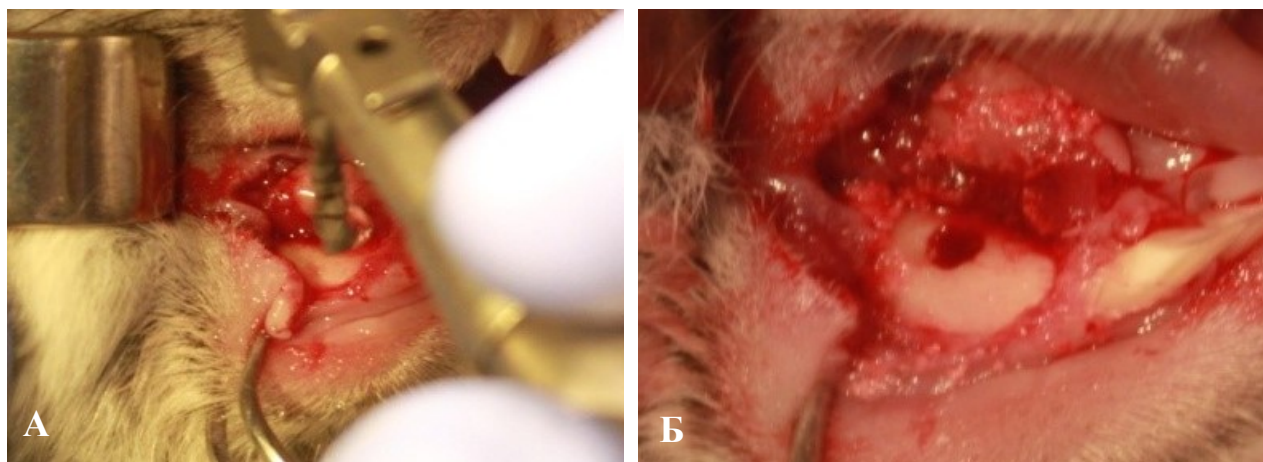


Рисунок 7. Фотографии полости рта экспериментальных животных: А - процесс препарирования полости в челюсти для проведения эксперимента; Б - сформированный костный дефект в челюсти

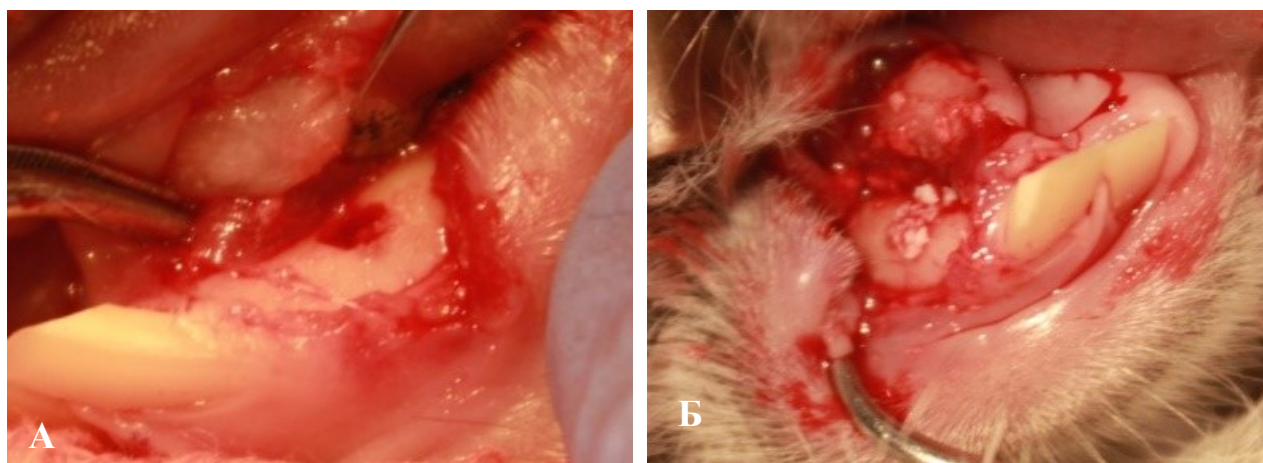


Рисунок 8. Фотографии полости рта экспериментальных животных: А - внесение в сформированный костный дефект тканеинженерной конструкции, содержащей PRF с нанодисперсным диоксидом церия; Б - внесение в дефект ксеногенных гранул «Bio-oss»

Для обезболивания в послеоперационном периоде животным через 30-60 минут после введения Ксилазина, внутримышечно вводили Атипамезол [«Антимедин»] 5 мг/мл, 0,35 мг/кг, а также Катозал [бутафосфан+В12] 0,5 мл/кг подкожно в течение 5 дней. Раны ушивали с обеих сторон биорезорбируемым шовным материалом «Викрил Плюс». Ежедневно для купирования послеоперационных болей в течение 3 дней внутримышечно вводили препарат мелоксикам 0,5 мг/кг.

Всех опытных животных выводили из эксперимента на сроках 15, 25, 35, 45 и 55 сутки внутривенным введением препарата Золетил-100 в дозе 50 мг/кг. В каждый срок эксперимента выводили по 4 животных. На аутопсийном материале проводили гистологическое исследование [см. описание методики в разделе 2.3., п.п. 2.3.6.] и иммуногистохимическое исследование.

2.3.9. Методика иммуногистохимического исследования

Постановку иммуногистохимических реакций после высокотемпературного восстановления антигенных детерминант в РТ-модуле для термической обработки парафиновых срезов осуществляли в аутостейнере Thermo Scientific, [Великобритания] согласно протоколам,

прилагаемым фирмами-изготовителями к моно- и поликлональным антителам. В качестве первичных использовали антитела к MMP-9 и TIMP-1 [Spring Bioscience Corporation, USA]. Для визуализации реакций применяли готовую тест-систему с универсальными вторичными антителами, мечеными хромогеном [3,3'-диаминобензидином] – Histophine [Nichirei Corp., Япония]. Учитывали два негативных контроля [на специфичность реакции и отсутствие активной эндогенной пероксидазы] и позитивный на специфичность реакции. Количественный анализ экспрессии MMP-9 и TIMP-1 путем подсчета общей площади (в кв. пикселях) окрашенных зон в условных единицах (y.e) по методике [126].

2.4. Методика исследования экспериментальных животных с имплантацией двухкассетной биоинженерной конструкции

Экспериментальные исследования по имплантации двухкассетной биоинженерной конструкции [ДБК] проводились на 54 кроликах мужского пола породы Шиншилла со средней массой 2,5-3,0 кг, которые были разделены на группы. В эксперименте было проведено сравнение двух остеопластических материалов: с ОКФ и двухкассетной системой – с двумя терапевтическими генами, кодирующими VEGF-A-165 и SDF-1 α (pl-VEGF-A-SDF), под разными цитомегаловирусными промоторами [табл.3].

Животных выводили из эксперимента передозировкой препарата Золетил-100 на сроках, представленных в таблице 3.

Таблица 3 - Количество животных, число дефектов и сроки исследования

Всего	Группы (n)	Правая сторона (опытная)	Левая сторона (сравнения)	Сроки исследования (сутки)
54	1-ая (n=27)	ОКФ/VEGF/SDF-1 α	ОКФ	30, 60, 90
	2-ая (n=27)			

Для проведения эксперимента у животных, которым имплантировали остеозамещающие материалы, проводилась поэтапная методика:

1 этап – создание искусственного дефекта в теменной части черепа [см. методику в разделе 2.3., п.п. 2.3.3.];

2 этап - внесение ДБК в искусственно смоделированный дефект черепа [см. методику в разделе 2.3.3.];

3 этап - выведение кроликов из эксперимента и получение аутопсийного материала [см. методику в разделе 2.3., п.п. 2.3.4].

Образцы были изучены гистологическими [см. методику в разделе 2.3.6.] и гистоморфометрическими методами.

2.4.1. Методика создания двухкасетной биоинженерной конструкции

Была разработана двухкасетная биоинженерная конструкция, которая состояла из гранул *октакальцийфосфата* $\text{Ca}_8\text{H}_2[\text{PO}_4]_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ [ОКФ] диаметром 500–1000 мкм с пористостью до 70%, *плазмидной ДНК с геном, кодирующего фактора роста эндотелия сосудов [VEGF] и фактора стромальных клеток-1 α [SDF-1 α]*. Совмещение компонентов проводили по разработанному лабораторному протоколу [58, 89].

В качестве основы был использован однокассетный ген-активированный остеопластический материал, содержащий 100 мкг биологически активных нуклеиновых кислот в 1 гр матрикса-носителя ОКФ [ООО «Гистографт» Россия, Москва, № РЗН 2019/8310 от 23.04.2019, прил.1 и прил.2] [рис.9].



Рисунок 9. Остеопластический материал «Гистографт», состоящий из гранул ОКФ и плазмидной ДНК с геном, кодирующим фактор роста эндотелия сосудов

Препарат «Гистографт» содержит биологически активный компонент VEGF-165 разработанный ПАО «Институт Стволовых Клеток Человека» [РУ ЛП-000671 от 28.09.11] [138]. В качестве вспомогательных компонентов в препарат входят моногидрат декстрозы – 60,0 мг [НД 42-11395-07], додекагидрат натрия гидрофосфата – 3,94 мг [ГОСТ 4172-76], дигидрат натрия дигидрофосфата – 0,160 мг [ГОСТ 245-76]. Форма выпуска препарата в виде лиофилизированного порошка белого цвета, содержащего ДНК плазмидной сверхскрученной pCMV-VEGF-165 1,2 мг.

2.4.2. Методика получения гистоморфометрических изображений

Гистоморфометрический анализ выполняли по методу [60] с модификациями. Для количественного подсчета объема новообразованного костного регенерата загружали изображение – гистотопограмму среза теменной кости с областью ранее выполненного костного дефекта – в программу Adobe Photoshop CS 6 [Adobe, США]. Затем линиями очерчивали вертикальные границы ранее выполненного костного дефекта, а

горизонтальными – проекции надкостницы и твердой мозговой оболочки [рис. 10].

Дополнительно, область костного дефекта разделялась на четыре равные части по 2,5 мм каждая, точность расстояний [разметки] обеспечивалась применением измерительных инструментов в программе «Pannoramic Viewer» [3DHISTECH, США].

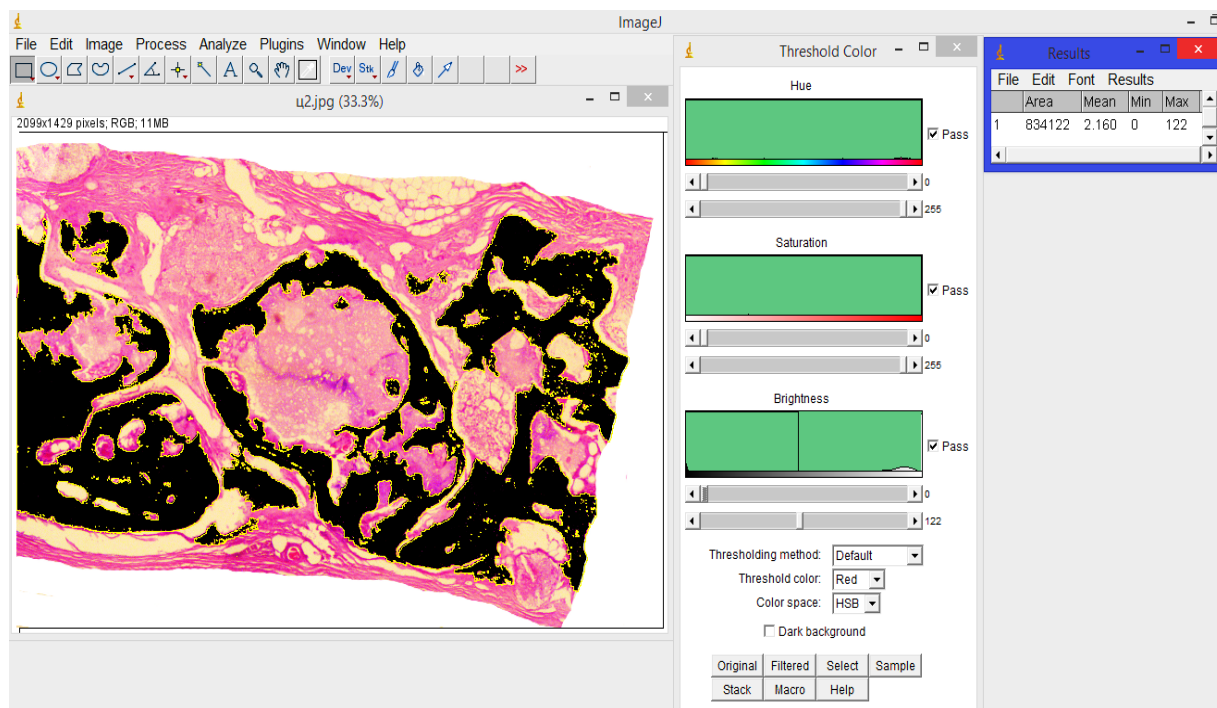


Рисунок 10. Интерфейс рабочей области программы «ImageJ» при определении количества пикселей изучаемой области костного регенерата [рис. по И.Я. Бозо, 2017 [21]]

Далее на программе Adobe Photoshop CS 6 выполняли кадрирование гистотопограммы по ранее очерченным границам с получением трех отдельных изображений: центральная зона и 2 краевых, в сумме образующих периферическую.

Затем на полученных изображениях выполняли заливку костного регенерата черным цветом для упрощения дальнейшей обработки. Кодированные изображения с размеченной черным цветом костной тканью подвергали сегментации в программе «ImageJ» [National Institutes of Health,

США]с определением количества пикселей выделенной области с применением статистического модуля. Определив общее количество пикселей в зоне гистотопограммы, вычисляли долю костного регенерата (%) в общей в общей площади костного дефекта.

2.4.3. Методика проведения морфометрической оценки аутопсийных срезов костной ткани экспериментальных животных

В основу гистоморфометрического расчета были положены параметры и критерии морфометрической оценки по методу [30].

Микропрепараты окрашивали гематоксилином и эозином, по Мейеру, Папаниколау, Массон – Голднеру и серебрением по Гордону. Далее срезы препаратов подвергали сканированию на «Mirax scanner» [Carl Zeiss].

Полученные при различных увеличениях цифровые изображения анализировали на микроскопе LeicaDM2500 с цифровой камерой LeicaEC5.

Компьютерная гистоморфометрия гистологических препаратов проводилась в программном комплексе Megamorph12 [«ГистоЛаб», Москва, Россия].

Измерялись параметры: объем губчатой кости, объем кортикальной кости, среднюю ширину трабекул, поверхность резорбции. Обработка полученных данных выполнялась в программе R version 3.0.3.

Параметры морфометрии представлены в таблице 4.

Таблица 4- Параметры морфометрии регенератов костной ткани[30]

Параметр	Описание	Параметр	Описание
N.ob	Количество остеобластов	BB	Костный баланс
N.oc	Количество остеокластов	TV	Объем образца
N.Mf	Количество макрофагов	BV/TV	Относительный объем костной ткани
N.Mat.Gs	Количество гигантских клеток на поверхности материала	FbV/TV	Относительный объем фиброзной ткани

N.Mat.Ob	Количество остеобластов на поверхности материала		Ma.V/TV	Относительный объем костного мозга
Ob.S	Остеобластическая поверхность		Mat.V/TV	Относительный объем остеопластического материала
Oc.S	Остеокластическая поверхность		AdV/TV	Относительный объем жировой ткани
Ob.S/BS	Относительная остеобластическая поверхность		VsV/TV	Относительный объем сосудов
Oc.S/BS	Относительная остеокластическая поверхность		Mat.ES/M at.S	Относительная эрозивная поверхность материала [показатель резорбции материала]
MatBS	Относительная площадь контакта кости с материалом			
Mat.Gc.S	Относительная площадь, занимаемая гигантскими клетками на поверхности материала		Mat.Ob.S	Относительная площадь, занимаемая osteoblastami на поверхности материала
ES/BS	Относительная эрозивная поверхность кости [показатель резорбции костной ткани]			

2.5. Методы клинического исследования пациентов с дефектами костной ткани челюстей

Было проведено рандомизированное контролируемое исследование пациентов, поступивших на лечение в хирургическое отделение Клинического центра стоматологии Университетской клиники МГМСУ. Все пациенты подписывали информированное согласие и получали разъяснение о предстоящем исследовании.

2.5.1. Исследуемая популяция

В настоящем исследовании хирургическое лечение было оказано 50 пациентам обоего пола [17 мужчин и 33 женщин], средний возраст $41,2 \pm 3,13$ лет с отсутствием одного или нескольких зубов на верхней или нижней челюсти в сочетании с дефицитом костной ткани альвеолярной кости по высоте и/или ширине [табл.5]. По виду имплантированного остеозамещающего материала пациенты были разделены на две группы:

1 группа [основная] – имплантировали остеопластический материал «Гистографт» на основе октакальциевого фосфата и биологически активных нуклеиновых кислот с геном VEGF [рис.4] в сочетании с аутологичной костной стружкой.

2 группа [сравнения] – имплантировали ксеногенный ГАП, выделенный из бычьей кости - «Bio-Oss» [«Geistlich», Швейцария; № ФСЗ 2009/04748 от 14.07.2009], в сочетании с аутологичной костной стружкой. Соотношение искусственного материала с аутокостью было 50/50.

Таблица 5. – Характеристика участков реконструкции костной ткани с применением остеозамещающих материалов

Участки кости, где проводилась реконструкция	Группы [n=50]	
	Основная [n=18]	Сравнения [n=32]
Атрофия альвеолярного гребня верхней челюсти	10	18
Атрофия альвеолярного гребня нижней челюсти	8	14

Критерии включения

Все участники испытания отвечали следующим критериям:

Мужчины/женщины в возрастном диапазоне 20 - 70 лет включительно;

Подписание информированного согласия на участие в клиническом испытании;

Частичное или полное отсутствие зубов на верхней или нижней челюсти;

Атрофия костной ткани альвеолярного отростка верхней или альвеолярной части нижней челюсти;

Высота костной ткани в области реконструкции по данным конусно-лучевой компьютерной томографии от 1 до 6 мм [нет возможности установить короткие имплантаты];

Ширина костной ткани в области реконструкции по данным конусно-лучевой компьютерной томографии от 1 до 4 мм [нет возможности установить узкие имплантаты];

Минимальная необходимая высота аугментации по высоте – 3 мм.

Минимальная необходимая высота аугментации по ширине – 2 мм.

Максимальная необходимая высота аугментации по высоте – 8 мм.

Максимальная необходимая высота аугментации по ширине – 4 мм.

Критерии не включения субъектов

Пациент считался неподходящим для исследования, если присутствовал хотя бы один из следующих критериев:

Возраст до 20 лет или старше 70 лет;

Невозможность или нежелание дать информированное согласие на участие в исследовании или на выполнение требований клинического исследования;

Прогрессирующие соматические заболевания [клинически выраженные заболевания сердечно-сосудистой системы, заболевания крови, кроветворных органов и эндокринной системы, заболевания щитовидной и паращитовидной желез в анамнезе, злокачественные новообразования, перенесенная лучевая терапия в области головы и шеи, системные заболевания соединительной ткани, иммунопатологические состояния, сахарный диабет];

Злоупотребление алкоголем;

Предшествующее лечение препаратами, влияющих на метаболизм костной ткани.

Критерии исключения

- Обострение или развитие острой соматической патологии;
- Беременность и лактация;
- Отказ пациента от дальнейшего участия в исследовании;
- Индекс зубного налета [PI] > 15%;
- Индекс кровоточивости зубодесневой борозды [SBI] > 10%;
- Несоблюдение назначений и послеоперационных рекомендаций;
- Острые воспалительные процессы в полости рта.

Критерий прерывания исследования

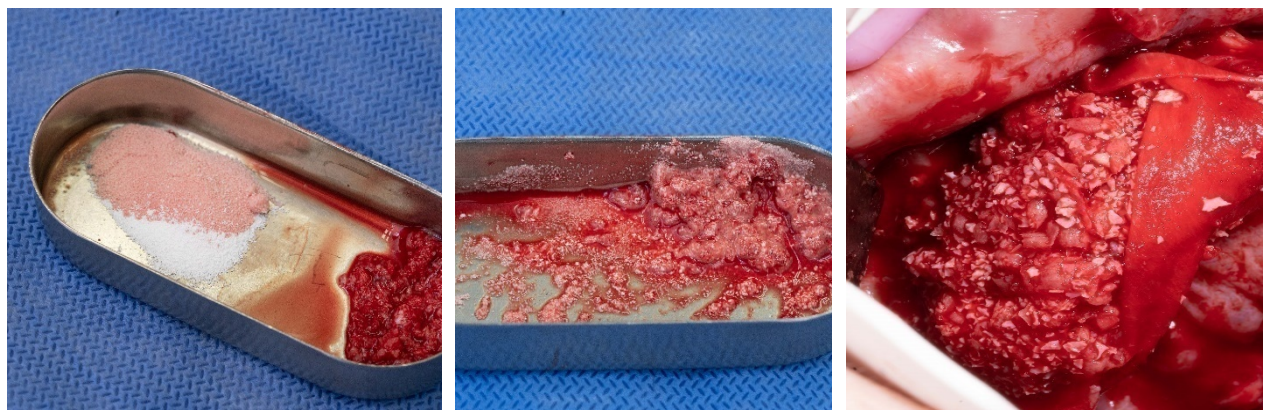
Исследование должно быть приостановлено, закончено досрочно или прекращено в случае развития серьёзных нежелательных явлений или побочных эффектов.

Критерии выбывания из исследования

- Перфорация мембраны Шнейдера более 5 мм на этапе проведения операции синус-лифтинга;
- Беременность на любом сроке.

2.5.2. Методика проведения хирургической операции с имплантацией остеозамещающего материала

Для проведения операции проводилась подготовка остеозамещающего материала для внесения его в зону дефекта челюстей [рис.11А]. Остеозамещающий материал разбавляли 0,9% раствором NaCl, а затем перемешивали одноразовым стерильным шпателем. Производили забор аутоостружки у пациента с помощью скребка MicroOSS. Далее смешивали аутоостружку и остеозамещающий материал [рис.11Б].



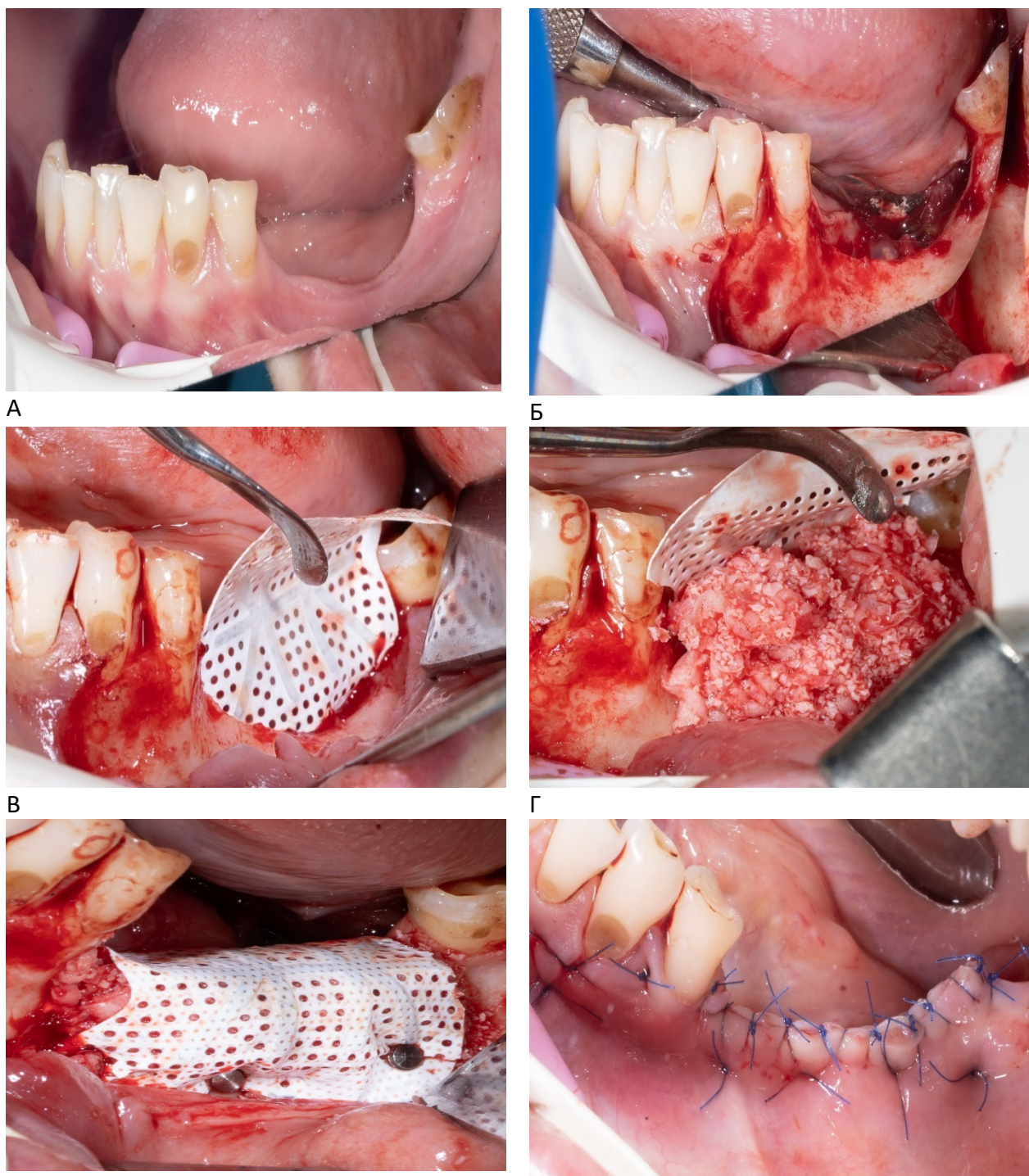
А

БВ

Рисунок 11. Получение остеопластического материала: А - Подготовка остеопластического материала для перемешивания; Б – готовая смесь; В - Внесение остеопластического материала в полость дефекта

После антисептической обработки полости рта 0,12% раствором хлоргексидина проводили проводниковую и инфильтрационную анестезию Ultracain DS Forte в объеме 1,7мл X 3. Затем осуществляли разрез по вершине альвеолярного гребня [рис.12 А] и вертикальный разрез в области медиально-расположенного зуба и отслаивание слизисто-надкостничного лоскута [рис.12 Б]. После этого в зону дефекта вносили материал ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой [группа опытная] или ксеногенный ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой [группа сравнения] в количестве 15-20 грамм, необходимом для заполнения дефекта челюсти и последующей отсроченной установки дентальных имплантатов [высотой не менее 10 мм] [рис.11В,12Г]. Закрывали мембраной, фиксировали титановыми пинами [рис.10Д] и ушивали рану нитью Vicryl 5-0 [рис.12Е].

В послеоперационном периоде назначался Аугментин [625 мг 3 раза в день/7 дней], Аквалор+Изофра [2 раза в день/ 7 дней], полоскания 0,12% раствором хлоргексидином биглюконата по 1 минуте 3 р/день в течение двух недель. В течение недели запрещалось чихать с закрытым ртом (при синус-лифтинге), осуществлять физические нагрузки, посещать сауну и баню. Контрольный осмотр раны осуществляли на 1, 3 и 7 дни после операции.



Д Е
Рисунок 12. Этапы хирургической операции с имплантацией остеозамещающего материала: А Вид участка убыли костной ткани до операции; Б] разрез по вершине альвеолярного гребня, вертикальный разрез и отслаивание слизисто-надкостничного лоскута; В] фиксация края мембраны в костном окне; Г] внесение остеопластического материала в зону дефекта; Д] укладка мембраны и фиксация пинами; Е] укладка слизисто-надкостничного лоскута и фиксация узловыми швами.

2.5.3. Методики оценки эффективности проведения хирургической операции челюстей после имплантации остеозамещающего материала

Первичные критерии:

- Клинические: характеристика течения послеоперационного периода [общие и местные симптомы] проводилась на каждом визите с внесением в визуально-аналоговую шкалу независимым наблюдателем следующих данных [табл.6] по методу [275, 280, 294]:

Таблица 6 – Оценочные критерии послеоперационного периода

Параметры	Критерии [баллы]			
	Отсутствует	Слабый	Средний	Сильный
Инфильтрация [294]	0	1	2	3
Болевые симптомы [275,280]	0	1-35	51-75	76-100
Гиперемия [294]	0	1	2	3

Дополнительно у пациентов оценивали следующие показатели:

- температура тела;
- признаки несостоятельности швов в области операции;
- наличие гематомы мягких тканей в челюстно-лицевой области;
- наличие гематомы на слизистой оболочке в области операции;
- признаки нагноения раны (гиперемия, отек, усиление боли);
- признаки миграции костного материала из области операции в полость рта;
- наличие заложенности носа и наличие отделяемого экссудата из носовых ходов [при синус-лифтинге];
- образование ороантрального свищевого хода [при синус-лифтинге];
- признаки экспозиции мембраны;
- признаки расстройства чувствительности в области операции;
- экссудация.
- Рентгенологические: КЛКТ, измерение объема костного регенерата в

мм и оценка минеральной плотности костной ткани;

- Лабораторные: гистологический анализ биопсийного материала через 6 месяцев после имплантации одного или двух типов комбинации костнопластических материалов.

Вторичные критерии:

Через 6 месяцев после операции проводилось рентгенографическое исследование с применением конусно-лучевого компьютерного томографа с оценкой объемных параметров регенерата костной ткани.

В первичную медицинскую документацию, индивидуальные регистрационные карты, лабораторные журналы, другие материалы исследования, и т.п. вносили соответствующие записи результатов исследования.

2.5.4. Методика получения биопсийного материала на хирургическом этапе установки дентального имплантата

Перед формированием ложа для имплантата операционное поле в течение минуты орошали 0,12% раствором хлоргексидина и проводили проводниковую или инфильтрационную анестезию Ultracain DS Forte 1,7мл х3. На альвеолярном отростке делали паракрестальный разрез и отслаивали слизисто-надкостничный лоскут. В области проведенной костной реконструкции формировали ложе под имплантат при помощи трепана с внутренним диаметром 2 мм [Meisinger, Германия][рис.13].

После выполнения биопсии костной ткани пациенту в процессе стандартного хирургического лечения устанавливали дентальный имплантат.

Сроки наблюдения за пациентом в послеоперационном периоде, все назначения и рекомендации соответствовали стандартам для данного метода лечения.

Столбик полученного материала извлекали из внутренней части трепана, затем для хранения и транспортировки гистологического материала полученный биоптат помещали в пробирку со средой [Гистофор; Бивитрум, Россия]. Пробирки были пронумерованы в соответствии с кодом пациента,

присвоенном при его включении в исследование. Гистологический анализ биоптатов костной ткани пациентов выполняли в лаборатории ФГБУ ГНЦ ФМБЦ им. А.И.Бурназяна ФМБА России.

Образцы биоптатов костной ткани подвергались гистологическому [см. методику в разделе 2.3, п.п. 2.3.6], гистоморфометрическому [см. методику в разделе 2.4, п.п. 2.4.3] и иммуногистохимическому исследованию.

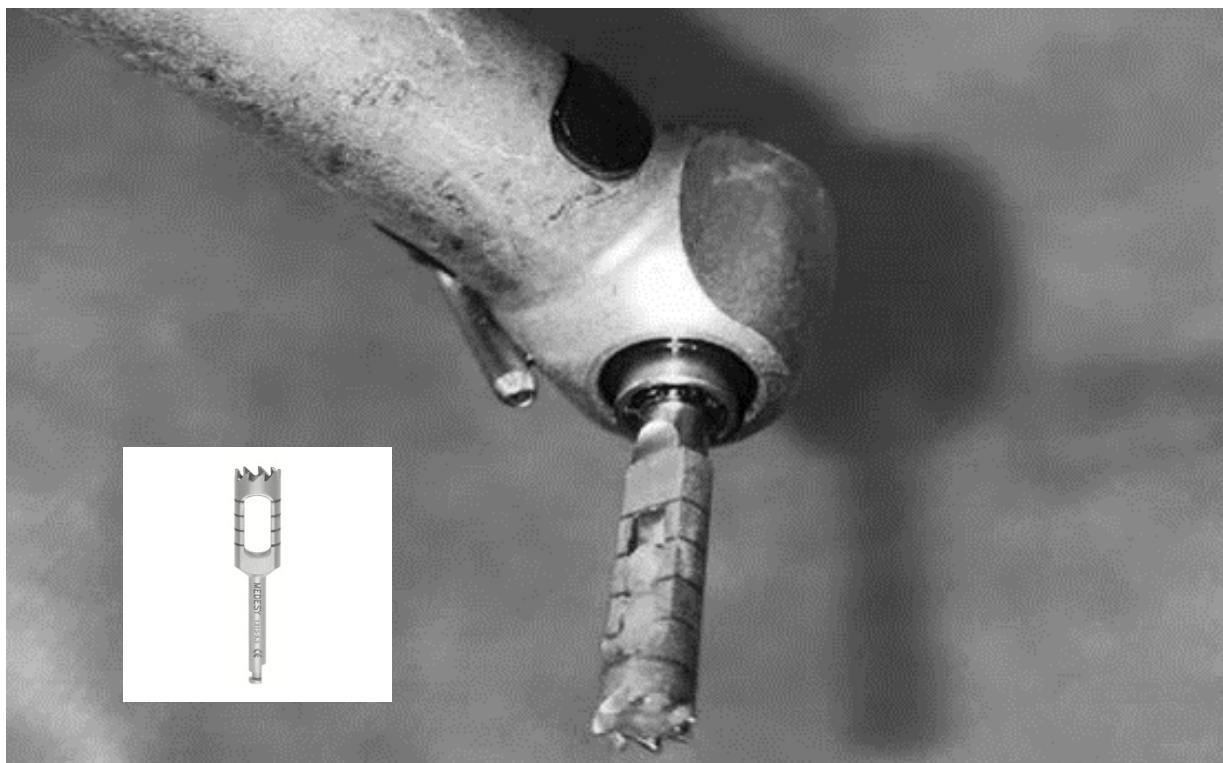


Рисунок 13. Трепан с полый фрезой и внутренним диаметром 2 мм, для биопсии костной ткани

2.5.5. Методика иммуногистохимического исследования биопсийного материала

В иммуногистохимическом исследовании образцов костного регенерата применяли антитела Ki-67 и α -SMA [ДАКО, Дания]. Визуализировали иммунные комплексы путем применения Universal LSAB2 [ДАКО, Дания]. Срезы с поставленными иммуногистохимическими реакциями докрашивали гематоксилином Майера. Достоверность проведенных реакций оценивали по сопоставлению с положительными и отрицательными контролями. За положительную реакцию с Ki-67 принимали четкое ядерное окрашивание.

Все изготовленные препараты подвергались сканированию [Miraxscanner, CarlZeiss, Германия], цифровые изображения анализировали на различных увеличениях.

2.6. Методы статистической обработки результатов исследования

Все полученные цифровые результаты исследования подвергались статистической обработке с применением офисного пакета приложений Microsoft Windows - Word, Excel. Для анализа полученных данных были использованы описательные статистические методы с использованием программы Statistica 10.0.: определение среднего значения, медианы, среднего квадратического отклонения, стандартной ошибки среднего значения, нижнего и верхнего квартилей.

Для проверки гипотезы о различии средних двух групп применялся критерий Стьюдента [Т], а для множественных сравнений среди непараметрических критериев U Манна-Уитни. Для сравнения количественных параметров на разных сроках в пределах одной группы применяли критерий Вилкоксона. Для сравнения распределений объектов двух совокупностей на основе измерений по шкале наименований в двух независимых выборках применялся критерий χ^2 [хи-квадрат]. Проверялась нулевая гипотеза H_0 и альтернативная гипотеза.

Во всех случаях уровень статистической значимости различий был принят за $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Раздел 1. Экспериментальные исследования *in vitro*

Исследования *in vitro*, проводимые в основном на клеточных культурах или образцах изолированных тканей, широко используются в экспериментальных исследованиях. Это связано с тем, что они могут предоставить важную информацию по определенным свойствам клеток, а также обеспечить более быстрый и экономичный подход к молекулярным и механическим исследованиям, чем обычные модели лабораторных животных.

ГЛАВА III. АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ КЛОНИРОВАНИЯ И ОСТЕОГЕННОЙ ДИФФЕРЕНЦИРОВКИ В КУЛЬТУРАХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ ВНУТРИРОТОВЫХ ИСТОЧНИКОВ

В нашем эксперименте были исследованы остеогенные потенции культур стволовых клеток из биоптатов губчатой кости челюсти, надкостницы, десны и оболочки Гертвига. Необходимо отметить, что в исследовании изучались популяции культур клеток различного происхождения – мезодермы и эктодермы. В частности, клетки оболочки Гертвига происходят из эктодермы, а остальные источники клеток имеют мезенхимное происхождение. Вместе с тем, сравнительный остеогенный потенциал у разных популяций внутриротовых зрелых стволовых клеток изучен не полностью.

3.1. Исследование остеогенного потенциала культур клеток, выделенных из внутриротовых источников

На рисунке 14 представлен рельеф образованного минерализованного матрикса [окр. ализариновым красным] и доля позитивных по ЩФ клеток [окр. тетразолий нитро-голубой]. Визуально самая высокая доля позитивных по ЩФ клеток выявлялась в культурах СК, полученных из эпителиальной оболочки Гертвига верхней челюсти. Активное колониобразование и

максимальный размер костных узелков также отмечались у клеточных культур СК, выделенных из оболочки Гертвига нижней челюсти.

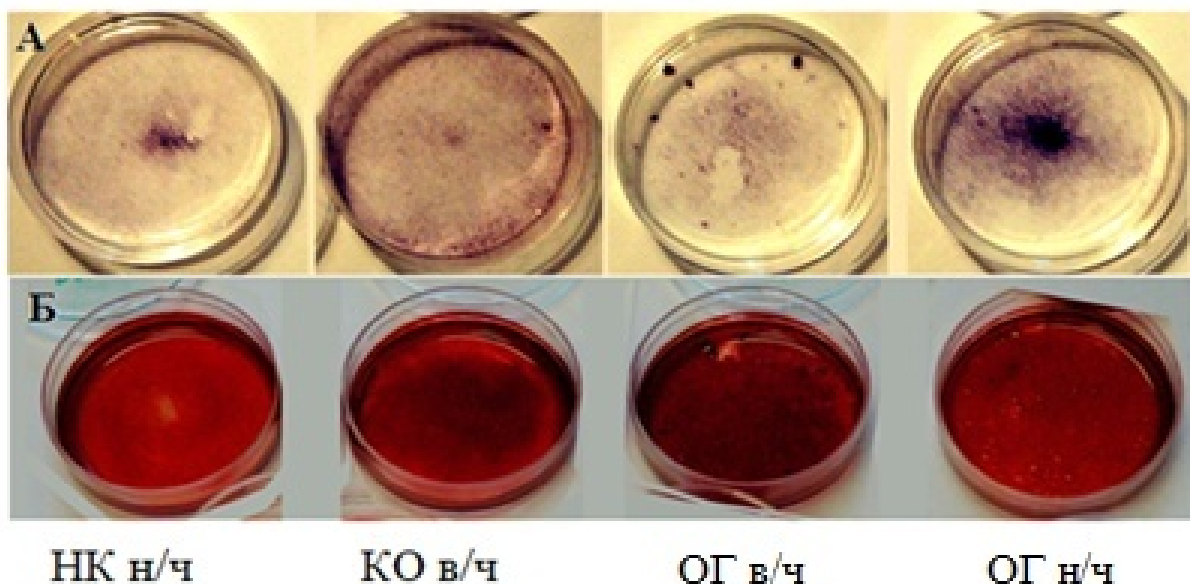


Рисунок14. Активность ЩФ и остеогенная потенция культур внутриротовых СК. Сокращения: надкостница [НК], костная ткань [КО], оболочка Гертвига[ОГ], верхняя [в/ч] и нижняя [н/ч] челюсти.

Подсчет клеток показал определённые различия между изученными культурами СК клеток, полученных из внутриротовых источников [табл. 7].

Таблица7- Сравнительная характеристика свойств культур стволовых клеток, полученных из внутриротовых источников

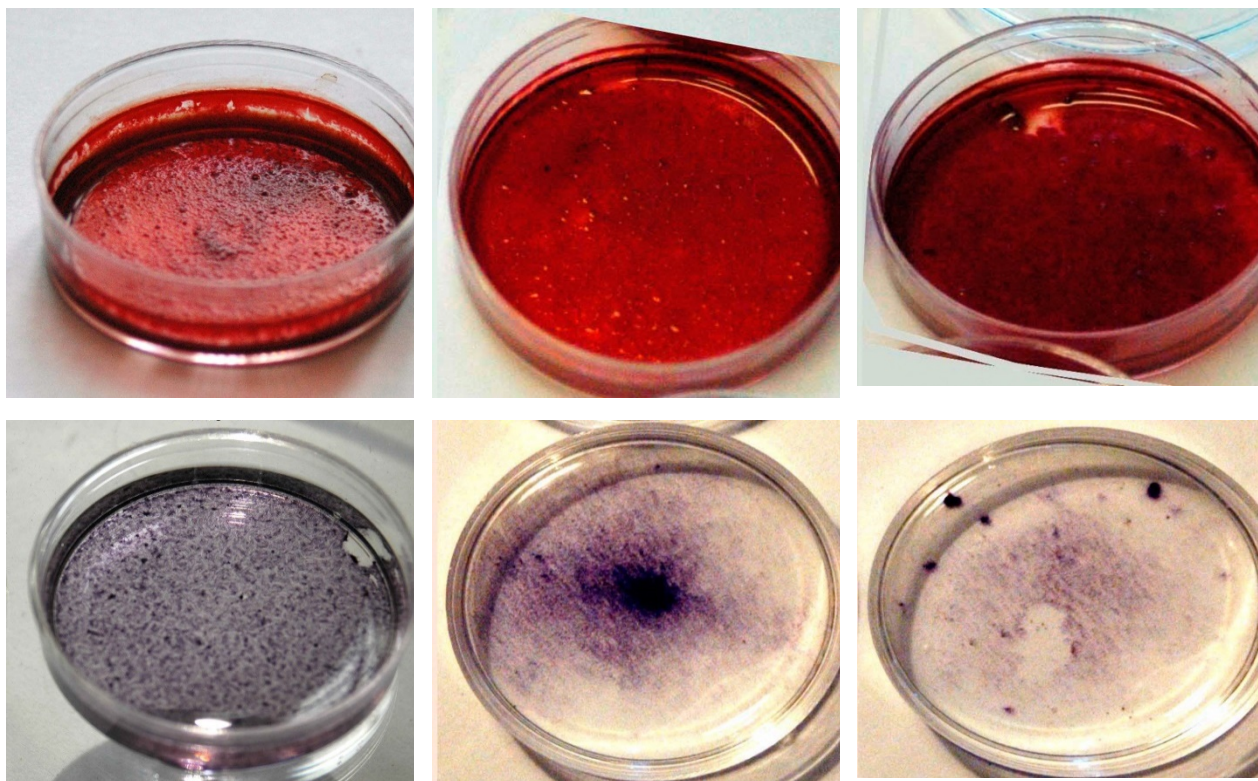
Культуры СК	НК н/ч	КО в/ч	ОГ в/ч	ОГ н/ч
Эффективность колониобразования[%]	58,0±3,20	38,0±4,50	46,0±3,80	54,0±2,60
Доля позитивных по ЩФ клеток[%]	20-30	20-30	40-60	25-35
Размер костных узелков[мм]	<0,5	<0,5	≤0,5	>0,5

Согласно результатам, представленным в таблице 7, наибольшая эффективность колониобразования обнаруживалась у клеток надкостницы [58%]. По способности к колониобразованию СК, выделенные из оболочки Гертвига, уступают МСК, выделенным из надкостницы: 58% против 46% и 54%. Культуры МСК из костной ткани показали низкую способность к колониобразованию [38%].

Процент позитивных по ЩФ клеток был самым высоким у клеток, выделенных из оболочки Гертвига верхней челюсти [40-60%] и нижней челюсти [25-35%], что совпадает с данными на рисунке 14, показывающими что СК оболочки Гертвига способны образовывать центры минерализации. Это подтверждают результаты подсчета размеров костных узелков, которые в большинстве обнаруживались в образцах клеточных культур, выделенных из оболочки Гертвига нижней челюсти.

На рисунках 15 и 16 визуально показаны индивидуальные результаты остеогенного потенциала СК.

На рисунке 15 показаны формирование центров минерализации [верхний ряд] и доля позитивных по ЩФ клеток [нижний ряд] при изучении культур СК, выделенных из ОГ верхней и нижней челюсти у пациентов разного возраста.



А

Б

В

Рисунок 15.Изображение остеогенной дифференцировки [верхний ряд] и клетки с очень высокой активностью ЩФ [нижний ряд] в чашке Петри с культурами СК, выделенных из оболочки Гертвига: А - Пациентка Р. 26 лет ОГ н/ч; Б - Пациентка М. 17 лет ОГ н/ч; В - Пациентка М. 17 лет ОГ в/ч

На рисунке 16[А] показано, что клетки СК у пациентки Р. обладают выраженной способностью к остеодифференцировке и исключительно высокой активностью ЩФ. При этом способность к колониеобразованию была невысокой – 13% [рис.17А].

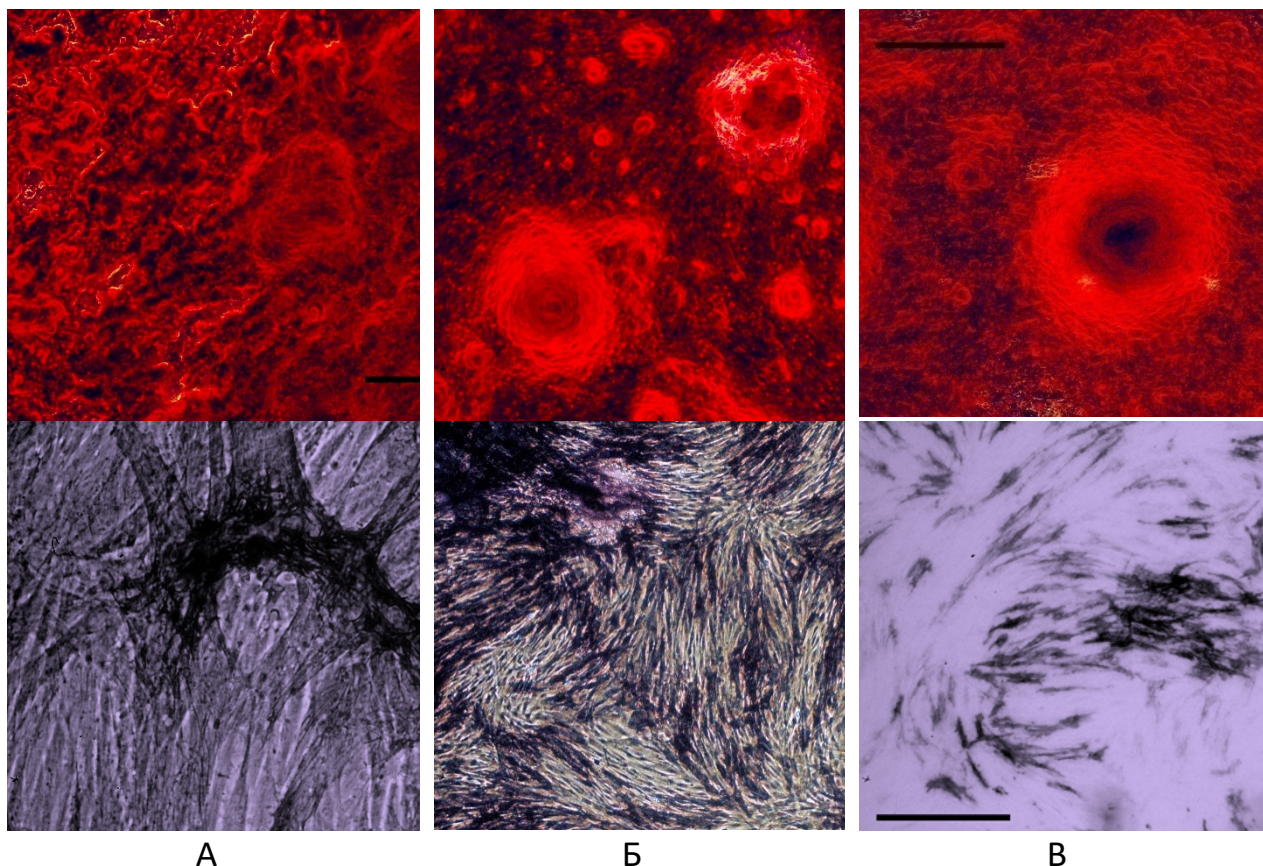


Рисунок 16.Электронная микрофотография культуры МСК, выделенных из оболочки Гертвига с остеогенной дифференцировкой[верхний ряд] и клетками с очень высокой активностью ЩФ [нижний ряд]. Бары: слева – 500 мкм, справа - 100 мкм. Цифровое контрастирование: А - Пациентка Р. 26 лет ОГ н/ч; Б - Пациентка М. 17 лет ОГ н/ч; В - Пациентка М. 17 лет ОГ в/ч

У пациентки М. в культурах СК, выделенные из оболочки Гертвига верхней челюсти, отличаются повышенной способностью к остеодифференцировке и высокой активностью ЩФ. На микрофотографии показаны разнообразные, в том числе довольно крупные, костные узелки [рис. 16Б, верхний ряд]. При этом колониеобразующая активность клеток достигала 46% [рис.17Б]. Культуры СК, выделенные из оболочки Гертвига нижней челюсти, у пациентки М. показаны сходные свойства с клетками, выделенными из верхней челюсти. Однако, эти СК отличались образованием

очень крупных костных узелков [рис.16В, верхний ряд]. Колониеобразующая активность клеток достигала 54% [рис.17В].

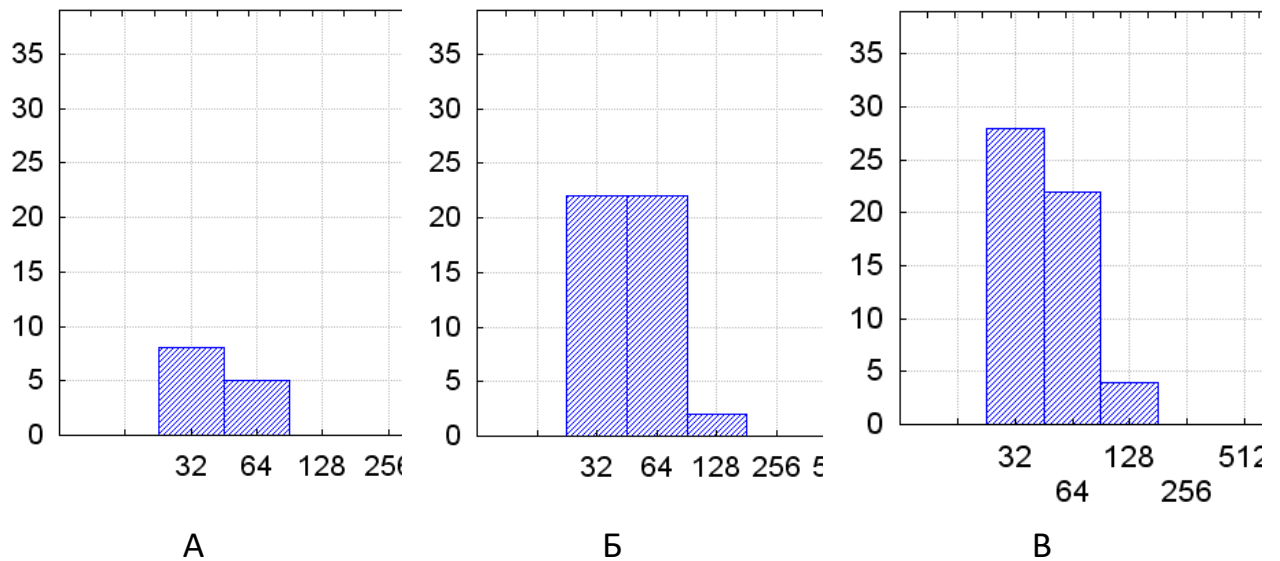


Рисунок 17. Распределение по размеру колоний культур стволовых клеток. По ординате доля колоний [%], по абсциссе – размер колоний: А] Пациентка Р. 26 лет ОГ н/ч; Б] Пациентка М. 17 лет ОГ н/ч; В] Пациентка М. 17 лет ОГ в/ч

Таким образом, исследование показало, что колониобразующая активность культур СК, выделенных из тканей полости рта, зависит от их тканевой принадлежности, возраста и расположения на челюсти.

Далее в эксперименте были изучены признаки остеобразующей активности СК в зависимости от возраста донора. У пациентов в возрасте от 17 до 61 года из биоптатов губчатой кости бугра верхней челюсти, полученных в ходе удаления третьих моляров были выделены культуры мезенхимальных недифференцированных стволовых клеток. В исследовании было установлено, что формирование центра минерализации было отчетливо выражено у пациентов молодого возраста от 17 до 25 лет [рис.18А]. При исследовании под микроскопом большого разрешения были видны многочисленные минеральные гранулы и расположенные между ними с различной плотностью костные узелки размером от 10 до 500 мкм и более.

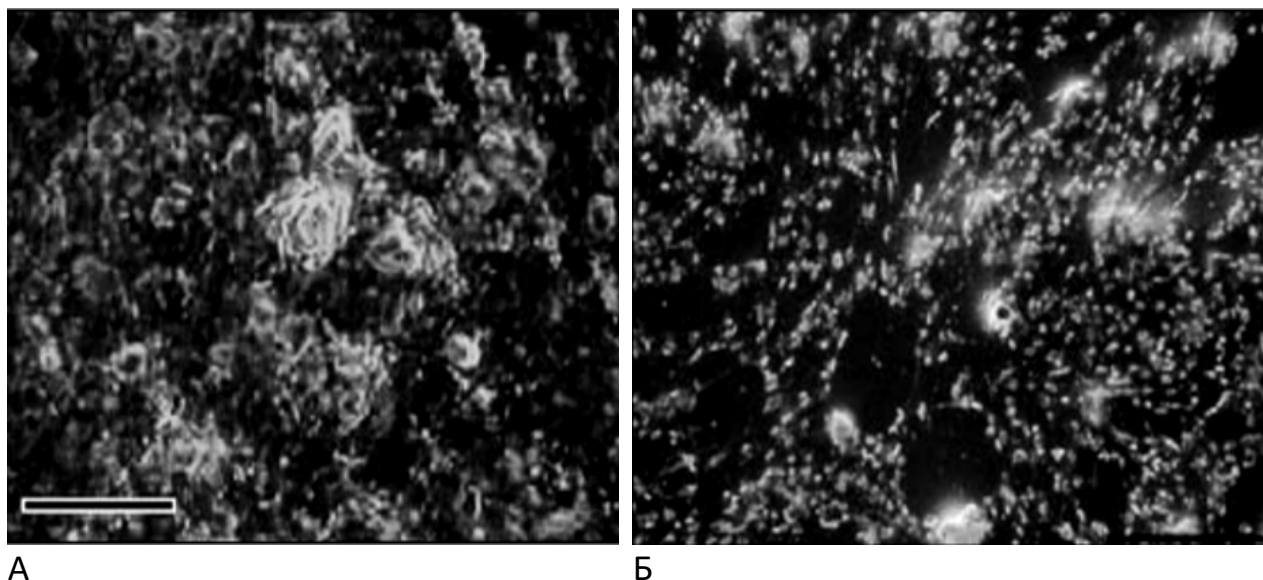


Рисунок 18. Минерализованный матрикс в культурах МСК пациентов молодого [А] и пожилого возраста [Б]. Световая микроскопия минерализованных костных структур. Темное поле. Бары – 500 мкм. Цифровое контрастирование

У пациентов старших возрастных групп [55-61 год] МСК костной ткани обладали более слабой способностью к формированию костной структуры [рис.18 Б]. При этом минерализованные структуры матрикса были более рыхло упакованы, костные узелки встречались значительно реже и имели меньшие размеры. Анализ препаратов показал, что после индукции остеогенной дифференцировки в культурах всех пациентов выявлялись МСК, активно секретирующие ЩФ. У молодых пациентов количество этих клеток и интенсивность их окраски были значительно больше, и они располагались плотными группами, соответствующими костным узелкам различного размера [рис. 19 А]. У СК, выделенных у пациентов старшего возраста это не было выражено [рис. 19 Б]. Как видно из таблицы 8, культуры СК, выделенные из КО у пациентов старшей возрастной группы, обладают более низкой способностью к остеобразованию [58,3%], чем у молодых пациентов [70%].

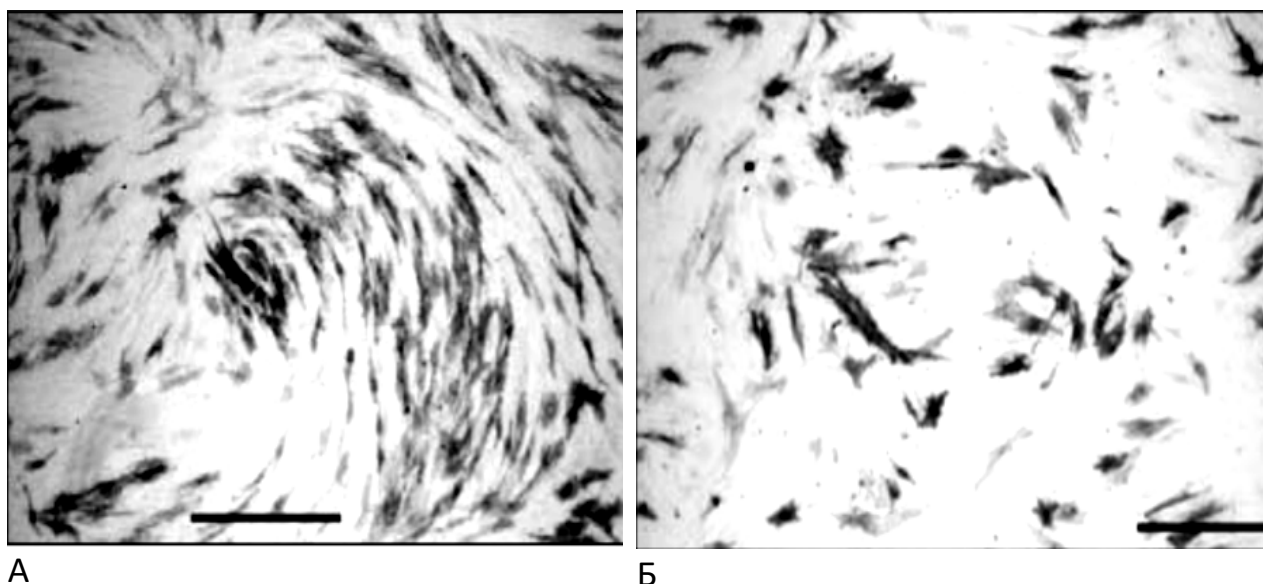


Рисунок 19. Активность щелочной фосфатазы в культурах, окрашенных по McGadey, стволовые клетки пациентов в возрасте 17 [А] и 59 [Б] лет. Световая микроскопия. Фазовый контраст. Бары – 500 мкм. Цифровое контрастирование

Высокая активность ЩФ обнаруживалась в 50% образцах культуры СК, полученных у молодых пациентов, а у пациентов старшей возрастной группы только в 41,7% образцах.

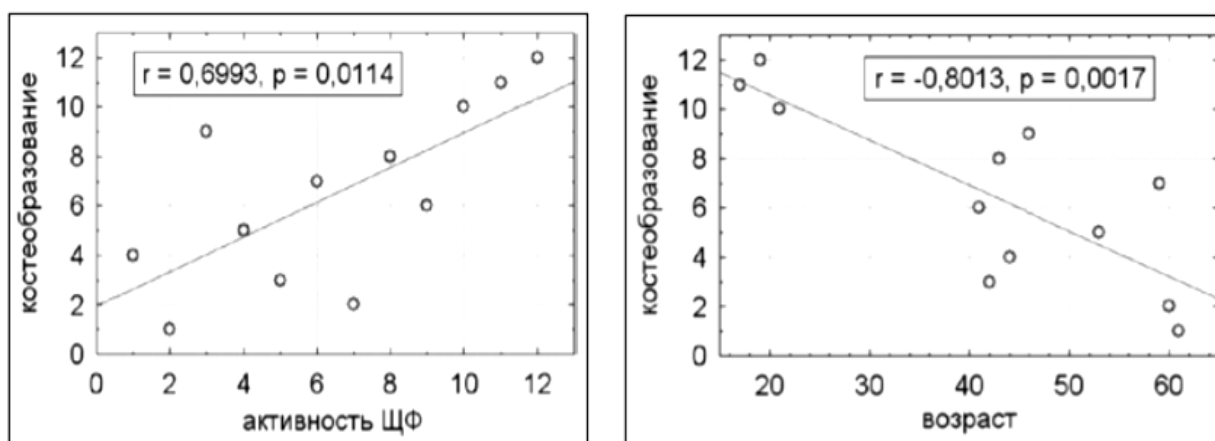
Таблица 8 - Свойства культур стволовых клеток, выделенных из костной ткани челюстей, у пациентов молодого и старшего возраста

Показатели	Пациенты молодого возраста [n=10]	Пациенты старшего возраста [n=12]
Уверенное [сплошное] остеобразование [%]	70,0±6,80	58,3±8,20*
Высокая активность ЩФ [%]	50,0±12,1	41,7±8,90
Эффективность колониеобразования [%]	55,3±18,2*	27,3±13,9*
Доля позитивных по ЩФ клеток [%]	В 3 культурах - 90%, в 7 культурах - от 10 до 50%	Во всех культурах – до 30%
Размер костных узелков [мм]	В 3 культурах - >0,5, в 7 культурах - ≥0,5	<0,5

Примечания: данные достоверны при * $p < 0,05$.

Эффективность колониеобразования в культурах МСК, выделенных у молодых пациентов, достигала 55,3%, а у лиц пожилого возраста была в 2 раза меньше [27,3%].

Сравнительный анализ полученного материала показал, что в 70% совпадений имелась сильная прямая положительная корреляция между остеогенным потенциалом МСК и активностью ЩФ [рис. 20 А]. Взаимосвязь остеобразующей способности от возраста пациентов в 80% случаев была отрицательна [рис. 20 Б].



А

Б

Рисунок 20. Взаимосвязь остеобразующей способности стволовых клеток, выделенных из костной ткани челюстей, от возраста пациентов и активности щелочной фосфатазы: А - корреляция между остеогенным потенциалом МСК и активностью ЩФ; Б - взаимосвязь остеобразующей способности от возраста пациентов

Таким образом, остеобразующая способность стволовых клеток и уровень регенераторных потенциалов, вероятно, обусловлены количеством мультипотентных стволовых клеток. В этом отношении наиболее активны клетки, полученные из оболочки Гертвига и нижней челюсти.

Оптимальной возрастной категорией для донорства стволовых клеток является молодой возраст от 17 до 25 лет, так как у них потенциал для дифференцировки и пролиферации мезенхимальных стволовых клеток значительно выше.

3.2. Исследование иммунофенотипа фибробластоподобных клеток, выделенных из десны человека

Так как фибробласты не имеют специфических иммунофенотипических маркеров, они характеризуются высоким уровнем экспрессии поверхностных антигенов, характерных для МСК, отличаясь от последних значимо большей продукцией структурных белков – компонентов межклеточного матрикса. В этой связи, для обоснованного отнесения полученных культур клеток к фибробластам, нами был использован стандартный перечень антигенов, исследуемых при идентификации МСК, а также оценен профиль экспрессии структурных белков.

Анализ иммунофенотипа фибробластоподобных клеток, выделенных из десны человека, показал отсутствие у них гемопоэтических [CD34, CD45], эпителиальных [панцитокератины 14-16,19] и наличие мезенхимных [CD73, CD90, CD105] поверхностных маркеров. Клетки экспрессировали также внутриклеточные маркеры фибробластов - коллаген I и III типа, эластин и виментин [табл.9]. Таким образом, иммунофенотипический анализ позволил отнести полученные нами культуры клеток к фибробластам. При этом выявленный уровень экспрессии основных белков внеклеточного матрикса [>99%] свидетельствует о высоком биосинтетическом потенциале данных клеток.

Таблица 9–Распределение белков-маркеров при исследовании иммунофенотипа культивированных фибробластов десны человека

Белки-маркеры	Фибробласты десны[%]
CD34	<0,5
CD45	<0,5
CD73	>99
CD90	>99
CD105	>99
Коллаген I типа	>95
Коллаген III типа	>95
Эластин	>95
Виментин	>95
Цитокератины 14-16, 19	<0,5

Эффективность колониеобразования фибробластов десны составила в среднем $75\pm 6\%$. Отмечено, что фибробласты десны образуют колонии, отличающиеся между собой по размерам и морфологии составляющих их клеток, которые обозначены как плотные, диффузные и смешанные: плотные [состоящие из 2500 ± 500 мелких, веретеновидных клеток], диффузные [состоящие из 100 ± 50 полиморфных фибробластов] и смешанные колонии, состоящие из 1000 ± 300 веретеновидных и полиморфных клеток][рис.21].

Таким образом, эффективность колониеобразования свидетельствует о наличии в десне достаточно большого количества клеток, обладающих высоким пролиферативным потенциалом. При этом доля плотных колоний в 5-10 раз превышает доли смешанных и диффузных колоний.

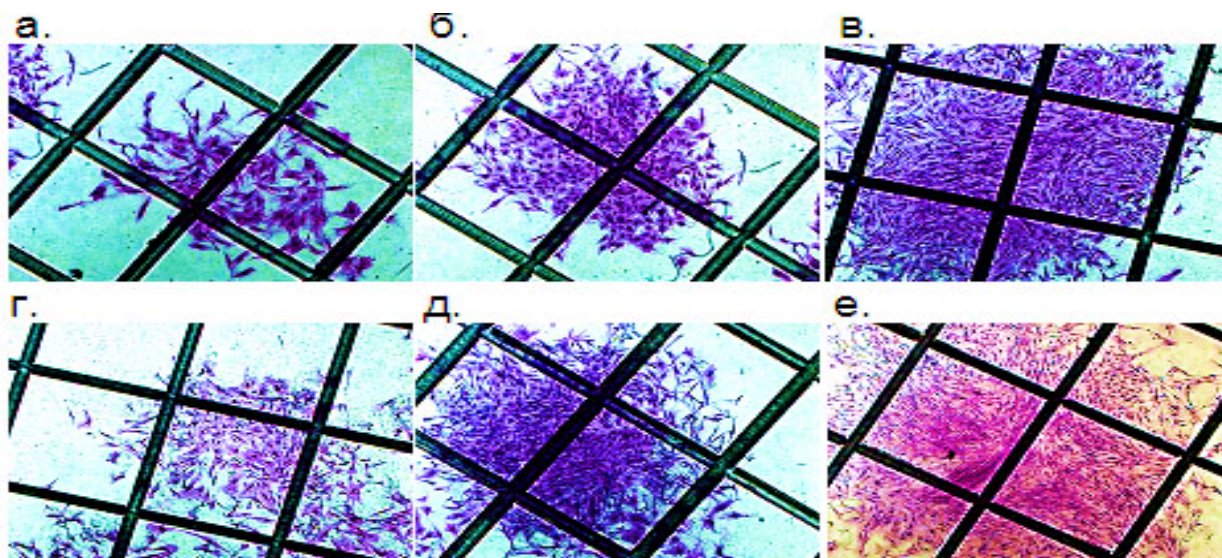


Рисунок 21. Колонии культивированных фибробластов десны:

А-Полиморфные [≤ 200 клеток]; **Б.** Смешанные [> 500 клеток];

В.Веретеновидные [> 1500 клеток]; **Г.** Полиморфные [≤ 200 клеток];

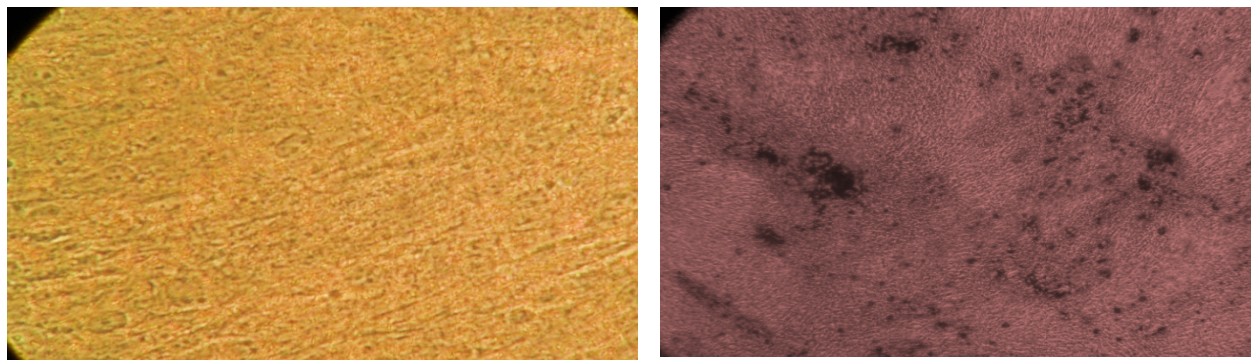
Д.Смешанные [> 1500 клеток]. **Е.**Веретеновидные [> 2500 клеток]

При культивировании фибробластов десны в указанных условиях во всех исследуемых клеточных культурах отмечено изменение морфологии клеток с классической веретеновидной формы на кубоидальную – характерную для остеобластов.

Гистохимическая окраска ализарином красным на кальцификацию межклеточного матрикса выявила очаги минерализации, выраженные в виде узелков, содержащих соли кальция [рис.22]. При этом выявлено, что все исследуемые культуры фибробластов десны, показали способность к дифференцировке в остеогенном направлении.

Случаев спонтанной остеогенной дифференцировки фибробластов десны в контрольных культурах [состав культуральной среды - α -Мем, 10% ЭТС] не выявлено.

Это свидетельствует об устойчивом механизме изученных клеток, способных препятствовать кальцинозу мягких тканей.



А

Б

Рисунок 22. Индукция дифференцировки фибробластов десны: А-контроль [недифференцированные фибробласты десны]. Б—остеогенная индукция фибробластов десны [окраска ализариновым красным].

Иммунофлуорометрический анализ дифференцированных в хондрогенном направлении культивированных фибробластов десны человека показал, что белки агрекан [хондрогенный], остеокальцин [остеогенный] и FAV4 [адипогенный], детектируются в фибробластных клетках, выделенных из тканей десны [рис.23].

Это подтверждает способность исследуемых МСК, выделенных из фибробластов десны, к плюрипотентной дифференцировке, помимо выявленных в клеточной культуре узелков кальцификации. Исследование остеогенного дифференцировочного потенциала фибробластов десны показало, что они лучше дифференцируются на поздних пассажах [рис.24].

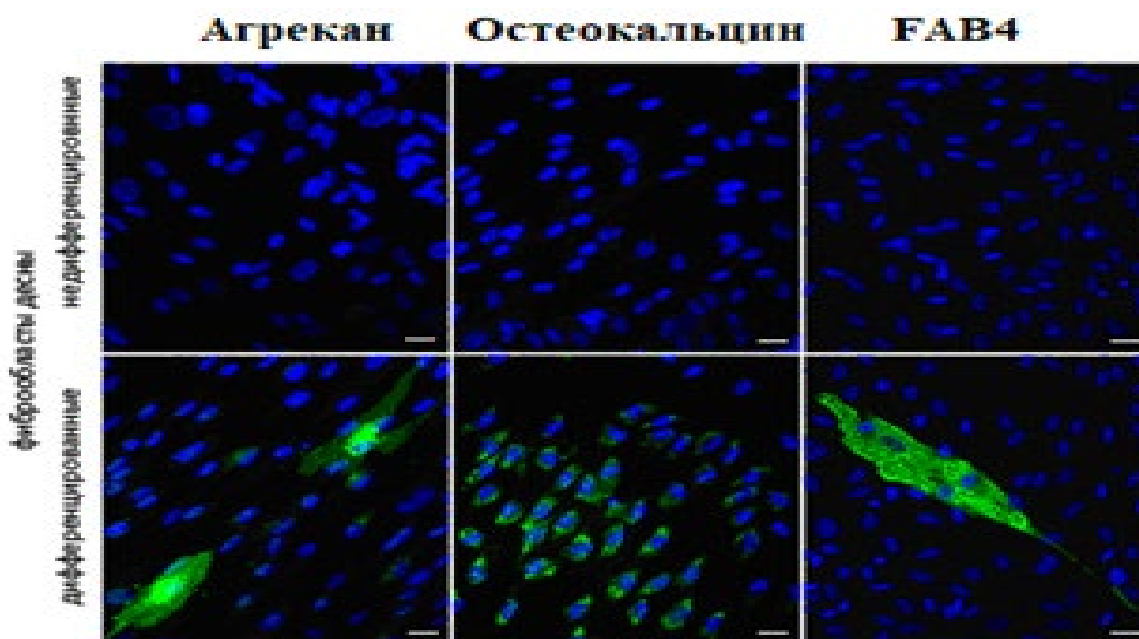


Рисунок 23. Индукция дифференцировки культивированных фибробластов десны, 4-й пассаж [масштаб –15мкм]

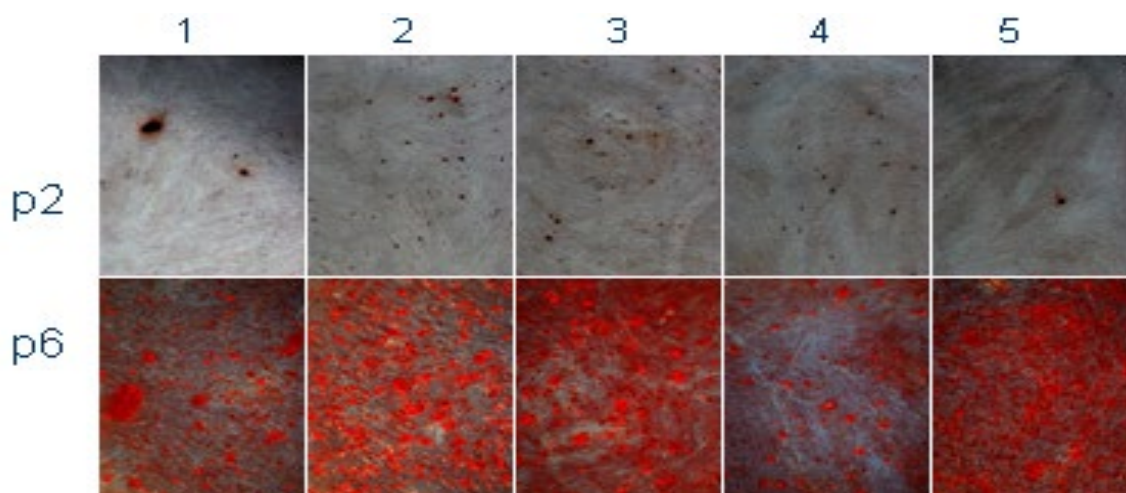


Рисунок 24. Остеогенная дифференцировка фибробластов десны на 2-м [p2] и 5-м [p5] пассажах

Таким образом, фибробласты, выделенные из десны человека, обладают способностью дифференцироваться в остео-, хондро- и адипогенном направлениях, уже на 4-м пассаже. Они по эффективности колонеобразования [75%] превосходят все изученные МСК, выделенные из других внутриротовых источников. Это позволило выделить МСК десны как потенциальный источник для создания тканеинженерных конструкций.

Раздел 2. Экспериментальные исследования *in vivo*

ГЛАВА IV. РЕЗУЛЬТАТЫ ПРИМЕНЕНИЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОГО ДЕФЕКТА

4.1. Результаты имплантации экспериментальным животным тканеинженерной конструкции на основе аутологичных мезенхимальных стволовых клеток

В рамках исследования тканеинженерные конструкции [ТИК] ТКФ+ММСК и ТКФ+ФК+ММСК были трансплантированы 27 кроликам в дефекты теменных костей диаметром 10 мм. Среднее количество ММСК, полученных из биоптатов десны кролика размером 5x5 мм, составило $7,88 \times 10^6 \pm 0,4 \times 10^6$ клеток. Контролем служила имплантированная слева основа ТКФ без клеток. Животных выводили из эксперимента на 30, 60, 120 сутки заживления дефекта. Была изучена безопасность и остеоиндуктивное действие тканеинженерных костных графтов.

Двое из прооперированных животных погибли в течение первых трех суток после операции имплантации в связи с развитием раннего послеоперационного осложнения, специфичного для данной экспериментальной модели – субдурального кровоизлияния. Остальные животные были выведены из эксперимента согласно запланированным срокам. Ни в одном из случаев не было обнаружено явлений острого воспаления или чрезмерного отека в послеоперационной области.

В ходе рентгенологического исследования в костных дефектах через 30 суток после имплантации границы дефектов на стороне с имплантированным материалом ТКФ+ММСК и ТКФ+ФК+ММСК прослеживались четче, чем в образцах с имплантированными ТКФ+ФК и ТКФ [рис.25].

Гранулы введенных материалов во всех исследуемых образцах определялись в виде дискретных участков с повышенной рентгеноконтрастностью, которые сохранялись на стороне с имплантированными материалами ТКФ+ММСК, ТКФ+ФК и ТКФ.

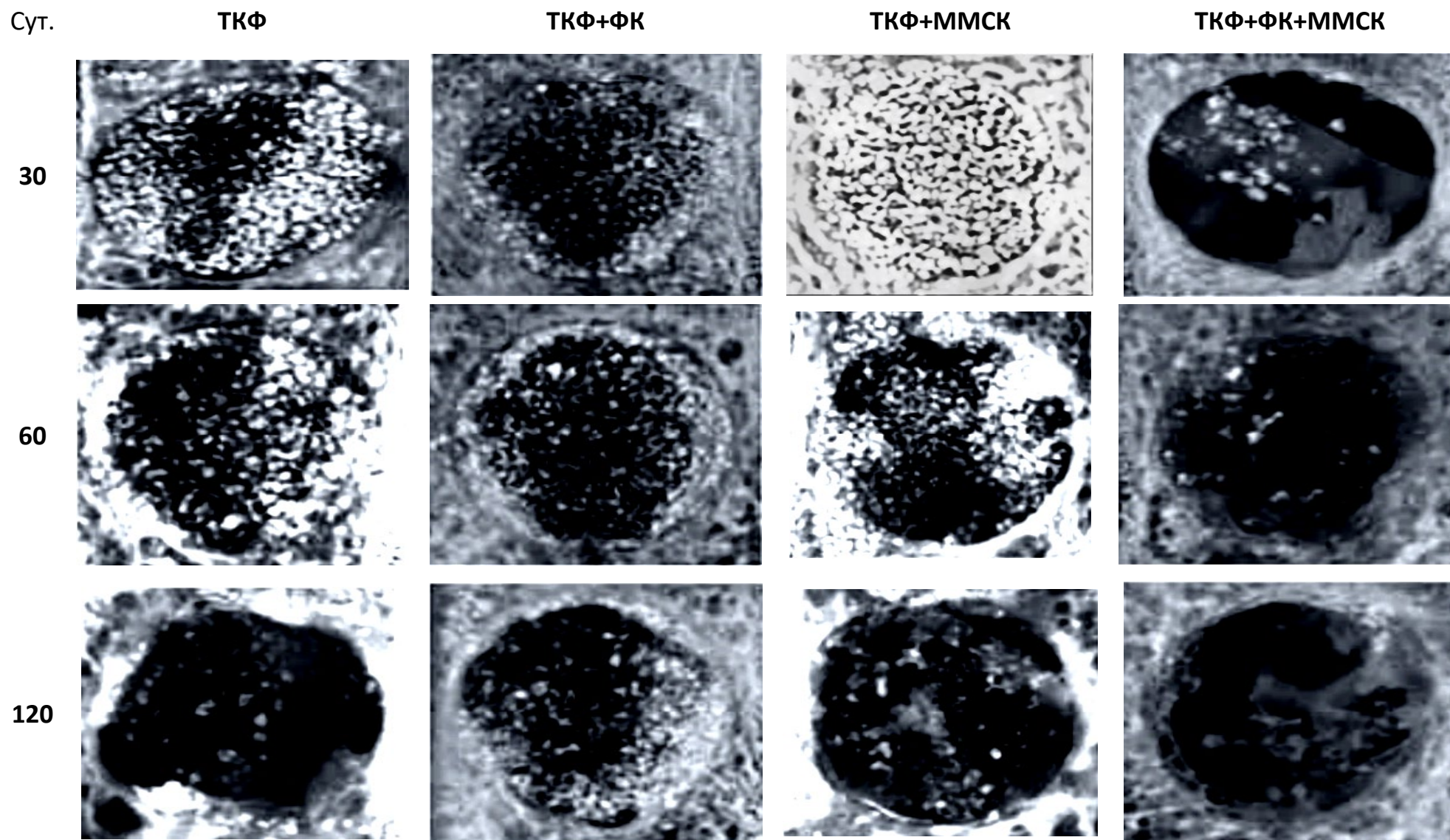


Рисунок 25. Близкофокусная рентгенография дефектов теменных костей кролика в динамике после имплантации различных остеозамещающих материалов.

На контрольной стороне с материалом ТКФ и стороне с имплантированным синтетическим остеопластическим материалом ТКФ+ФК гранулы основы четко визуализировались на всех сроках исследования, заполняя весь объем дефектов или сохраняясь по периферии дефекта.

На данном сроке наблюдения средняя плотность регенерата статистически значимо не отличалась между сторонами исследования, составляя в экспериментальных образцах ТКФ+ФК - $1012,3 \pm 152,6$ НУ, ТКФ+ММСК - $1029 \pm 125,4$ НУ, ТКФ+ФК+ММСК - $1087,5 \pm 137,3$ НУ, а в контрольном образце ТКФ - $1034,0 \pm 144,8$ НУ.

Несмотря на это, если через 30 суток после операции границы костных дефектов были четкими и ровными, то начиная с 60 суток становились менее различимыми. На образцах с имплантированными материалами ТКФ и ТКФ+ФК, ТКФ+ММСК гранулы сдвигались к периферии дефекта, а в образце ТКФ+ФК+ММСК оставались лишь следовые количества.

На 120 сутки на контрольной стороне ТКФ и ТКФ+ФК наблюдали постепенное снижение плотности регенерата до $921,6 \pm 124,1$ НУ и $1001 \pm 132,6$ НУ, то на опытной стороне с ТКФ+ММСК и ТКФ+ФК+ММСК, напротив, увеличение на $238,4 \pm 83,8$ НУ и $536,5 \pm 146,1$ НУ соответственно. Визуально в образцах с имплантированным ТКФ обнаруживаются нечеткие границы дефекта с остатками гранул, в дефекте с ТКФ+ФК гранулы неравномерно распределены по периферии, в образцах с имплантированным ТКФ+ММСК видны фрагменты новообразованных костных балочек от периферии к центру со следами гранул. В дефекте с имплантированным ТКФ+ФК+ММСК зона дефекта без гранул с сетью костных балочек и нарастание коллагеновой сети по периферии дефекта к центру.

Подсчет долей новообразованной ретикулофиброзной костной ткани в периферической зоне на 30 сутки регенерации костной ткани отличалась между образцами имплантированных остеозамещающих материалов [рис.26].

Так, на 30 сутки в периферической зоне доля новообразованной костной ткани после имплантации ТКФ достигала 22%, ТКФ+ФК – 33%,

ТКФ+ММСК- 32%, и наибольшая доля в этот срок выявлялась у материала ТКФ+ФК+ММСК – 40%. На 60 сутки доля новообразованной костной ткани по периферии увеличилась во всех экспериментальных сторонах: ТКФ достигала 33%, ТКФ+ФК – 37%, ТКФ+ММСК- 39%, ТКФ+ФК+ММСК – 44,2%.

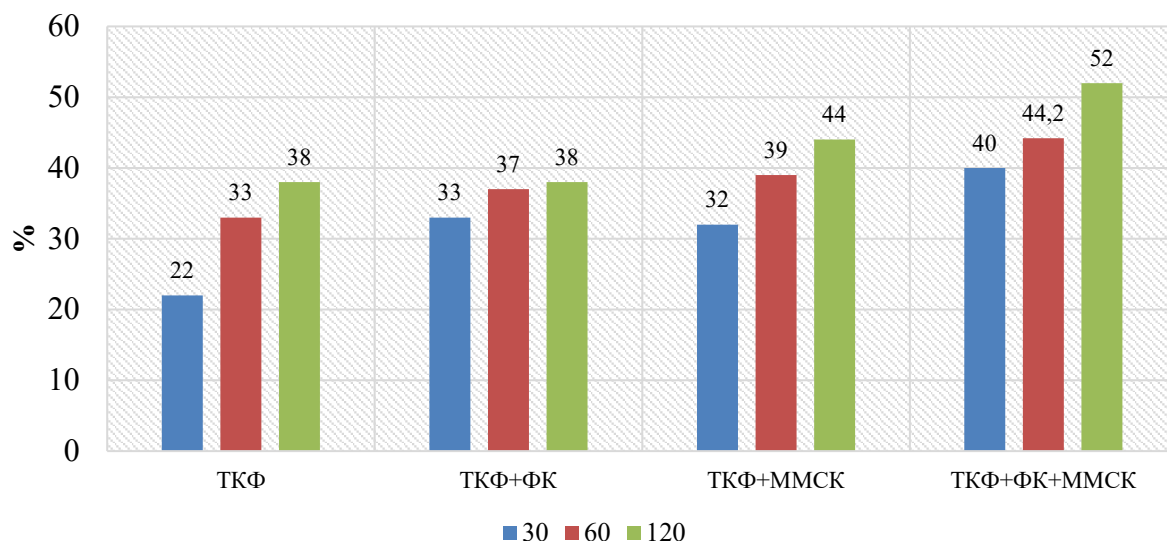


Рисунок 26. Процентная величина доли новообразованной костной ткани в периферических зонах костных дефектов.

На 120 сутки доля новообразованной костной ткани по периферии во всех экспериментальных образцах увеличивалась от 60 дня регенерации кости. В образцах ТКФ и ТКФ+ФК она достигала 38%, а в образцах с ТКФ+ММСК увеличивалась в среднем до 44%, и была наибольшая [52%] в костном дефекте, где имплантировали комбинированную тканеинженерную конструкцию ТКФ+ФК+ММСК.

График прироста доли новообразованной костной ткани показал, что на периферии относительно значимый прирост на всех сроках эксперимента отмечался в тех дефектах костной ткани, где был имплантирован материал ТКФ [рис.27]. В образцах, полученных после имплантации ТКФ+ФК, доля прироста костной ткани по периферии была относительно выше, чем в дефектах с остеопластическими материалами ТКФ+ММСК и ТКФ+ФК+ММСК.

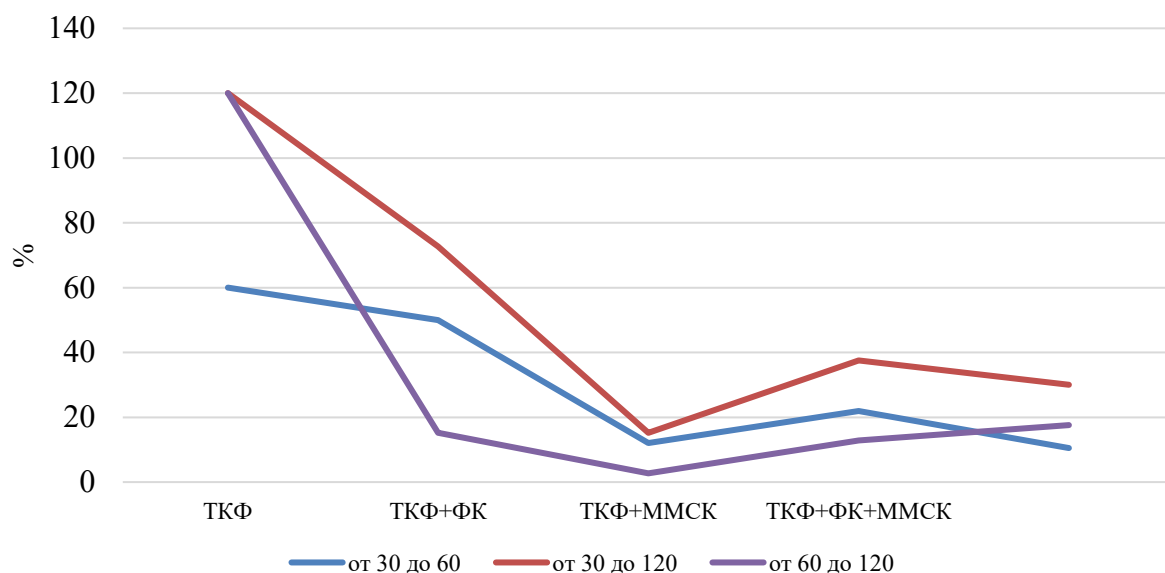


Рисунок 27.График прироста новообразованной костной ткани в периферических зонах костных дефектов.

Исследование доли новообразованной костной ткани в центральных зонах дефекта после имплантации различных комбинаций остеопластических материалов наблюдается несколько иная картина [рис.28].

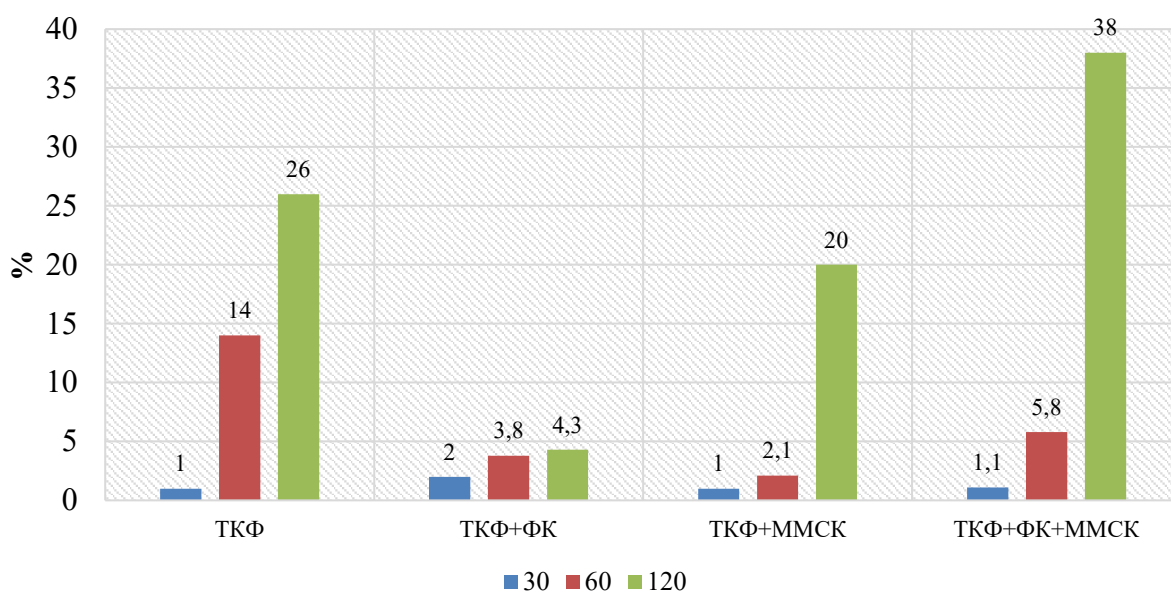


Рисунок 28.Процентная величина доли новообразованной костной ткани в центральных зонах костных дефектов.

На этапе созревания в течение 30 дней доля костной ткани во всех образцах составляла от 1 до 2%, что составляет значительно меньшую величину, чем на периферическом участке. На 60 сутки регенерации

значительный синтез костной ткани в центре дефекта отмечался в образцах после имплантации материала ТКФ и достигал 14%. В остальных опытных образцах процессы образования костной ткани колебались в пределах от 2,1 до 5,8%, что было значительно ниже, чем у образцов с материалом ТКФ. На поздних сроках регенерации на 120 сутки наблюдался интенсивный рост костной ткани в центральной зоне в образцах после имплантации материалов ТКФ [26%], ТКФ+ММСК [20%], и наиболее значимый процент выявлялся у образцов с комбинированной тканеинженерной конструкцией ТКФ+ФК+ММСК [38%].

Значительный прирост костной ткани в центральном участке выявлялся в дефекте с имплантированным материалом ТКФ+ФК+ММСК, причем это увеличение зафиксировано на сроках от 60 до 120 суток [рис.29]. Образцы с имплантированным синтетическим остеозамещающим материалом ТКФ не показали активный остеогенез в центральной зоне дефекта. Образцы с материалом ТКФ+ФК показали активный синтез костной ткани до 60 суток, а дальше процесс остеосинтеза в центральном участке замедлился.

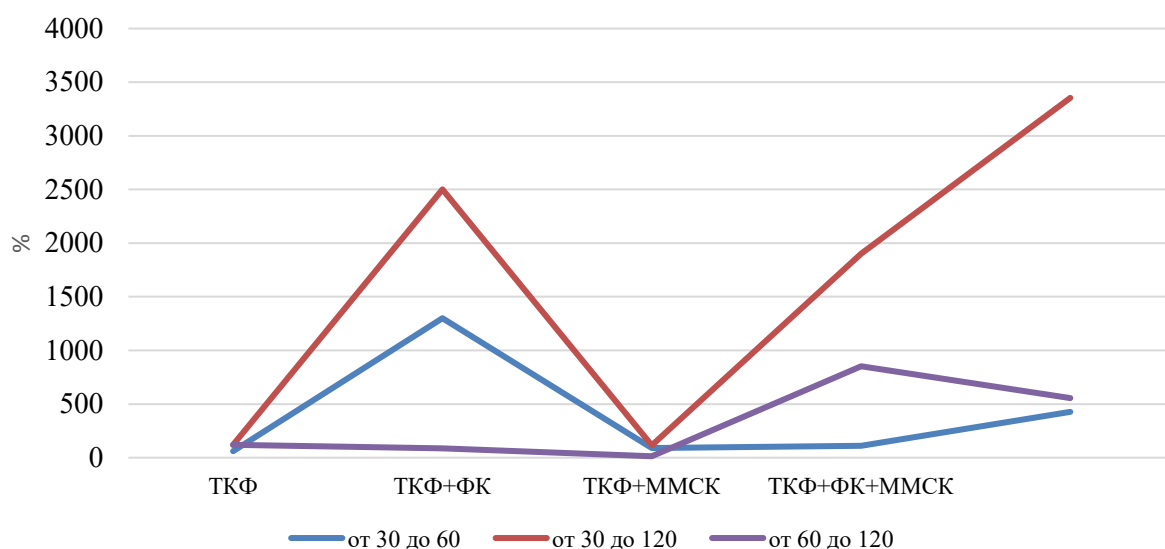


Рисунок 29. График прироста новообразованной костной ткани в центральных зонах костных дефектов.

Гистологическое исследование препаратов после имплантации остеозамещающих материалов в дефекты теменной кости черепа кроликов на 30 сутки показало, что в участке, где имплантировали синтетические

остеозамещающие материалы ТКФ и ТКФ+ФК выявлялись большие участки фрагментов материала, вокруг которых располагалась рыхлая соединительная ткань и тоненькая прослойка новообразованной костной ткани. В тех дефектах, где были имплантированы различные комбинации тканеинженерных конструкций ТКФ+ММСК и ТКФ+ФК+ММСК также выявлялись фрагменты материала, но они были меньше, чем в дефектах, заполненных синтетическими материалами. Тем более, в дефекте, в который имплантировали ТКФ+ФК+ММСК выявлялись самые маленькие объемы фрагментов материала.

На 60 сутки регенерации дефекта теменной кости черепа особенностью гистологической картины во всех образцах являлось формирование костного мозга между трабекулами новообразованной пластинчатой костной ткани и сохранившимися к данному сроку гранулами материалов. Однако участки новообразованной костной ткани, как дискретные, так и связанные с гранулами материалов, определялись на всем протяжении дефектов и характеризовались сложным строением: центральная часть, окружающая сосуды, была представлена пластинчатой, а периферическая, граничащая с окружающей соединительной тканью – ретикулофиброзной тканью.

На 120 сутки в дефектах после имплантации ТКФ+ФК+ММСК практически каждая из единичных гранул в центральной части дефекта была окружена новообразованной костной тканью, а в дефектах с ТКФ и ТКФ+ФК, где фрагментов носителя было значительно больше, лишь единичные гранулы были связаны с участками репаративного остеогенеза. Доля новообразованной костной ткани в периферической зоне была несколько выше после трансплантации ТКФ, чем в образцах с ТКФ+ФК+ММСК, на всех сроках наблюдения. Полного восстановления целостности теменной кости к 120 суткам не было выявлено ни в одном из образцов [рис. 30].

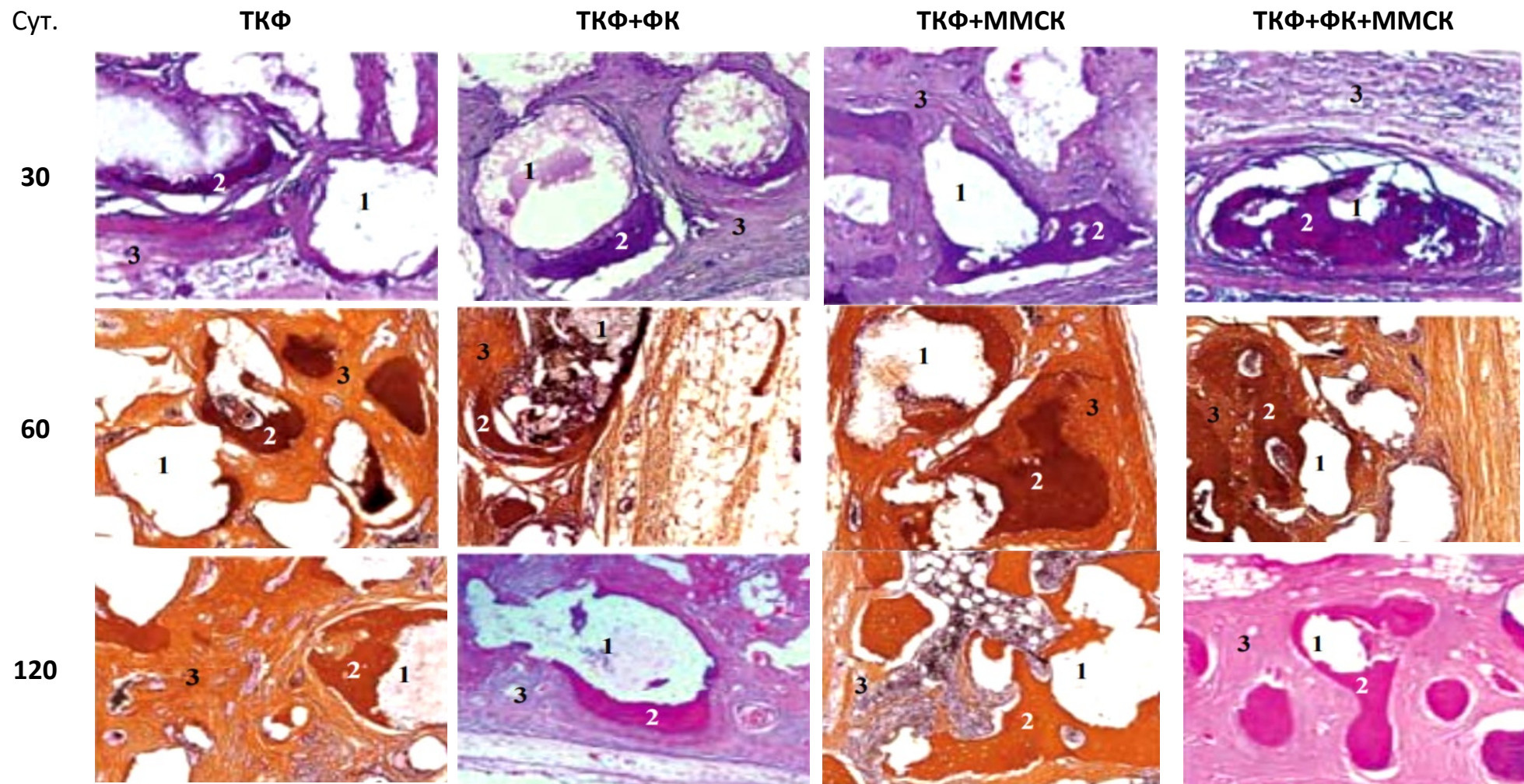
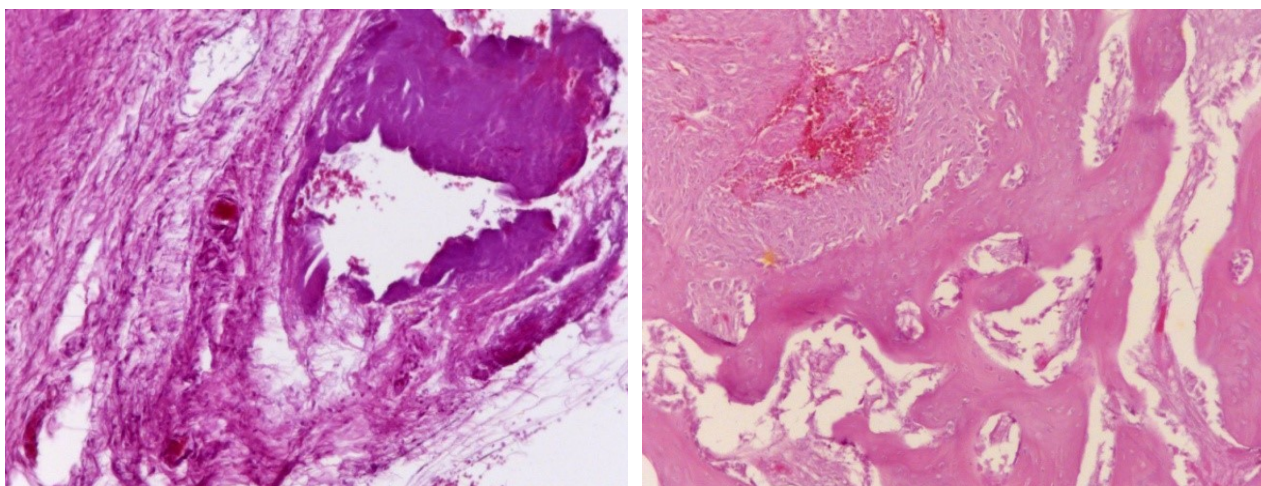


Рисунок 30. Гистологическая картина дефектов теменных костей кролика в динамике после имплантации различных остеозамещающих материалов. Обозначения: 1 – фрагменты материалов, 2 – новообразованная костная ткань, 3 – волокнистая соединительная ткань. Окраска: Гематоксилином и эозином, серебрение по Гордону. Ув. x40

4.2. Результаты имплантации экспериментальным животным тканеинженерной конструкции на основе нанодисперсного диоксида церия с аутологичным фибриновым матриксом, обогащенного тромбоцитами

Морфологическое исследование аутопсийных образцов костной ткани животных через 15 суток после внесения в дефект ксеногенного материала «Bio-Oss» выявило очаги разрушенных и некротизированных балочных конструкций кости, которые были окружены базофильными гранулятами. В этом участке имелось разрастание соединительной ткани [рис. 31А].

В зоне дефекта челюсти, в которую была имплантирована тканеинженерная конструкция с аутологичным фибрином, обогащенного тромбоцитарными клетками, и диоксидом церия, наблюдалось фокальное расширение соединительнотканного матрикса с насыщенной сосудистой сетью, где рассредоточены мелкие костные фрагменты. В приграничной зоне с балочными элементами кости выявляется локализация клеток кости остеобластов и остеокластов [рис. 31Б].

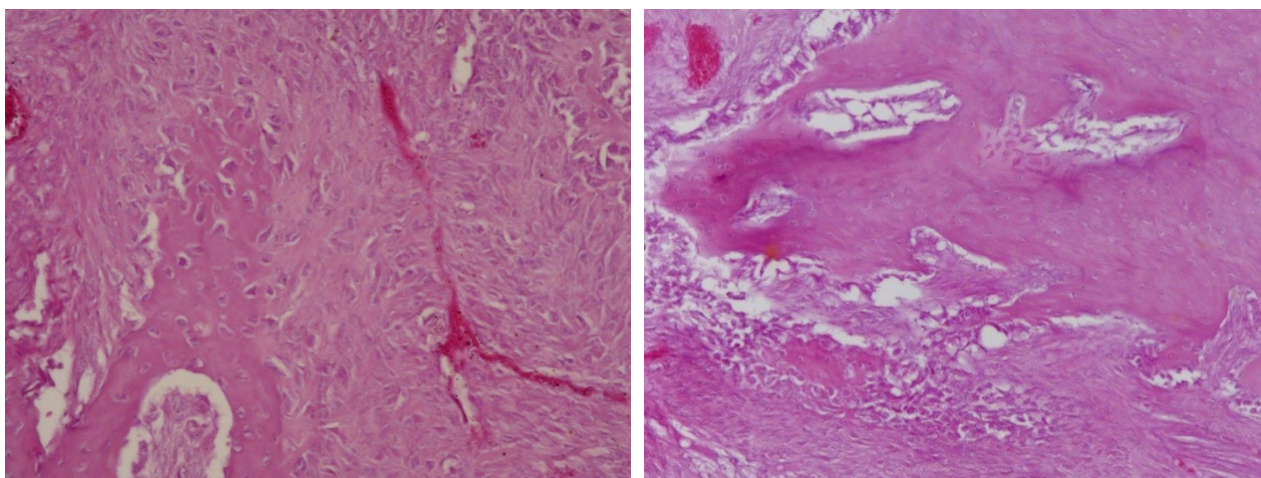


А

Б

Рисунок 31. Гистотопограмма поперечного сечения челюсти кролика на 15 сутки эксперимента [А] внесение в сформированный костный дефект гранул «Bio-Oss»; [Б] внесение в дефект биокомпозиции PRF на основе nanoCeO_2 . Окраска: Гематоксилин-эозин. Ув. x120

Исследование тканевого детрита на 25 сутки показало, что в левостороннем дефекте, содержащего биоматериал «Bio-Oss», на фоне остеосинтеза балочных элементов кости, окруженных сетью остеобластов, выявлялось фокальное расширение соединительнотканного матрикса с новообразованной кровеносной сетью, с локализацией базофильных клеток и мелких частиц разрушенных клеток [рис. 32А]. После имплантации тканеинженерной конструкции в участке дефекта в зоне соединительного матрикса просматривается расширение костной консоли, окруженной остеобластами и частично видимыми остеокластами [рис. 32Б].



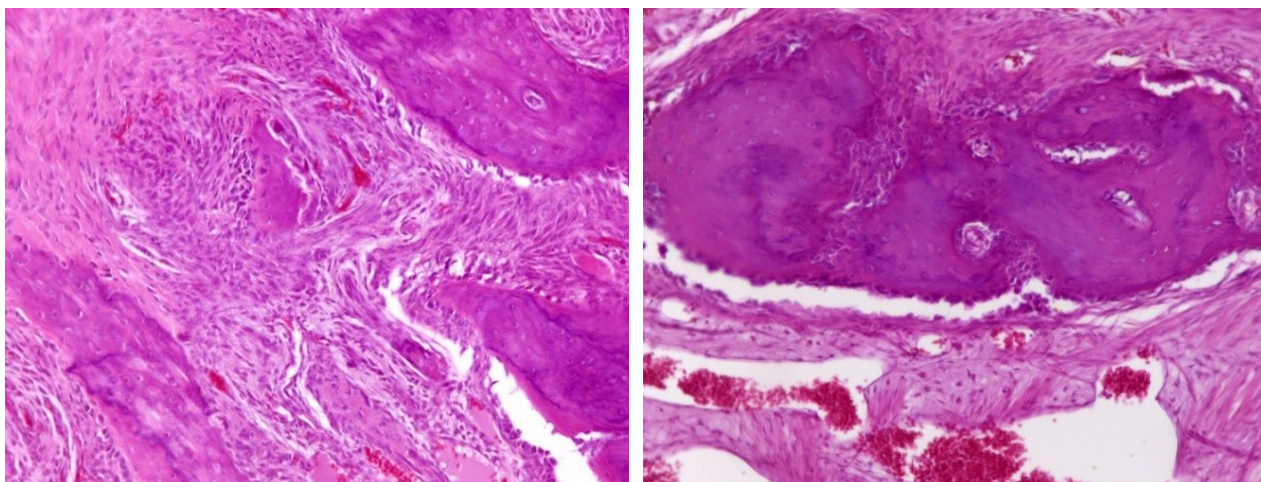
А

Б

Рисунок 32. Гистотопограмма поперечного сечения челюсти кролика на 25 сутки эксперимента [А] внесение в сформированный костный дефект гранул «Bio-Oss»; [Б] внесение в дефект биокомпозиции PRF на основе nanoSeO_2 . Окраска: Гематоксилин-эозин. Ув. x120

Остеосинтетические процессы на 35 сутки регенерации дефекта у ксеногенного материала «Bio-Oss» выражались в формировании очаговых зон костной консоли в толще соединительнотканного матрикса, образованием остеонов, и разбросанных по всему периметру дефекта мелких фрагментов лизированной ткани. Наблюдается образование компактной костной ткани со значительным количеством остеобластных клеток по периферии [рис. 33А].

В участке регенерации костной ткани челюстей после имплантации тканеинженерной конструкции на основе диоксида церия и аутологичного фибринового матрикса, насыщенного тромбоцитарными клетками, выявлялась чистая зона без лизированных фрагментов костной ткани и сформированными костными консолями, окруженных подавляющим числом остеобластов [рис. 33Б].



А

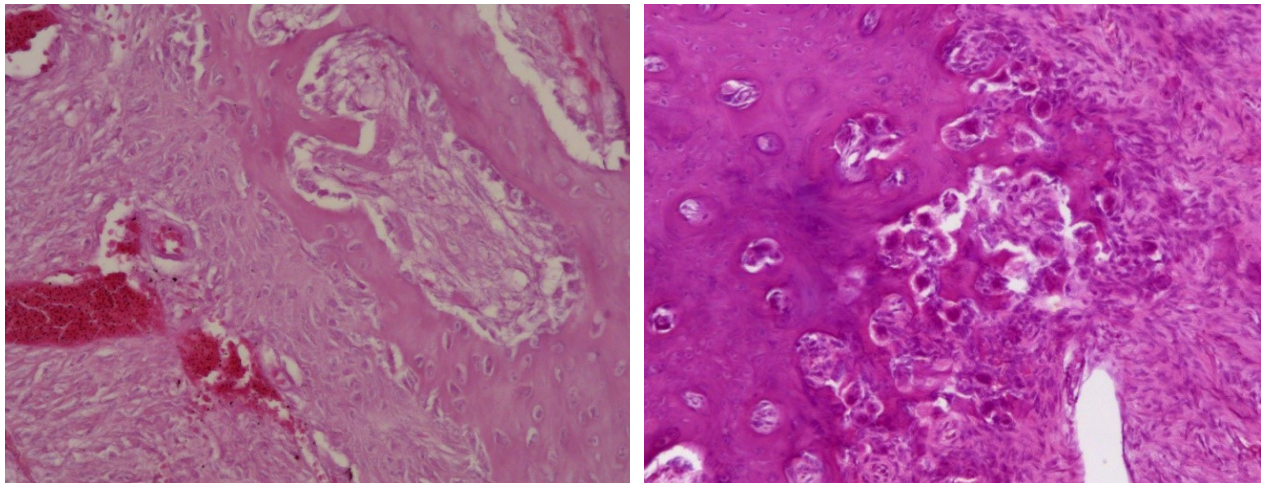
Б

Рисунок 33. Гистотопограмма поперечного сечения челюсти кролика на 35 сутки эксперимента [А] внесение в сформированный костный дефект гранул «Bio-Oss»; [Б] внесение в дефект биоконструкции PRF на основе nanoCeO_2 . Окраска: Гематоксилин-эозин. Ув. $\times 120$

Регенерация костного дефекта челюсти на 45 сутки после имплантации материала «Bio-Oss» сопровождалась образованием участков компактной кости с видимыми границами остеонов, окруженных остеобластами и формированием узелков. В полости дефекта, заполненного материалом PRF с nanoCeO_2 , главным гистологическим отличием является очаговое формирование костных балок, окруженных большим числом остеобластов и остеокластов, отсутствие узелков [рис. 34Б].

После имплантации материала «Bio-Oss» в дефект челюсти на 55 сутки сопровождалось образованием компактной костной структуры, сходной с кортикальной костью, с большим числом лакун, заполненных остеокластами

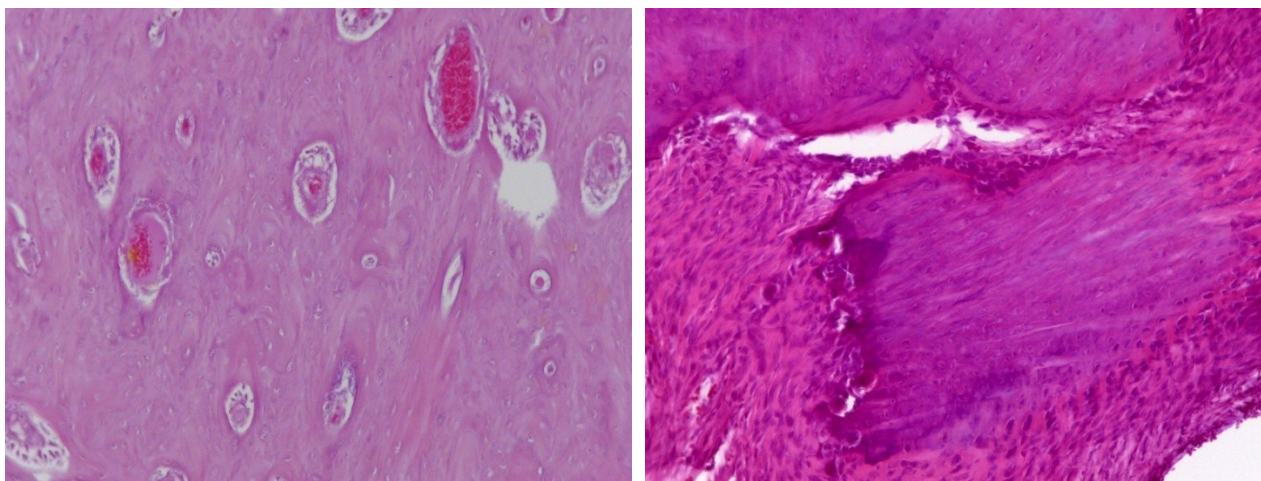
[рис. 35А]. После имплантации тканеинженерной конструкции в челюстной дефект в этот срок наблюдения выявлялись зоны губчатой кости, межующиеся соединительнотканым матриксом между костными консолями, окруженных остеокластоподобными клетками [рис.35Б].



А

Б

Рисунок 34. Гистотопограмма поперечного сечения челюсти кролика на 45 сутки эксперимента [А] внесение в сформированный костный дефект гранул «Bio-Oss»; [Б] внесение в дефект биоконпозиции PRF на основе nanoCeO_2 . Окраска: Гематоксилин-эозин. Ув. х120



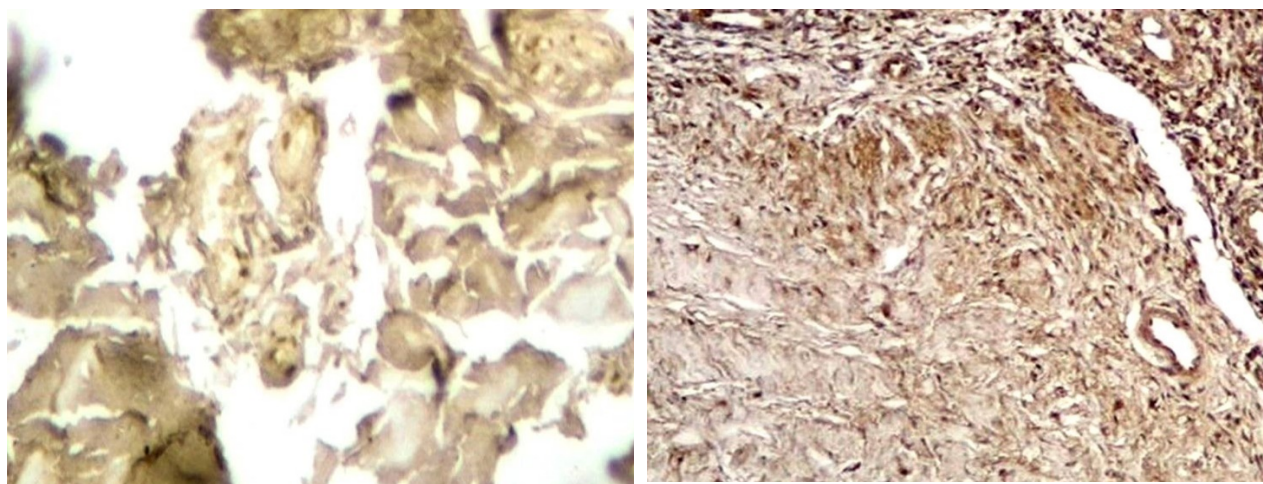
А

Б

Рисунок 35. Гистотопограмма поперечного сечения челюсти кролика на 55 сутки эксперимента [А] внесение в сформированный костный дефект гранул «Bio-Oss»; [Б] внесение в дефект биоконпозиции PRF на основе nanoCeO_2 . Окраска: Гематоксилин-эозин. Ув. х120

4.2.1. Результаты иммуногистохимического анализа костной ткани после имплантации тканеинженерной конструкции на основе нанодисперсного диоксида церия с аутологичным фибриновым матриксом, обогащенного тромбоцитами

Позитивные результаты иммуногистохимической реакции определяли по специфичности реакции и отсутствию активной эндогенной пероксидазы. На гистотопограммах [рис. 36-40] показана различная экспрессия ММП-9 и слабая экспрессия ТИМП-1 на всех сроках наблюдения.



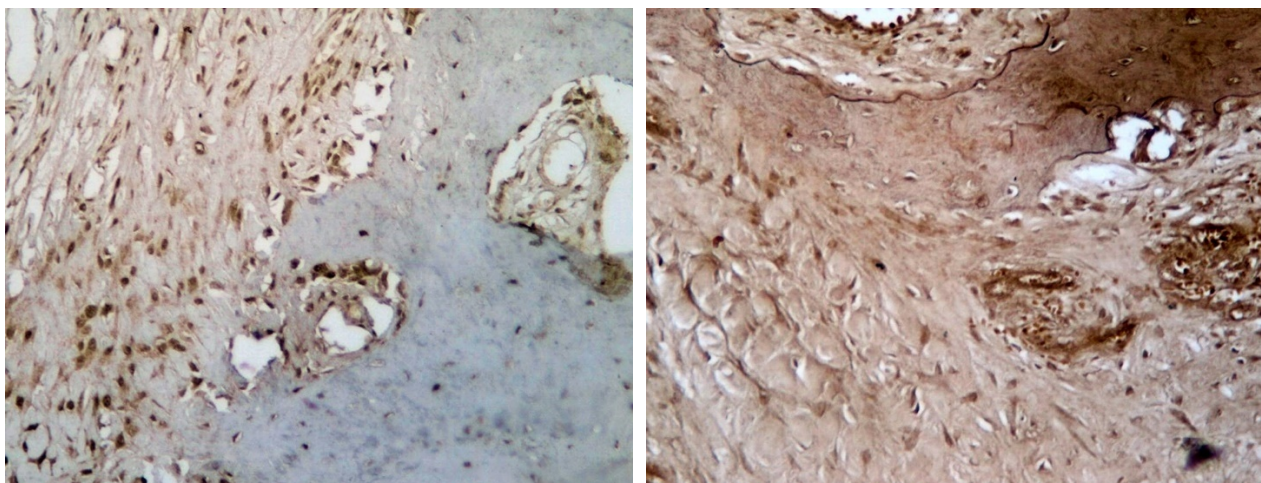
А

Б

Рисунок 36. Гистотопограмма поперечного сечения челюсти кролика на 15 сутки эксперимента [А] внесение в сформированный костный дефект гранул «Bio-Oss» - слабая экспрессия ММП-9; [В] внесение в дефект новой биокомпозиции PRF на основе наноCeO₂ -выраженная экспрессия ММП-9. Окраска: Гематоксилин Майера. Ув. x120

После имплантации в костный дефект биоматериала наноCeO₂ с PRF, на 15 сутки выявляется наиболее высокая экспрессия ММП-9 и низкая у ингибитора ТИМП-1, которое сохраняется до 35 суток.

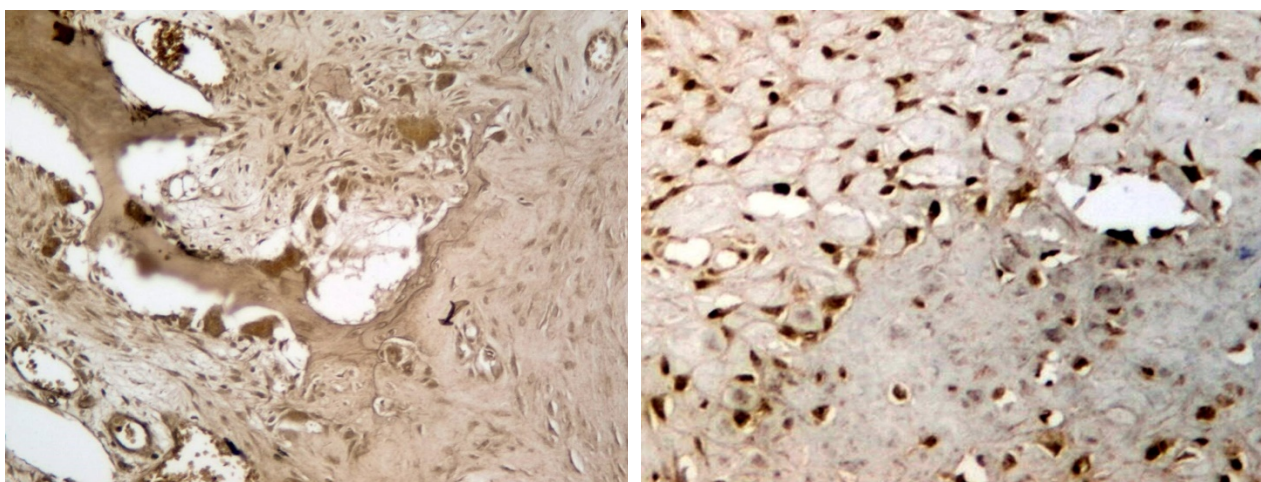
К 45-55 суткам эксперимента в опытном участке дефекта экспрессия ММП-9 в костной ткани оставалась выше, по сравнению с контралатеральной стороной, где был имплантирован ксеногенный материал «Bio-Oss».



А

Б

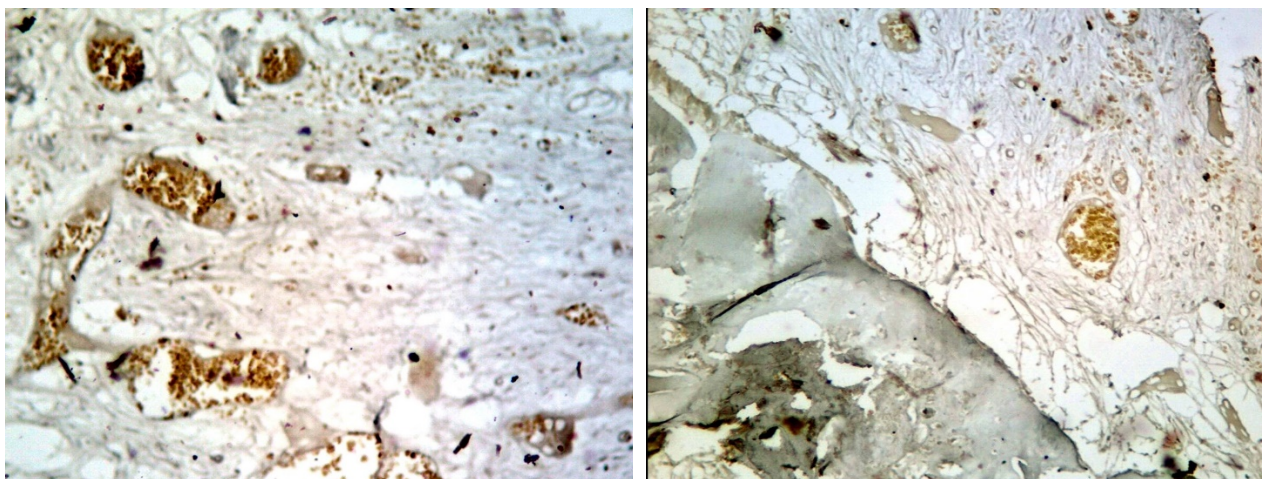
Рисунок 37. Гистотопограмма поперечного сечения челюсти кролика на 25 сутки эксперимента [А] внесение в сформированный костный дефект гранул «Bio-Oss» - выраженная экспрессия ММП-9; [В] внесение в дефект новой биокomпозиции PRF на основе наноCeO₂ -выраженная экспрессия ММП-9. Окраска: Гематоксилин Майера. Ув. x120



А

Б

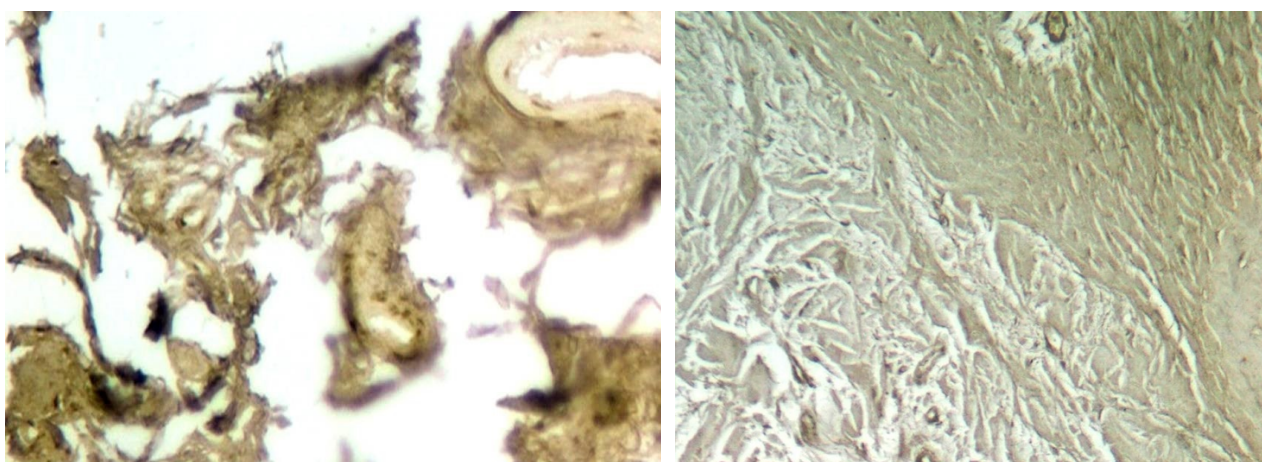
Рисунок 38. Гистотопограмма поперечного сечения челюсти кролика на 35 сутки эксперимента [А] внесение в сформированный костный дефект гранул «Bio-Oss» - выраженная экспрессия ММП-9; [В] внесение в дефект новой биокomпозиции PRF на основе наноCeO₂ -выраженная экспрессия ММП-9. Окраска: Гематоксилин Майера. Ув. x120



А

Б

Рисунок 39. Гистотопограмма поперечного сечения челюсти кролика на 45 сутки эксперимента [А] внесение в сформированный костный дефект гранул «Bio-Oss» - слабая экспрессия ТИМП-1; [В] внесение в дефект новой биокомпозиции PRF на основе nanoCeO_2 - слабая экспрессия ТИМП-1. Окраска: Гематоксилин Майера. Ув. $\times 120$



А

Б

Рисунок 40. Гистотопограмма поперечного сечения челюсти кролика на 55 сутки эксперимента [А] внесение в сформированный костный дефект гранул «Bio-Oss» - слабая экспрессия ТИМП-1; [В] внесение в дефект новой биокомпозиции PRF на основе nanoCeO_2 - слабая экспрессия ТИМП-1. Окраска: Гематоксилин Майера. Ув. $\times 120$

Таким образом, иммуногистохимическое исследование показало, что на стороне после оперативного вмешательства с имплантацией ксеногенного материала «Bio-Oss» на 25-35 сутки выявляется максимальная экспрессия ММП-9 и минимальная экспрессия ТИМП-1. Экспрессия ТИМП-1 повышается на 45-е сутки, и соотношение меняется к 55 суткам. При этом подавление экспрессии ТИМП-1 совпадает с активной экспрессией ММП-9.

Морфометрический анализ окрашенных зон показал активную экспрессию ММП-9 на стороне дефектов, заполненных тканеинженерной конструкции на основе нанодисперсного диоксида церия с аутологичным фибриновым матриксом, обогащенного тромбоцитами, на всех этапах наблюдения. Начиная с 15 суток наблюдения активность ММП-9 на стороне с имплантированным ТИК была достоверно выше ($p < 0,05$) по сравнению с регенератом кости после имплантации материала «Bio-Oss», и повторное повышение зарегистрировано уже на 55 сутки [$2,3 \pm 0,48$ и $2,0 \pm 0,29$ у.е. соответственно] [табл. 10].

Таблица 10 – Показатели экспрессии ММП-9 и ТИМП-1 [у.е] в образцах костной ткани после имплантации остеопластических материалов в разные сроки эксперимента [$M \pm m$]

Сроки эксперимента [сутки]	15		25		35		45		55	
	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Показатель/сторона челюсти										
ММП-9	0,8± 0,73	2,3± 0,48*	2,4± 0,57	2,6± 0,50	2,6± 0,42	2,5± 0,31	1,2± 0,11	2,3± 0,27*	0,9± 0,11	2,0± 0,29*
ТИМП-1	2,1± 0,33	1,1± 0,51*	0,5± 0,12	0,6± 0,16	0,7± 0,09	0,5± 0,08	1,1± 0,10	0,6± 0,07*	2,2± 0,20	0,9± 0,06*

Примечания: Разница достоверна между сторонами челюсти при * $p < 0,005$.

В дефектах, заполненных гранулами материала «Bio-Oss», по отношению к ТИК, экспрессия ММП-9 к 15 суткам была в 2,88 раза ниже, нарастала только к 25 суткам эксперимента, а уже к 45-55 суткам наблюдения значительно снижалась практически в 2,2 раза. В то же время экспрессия ТИМП-1 в образцах с имплантированным ТИК определялась на низком уровне на всех этапах наблюдения, начиная от 15 до 55 суток наблюдения. На стороне с имплантированным материалом «Bio-Oss» эти показатели имели существенные отличия – на 15 сутки экспрессия ТИМП-1 была в 1,9 раза выше и на 55 сутки в 2,4 раза выше по сравнению с ТИК.

Таким образом, результаты морфометрического исследования показали, что после введения тканеинженерной конструкции на основе нанодисперсного диоксида церия с аутологичным фибриновым матриксом, обогащенного тромбоцитами в образцах костной ткани повышенная экспрессия ММП-9 и сниженная ТИМП-1 сохранялась на всех сроках исследования.

Полученные данные свидетельствуют о пролонгированном влиянии тканеинженерной конструкции на основе нанодисперсного диоксида церия с аутологичным фибриновым матриксом, обогащенного тромбоцитами на остеогенез на всех этапах остеорегенерации. В экспериментальных дефектах процессы регенерации костной ткани интенсифицируются, образуя больший объем костной ткани морфологически идентичной нативной кости, уменьшается количество грануляционной ткани, что свидетельствует о стимулирующем действии тканеинженерной конструкции на основе нанодисперсного диоксида церия с аутологичным фибриновым матриксом, обогащенного тромбоцитами на процессы регенерации костной ткани.

**ГЛАВА V. РЕЗУЛЬТАТЫ ИМПЛАНТАЦИИ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЖИВОТНЫМ ДВУХКАССЕТНОЙ
БИОИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ
ОКТАКАЛЬЦИЙФОСФАТА, АКТИВИРОВАННОГО ПЛАЗМИДНОЙ
ДНК С ГЕНАМИ ФАКТОРОВ РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ И
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК -1 α**

Экспериментальные исследования проведены в ортотопических условиях на 54 кроликах массой 2–2,5 кг с соблюдением международных правил гуманного обращения с лабораторными животными. Каждому животному выполнялись два одинаковых симметричных полнослойных дефекта обеих теменных костей диаметром по 10 мм. В дефект правой теменной кости трансплантировали двухкассетную конструкцию ОКФ+VEGF+SDF-1 α [опытная сторона], в дефект левой – ОКФ [сторона сравнения].

**5.1. Результаты гистологического исследования регенератов
костной ткани животных в динамике**

Гистологическое исследование образцов теменных костей кролика уже через 30 суток после имплантации остеопластического материала на основе ОКФ показано, что гранулы введенного материала расположены в центральной части костного регенерата в окружении тонковолокнистой соединительной ткани [рис.41]. Со стороны опилов обнаружены фронты регенерации костной ткани направлены к центру дефекта, но не достигают его. Первичная костная ткань охватывает прилежащие к костному ложу гранулы, проникая в поры материала. В остеогенез вовлечены в основном периферийные гранулы. На поверхности материала обнаружены цепочки остеобластов с напластованием остеоида. В центральной части дефекта гигантские многоядерные клетки инородных тел окутывают по типу мантии гранулы материала, краевая каемка которых проникает в поры материала. Большая часть поверхности гранул материала занята этими клетками. В свою очередь волокнистая соединительная ткань содержит участки уплотнения

коллагеновых волокон с фибробластоподобными веретеновидными клетками. Между ними отчетливо выявлены кровеносные сосуды с тонкими стенками и умеренным кровенаполнением.

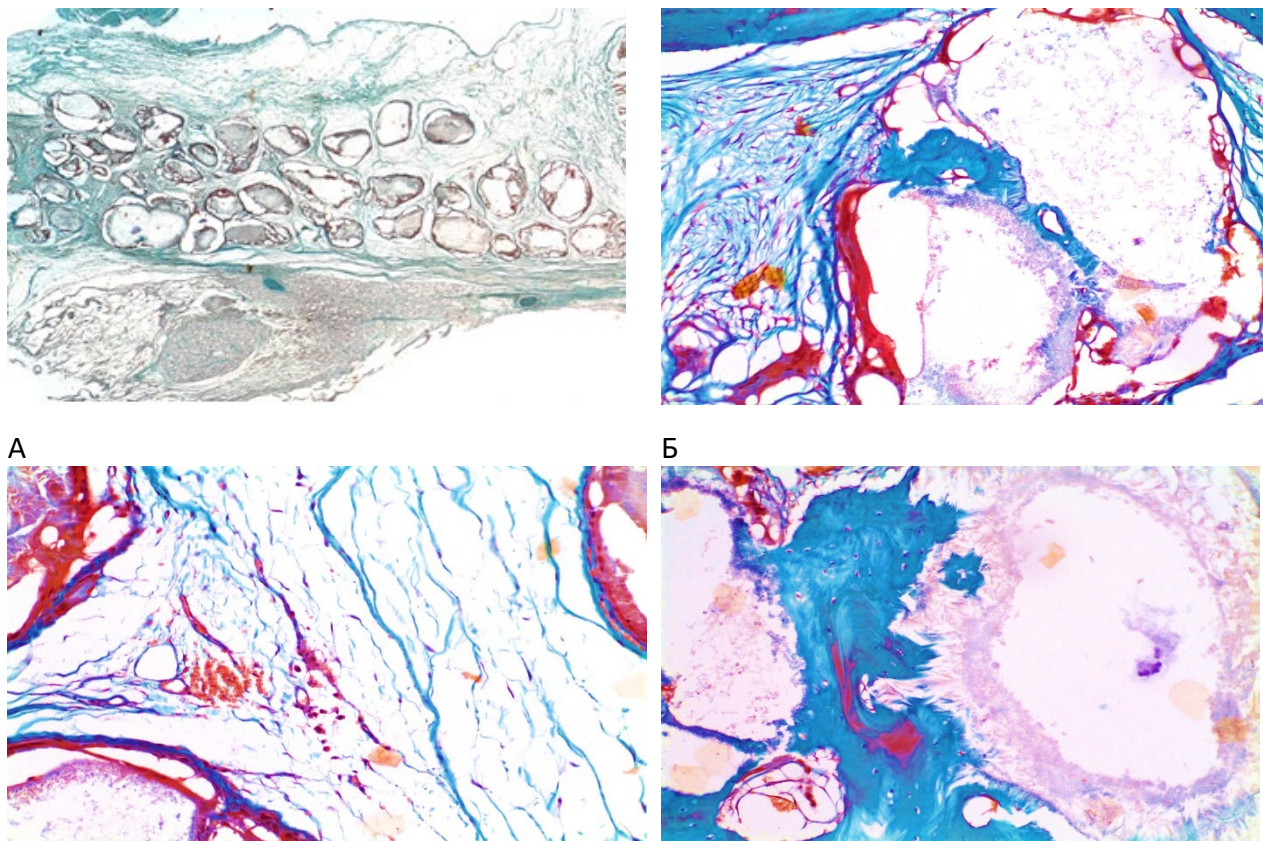


Рисунок 41. Гистологическая картина костного регенерата теменной кости кролика через 30 суток после имплантации гранул ОКФ. Окраска по Папаниколау: А - гранулы материала расположены в центральной части костного регенерата в окружении тонковолокнистой соединительной ткани. ув. x50; Б - гранулы материала с гигантскими многоядерными клетками инородных тел и с ретикуло-фиброзной костной тканью. ув. x100; В - между гранулами материала среди волокнистой соединительной ткани немногочисленные тонкостенные сосуды. ув. x200; Д - гранулы материала с поверхности ретикуло-фиброзной костной тканью. Диффузное проникновение костного матрикса в поры материала. ув. x200.

При гистологическом исследовании образцов теменных костей кролика через 30 суток после имплантации двухкассетной биоинженерной

конструкции ОКФ+VEGF+SDF-1 α было выявлено, что гранулы располагаются в центральной части костного регенерата в окружении тонковолокнистой соединительной ткани[рис.42]. С краев резекции теменных костей обнаружены фронты регенерации костной ткани, направленные к центру дефекта. Очаги остеогенеза обнаруживались в центральных частях регенерата в основном с распространением параллельно твердой мозговой оболочке.

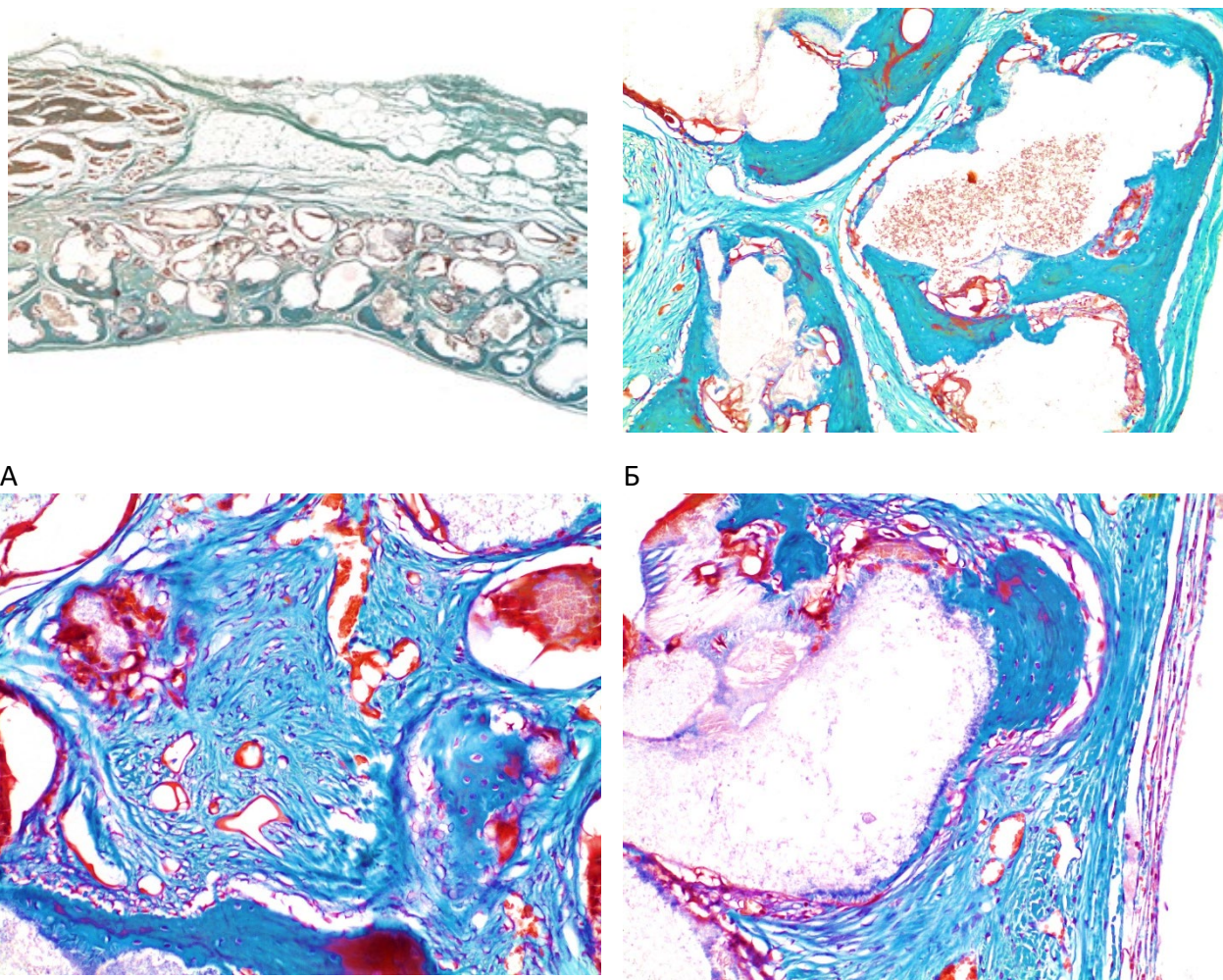


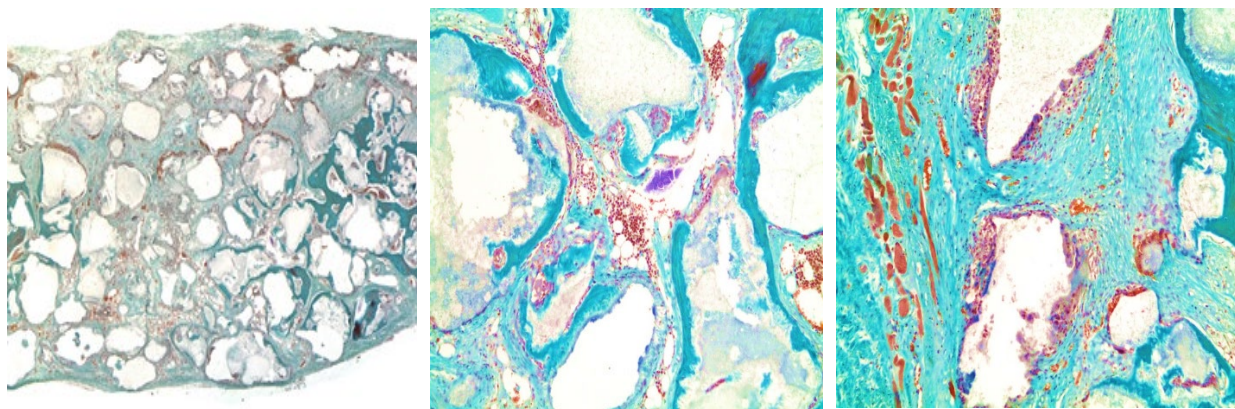
Рисунок 42. Гистологическая картина костного регенерата теменной кости кролика через 30 суток после имплантации двухкассетной биоинженерной конструкции ОКФ+VEGF+SDF-1 α . Окраска по Папаниколау: А - фронты регенерации костной ткани направлены к центру дефекта. Ув. x50; Б - гранулы материала в окружающей созревающей ретикуло-фиброзной костной ткани. Ув. x100; В - большое количество тонкостенных сосудов

среди недифференцированной соединительной ткани регенеративного типа. Ув. x200; Г -на грануле материала напластование остеоида. Ув. x100

Первичная костная ткань охватывает прилежащие к костному ложу гранулы, проникая в поры материала, и охватывает их со всех сторон, от чего гранулы становятся погруженными в массив новообразованного костного матрикса. В остеогенез вовлечена большая часть гранул. На поверхности материала цепочки остеобластов с напластованием остеоида сменяются серповидными пластинами ретикулофиброзной костной ткани. Молодая костная ткань содержит костный мозг обычного строения. На поверхности ее обнаруживаются гигантские клетки, которые покрывают остеопластический материал по типу мантии. На части гранул обнаружены признаки резорбции по типу эрозии. Волокнистая соединительная ткань содержит участки уплотнения коллагеновых волокон с фибробластоподобными веретеновидными клетками, среди которых определяются кровеносные сосуды с тонкими стенками и умеренным кровенаполнением. Параваскулярно и в толще соединительной ткани регенераторного типа обнаруживаются единичные макрофаги и лимфоциты.

При микроскопическом исследовании образцов теменных костей кролика через 45 суток после имплантации остеопластического материала на основе ОКФ выявлено, что гранулы материала располагаются в центральной части костного регенерата в окружении тонковолокнистой соединительной ткани [рис.43]. С краев резекции материнской кости фронты регенерации костной ткани направлены к центру дефекта. Очаги остеогенеза в центральных частях регенерата обнаруживаются редко. Единичные островки ретикулофиброзной костной ткани обнаруживаются на гранулах, прилежащих к центру регенерата. Синтезированная новая костная ткань охватывает прилежащие к материнской кости гранулы, проникая в поры материала, и охватывает их со всех сторон, от чего гранулы становятся погруженными в массив костного матрикса. В остеогенез вовлечена большая часть гранул. На поверхности материала цепочки остеобластов с

напластованием остеоида сменяются серповидными пластинами ретикулофиброзной костной ткани. Развивающаяся костная ткань содержит костный мозг обычного строения.



А

Б

В

Рисунок 43. Гистологическая картина костного регенерата теменной кости кролика через 45 суток после имплантации гранул ОКФ. Окраска по Папаниколау: А - гранулы материала расположены в центральной части костного регенерата в окружении тонковолокнистой соединительной ткани. Ув. x50; Б - неоостеогенез на поверхности гранул остеопластического материала в окружении недифференцированной соединительной ткани регенеративного типа. Ув. x100; В - гигантские клетки инородных тел на поверхности материала. Ув. x100

Многоядерные клетки на поверхности гранул материала практически полностью окутывают их по типу мантии и проникают в поры материала. На части гранул имеются признаки резорбции по типу эрозии. Нежно-волокнистая соединительная ткань содержит участки уплотнения коллагеновых волокон с фибробластоподобными веретеновидными клетками, среди которых определяются кровеносные сосуды с тонкими стенками и умеренным кровенаполнением, а иногда полнокровные. Выявляется жировая прослойка и не обнаруживаются макрофаги и лимфоциты.

Через 45 суток после имплантации двухкассетной биоинженерной конструкции ОКФ+VEGF+SDF-1 α выявлено, что гранулы материала располагаются в центральной части костного регенерата в окружении тонковолокнистой соединительной ткани [рис.44].

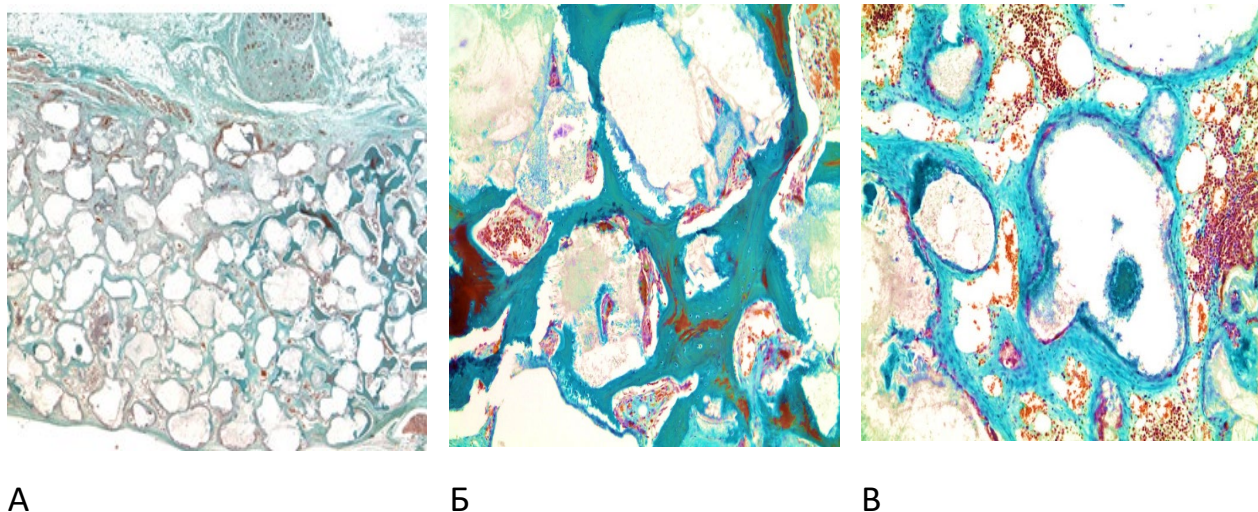


Рисунок 44. Гистологическая картина костного регенерата теменной кости кролика через 45 суток после имплантации двухкассетной биоинженерной конструкции ОКФ+VEGF+SDF-1 α . Окраска по Папаниколау: А] Гранулы материала расположены в центральной части костного регенерата в окружении тонковолокнистой соединительной ткани.ув. x50; Б] Гранулы остеопластического материала в окружении зрелой костной ткани. ув. x100; В] Неоостеогенез на поверхности гранул материала в центральной части костного регенерата. Большое количество тонкостенных сосудов. ув. x100

С краев резекции материнской кости обнаруживаются фронты регенерации костной ткани, направленные к центру дефекта. Очаги остеогенеза обнаруживаются редко в центральных частях регенерата в основном не достигая его. Единичные островки ретикулофиброзной костной ткани обнаруживаются на гранулах, прилежащих к центру регенерата. Молодая костная ткань охватывает прилежащие к материнской кости гранулы, проникая в поры материала, и охватывает их со всех сторон, от чего гранулы становятся погруженными в массив костного матрикса. В остеогенез

вовлечена большая часть гранул. На поверхности материала цепочки остеобластов с напластованием остеоида сменяются серповидными пластинами ретикулофиброзной костной ткани.

При микроскопическом исследовании образцов теменных костей кролика через 60 суток после имплантации остеопластического материала на основе ОКФ выявлено, что гранулы материала расположены в центральной части костного регенерата в окружении зрелой нежно-волокнистой соединительной ткани [рис.45].

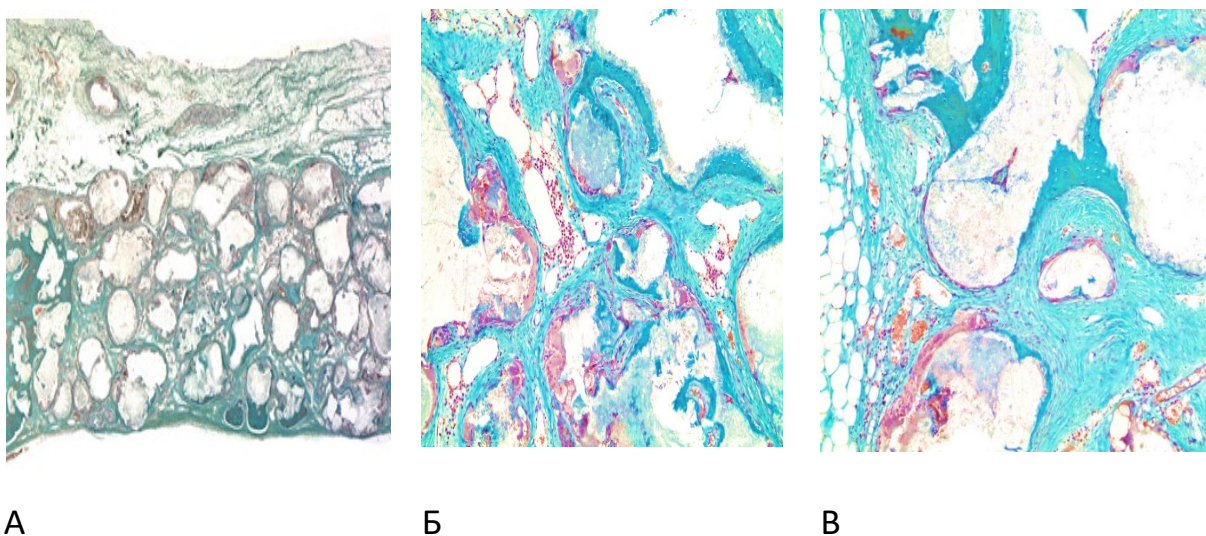
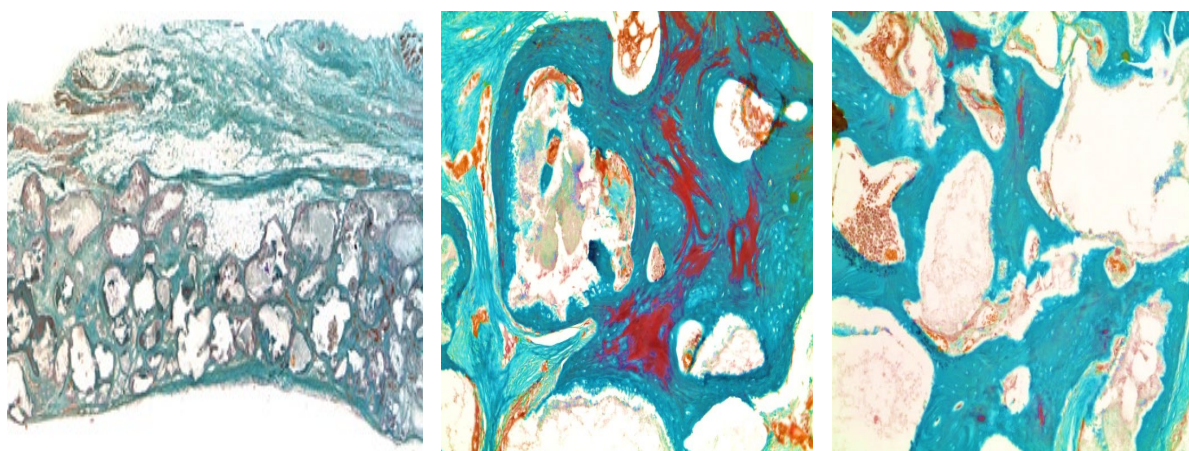


Рисунок 45. Гистологическая картина костного регенерата теменной кости кролика через 60 суток после имплантации гранул ОКФ. Окраска по Папаниколау: А - гранулы материала расположены в центральной части костного регенерата в окружении зрелой нежно-волокнистой соединительной ткани. ув. x50; Б - гигантские клетки инородных тел на поверхности материала. ув. x100; В - на поверхности гранул тонкие иногда серповидные костные балки с признаками неоостеогенеза. Между гранулами созревающая грубоволокнистая соединительная ткань. ув. x100

Большая часть дефекта на этом сроке заполнена конгломератом, состоящим из грубоволокнистой соединительной ткани с включёнными в нее гранулами остеопластического материала. Балки ретикулофиброзной костной ткани иногда прослеживаются на гранулах, находящихся непосредственно в центре регенерата с напластованием остеоида на

поверхности материала. Развивающаяся костная ткань содержит костный мозг обычного строения. Гранулы материала лишь частично окружены гигантскими клетками инородных тел. Поверхность гранул имеет признаки эрозивной резорбции. Среди волокон соединительной ткани отчетливо определяются кровеносные сосуды с тонкими и утолщенными стенками. Они имеют умеренное кровенаполнение, а иногда и полнокровное. Лимфоцитарная и макрофагальная инфильтрация не выражена. В некоторых образцах наряду с нежно-волокнуистой соединительной тканью обнаруживается жировая прослойка.

При микроскопическом исследовании образцов теменных костей кролика через 60 суток после имплантации двухкассетной биоинженерной конструкции ОКФ+VEGF+SDF-1 α выявлено, что большая часть дефекта заполнена конгломератом, состоящим из костной ткани с включёнными в нее гранулами остеопластического материала с прослойками грубоволокнистой соединительной ткани [рис.46].



А

Б

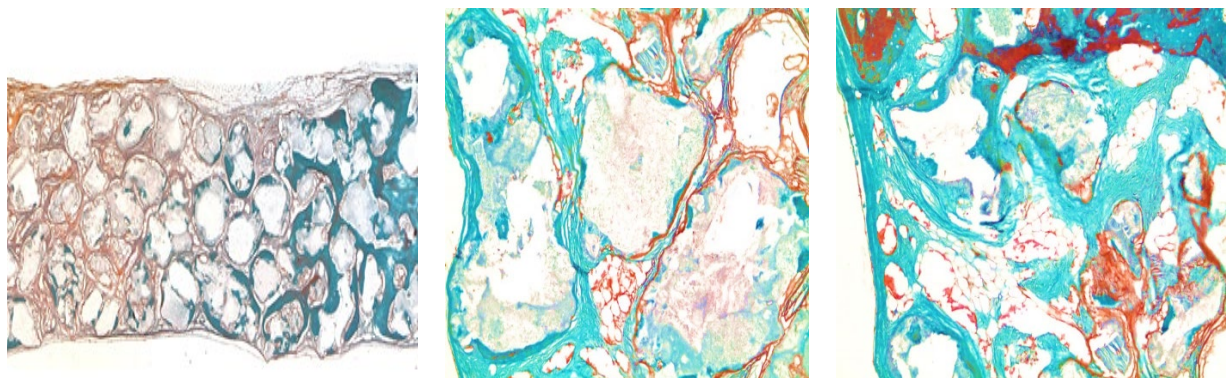
В

Рисунок 46. Гистологическая картина костного регенерата теменной кости кролика через 60 суток после имплантации двухкассетной биоинженерной конструкции ОКФ+VEGF+SDF-1 α . Окраска по Папаниколау: А-конгломерат, состоящий из костной ткани, с включёнными в нее гранулами остеопластического материала с прослойками грубоволокнистой соединительной ткани. ув. х50; Б -гранулы остеопластического материала в окружении зрелой пластинчатой костной ткани с очагами красного костного

мозга. ув. x100; В - продолжающиеся признаки резорбции материала со стороны костномозгового пространства. ув. x100

Костная ткань, после имплантации двухкассетной биоинженерной конструкции ОКФ+VEGF+SDF-1 α , в основном представлена зрелой компактной костью с редкими участками неоостеогенеза как на поверхности балок, так и на гранулах материала. Новообразованная костная ткань содержит костный мозг обычного строения. Гранулы материала лишь частично окружены гигантскими клетками инородных тел. Поверхность гранул имеет признаки эрозивной резорбции. Среди волокон соединительной ткани отчетливо определяются кровеносные сосуды с тонкими и утолщенными стенками и умеренным кровенаполнением иногда полнокровные. Лимфоцитарная и макрофагальная инфильтрация не выражена. В некоторых образцах наряду с нежно-волокнистой соединительной тканью обнаружена жировая ткань.

При микроскопическом исследовании образцов теменных костей кролика через 90 суток после имплантации остеопластического материала на основе ОКФ выявлено, что гранулы материала располагаются в центральной части костного регенерата в окружении зрелой нежно-волокнистой соединительной ткани [рис.47].



А **Б** **В**

Рисунок 47. Гистологическая картина костного регенерата теменной кости кролика через 90 суток после имплантации гранул ОКФ. Окраска по Папаниколау: А - гранулы материала расположены в центральной части костного регенерата в окружении зрелой нежно-волокнистой соединительной ткани. ув. x50; Б - гранулы остеопластического материала в окружении зрелой фиброзной и жировой ткани ув. x100; В - продолжающиеся признаки резорбции материала. Отсутствие признаков продолжающегося остеогенеза. ув. x100

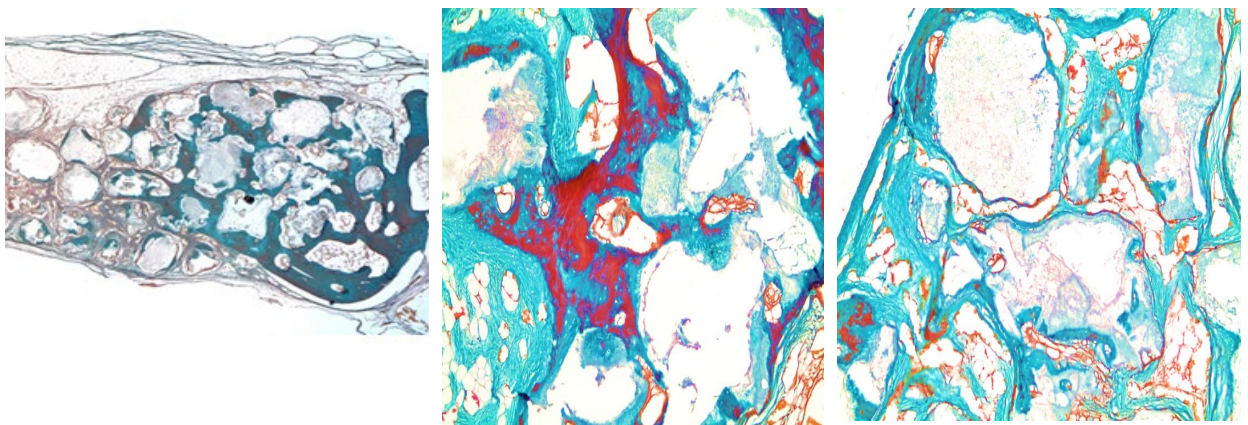
Большая часть дефекта заполнена конгломератом, состоящим из грубоволокнистой соединительной ткани с включёнными в нее гранулами остеопластического материала.

Балки ретикулофиброзной костной ткани редко обнаруживают на гранулах, находящихся непосредственно в центре. Новообразованная костная ткань содержит костный мозг обычного строения [рис.47 А, Б]. Гранулы материала лишь частично окружены гигантскими клетками инородных тел. Поверхность гранул имеет признаки эрозивной резорбции [рис.47 В].

Среди волокон соединительной ткани отчетливо определяются кровеносные сосуды с тонкими и утолщенными стенками. Они имеют умеренное кровенаполнение, а иногда и полнокровное. Лимфоцитарная и макрофагальная инфильтрация отсутствует. В ряде образцов наряду с нежноволокнистой соединительной тканью обнаруживается жировая прослойка.

При микроскопическом исследовании образцов теменных костей кролика через 90 суток после имплантации двухкассетной биоинженерной конструкции ОКФ+VEGF+SDF-1 α выявлено, что большая часть дефекта заполнена конгломератом, состоящим из костной ткани с включёнными в нее гранулами материала с прослойками грубоволокнистой соединительной ткани [рис.48].

Костная ткань в основном представлена зрелой компактной костью с редкими участками неоостеогенеза как на поверхности балок, таки на гранулах материала. Края дефекта имеют тенденцию к слиянию – практически полное заполнение дефекта новообразованной костной тканью. Новообразованная костная ткань содержит костный мозг обычного строения. Гранулы материала лишь частично окружены гигантскими клетками инородных тел. Поверхность гранул имеет признаки эрозивной резорбции. Среди волокон соединительной ткани отчетливо определяются кровеносные сосуды с тонкими и утолщенными стенками. Они имеют умеренное кровенаполнение, а иногда и полнокровное. Лимфоцитарная и макрофагальная инфильтрация не выражена. В некоторых образцах наряду с нежно-волокнутой соединительной тканью обнаруживаются прослойки жировой ткани.



А

Б

В

Рисунок 48. Гистологическая картина костного регенерата теменной кости кролика через 90 суток после имплантации двухкассетной биоинженерной конструкции ОКФ+VEGF+SDF-1 α . Окраска по Папаниколау: А -

конгломерат, состоящий из костной ткани с включёнными в нее гранулами остеопластического материала с прослойками грубоволокнистой соединительной ткани. ув. x50; Б - центральная часть регенерата. Гранулы остеопластического материала в окружении зрелой фиброзной и жировой ткани. [ретикулофиброзная костная ткань]. ув.100; В-центральная часть костного регенерата. Продолжающиеся признаки резорбции материала. Отсутствие признаков продолжающегося остеогенеза. ув.100

Таким образом, в случае применения двухкассетной биоинженерной конструкции ОКФ+VEGF+SDF-1 α в периферической и в центральной зонах костных дефектов выявлено полное восстановление целостности теменных костей к 90 суткам. В группе животных с имплантированным ОКФ в ряде дефектов отмечался неполный остеогенез, выражающийся в наличии плотной волокнистой соединительной ткани с большим количеством кровеносных сосудов. Полученные данные свидетельствуют о более выраженных остеоиндуктивных свойствах двухкассетной биоинженерной конструкции ОКФ+VEGF+SDF-1 α .

5.2. Результаты морфометрического исследования регенератов костной ткани экспериментальных животных после имплантации остеозамещающих материалов в динамике

При морфометрическом исследовании *основных компонентов костного регенерата* [табл.11] на 30 сутки регенерации костной ткани выявлено, что объемная доля костной ткани [BV/TV] достоверно [$p < 0,001$] выше в образцах с ОКФ+VEGF+SDF-1 α . Между образцами обнаружена недостоверная разница в объемной доле сосудов 3% в образцах с ОКФ+VEGF+SDF-1 α и 2,2% в образцах с ОКФ ($p > 0,5$).

На 45 сутки эксперимента в образцах с ОКФ+VEGF+SDF-1 α и с ОКФ продолжалось увеличение объемной доли костной ткани [BV/TV] и эти показатели достоверно выше [$p < 0,001$] у образцов с имплантированным ОКФ+VEGF+SDF-1 α , при относительно более низкой объемной доле остеопластического материала ОКФ. Также между образцами обнаружена

недостовверная разница в объемной доле сосудов: 3% в образцах с ОКФ+VEGF+SDF-1 α и 2,3% в образцах с ОКФ [$p>0,05$].

На 60 сутки эксперимента в образцах с имплантированными ОКФ+VEGF+SDF-1 α и ОКФ выявлено, что объемная доля костной ткани [BV/TV] достоверно [$p<0,05$] выше у образцов с ОКФ+VEGF+SDF-1 α , при относительно более низкой объемной доле остеопластического материала. По показателю объемной доли сосудов образцы между собой практически выровнялись: 3,2% - ОКФ+VEGF+SDF-1 α и 2,6% - ОКФ, однако различия между образцами оставались недостоверными [$p>0,05$].

На 90 сутки регенерации костной ткани выявлено, что ее объемная доля [BV/TV] достоверно выше у образцов с ОКФ+VEGF+SDF-1 α при относительно более низкой объемной доле остеопластического материала. По показателю объемной доли сосудов все из изученных образцов между собой практически выровнялись: 2,5% в образцах с ОКФ+VEGF+SDF-1 α и 2,25% в образцах с ОКФ без достоверных отличий [$p>0,1$] между ними.

Таблица 11 - Относительные объемные доли[%]основных структурных компонентов костных регенератов[M±m]

Сроки [сут]	30		45		60		90	
Материал/ Параметры	ОКФ+ VEGF+SDF- 1α	ОКФ	ОКФ+ VEGF+SDF-1α	ОКФ	ОКФ+ VEGF+SDF-1α	ОКФ	ОКФ+ VEGF+SDF- 1α	ОКФ
BV/TV	32,0±0,82*	11,0±1,08*	38,0±3,30**	19,0±0,82	40,0±0,82**	26,5±1,50	36,5±0,50*	31,0±2,00*
AdV/TV	20,5±11,0*	19,2±9,25	1,50±0,50	1,00±0,25	1,46±0,11	1,30±0,15	2,00±0,02	1,50±0,10
MatV/TV	41,0±1,25	37,0±1,63	24,0±1,73	39,0±1,63**	39,0±2,05	39,5±0,50	32,5±1,50	32,0±3,00
Fb.V/TV	23,0±0,94*	28,0±1,60*	31,2±1,73	35,0±1,84	15,0±4,19	28,0±1,00*	21,0±1,00*	27,0±1,00*
VsV/TV	3,00±0,31	2,20±0,22	3,00±0,12	2,30±0,12	3,20±0,12	2,60±0,15	2,50±0,50	2,25±0,25

Достоверность различий при *p<0,05, **p<0,001. Сокращения: BV/TV - Относительный объем костной ткани; Mat.V/TV -Относительный объем остеопластического материала; AdV/TV - Относительный объем жировой ткани; FbV/TV- Относительный объем фиброзной ткани; VsV/TV- Относительный объем сосудов

При морфометрическом исследовании *основных свойств остеопластического материала* [остеоиндукция, остеокондукция, эрозивная резорбция] [табл.12] на 30 сутки эксперимента выявлено, что у материала с факторами роста и адгезии в образцах с ОКФ+VEGF+SDF-1 α индуктивные свойства [MatBS/BS] достоверно выше [$p < 0,05$].

Обнаружилось свойство включенных в материал веществ привлекать гигантские клетки инородных тел [Mat.Gc.S/Mat.S], количество которых до 91% поверхности занимают клетки макрофагального ряда в образцах наблюдения по сравнению с образцами ОКФ 57% [$p < 0,001$].

Относительная площадь остеобластов на поверхности материала ОКФ+VEGF+SDF-1 α доходила до 3,1%. Однако достоверных отличий по относительной площади эрозии материала [Mat.ES/Mat.S] на указанный срок наблюдения не было выявлено.

На 45 сутки эксперимента в образцах с имплантированными ОКФ+VEGF+SDF-1 α и ОКФ индуктивные свойства материала [MatBS/BS] с факторами роста и адгезии [образцы наблюдения] имеют тенденцию к равносному сближению показателя с сохранением достоверной разницы [$p < 0,05$].

Относительная поверхность материала, занятая гигантскими клетками инородных тел [Mat.Gc.S/Mat.S] снизилась в образцах с ОКФ+VEGF+SDF-1 α до 44% по сравнению с образцами ОКФ [49%].

Аналогичная ситуация по выравниванию остеоиндуктивных свойств материала наблюдается в отношении привлечения остеогенных клеток предшественников – относительная площадь остеобластов на поверхности материала выравнивалась до 1% с некоторым перевесом в образцах с ОКФ. Достоверные отличия по относительной площади эрозии материала [Mat.ES/Mat.S] на указанный срок наблюдения не выявлены.

Таблица 12 - Свойства остеопластических материалов [M±m]

Сроки [сут]	30		45		60		90	
Материал/ Параметры	ОКФ+ VEGF+SDF-1α	ОКФ	ОКФ+ VEGF+SDF- 1α	ОКФ	ОКФ+ VEGF+SDF-1α	ОКФ	ОКФ+ VEGF+SDF- 1α	ОКФ
MatBS/BS	41,5±1,31**	11,0±1,19	36,0±2,76*	31,2±2,08*	55,4±5,50**	30,5±2,05	50,6±7,80*	17,1±16,8
Mat.Ob.S/Mat.S	3,10±0,12**	2,10±0,17	1,00±0,09	0,80±0,07	0,64±0,07*	0,42±0,07	0,33±0,02	0,29±0,04
Mat.Gc.S/Mat.S	91,0±0,90**	57,0±7,54	44,0±1,60*	49,0±2,25*	20,8±0,33	21,4±0,15	20,3±2,25*	13,4±1,06
Mat.ES/Mat.S	9,00±0,21	8,70±0,32	9,20±0,19	9,10±0,24	4,34±0,67	4,80±0,43	4,67±0,23	5,00±0,20

Достоверность различий при *p<0,05, **p<0,001. Сокращения: MatBS - Относительная площадь контакта кости с материалом; Mat.Ob.S - Относительная площадь, занимаемая остеобластами на поверхности материала; Mat.Gc.S - Относительная площадь, занимаемая гигантскими клетками на поверхности материала; Mat.ES/Mat.S - Относительная эрозивная поверхность материала [показатель резорбции материала]

При морфометрическом исследовании основных свойств остеопластического материала на 60 сутки регенерации костной ткани в образцах с ОКФ+VEGF+SDF-1 α и ОКФ выявлено, что индуктивные свойства материала [MatBS/BS] с факторами роста и адгезии в образцах с имплантированными ОКФ+VEGF+SDF-1 α усиливаются и достигают более высокого уровня и достоверно превышают образцы с ОКФ [$p < 0,001$].

В свою очередь, выявлено, что относительная поверхность материала, занятая гигантскими клетками инородных тел [Mat.Gc.S/Mat.S], выравнивается в пределах 20% поверхности в опытных образцах и образцов с контралатеральных сторон.

Относительная площадь остеобластов на поверхности материала снизилась менее 1% в обеих образцах с некоторым перевесом в образцах с ОКФ+VEGF+SDF-1 α . Достоверных отличий по относительной площади эрозии материала [Mat.ES/Mat.S] на указанный срок наблюдения не выявлено.

На 90 сутки эксперимента в образцах с имплантированными ОКФ+VEGF+SDF-1 α и ОКФ индуктивные свойства материала [MatBS/BS] с факторами роста и адгезии в образцах с ОКФ+VEGF+SDF-1 α сохраняются на высоком уровне и достоверно превышают образцы с ОКФ [$p < 0,001$]. Относительная поверхность материала, занятая гигантскими клетками инородных тел [Mat.Gc.S/Mat.S], имеет тенденцию к выравниванию показателя, с незначительным перевесом в образцах с ОКФ+VEGF+SDF-1 α . Относительная площадь остеобластов на поверхности материала снизилась менее 1% в обеих образцах. Достоверные отличия по относительной площади эрозии материала [Mat.ES/Mat.S] отсутствуют.

Таблица 13 - Характеристика остеогенеза и динамика роста костной ткани[M±m]

Сроки [сут]	30		45		60		90	
Материал/ Параметры	ОКФ+ VEGF+SDF-1α	ОКФ	ОКФ+ VEGF+SDF-1α	ОКФ	ОКФ+ VEGF+SDF- 1α	ОКФ	ОКФ+ VEGF+SDF- 1α	ОКФ
ВВ	18,3±1,09	20,1±3,94	7,18±0,80**	4,89±0,55	7,41±0,94*	3,56±0,82	3,36±0,08*	2,25±1,00
В.Ob.S/BS	1,33±0,02**	0,11±0,04	1,35±0,03*	1,09±0,02	2,18±0,05*	1,23±0,33	0,60±0,02*	0,47±0,03
Mat.Ob.S/Mat.S	3,11±0,12*	2,10±0,17	1,02±0,09*	0,81±0,07	0,64±0,07*	0,42±0,07	0,33±0,02	0,29±0,04

Достоверность различий при *p<0,05, **p<0,001. Сокращения: ВВ - Костный баланс; В.Ob.S – Остеобластическая поверхность; Mat.Ob.S - Относительная площадь, занимаемая остеобластами на поверхности материала

Таблица 14 - Характеристика клеточного состава костных регенератов[М]

Срок	30				45				60				90			
	ОКФ+ VEGF+SDF-1α		ОКФ		ОКФ+ VEGF+SDF-1α		ОКФ		ОКФ+ VEGF+SDF- 1α		ОКФ		ОКФ+ VEGF+SDF- 1α		ОКФ	
N.Ob	3,00**	0,40	7,00	0,80	7,00**	0,50	7,00	0,50	5,00	0,90	4,00	1,00	3,00	0	3,00	0
N.Oc	1,00	0,40	2,00	0,50	1,00	0,50	2,00	0,50	1,00	0	2,00	0	1,00	0	1,50	0,50
N.Mat.Ob	46,0**	1,60	12,0	1,70	18,0**	0,90	11,0	1,70	8,00	1,20	6,00*	1,00	4,00	1,00	4,50	0,50
N.Mat.Gc	73,0**	2,90	124	12,2	135	3,30	135	3,70	35,0	2,90	37,0	2,00	33,0	2,00	30,5	2,50
N.Mf	30,0	2,60	28,0	1,70	17,0	0,50	17,0	1,20	7,00	0,80	7,50	0,50	4,50	0,50	4,50	0,50

Достоверность различий при * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$. Сокращения: N.Ob - Количество остеобластов; N.Oc - Количество остеокластов; N.Mat.Ob - Количество остеобластов на поверхности материала; N.Mat.Gs- Количество гигантских клеток на поверхности материала; N.Mf - Количество макрофагов.

Определение *основных показателей остеогенеза* [табл.13] в образцах с имплантированными ОКФ+VEGF+SDF-1 α и ОКФ на 30 сутки эксперимента выявило, что основной показатель костного баланса [BB] был на сравнимых уровнях порядка 18-20 единиц, что в сочетании с остеобластической активностью на поверхностях кости [1,33%] и остеопластического материала [3,11%] указывают на активизацию остеогенеза. Это в дополнении с высокой относительной долей костной ткани [36,5%], демонстрирует высокую эффективность сочетания материала с факторами роста и адгезии.

На 45-90 сутки заживления дефекта в образцах с ОКФ+VEGF+SDF-1 α и ОКФ выявлено, что процесс остеогенеза в обоих образцах имеет тенденцию к снижению. Однако в образцах с ОКФ+VEGF+SDF-1 α уровень остеогенеза на всех сроках достоверно превышает значения, полученные в образцах с ОКФ.

Морфометрическая оценка *клеточного состава* [табл.14] костных регенератов в образцах сравнения и наблюдения, демонстрирует достоверное преобладание клеточной популяции остеопрогениторных клеток в образцах с ОКФ+VEGF+SDF-1 α с тенденцией к снижению по мере увеличения срока наблюдения. В свою очередь количество клеток макрофагального ряда на поверхности материала на срок 30 дней в два раза ниже, чем в образцах с ОКФ.

Вместе с тем, площадь, занимаемая ими больше, чем у образцов сравнения, вероятно за счет молекул адгезии. Количество собственно макрофагов и остеокластов при этом было во всех изученных образцах сопоставимо на каждом сроке.

На 30 сутки костный регенерат, содержащий ОКФ+VEGF+SDF-1 α , показал большую *степень васкуляризации* по сравнению с ОКФ. При динамическом наблюдении выявлено, что физиологическая перестройка кровоснабжения с регенеративного типа на физиологический, идет параллельно в обоих образцах с тенденцией к постепенному уравниванию.

Таким образом, двухкассетная биоинженерная конструкция ОКФ+VEGF+SDF-1 α с точки зрения тканевой инженерии и генной терапии или даже «системного» улучшения восстановления кости ускоряет регенераторный потенциал костной ткани и является безопасным для биологических тканей, о чем свидетельствует отсутствие скопления лейкоцитарных и макрофагальных клеток в зоне репарации костной ткани. В этом смысле двухкассетная биоинженерная конструкция ОКФ+VEGF+SDF-1 α придает материалу остеоиндуктивный эффект, тогда как материал, состоящий только из ОКФ, обладает остеокондуктивными свойствами.

Раздел 3. Результаты клинического исследования
ГЛАВА VI. ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ
ЧЕЛЮСТЕЙ ПАЦИЕНТОВ ПОСЛЕ ИМПЛАНТАЦИИ
ОДНОКАССЕТНОЙ БИОИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ НА
ОСНОВЕ ОКТАКАЛЬЦИЙФОСФАТА, АКТИВИРОВАННОГО
ПЛАЗМИДНОЙ ДНК С ГЕНОМ СОСУДИСТОГО ФАКТОРА РОСТА В
СОЧЕТАНИИ С АУТОЛОГИЧНОЙ КОСТНОЙ СТРУЖКОЙ

6.1. Результаты гистологического и морфометрического исследования биоптатов костной ткани челюстей пациентов после имплантации однокассетной биоинженерной конструкции на основе октакальцийфосфата, активированного плазмидной ДНК с геном сосудистого фактора роста в сочетании с аутологичной костной стружкой

Участникам исследования через 6 месяцев проводилась установка имплантатов в участки реконструкции челюсти. На этапе подготовки имплантационного ложа был отобран биопсийный материал для гистологического исследования костного регенерата.

У пациентов основной группы, которым проводилась реконструкция костной ткани челюстей синтетическим ген-активированным остеопластическим материалом ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой биопсийный материал представлен мультитканевым регенератом, состоящим из костной ткани смешанного строения, фиброзной ткани, остеопластических гранул, а также тканевого детрита из костных опилок – в большом количестве, фибрина, и тонких коллагеновых волокон [рис. 49]. Было установлено, что в препарате в этот период превалирует костная ткань [$<43\%$], причем доля дифференцированной пластинчатой костной ткани составляет $<90\%$, что свидетельствует о ранней перестройке в механически плотную и высокоминерализованную структуру.

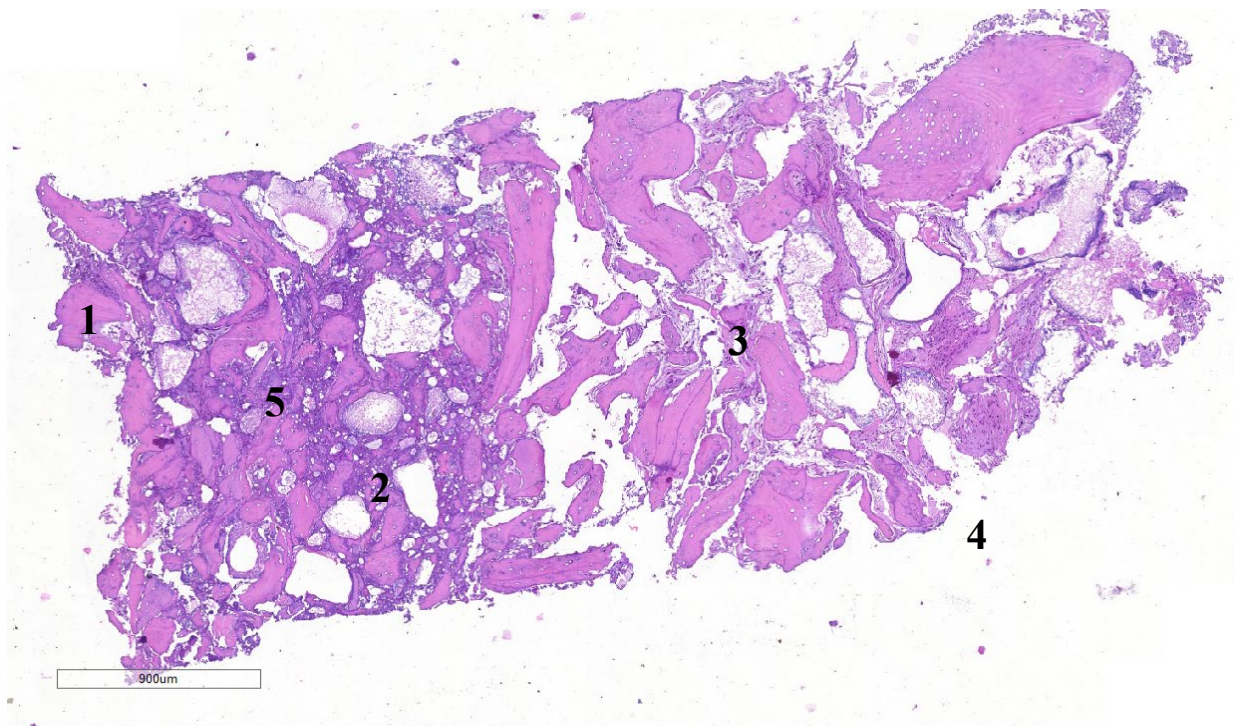


Рисунок 49.Общий вид биоптата [гистотопограмма]: 1 – вновь образованная костная ткань; 2 – остеопластический материал; 3 – рыхлая волокнистая соединительная ткань; 4 – фиброзная ткань; 5 – тканевой детрит, представленный костными опилками, фибрином, гранулами костнопластического материала. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув. x200

Однако, пока мощные трабекулы располагаются разрозненно и не формируют каркасную сеть [рис. 50]. Остеоцитарные лакуны, в большинстве случаев, располагаются с противоположной стороны от имплантируемого материала, скапливаясь в группы. Фрагменты материала диффузно распространены по всему объему биоптата, окружены тонкими прослойками ретикулофиброзной костной ткани и остеидом, соединительной тканью. Некоторые гранулы окружены тканевым детритом, определяются большие оптически пустые вакуоли, называемые зонами резорбции [рис. 51]. Клетки, резорбирующие материал, не выявлены.

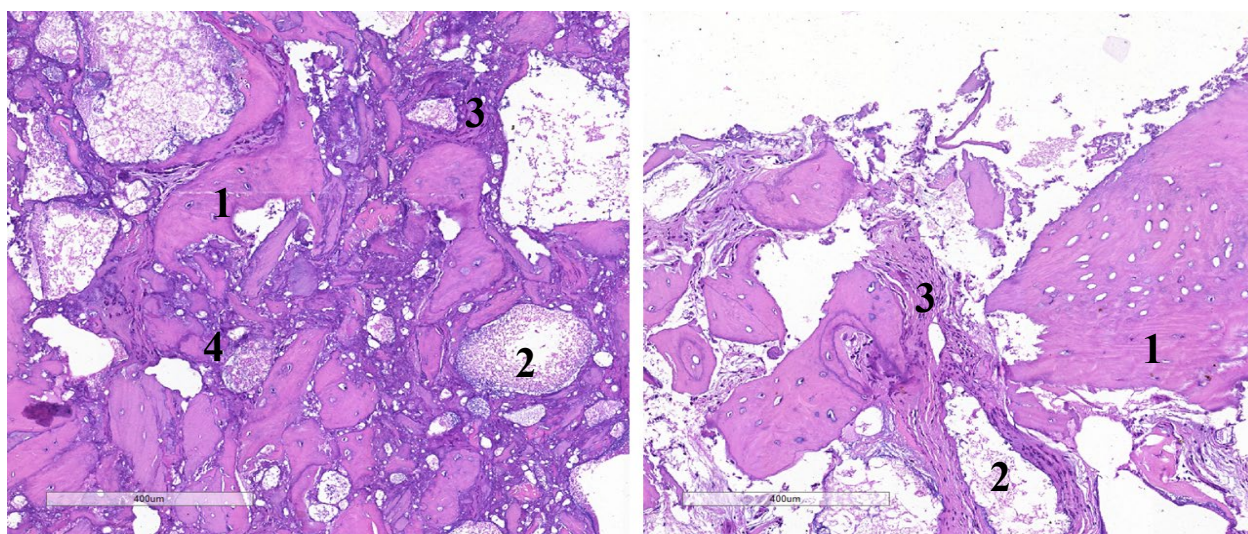


Рисунок 50. Структура костного регенерата: 1 – трабекулы костной ткани смешанного строения; 2 – гранулы ОКФ+VEGF; 3 – фиброзная ткань; 4 – тканевой детрит, представленный костными опилками и фибрином. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув. x200

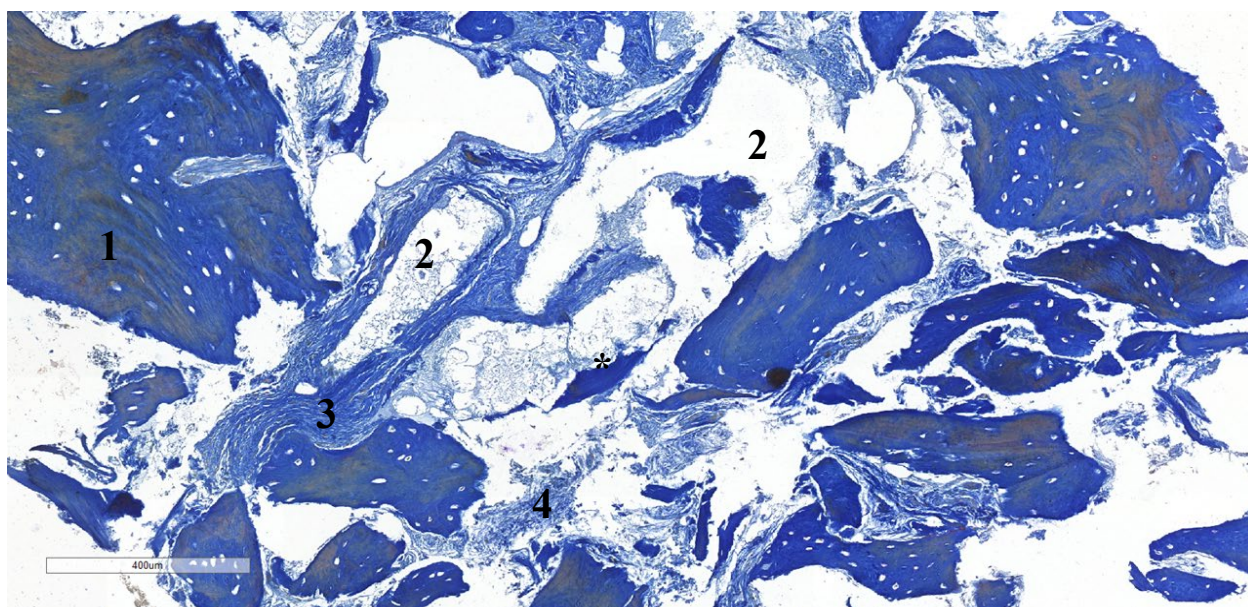


Рисунок 51. Остеопластический материал ОКФ+VEGF в структуре регенерата: * - костная ткань на поверхности гранулы; 1 – трабекулы костной ткани смешанного строения; 2 – фрагменты остеопластического материала; 3 – фиброзная ткань; 4 – фибрин. Окраска: Трихром по Маллори. Ув. x400

У пациентов группы сравнения, которым проводилась реконструкция костной ткани челюстей ксеногенным ГАП на препаратах биоптат был представлен костным регенератом смешанного строения, состоящим преимущественно из волокнистой соединительной ткани с различной упорядоченностью коллагеновых волокон – всего около 40% [рис. 52].

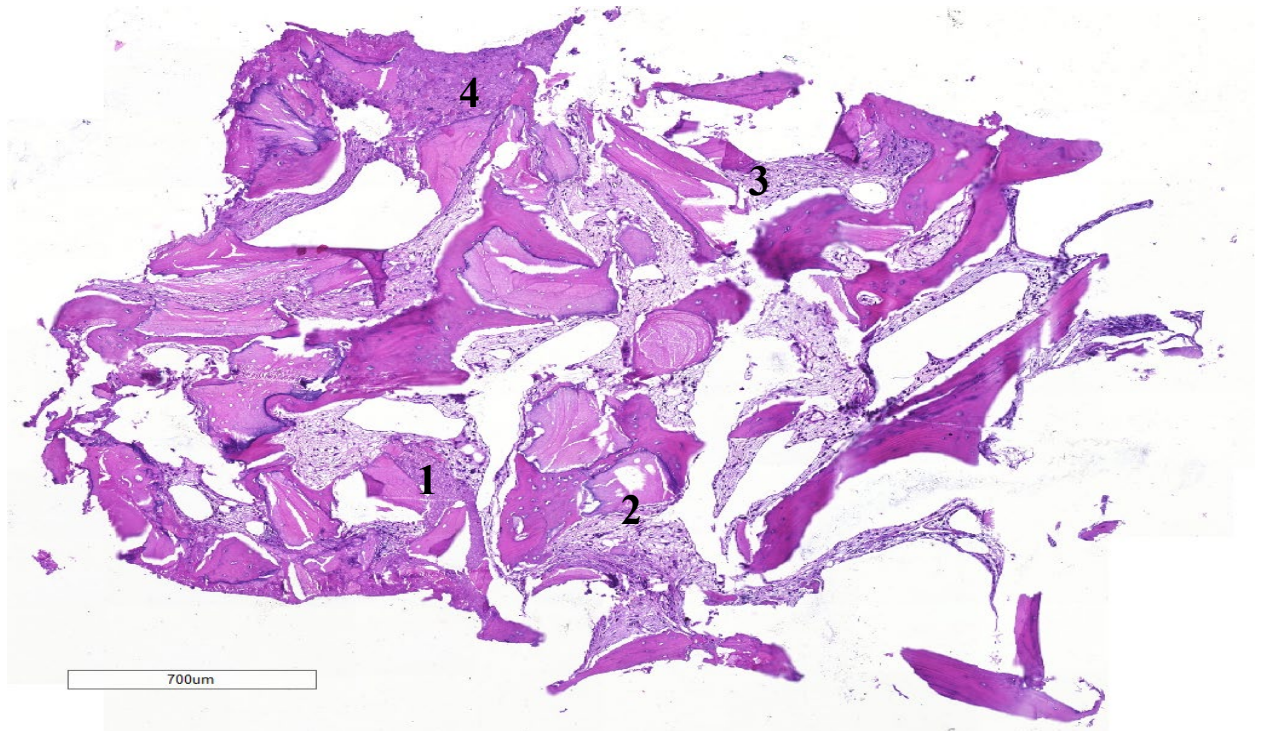


Рисунок 52. Общий вид биоптата [гистотопограмма]: 1 – вновь образованная костная ткань; 2 – фрагменты остеопластического материала; 3 – волокнистая соединительная ткань, с разной упакованностью коллагеновых волокон; 4 – тканевой детрит, представленный костными опилками и фибрином. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув. x200

Оставшаяся часть представленного образца была построена из костной ткани как пластинчатого, так и ретикулофиброзного типов, остаточных фрагментов костнозамещающего материала, а также костных опилок и фибрина, сформировавшихся интраоперационно и располагающихся преимущественно на периферии исследуемого биоптата.

Костная ткань имеет в основном пластинчатое строение [64,8%], формируются балочные системы с интратрабекулярно расположенными фрагментами остеопластического материала и межтрабекулярно – соединительной тканью [рис. 53].

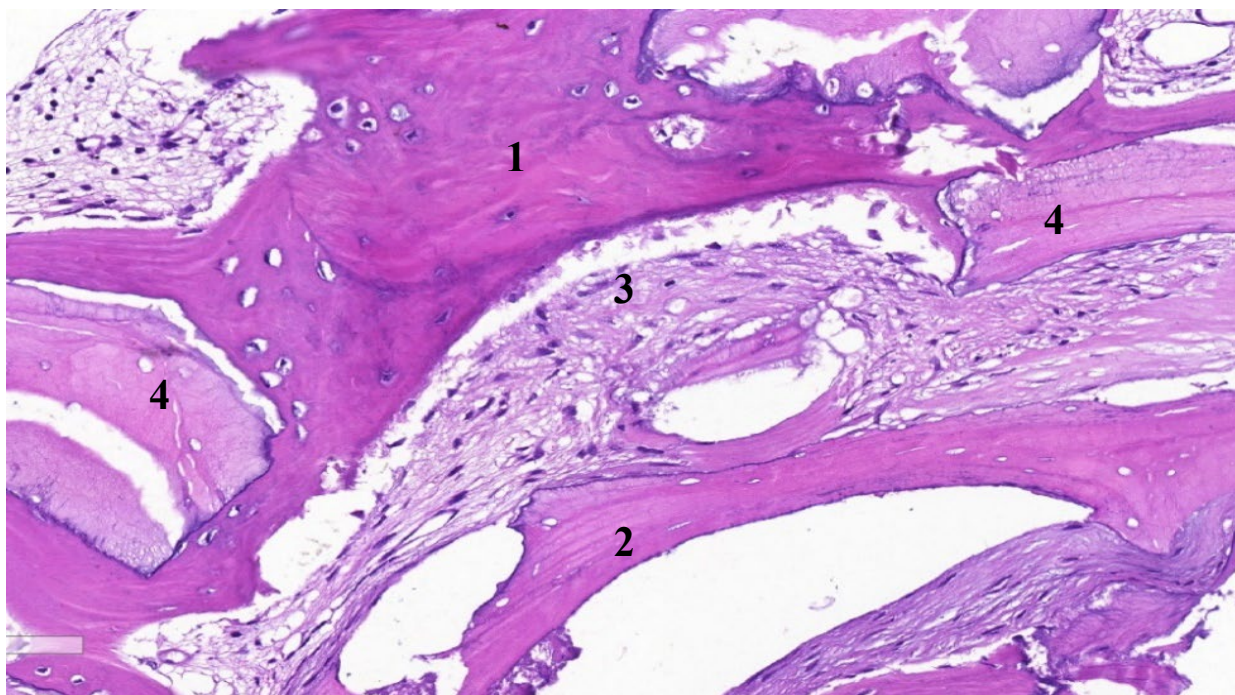


Рисунок 53. Структура костного регенерата: 1 – ретикулофиброзная костная ткань; образованная костная ткань; 2 – пластинчатая костная ткань; 3 – рыхлая волокнистая соединительная ткань; 4 – фрагменты остеопластического материала. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув. x200

Фрагменты костнопластического материала представляют собой слабо эозинофильные структуры с запустевшими остеоцитарными лакунами, интегрированные с новообразованными костными структурами. Часть фрагментов граничит как с костной, так и с соединительной тканями, другая часть полностью замкнута в костные трабекулы, плавно переходящие и прорастающие в структуру материала [рис. 54]. Обращают на себя внимание признаки биорезорбции ксеногенного ГАП. Поверхность остаточных фрагментов узурирована, в ряде полей зрения встречаются резорбирующие материал клетки, включая гигантские многоядерные [рис. 55].

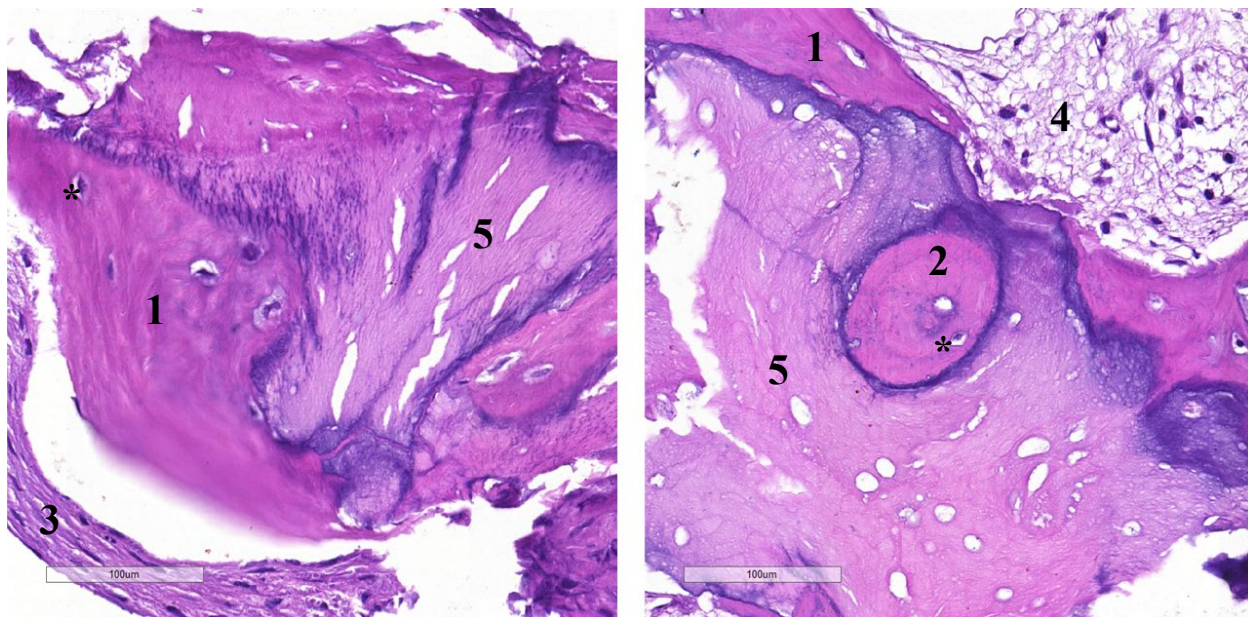


Рисунок 54.Остеопластический материал ксеногенный ГАП в структуре костного регенерата: 1 - ретикулофиброзная костная ткань; 2 - пластинчатая костная ткань; * - остеоцитарные лакуны с остеоцитами; 3 - фиброзная ткань; 4 - рыхлая волокнистая соединительная ткань; 5 - фрагменты остеопластического материала. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув. х200

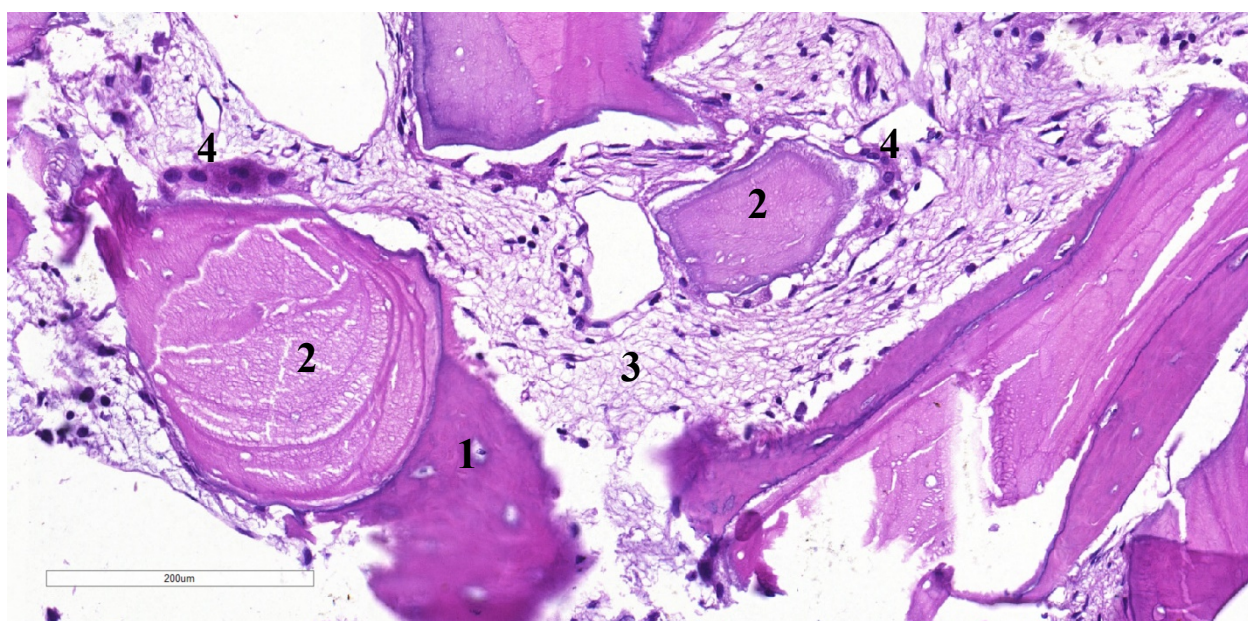


Рисунок 55.Участки резорбции остеопластического материала: 1 - вновь образованная костная ткань; 2 - фрагменты остеопластического материала ксеногенного ГАП; 3 - рыхлая волокнистая соединительная ткань; 4 - гигантские многоядерные клетки, резорбирующие материал. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув. х400

Таким образом, биоптат костной ткани у пациентов, которым имплантировали ксеногенный ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой представлен костным регенератом смешанного строения [26,2 % от общей площади] с интегрированными в него фрагментами остеопластического материала [27,73 % от общей площади] с признаками продолжающейся биорезорбции и отсутствием воспалительной инфильтрации.

Сравнение результатов гистологического анализа показало, что в основной группе пациентов доля новообразованной костной ткани достигает 42,71%, что в 1,6 раза превышает данные, полученные у пациентов в группе сравнения [26,2%] [рис.56].

Это подтверждается данными активного прироста зрелой костной ткани у пациентов, которым имплантировали остеозамещающий материал ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой [рис.57].

При этом через 6 месяцев после реконструкции костной ткани ксеногенным ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой, доля незрелой ретикулофиброзной ткани в образце остается достаточно высокой - 35,2% против 5,7% после имплантации материалом ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой.

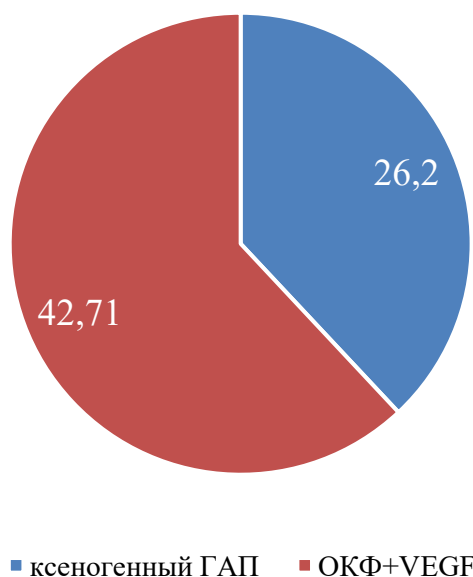


Рисунок 56. Доля новообразованной костной ткани в общей площади [%]

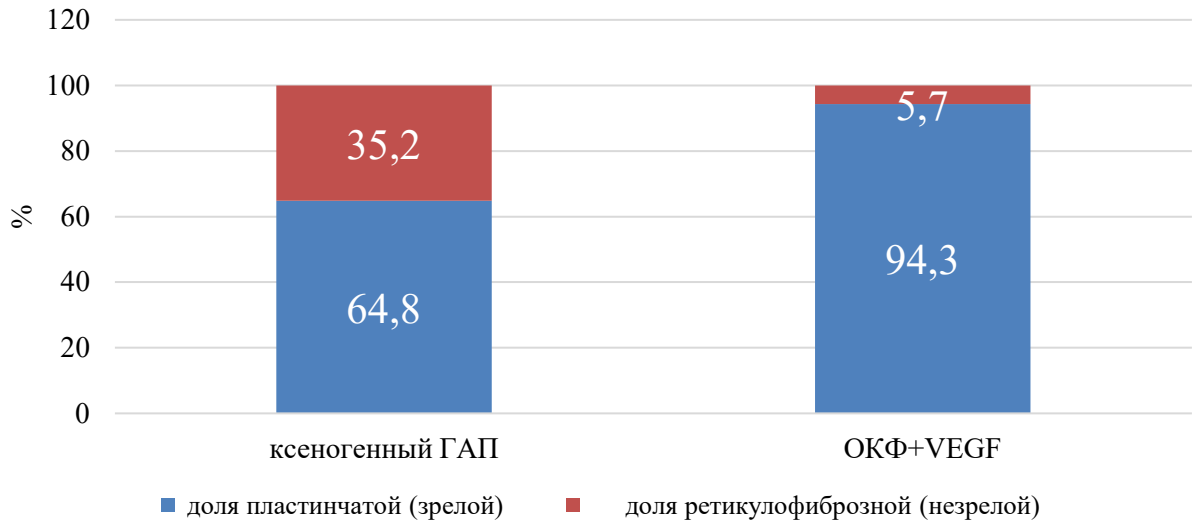


Рисунок 57. Степень зрелости новообразованной костной ткани.

О значительной незрелости костного регенерата у пациентов, которым имплантировали ксеногенный ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой свидетельствует расчет доли рыхлой участков соединительнотканного волокна [25,3%][рис.58].

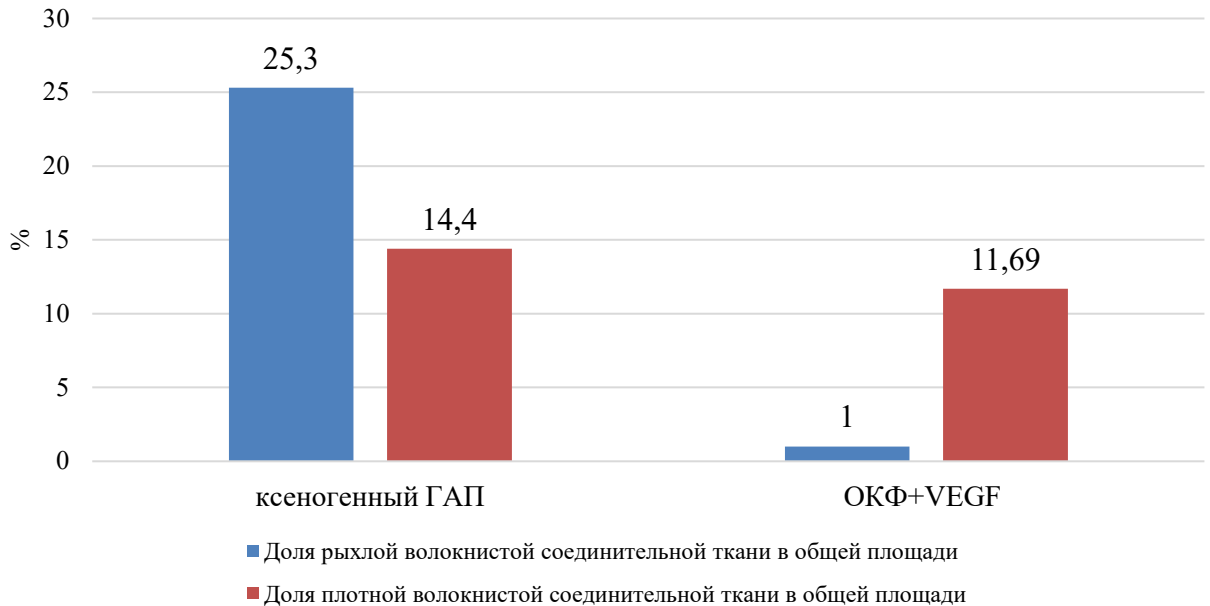


Рисунок 58. Структура соединительнотканного волокна в биоптате новообразованной костной ткани

У пациентов, которым имплантировали остеозамещающий материал ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой через 6 месяцев

доля рыхлого соединительнотканного волокна достигала 1%, при этом доля плотного волокна была сопоставима с результатами, полученными у пациентов, которым имплантировали ксеногенный ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой [11,7% против 14,4%]. Резорбция остеопластического материала была выше в биоптате костной ткани пациентов, которым имплантировали материал ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой [18,5%] [рис.59].

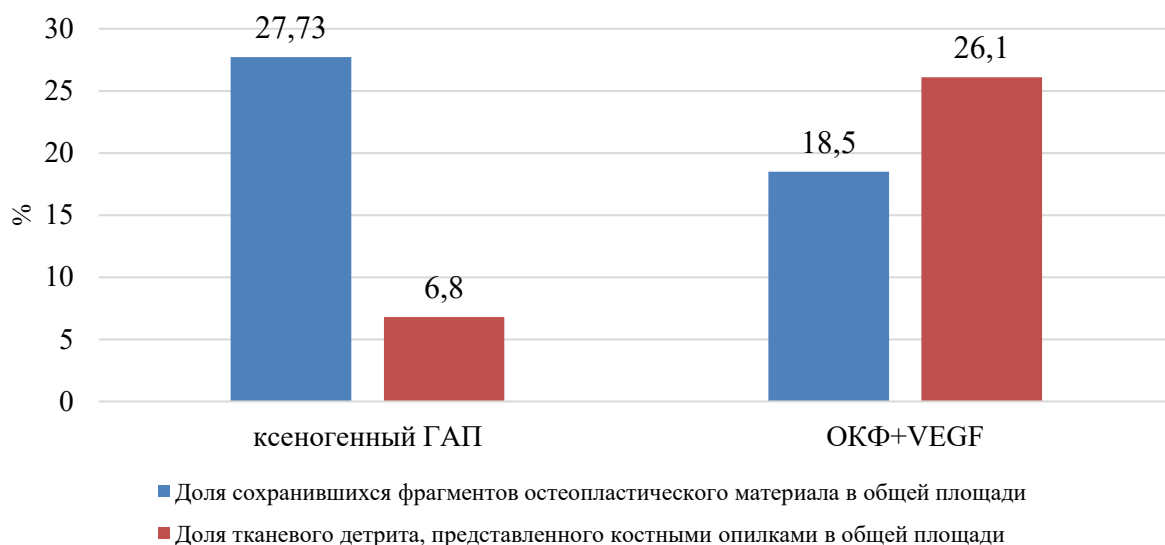


Рисунок 59. Содержание детрита и фрагментов остеопластического материала в биоптате новообразованной костной ткани

В биоптате костной ткани пациентов, которым имплантировали ксеногенный ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой, через 6 месяцев резорбция материала происходила менее значительно [27,7%], что следует рассматривать как свидетельство о его высоких остеокондуктивных свойствах.

Доля тканевого детрита была выше в биоптате костной ткани пациентов, которым проводили реконструкцию костной ткани челюстей остеозамещающим материалом ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой [26,1%], при этом в биоптате кости после имплантации ксеногенного ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой доля костного детрита была крайне низкая [6,8%].

6.2. Результаты иммуногистохимического исследования биоптатов костной ткани челюстей пациентов

При иммуногистохимическом исследовании биоптатов костной ткани после имплантации материалом ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой с антителами к Ki-67 не выявлено локально значимых участков окрашивания. Обнаруживаются участки плотной зрелой костной ткани [рис.60].

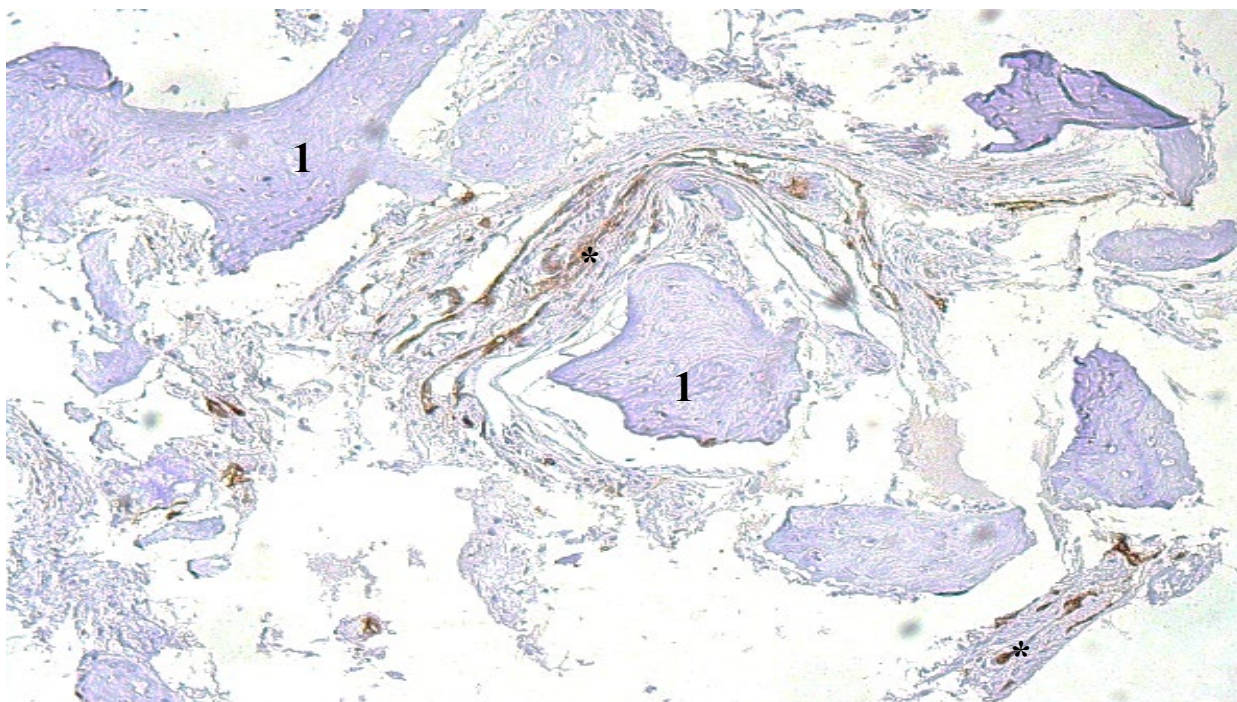


Рисунок 60. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki-67: * - положительно окрашенные клетки. 1 – участки новообразованной костной ткани; Продукт реакции коричневого цвета. Окраска: Гематоксилин. Ув. x400

Иммуногистохимическое выявление эндотелия [CD31⁺] показало различия в характере и распределении сосудов по сравнению с предыдущим регенератом. В объеме тканей были сформированы многочисленные капилляр подобные сосуды, осуществляющие эффективную перфузию зоны морфогенетических процессов.

Они в большом количестве располагались в межкостных промежутках, заполненных реактивно измененной волокнистой соединительной тканью с различной степенью зрелости матрикса коллагеновых волокон [рис. 61].

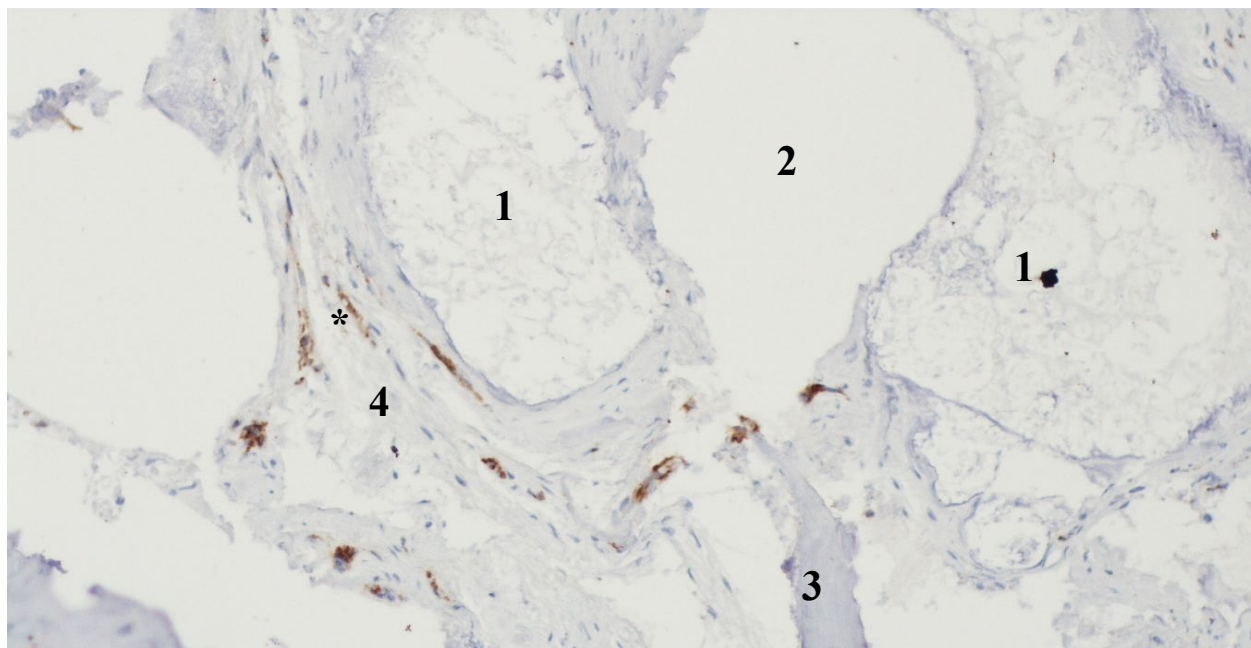


Рисунок 61. Иммуногистохимическое исследование с антителами к CD31:* - эндотелий сосудов микроциркуляторного русла; 1 – остатки гранул материала; 2 – резорбционные полости; 3 – новообразованные костные трабекулы; 4 – волокнистая соединительная ткань. Продукт реакции коричневого цвета. окраска: гематоксилин. Ув. x100

При иммуногистохимическом исследовании с антителами к CD163 выявлено небольшое число M2-регуляторных макрофагов. Они характеризовались относительно небольшим диаметром, малым количеством коротких отростков [рис. 62]. Кроме этого установлено, что часть клеток фрагментированы.

При иммуногистохимическом исследовании биоптатов костной ткани пациентов, которым проводили реконструкцию челюстей материалом ксеногенным ГАП с антителами к Ki-67 видно, что на данном сроке наблюдений процессы пролиферации в регенерационном гистогенезе не являются ведущими [рис. 62].

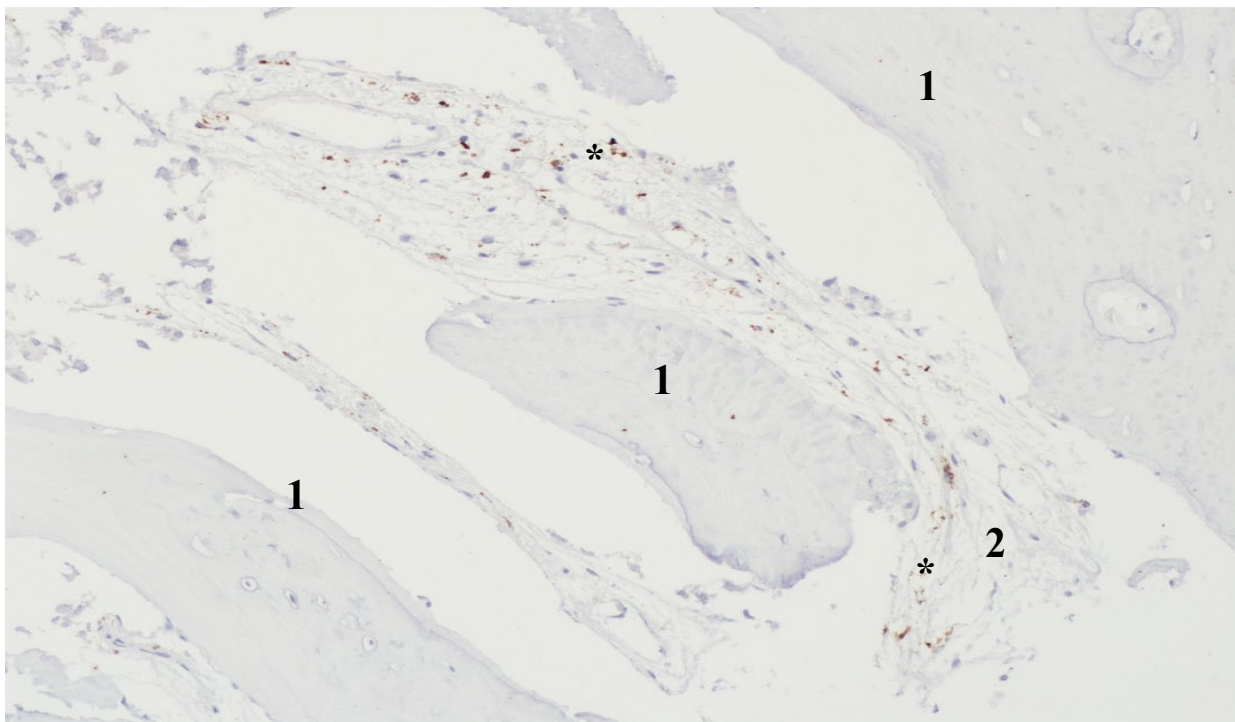


Рисунок 62. Иммуногистохимическое исследование с антителами к CD163: * - незначительная диффузная макрофагальная инфильтрация; 1 – фрагменты новообразованной костной ткани; 2 – реактивно измененная рыхлая волокнистая соединительная ткань. Продукт реакции коричневого цвета. окраска: Гематоксилин. Ув. x200

Обнаруживаются единичные одноядерные клетки с ядерным паттерном окрашивания, которые расположены дискретно в составе реактивно измененной соединительной ткани регенерата в окружении остатков костнопластического материала [рис. 63].

Антитела к CD31 давали положительную реакцию с эндотелиоцитами кровеносных сосудов регенерата, а также единичными одноядерными шаровидными клетками рыхлой соединительной ткани [рис. 64]. Кровеносные сосуды характеризовались тонкой стенкой и по структурным особенностям наиболее соответствовали венам.

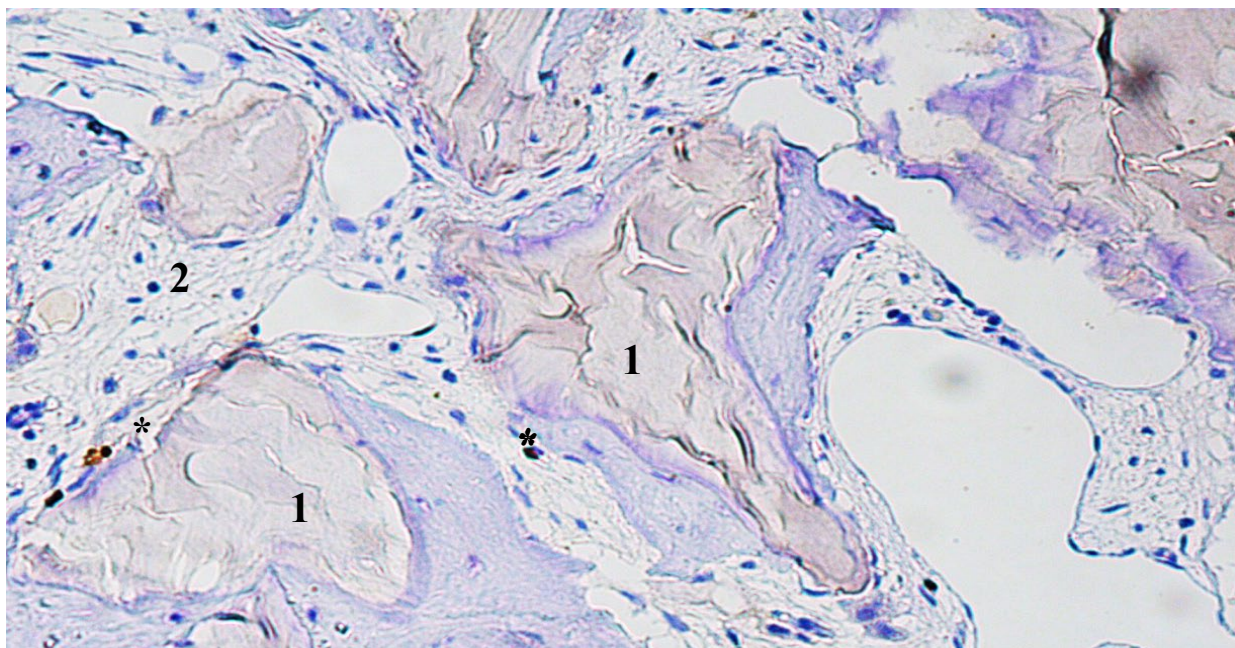


Рисунок 63. Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki-67: * - положительно окрашенные клетки; 1 – фрагменты ксеногенного ГАП; 2 – реактивно измененная соединительная ткань. Продукт реакции коричневого цвета. окраска: Гематоксилин. Ув. х400

Определение цитогеनेза единичных $CD31^+$ клеток нуждается в уточнении; они могут являться как мигрирующими эндотелиальными клетками-предшественницами, так и клетками гемопоэтического ряда, дающими перекрестную реакцию с антителом. $CD163^+$ клетки – гистиоциты [макрофаги соединительной ткани] с регуляторным [секреторным] фенотипом M2 в регенерате расположены диффузно в изрядном количестве [рис. 65].

Для реакции характерен, прежде всего, цитоплазматический и мембранный паттерн окрашивания. $CD163^+$ клетки представляют собой крупные [20-25 мкм] отростчатые клетки с небольшим числом отростков. Основная зона их локализации – реактивно измененная соединительная ткань регенерата, являющаяся не просто областью заполнения пространства в зоне гистогенеза, а основной «фабрикой» регуляторных сигналов локального морфогенеза.

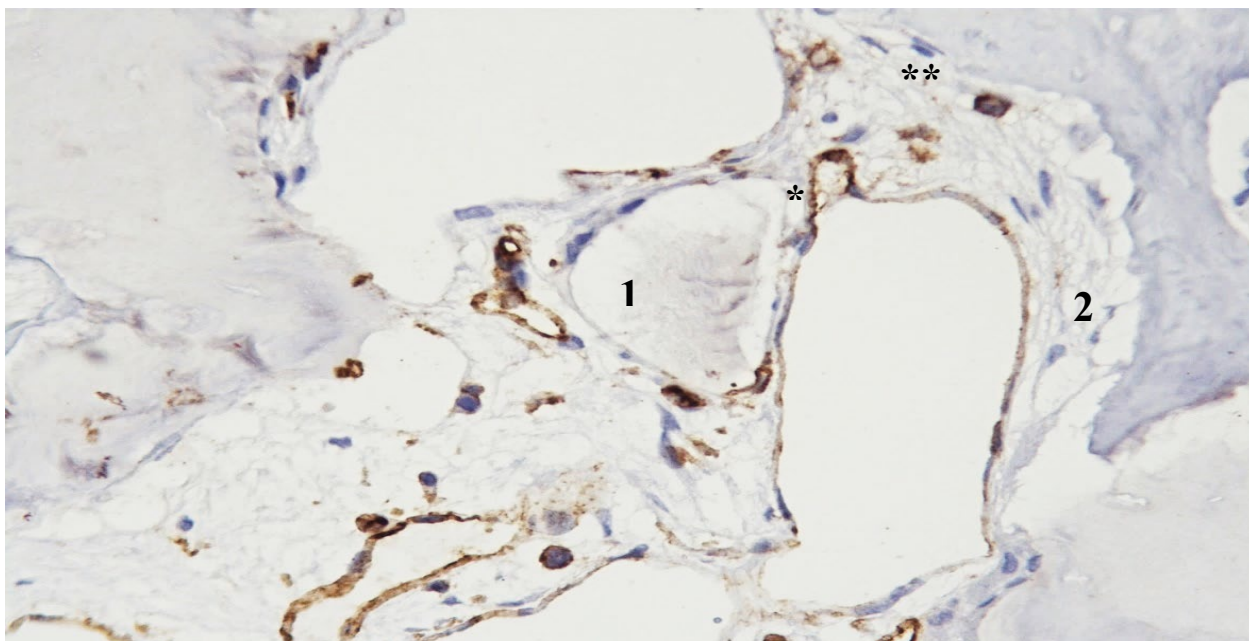


Рисунок 64. Иммуногистохимические реакции с антителами к CD31: продукт реакции в эндотелии кровеносных сосудов регенерата[*] и дискретных одноядерных клетках [**]; 1 – фрагменты ксеногенного ГАП; 2 – балки новообразованной костной ткани. Продукт реакции коричневого цвета. окраска: гематоксилин. Ув. х900

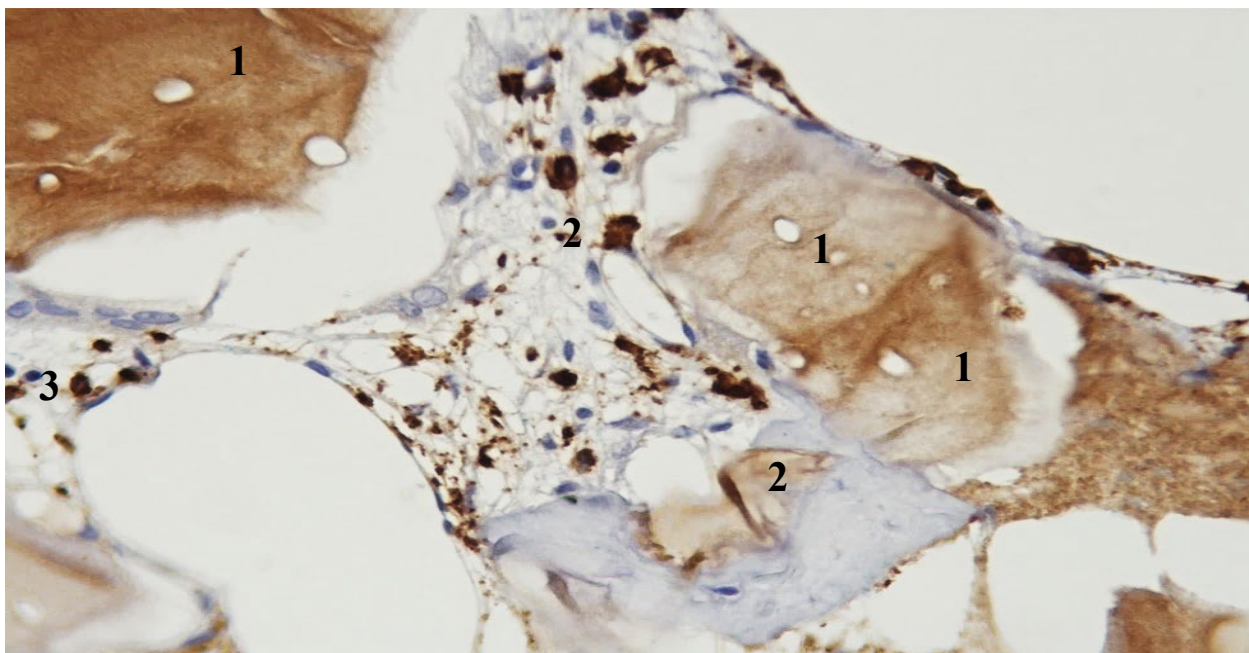


Рисунок 65. Иммуногистохимические реакции с антителами к CD163: продукт реакции в гистиоцитах [M2] регенерата; 1 – фрагменты ксеногенного ГАП; 2 – балки новообразованной костной ткани; 3 - остеокласт. Продукт реакции коричневого цвета. окраска: Гематоксилин. Ув.х900

Отростчатые клетки локализованы вблизи кровеносных сосудов и одновременно – рядом с новообразованными объемами костной ткани [рис. 65]. Важно отметить, что маркер регуляторных макрофагов M2 не вырабатывают все производные моноцитарного роста – гигантские многоядерные клетки – остеокласты, что подчеркивает высокую специализацию различных субпопуляций мононуклеаров, в том числе и в ходе репаративного остеогистогенеза.

Таким образом, при сравнении двух остеопластических материалов в условиях репаративной регенерации был выявлен ряд особенностей регенерационного процесса. В области воссоздания костной ткани с использованием общепринятого ксеногенного материала характерна низкая пролиферативная активность, формирование релаксированных полнокровных венозных сосудов в регенерате, присутствие значимого пула регуляторных M2-макрофагов. При применении остеопластического материала ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой установлено, что материал не вызывает воспалительную реакцию и резорбируется за счёт гигантских многоядерных клеток.

Установлен иной тип кровоснабжения области регенерации, новообразовавшиеся кровеносные сосуды обуславливают активный рост и remodelирование костной ткани в области реконструкции. Имеется низкая доля M2-регуляторных макрофагов в зоне регенерации. Интегративной показатель статуса костной регенерации, собственно доля новообразованной кости двукратно превышает в последнем случае исход в первом случае.

Вместе с тем, следует констатировать, что в обоих случаях процесс нельзя считать завершённым. Отсутствие формирования сцепленной каркасной системы балок регенерата, несмотря на высокую долю пластинчатой костной ткани, свидетельствует о низких механических свойствах кости под действием материала ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой.

6.3. Результаты клинической оценки состояния костной ткани

Клинический осмотр включал оценку болевого симптома и инфильтрацию в области раны. Показатели этих процессов оценивали в баллах [табл.15].

Таблица 15 – Оценка первичных результатов после остеозамещающей операции в группах пациентов в динамике [M±m]

Группы/ Параметры [баллы]		Основная [n=18]			Сравнения [n=32]		
		Болевые симпто мы	Инфилт рация	Гипере мия	Болевые симпто мы	Инфилт рация	Гипере мия
Сроки обследования	На 3 сутки	26,3 ±2,05	1,33 ±0,02	1,84 ±0,03	29,4 ±1,80	1,27 ±0,03	1,77 ±0,03
	На 7 сутки	5,40 ±0,11 **	1,12 ±0,01	0,44 ±0,003	7,70 ±0,13 **	1,18 ±0,01	0,67 ±0,008
	На 14 сутки	0,13 ±0,02 **▶▶	0	0	0,20 ±0,01 **▶▶	0	0

Примечания: * p<0,001– уровень значимость различий показателей от 3-х суток; ▶p <0,001– уровень значимость различий показателей от 7-х суток.

Подсчет баллов и процента опрошенных выявил, что на 3-и сутки 25 [89,3%] пациентов основной группы и 28 [87,5%] пациентов группы сравнения испытывали незначительные болевые ощущения и интенсивность этой боли была сопоставима в группах [p>0,5]. Тканевая инфильтрация в зоне операции была выявлена у 17 [94,4%] пациентов основной группы и 30 [93,8%] пациентов группы сравнения. На повышение температуры тела указывали 3 [16,6%] пациента основной группы и 4 [12,5%] пациента группы сравнения. Контрактура челюстей выявлялась у 5 [27,8%] пациентов основной группы и 4 [12,5%] пациентов группы сравнения. Этим пациентам назначено продолжать прием противовоспалительных препаратов и антибиотиков.

На 7-е сутки незначительные явления сохранялись у 9 [50%] пациентов основной группы и 12 [37,5%] пациентов группы сравнения. У большинства пациентов было выявлено достоверное [$p<0,001$] снижение болевых ощущений, гиперемии и инфильтрации участка реконструкции челюсти.

На 14-е сутки осмотра у пациентов обеих групп после операции параметры боли приближались к нулевой отметке, и достоверно [$p<0,001$] отличались от предыдущих дней обследования. Незначительные симптомы болевых ощущений и слабо выраженного отека сохранялись у 2-х [11,1%] пациентов основной группы и 4-х [12,5%] пациентов группы сравнения.

Таким образом, клинические параметры не показали существенных отличий течения заживления раневого процесса у пациентов в зависимости от имплантированного остеозамещающего материала.

У пациентов после остеозамещающей операции были проведены замеры оперируемых участков до и после вмешательства для сравнения изменения объема костной ткани с помощью парного t-критерия Стьюдента [табл.16].

Таблица 16 – Размеры альвеолярного гребня (мм) у пациентов до и после реконструкции остеозамещающими материалами [$M\pm m$]

Параметры [мм]		Группы			
		Основная[n=18]		Сравнения[n=32]	
		Высота	Ширина	Высота	Ширина
Сроки исследования	До операции	4,22±0,65	3,88±0,16	4,65±0,12	4,01±0,21
	Через 6 месяцев после операции	9,33±0,88 ¹ p<0,001 *p<0,05	8,12±0,54 ¹ p<0,001 *p<0,05	7,14±0,34 ¹ p<0,05	6,78±0,55 ¹ p<0,05

Примечания: *p – уровень значимости различий показателей между группами; ¹p – уровень значимость различий показателей между сроками.

Через 6 месяцев после операции реконструкции костной ткани в основной группе пациентов, которым был имплантирован материал ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой, наблюдалось достоверно значимое увеличение прироста [$p<0,001$] костной ткани как в

высоту, так и в ширину. В группе сравнения, которым имплантировали ксеногенный ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой, также выявлен достоверный [$p < 0,05$] показатель роста объема костной ткани, но эти цифры были недостоверно [$p > 0,05$] ниже [высота в 1,3 раза и ширина в 1,2 раза] по сравнению с пациентами основной группы.

Таким образом, у пациентов, которым имплантировали материал ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой для восстановления объема костной ткани челюстей, объем новообразованной костной ткани по высоте и ширине был достоверно выше, чем у пациентов, которым имплантировали бычий ГАП.

Клинический случай 1

Пациентка М., 55 лет, обратилась с целью функциональной и эстетической реабилитации в КЦС МГМСУ им А.И. Евдокимова с жалобами на отсутствие зубов верхней челюсти справа, затрудненный прием пищи из-за отсутствия зубов. При объективном осмотре: общее состояние удовлетворительное, конфигурация лица не изменена. Региональные лимфатические узлы не увеличены. Слизистая оболочка полости рта бледно-розового цвета. Отмечается толстый десневой биотип. После проведения клинико-рентгенологического обследования было диагностировано отсутствие зубов 1.5 1.6 1.7, сопровождающееся значительным дефицитом объема костной ткани по высоте за счет атрофии альвеолярного отростка верхней челюсти справа и гиперпневматизации правой верхнечелюстной пазухи. Из анамнеза: зубы удалены около 5 лет назад вследствие осложненного кариеса. От пользования съемным протезом пациентка отказалась.

С помощью конусно-лучевой компьютерной томографии [КЛКТ] было выявлено, что резидуальная высота костной ткани в области отсутствующих зубов варьировала от 1 до 2 мм, ширина от 5 до 7 мм [рис.66].

Пациентке было предложено несколько вариантов лечения, включая съемные и несъемные методы лечения. По согласованию с пациенткой было принято решение об отсроченной установке дентальных имплантатов, после реконструкции альвеолярного отростка верхней челюсти справа по высоте, с применением техники направленной костной регенерации [НКР] под нерезорбируемой мембраной РТФЕ с использованием комбинации аутокостной крошки, полученной из области бугра верхней челюсти соответствующей стороны и материала ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой с размером гранул 150-500 мкм.

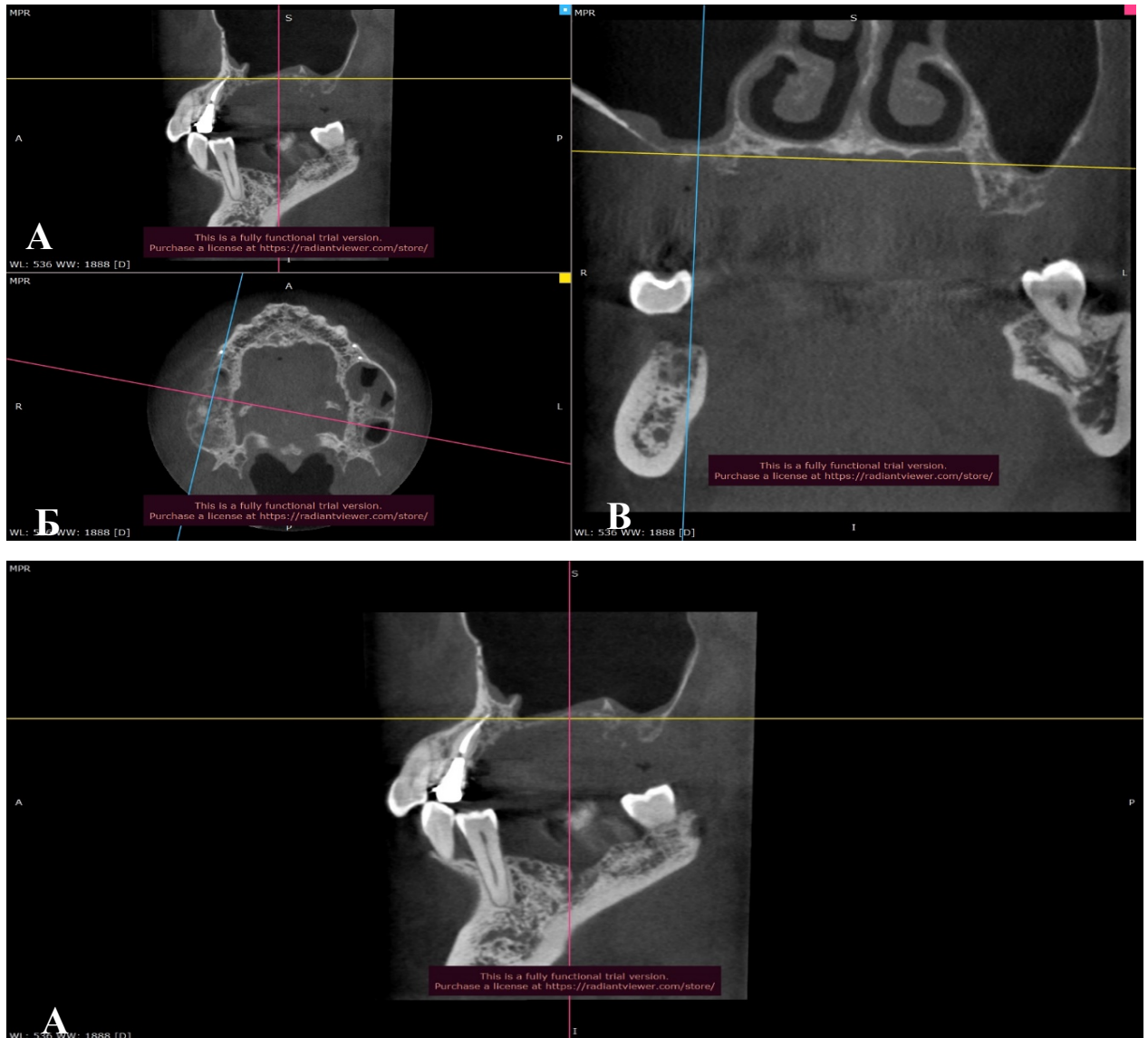
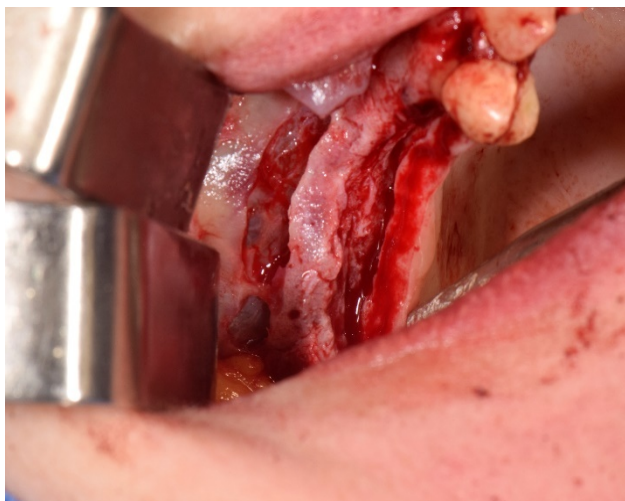


Рисунок 66. Скриншот конусно-лучевой компьютерной томографии пациентки М. до этапа остеозамещающей имплантации материалом

ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой: А – в саггитальной проекции; Б – в трансверзальной проекции; В – во фронтальной проекции.

Операция проводилась после полной стоматологической санации полости рта в амбулаторных условиях под внутривенной седацией. Под местным обезболиванием Sol. Ubistesini 4% 3.6 ml произведен линейный разрез по ходу альвеолярного отростка в/ч в проекции отсутствующих зубов 1.5 1.6 1.7. Скелетирован слизисто-надкостничный лоскут [рис.67 А].



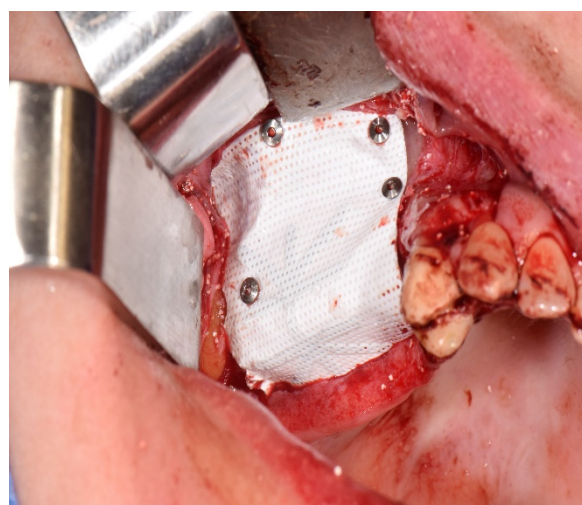
А



Б



В

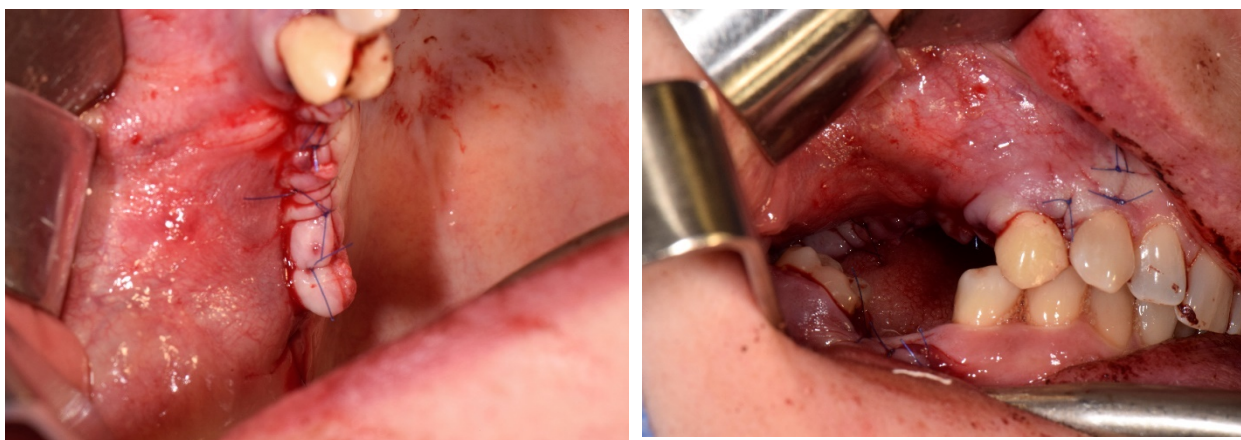


Г

Рисунок 67. Этапы проведения операции реконструкции костной ткани верхней челюсти пациентки М. остеопластическим материалом ОКФ+VEGF

в сочетании с аутологичной костной стружкой: А – разрез, откидывание слизисто-надкостничного лоскута; Б- подготовка остеопластического материала; В- укладка мембраны и материала; Г – укрытие мембраной.

Произведен забор аутостружки с помощью скребка MicroOSS. Смешивалась аутостружка с остеозамещающим материалом [рис.67Б]. Костный материал был помещен в область в/ч справа в проекции отсутствующих зубов 1.5 1.6 1.7 [рис.67В] и сверху укрывалась dPTFE мембраной, фиксированной титановыми пинами [рис.67Г]. Лоскут был мобилизован и ушит узловыми швами «ПГА 5/0» [рис.68].



А

Б

Рисунок 68. Фотография полости рта пациентки М. с репозицией лоскута на место и ушиванием: А – вид снизу; Б – вид сбоку.

Пациентке все рекомендации даны в письменном виде.

Схема приёма препаратов и рекомендации после проведенной операции:

- Аугментин 500\125-по 500\125 мг 3 раза в сутки в течение 10 дней;
- Эриус 5 мг –1 раз в сутки в течение 3 дней перед сном;
- Вольтарен 50 мг – по 50 мг 2 раза в сутки в течение 3 дней;
- Кетанов 10 мг – при болях по 1 таблетке на 12 часов при выраженном болевом синдроме;
- Отривин 0,1% капли в нос – по 2-3 капли в каждую ноздрю 3 раза в сутки в течение 10 дней;

- Солкосерил дентальная адгезивная паста– наносить на область операции [после нанесения рекомендуется смочить водой для более равномерного распределения пасты];

- Холод на область операции в течение первых суток после операции на 40 мин с перерывами.

Ранний послеоперационный период протекал без особенностей: общее состояние пациентки было удовлетворительным. В первые сутки после операции отмечалось повышение температуры тела до субфебрильных значений [37,4], определялся послеоперационный коллатеральный отек щечной области и слизистой оболочки полости рта на стороне операции умеренной интенсивности, имеющий тенденцию к нарастанию до вторых суток после операции, гематома щечной области в пределах 1,5 см в диаметре, которая купировалась в течение 10 дней.

На вторые сутки после проведенного оперативного вмешательства температура тела нормализовалась.

Пальпация поднижнечелюстных лимфатических узлов была слабо болезненна в течение первых 3 суток после операции. Гиперемия слизистой оболочки в области проведенной операции на 3 сутки была слабой интенсивности. Болевой синдром был мало выражен, его интенсивность по визуальной аналоговой шкале соответствовала 1-35 баллам в первые, вторые и третьи сутки после реконструктивного вмешательства соответственно, затем снижалось до нулевой отметки.

Швы были сняты на 14 сутки после операции. Рана на всем протяжении репаративного процесса заживала первичным натяжением без присутствия фибринозного налета.

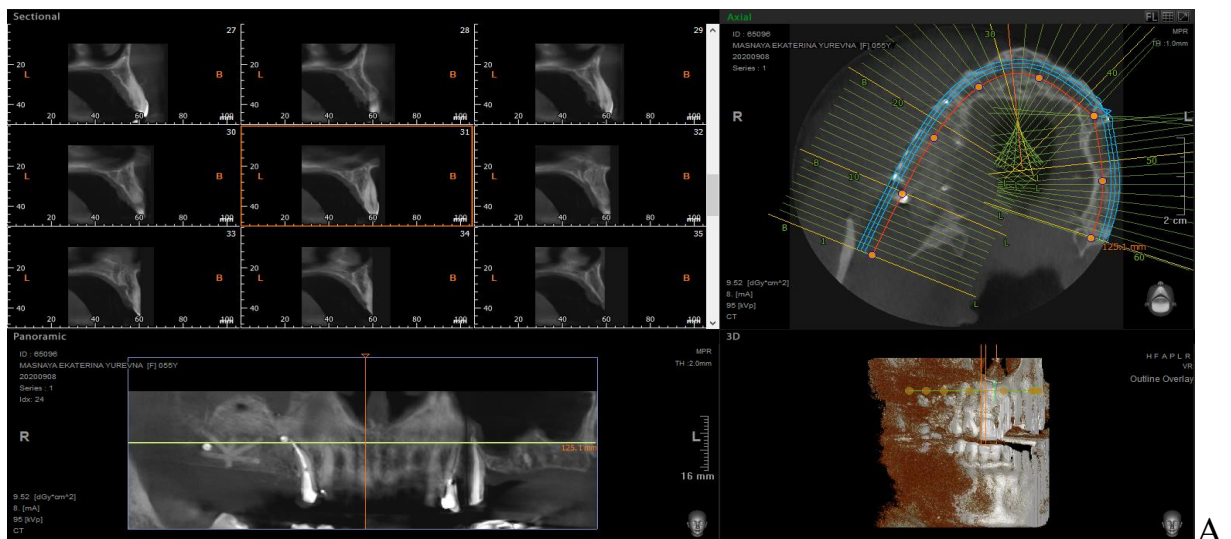
Такие неблагоприятные послеоперационные симптомы как экспозиция мембраны, заложенность носа, признаки миграции материала в полость рта, нарушение чувствительности в области операции отсутствовали.

Обращал на себя внимание слабовыраженный остаточный отек мягких тканей щеки, сохраняющийся в течение месяца после проведенной операции.

Результатами КЛКТ исходно установлено, что в костной ткани пациентки М. в области отсутствующих зубов резидуальная высота варьировала от 1 до 2 мм, а ширина от 5 до 7мм [рис.69 А].

Через 6 месяцев после остеозамещающей операции материалом ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой объем костной ткани возрастал за счет увеличения высоты до 4 мм и ширины до 9 мм [рис.69 Б]. Согласно полученным результатам, было решено проводить дентальную имплантацию в области отсутствующих зубов 1.5 1.6 1.7 верхней челюсти справа спустя 8 месяцев после проведения остеозамещающей операции.

На месте имплантированного материала под мембраной обнаружен костный регенерат, в структуре которой практически не определялись гранулы материала [рис.70]. Костные биоптаты были помещены в 10% раствор формалина для последующего морфологической оценки костного регенерата.



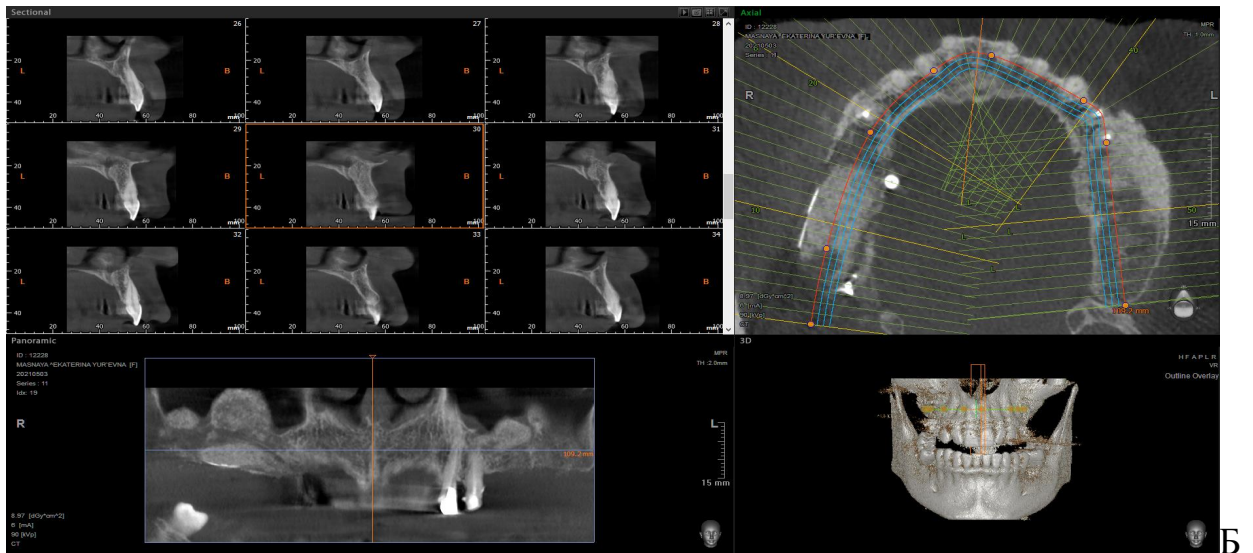


Рисунок 69.Скриншоты конусно-лучевой компьютерной томографии пациентки М. исходно [А] и через 8 месяцев после остеозамещающей операции [Б]

Установлены 3 дентальных имплантата [рис.71]. В область отсутствующего зуба 1.5 был установлен имплантат диаметром 4.0, длиной 10 мм, в область отсутствующего 1.6 проведена установка имплантата диаметром 4.6 длиной 10 мм. В область отсутствующего 1.7 установлен имплантат диаметром 4.6 длиной 10 мм. Имплантаты установлены в правильную ортопедическую позицию. Послеоперационный период протекал без особенностей.

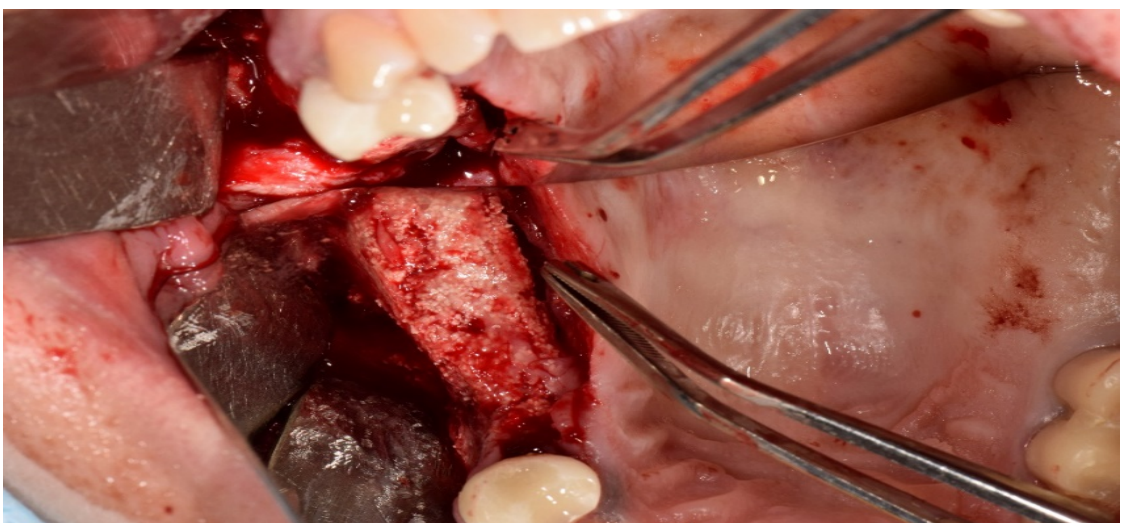


Рисунок 70.Вид костного биоптата через 6 месяцев после проведения остеозамещающей операции материалом ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой

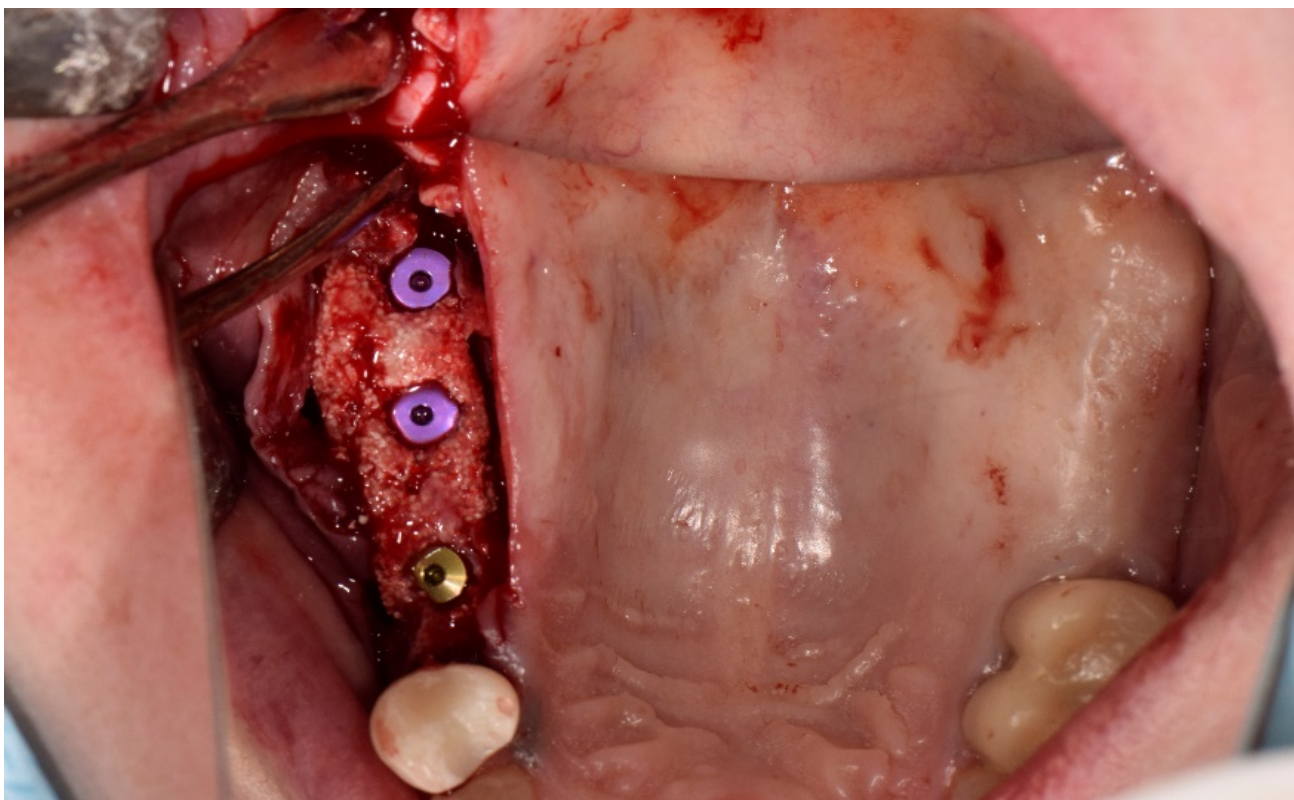


Рисунок 71. Вид операционного поля с установленными дентальными имплантатами

Результаты гистоморфометрического исследования костного биоптата пациентки М. после остеозамещающей операции материалом ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой.

Биоптат костной ткани после имплантации материала ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой представлен костным регенератом, состоящим преимущественно из костной ткани пластинчатого строения [32,5% от общей площади], с интегрированными в него фрагментами остеопластического материала [38,7% от общей площади] [рис.72].

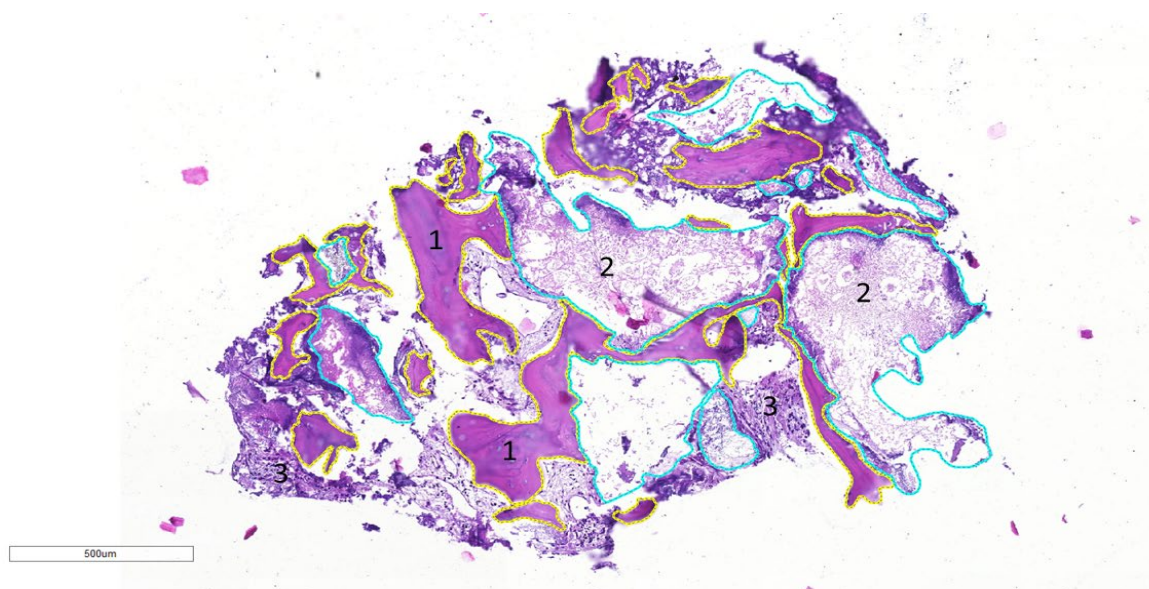


Рисунок 72. Гистотопограмма биоптата с выполненной сегментацией структур: 1 – вновь образованная костная ткань; 2 – фрагменты остеопластического материала; 3 – фиброзная ткань. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув. x200

На гистотопограмме [рис.73] определяются фрагменты частично резорбированного остеопластического материала, которые распределены равномерно по всей площади биоптата. Часть фрагментов остеопластического материала интегрирована в костную ткань, меньшая часть окружена соединительнотканной капсулой. Преобладающая часть костной ткани, окружающей фрагменты материала, представлена зрелой [пластинчатой] костной тканью. Признаки воспалительной инфильтрации не обнаружены. В ряде полей зрения выявлены клетки, резорбирующие фрагменты материала [рис. 74].

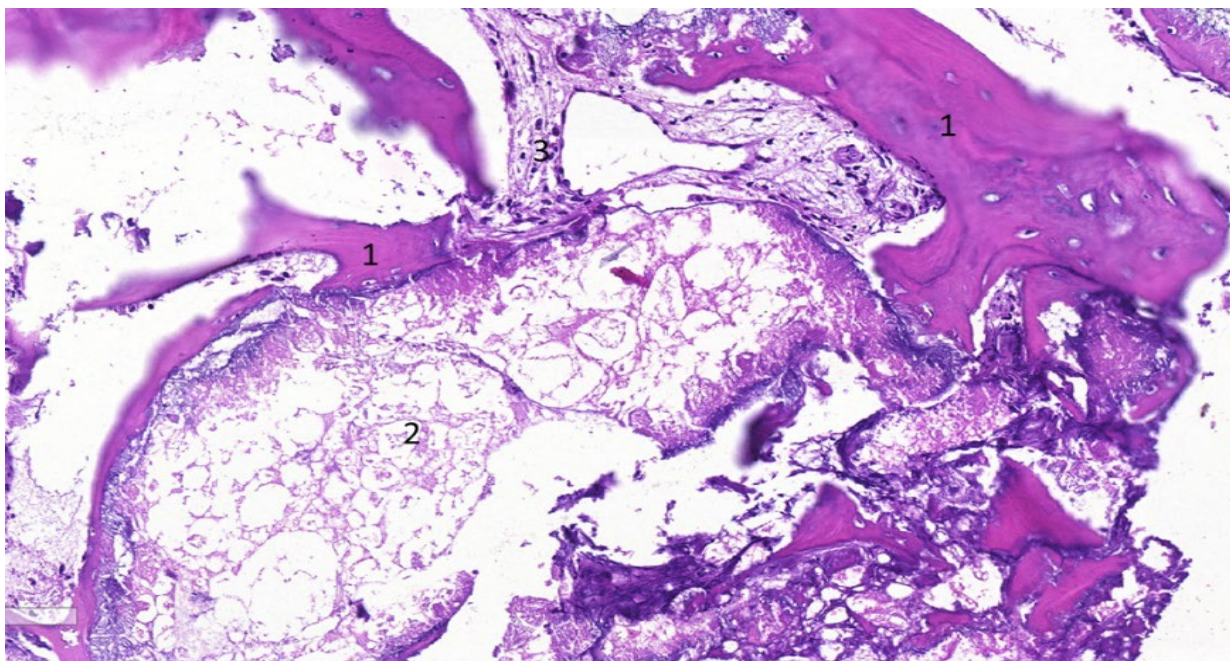


Рисунок 73. Граница между остеопластическим материалом и окружающими его структурами: 1 – вновь образованная костная ткань; 2 – фрагменты остеопластического материала; 3 – фиброзная ткань. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув. х400

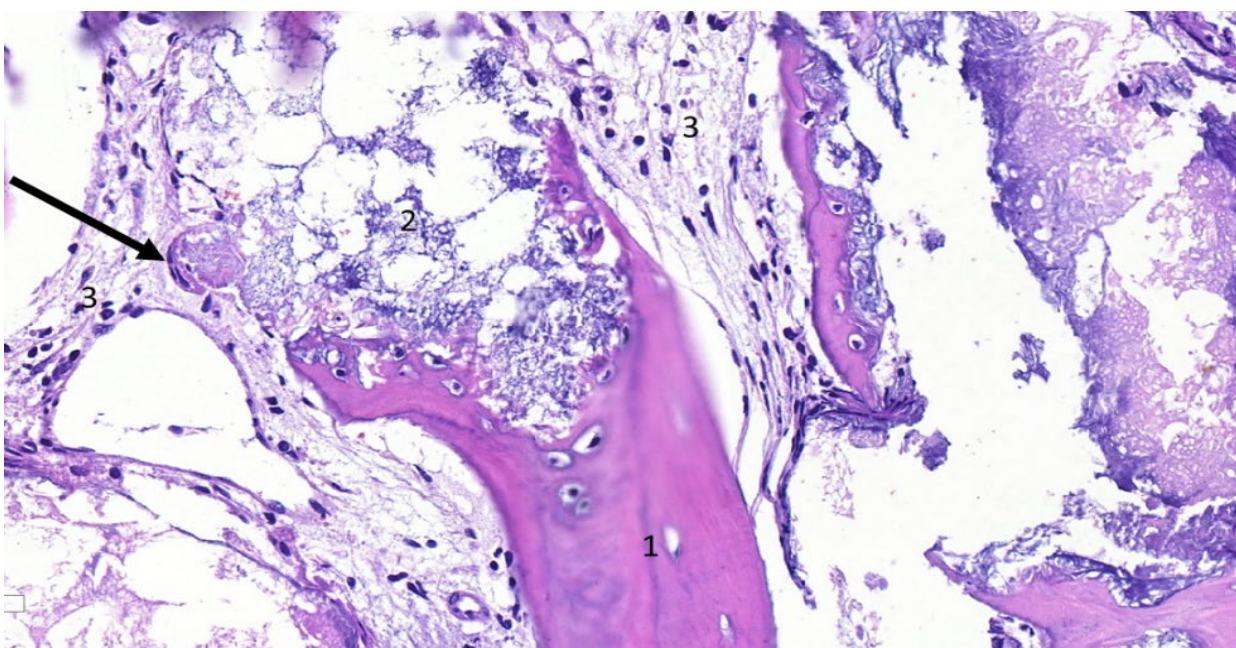


Рисунок 74. Поверхность остеокластической резорбции: 1 – вновь образованная костная ткань; 2 – фрагменты остеопластического материала; 3 – рыхлая волокнистая соединительная ткань; стрелка – остеокласт, резорбирующий материал. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув. х400

Согласно полученным данным, доля костной ткани в образце, полученном после имплантации материала ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой, составляет 34,2%, из них на долю зрелой ткани приходится 73,1%, что является значимым результатом [табл.17].

Таблица 17 - Доли основных элементов регенерата в общей площади гистологического препарата, полученного из биоптата пациентки М.

Доля костной ткани в общей площади	34,2 %
Из нее:	
• доля пластинчатой [зрелой]	73,1 %
• доля ретикулофиброзной [незрелой]	28,2 %
Доля волокнистой соединительной ткани в общей площади	26,9 %
Доля сохранившихся фрагментов остеопластического материала в общей площади	34,3 %

Клинический случай 2.

Пациентка А., 58 лет, обратилась с целью функциональной и эстетической реабилитации в КЦС МГМСУ им А.И. Евдокимова с жалобами на полное отсутствие зубов на верхней челюсти, затрудненный прием пищи и нарушение эстетики. Зубы удалены на фоне прогрессирующего пародонтита. При объективном осмотре: общее состояние удовлетворительное, конфигурация лица не изменена. Региональные лимфатические узлы не увеличены. Слизистая оболочка полости рта бледно-розового цвета. Отмечается толстый десневой биотип. После проведения клинко-рентгенологического обследования было диагностировано отсутствие зубов 1.7-2.7, сопровождающееся значительным дефицитом объема костной ткани по ширине и высоте за счет атрофии альвеолярного отростка верхней челюсти. По данным результатам КЛКТ исследования отмечается недостаточный и неравномерный объем костной ткани в области верхней

челюсти по вертикали и горизонтали [рис.75 А,Б]. Было принято решение о проведении операции НКР с имплантацией по горизонтали ксеногенного костного ГАП с добавлением аутоостружки и резорбируемых коллагеновых мембран. Операция проводилась после полной стоматологической санации полости рта в амбулаторных условиях под внутривенной седацией.

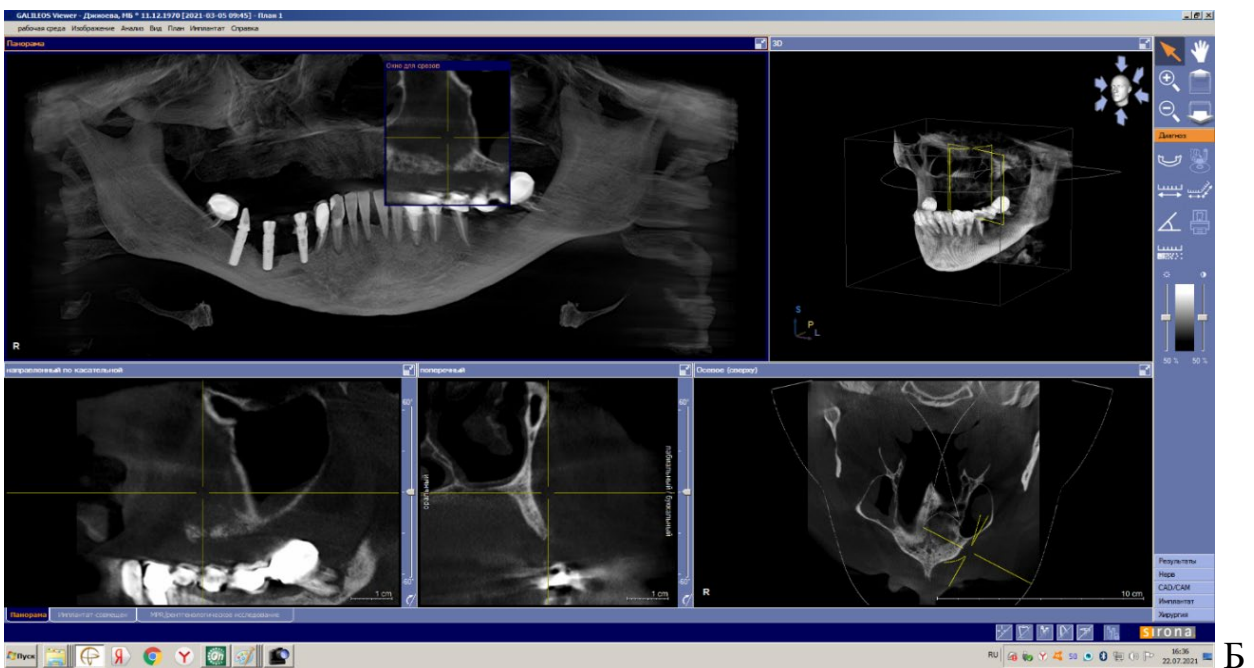
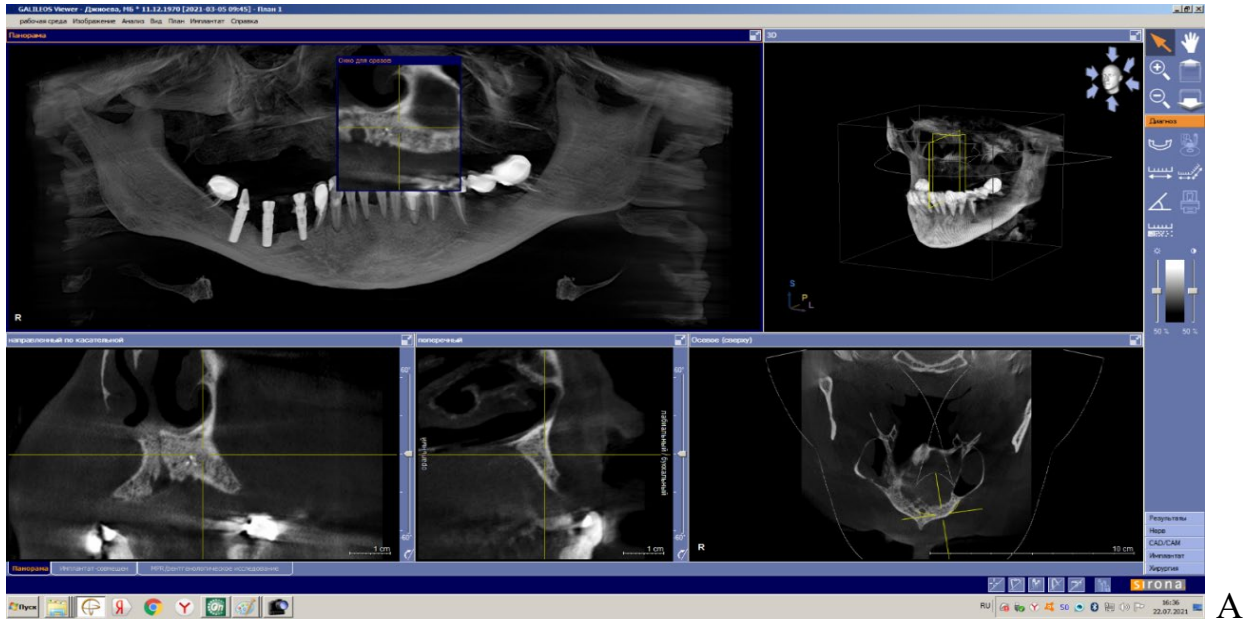


Рисунок 75. Скриншоты конусно-лучевой компьютерной томографии у пациентки А. на этапе консультации перед остеозамещающей операцией при реконструкции костной ткани верхней челюсти: А – сегмент 1.3-2.3; Б – сегмент 2.1-2.5.

Протокол операции: под местным обезболиванием Sol. Ubistesini 4% 5.4 ml произведен линейный разрез по ходу альвеолярного отростка в/ч в проекции отсутствующих зубов 1.7-2.7 [рис.76А]. Скелетирован слизисто-надкостничный лоскут. Произведен забор аутоостружки с помощью скребка MicroOSS, которую затем смешивали с ксеногенным ГАП и укладывали в область верхней челюсти в проекции отсутствующих зубов 1.7-2.7 [рис.76Б] и укрывали сверху резорбируемой коллагеновой мембраной [рис.76В]. Лоскут мобилизовали и ушивали узловыми и Х-образными швами «ПГА 5/0» [рис.76Г]. Холод местно. Пациентке все рекомендации были даны в письменном виде.

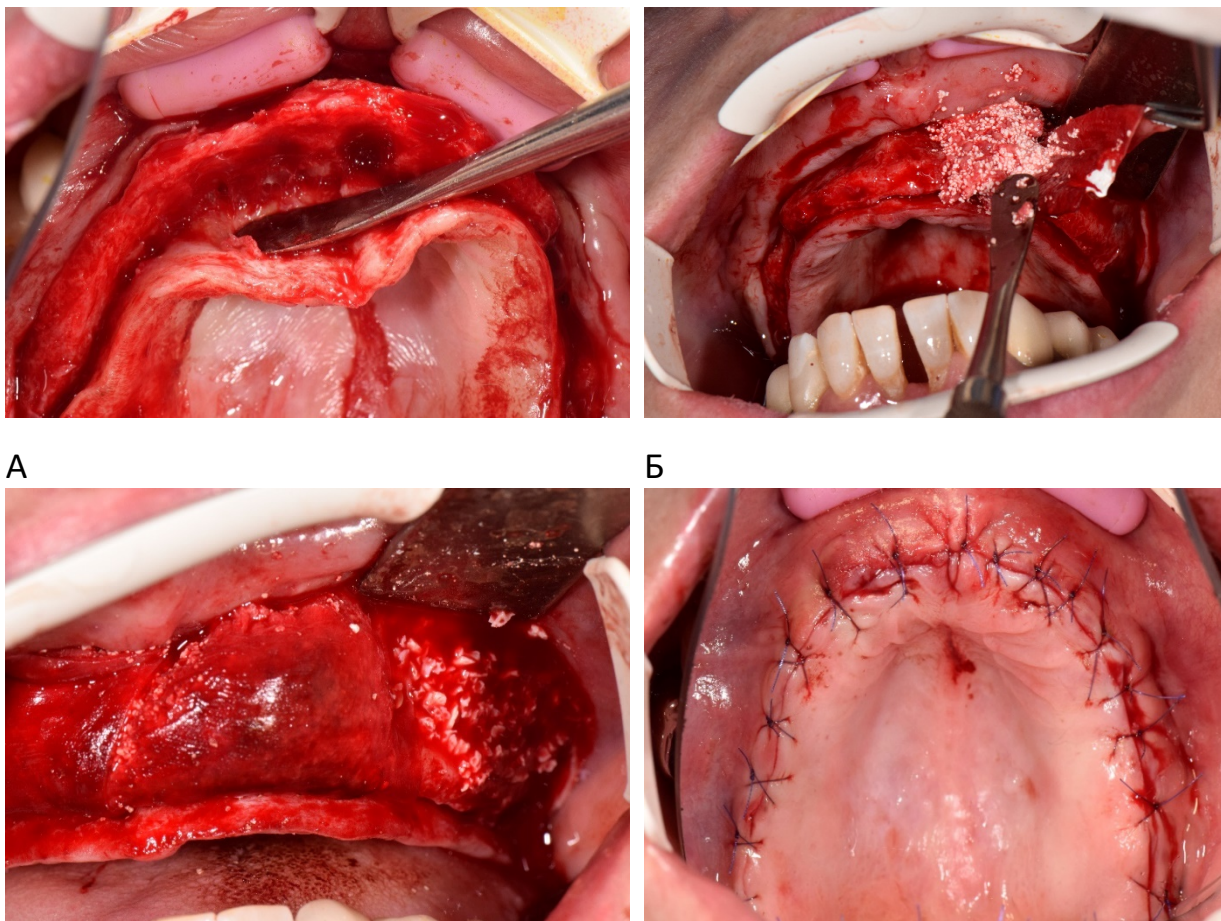


Рисунок 76. Этапы проведения операции реконструкции костной ткани верхней челюсти пациентки А. ксеногенным ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой: А – откидывание слизисто-надкостничного лоскута; Б – закладывание остеопластического материала; В – мобилизация лоскута; Г – ушивание раны.

Схема приёма препаратов и рекомендации после проведенной операции:

- Аугментин 500\125-по 500\125 мг 3 раза в сутки в течение 10 дней;
- - Эриус 5 мг –1 раз в сутки в течение 3 дней перед сном;
- -Вольтарен 50 мг – по 50 мг 2 раза в сутки в течение 3 дней;
- - Кетанов 10 мг – при болях по 1 таблетке на 12 часов при выраженном болевом синдроме;
- - Отривин 0,1% капли в нос – по 2-3 капли в каждую ноздрю 3 раза в сутки в течение 10 дней;
- - Солкосерил дентальная адгезивная паста– наносить на область операции [после нанесения рекомендуется смочить водой для более равномерного распределения пасты];

- Холод на область операции в течение первых суток после операции прикладывали на 40 минут с перерывами. Ранний послеоперационный период протекал без особенностей: общее состояние пациентки было удовлетворительным. В первые сутки после операции определялся послеоперационный коллатеральный отек щечной области и слизистой оболочки полости рта на стороне операции умеренной интенсивности, который сохранялся в последующие 2-3 суток после операции.

Пациентка жаловалась на чувство онемения тканей в области операции, которое исчезло в течение первых суток. Внешне определялась гематома подглазничной области в пределах 1,0 см в диаметре и в области носогубных складок в пределах 2-3 см [рис.77]. Пальпация поднижнечелюстных лимфатических узлов была слабо болезненна в течение первых 2-3-х суток после операции. Гиперемия слизистой оболочки в области проведенной операции наблюдалась в течение 10 суток. Температура тела нормализовалась на 2 сутки. Болевой синдром имел выраженный характер, его интенсивность по визуальной аналоговой шкале менялась 75 до 51 баллов в первые, вторые и третьи сутки после реконструктивного вмешательства соответственно, затем к 10 суткам снижалось до нулевой отметки.



Рисунок 77. Гематомы на лице пациентки А., вследствие травмы сосудов в ходе операции реконструкции альвеолярного отростка верхней челюсти

Швы были сняты на 14 сутки после операции. Рана на всем протяжении репаративного процесса заживала первичным натяжением без присутствия фибринозного налета. Такие неблагоприятные послеоперационные симптомы как экспозиция мембраны, заложенность носа, признаки миграции материала в полость рта, нарушение чувствительности в области операции отсутствовали. Имелся слабовыраженный остаточный отек мягких тканей щеки и рассасывание гематомы на лицевой поверхности кожи, сохраняющиеся в течение месяца после проведенной операции.

Результатами КЛКТ показано, что через 6 месяцев после остеозамещающей операции пациентки А. у объем костной ткани на верхней челюсти возростала до 3 мм по высоте и до 2-3 мм по ширине [рис.78].

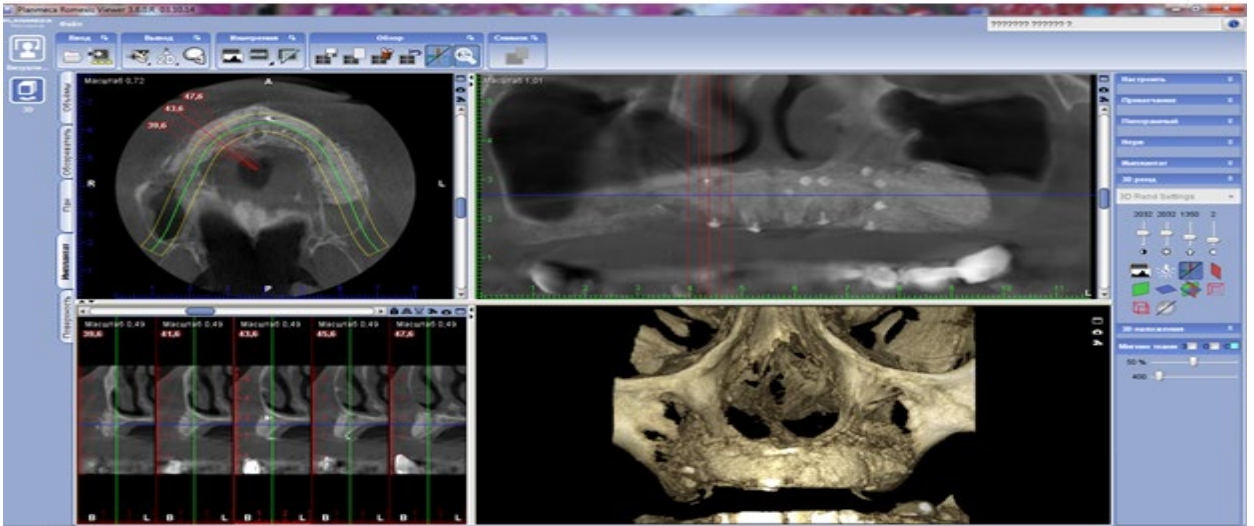


Рисунок 78. Скриншот конусно-лучевой компьютерной томографии пациентки А. через 6 месяцев после реконструкции костной ткани верхней челюсти

Через 6 месяцев пациентке А. были установлены дентальные имплантаты [рис.79].



Рисунок 79. Фотография полости рта пациентки А. с шаблоном для установки дентальных имплантатов через 6 месяцев после остеопластики альвеолярного отростка верхней челюсти

При заборе костной стружки трепаном были отобраны образцы справа и слева, в зависимости от биоматериала, имплантированного ранее. Костные биоптаты были помещены в 10% раствор формалина для последующего морфологической оценки костного регенерата.

Результаты гистоморфометрического исследования костного биоптата пациентки А. после остеозамещающей операции ксеногенным ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой.

При гистоморфометрическом исследовании имелась гистологическая картина вновь образованного зрелого костного регенерата с интегрированными в него фрагментами остеопластического материала без признаков продолжающейся биорезорбции [рис.80].

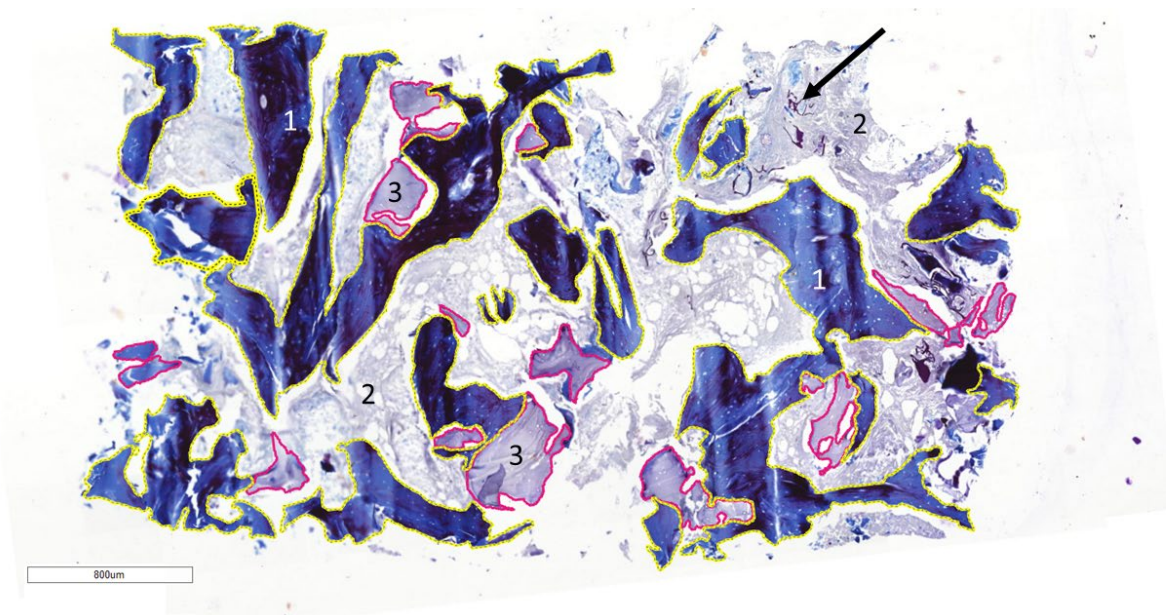


Рисунок 80.Общий вид биоптата [гистотопограмма] с выполненной сегментацией структур: 1 – вновь образованная костная ткань; 2 – «фиброзная ткань»; 3 – фрагменты остеопластического материала. Стрелкой указаны инородные тела. Окраска: Трихром по Маллори. Ув.х200

На гистологическом срезе выявлено 15 фрагментов нерезорбированного остеопластического материала, распределённых относительно равномерно по всей площади биоптата. Фрагменты остеопластического материала интегрированы с костной тканью и соединительной тканью в равной степени. Большая часть регенерата представлена зрелой [пластинчатой] костной тканью [рис. 81].

В одной из зон биоптата определяются инородные тела в виде нитей различного диаметра и формы, окруженные соединительно-тканой капсулой без признаков остеогенеза [рис. 82].

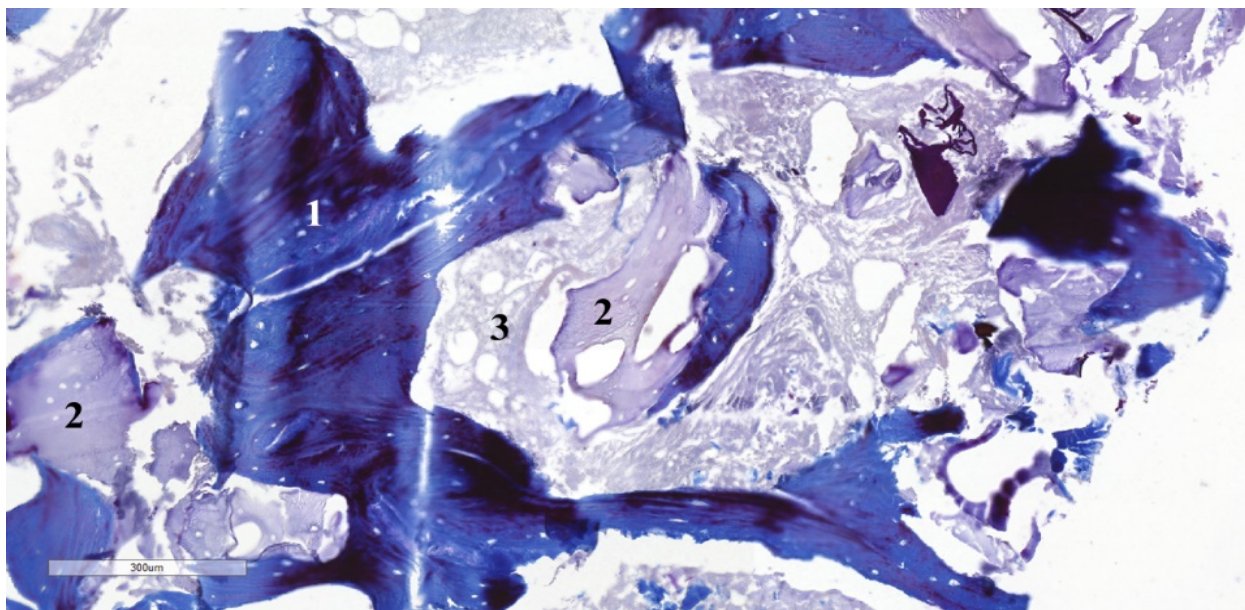


Рисунок 81. Граница между материалом и окружающими его структурами: 1 – вновь образованная костная ткань; 2 – фрагменты остеопластического материала; 3 – волокнистая соединительная ткань [«фиброз»]. Окраска: Трихром по Маллори. Ув.х400

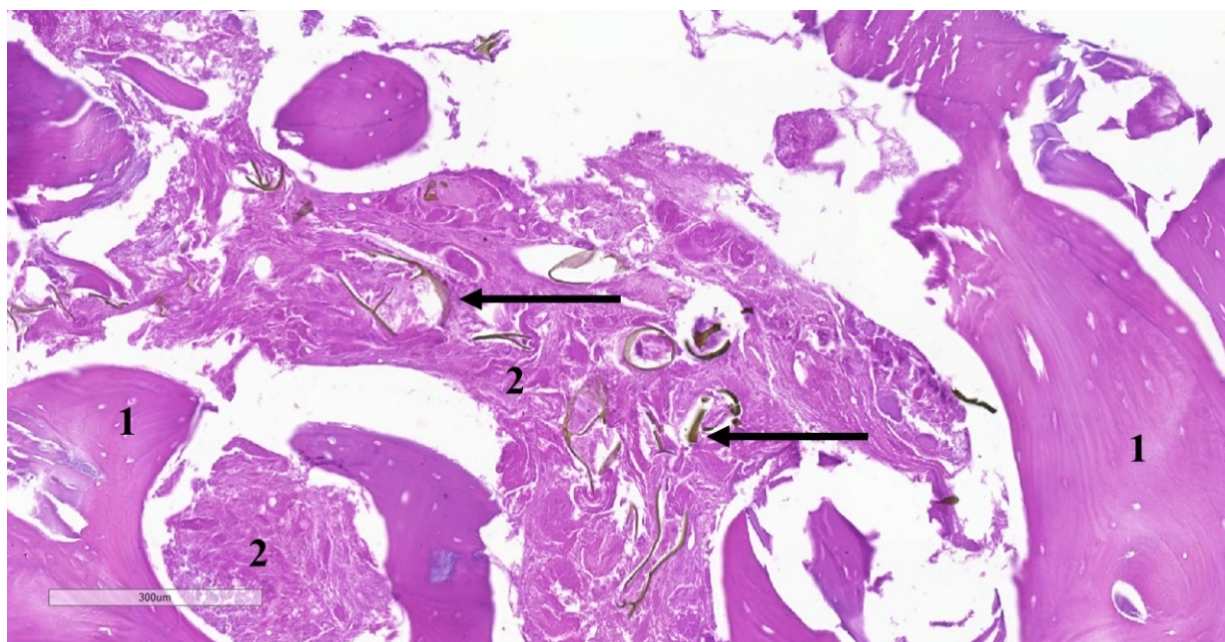


Рисунок 82. Зона регенерата с инородными телами: 1 – вновь образованная костная ткань; 2 – соединительнотканная капсула, окружающая инородные тела; стрелки – инородные тела. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув.х200

Признаков воспалительной инфильтрации и наличие клеток, резорбирующих фрагменты материала, не выявлено.

Доля костной ткани составляет 55,4%, из нее доля зрелой костной ткани составляет 25,5%, что свидетельствует о незавершенном остеогенезе в этом участке костной ткани [табл.18].

Таблица 18 - Доли основных элементов регенерата в общей площади гистологического препарата

Доля костной ткани в общей площади	55,4 %
Из нее:	
• доля пластинчатой [зрелой]	25,5%
• доля ретикулофиброзной [незрелой]	64,5%
Доля волокнистой соединительной ткани в общей площади	36,3 %
Доля сохранившихся фрагментов остеопластического материала в общей площади	16,7 %
Средняя толщина костных трабекул	149,2±78,6 мкм

Клинический случай 3.

Пациент Р., 54 года, обратился с целью функциональной и эстетической реабилитации в КЦС МГМСУ им А.И. Евдокимова с жалобами на отсутствие зубов 3.6, 3.7, 4.6, 4.7 на нижней челюсти, затрудненный прием пищи.

Зубы удалены на фоне осложненного кариозного процесса. При объективном осмотре: общее состояние удовлетворительное, конфигурация лица не изменена. Региональные лимфатические узлы не увеличены. Слизистая оболочка полости рта бледно-розового цвета. Отмечается толстый десневой биотип. После проведения клинико-рентгенологического обследования было диагностировано отсутствие зубов 3.6, 3.7, 4.6, 4.7, сопровождающееся значительным дефицитом объема костной ткани по ширине и высоте за счет атрофии альвеолярного отростка нижней челюсти справа и слева.

По данным результатам КЛКТ исследования отмечается недостаточный и неравномерный объем костной ткани в области н/ч по вертикали и горизонтали [рис.83 А, Б]. Было принято решение о проведении операции

НКР с использованием комбинации остеопластических материалов - по горизонтали с применением ксеногенного костного ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой [слева] и материала ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой [справа] с добавлением аутостружки.

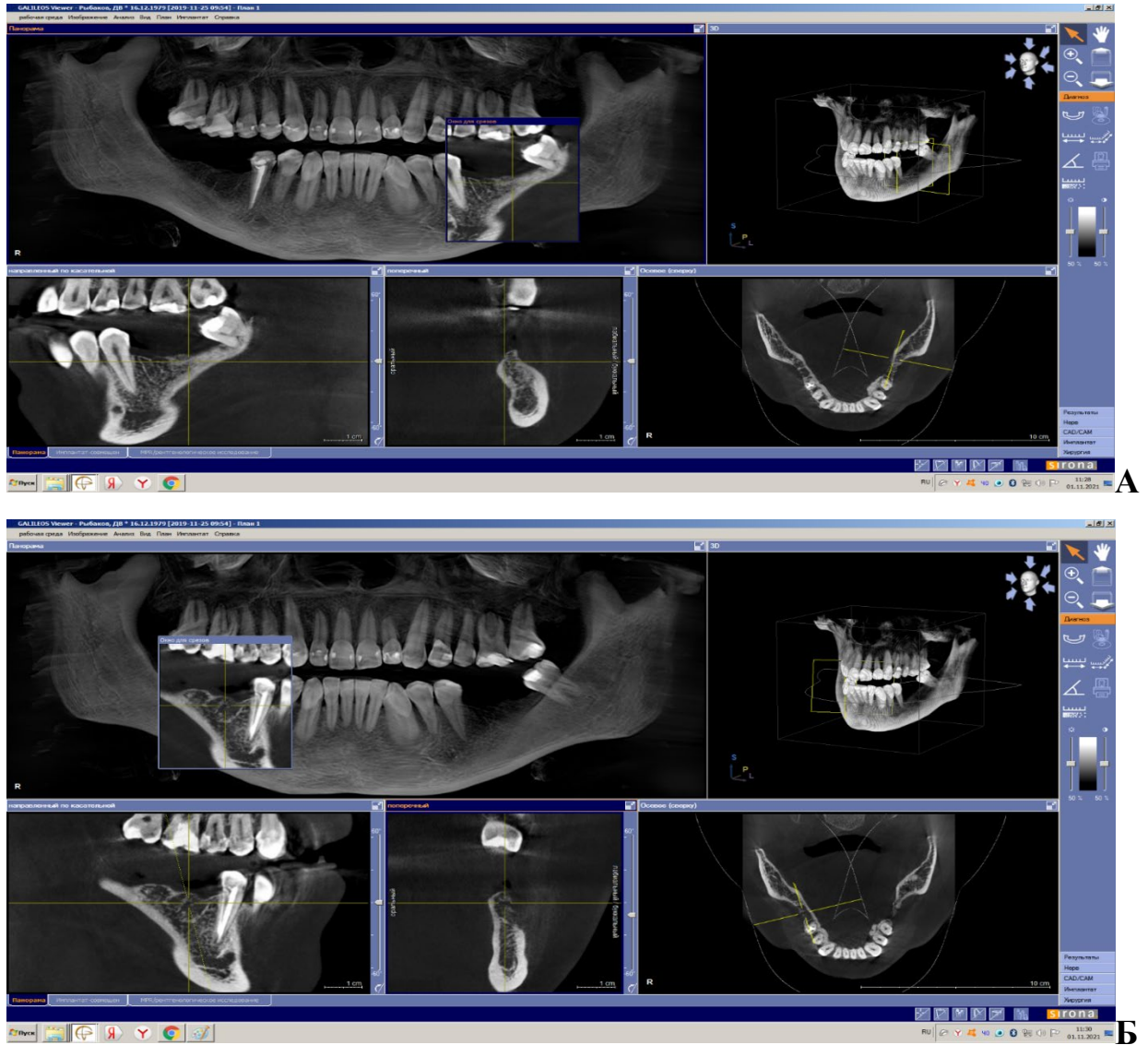
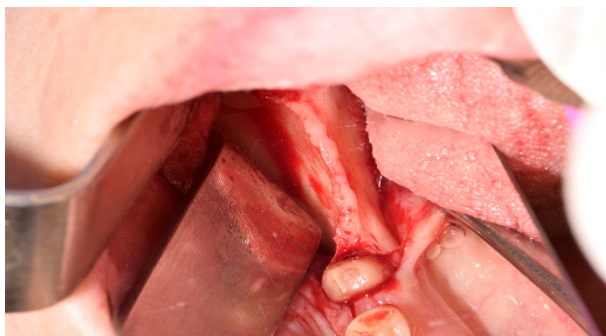


Рисунок 83. Скриншот конусно-лучевой компьютерной томографии у пациента Р. на этапе консультации перед остеозамещающей операцией при реконструкции костной ткани нижней челюсти. Обозначение: А – справа, Б – слева

Операция проводилась после полной стоматологической санации полости рта в амбулаторных условиях под внутривенной седацией. Протокол операции: под местным обезболиванием Sol. Ubistesini 4% 5.4 ml произведен

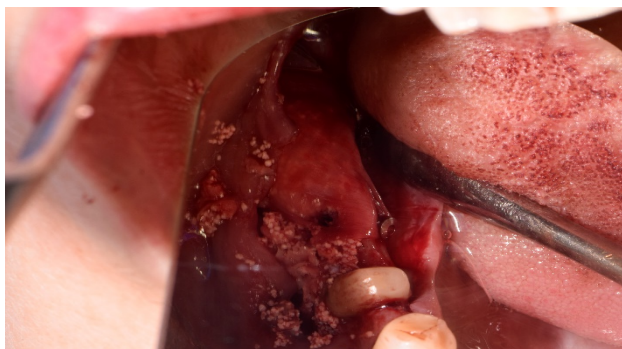
линейный разрез по ходу альвеолярного отростка н/ч в проекции отсутствующих зубов 3.6, 3.7 слева [рис.84А] и 4.6, 4.7 справа [рис.84Б].



А



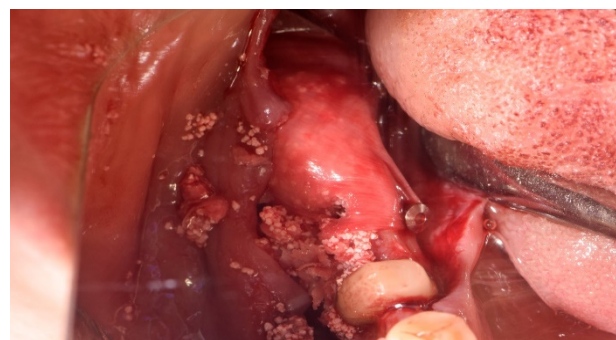
Б



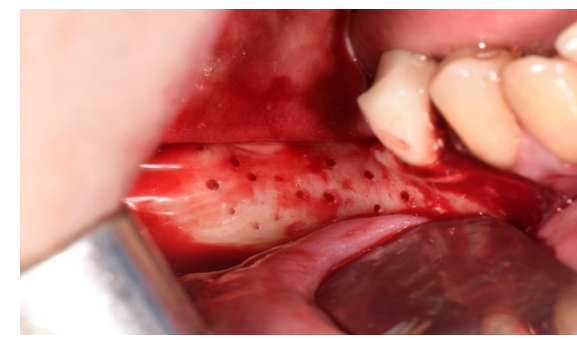
В



Г



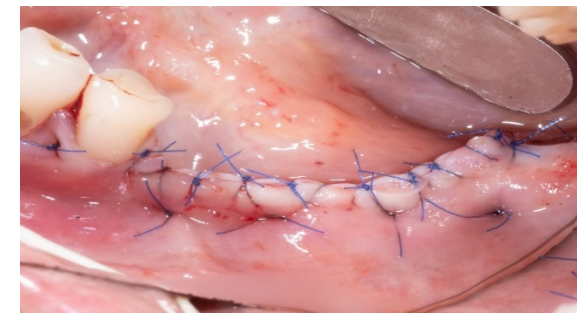
Д



Е



Ж



З

Рисунок 84. Фотографии полости рта пациента Р. с этапами проведения операции реконструкции костной ткани альвеолярного отростка нижней челюсти комбинацией ксеногенного ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой [слева] и ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной

стружкой[справа]: А,Б – откидывание слизисто-надкостничного лоскута; В,Г – укладка остеопластического материала; Д,Е – укрытие мембраной; Ж,З – ушивание раны.

Скелетирован слизисто-надкостничный лоскут. Произведен забор аутостружки с помощью скребка MicroOSS. Смешивали аутостружку и остеопластические материалы ксеногенный ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой [рис.84В] и ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой[рис.84Г],затем уложили в область н/ч в проекции отсутствующих зубов 3.6, 3.7, 4.6, 4.7. Операционное поле с материалом из ксеногенного ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой укрыто резорбируемой коллагеновой мембраной [рис.84Д] и с материалом ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой укрыто PTFE мембраной, фиксированной титановыми пинами [рис.84Е]. Лоскуты мобилизованы, ушиты узловыми и Х-образными швами «ПГА 5/0» [рис.84Ж,З]. Холод местно. Пациенту все рекомендации даны в письменном виде.

Схема приёма препаратов и рекомендации после проведенной операции:

- Аугментин 500\125-по 500\125 мг 3 раза в сутки в течение 10 дней;
- - Эриус 5 мг –1 раз в сутки в течение 3 дней перед сном;
- -Вольтарен 50 мг – по 50 мг 2 раза в сутки в течение 3 дней;
- - Кетанов 10 мг – при болях по 1 таблетке на 12 часов при выраженном болевом синдроме;
- - Отривин 0,1% капли в нос – по 2-3 капли в каждую ноздрю 3 раза в сутки в течение 10 дней;
- - Солкосерил дентальная адгезивная паста– наносить на область операции [после нанесения рекомендуется смочить водой для более равномерного распределения пасты];

- - Холод на область операции в течение первых суток после операции прикладывали на 40 минут с перерывами.

Ранний послеоперационный период протекал без особенностей: общее состояние пациента было удовлетворительным. В первые сутки после операции определялся послеоперационный коллатеральный отек щечной области и слизистой оболочки полости рта на стороне операции умеренной интенсивности, которая сохранялась в течение 2 суток после операции. Имелось чувство онемения тканей в области операции, которое исчезло в течение суток. Пальпация поднижнечелюстных лимфатических узлов была слабо болезненна первые 2-3 суток после операции. Гиперемия слизистой оболочки в области проведенной операции наблюдалась в течение 7 суток. Интенсивность болевого синдрома по визуальной аналоговой шкале менялась от 1-35 баллов в первые, вторые и третьи сутки после реконструктивного вмешательства соответственно, затем снижалось до нулевой отметки к 7 суткам. Швы сняты на 14 сутки после операции. Рана на всем протяжении репаративного процесса заживала первичным натяжением без присутствия фибринозного налета. Имелся слабовыраженный остаточный отек мягких тканей щеки в течение месяца после проведенной операции.

Результатами КЛКТ показано, что через 6 месяцев после остеозамещающей операции объем костной ткани на верхней челюсти пациента Р. увеличился по высоте до 3 мм и ширине до 2-3 мм [рис.85].

Пациенту Р. были установлены дентальные имплантаты. При заборе костной стружки трепаном были отобраны образцы справа и слева, в зависимости от биоматериала, имплантированного ранее. Выбранные костные биоптаты были помещены в 10% раствор формалина для последующего морфологической оценки костного регенерата.

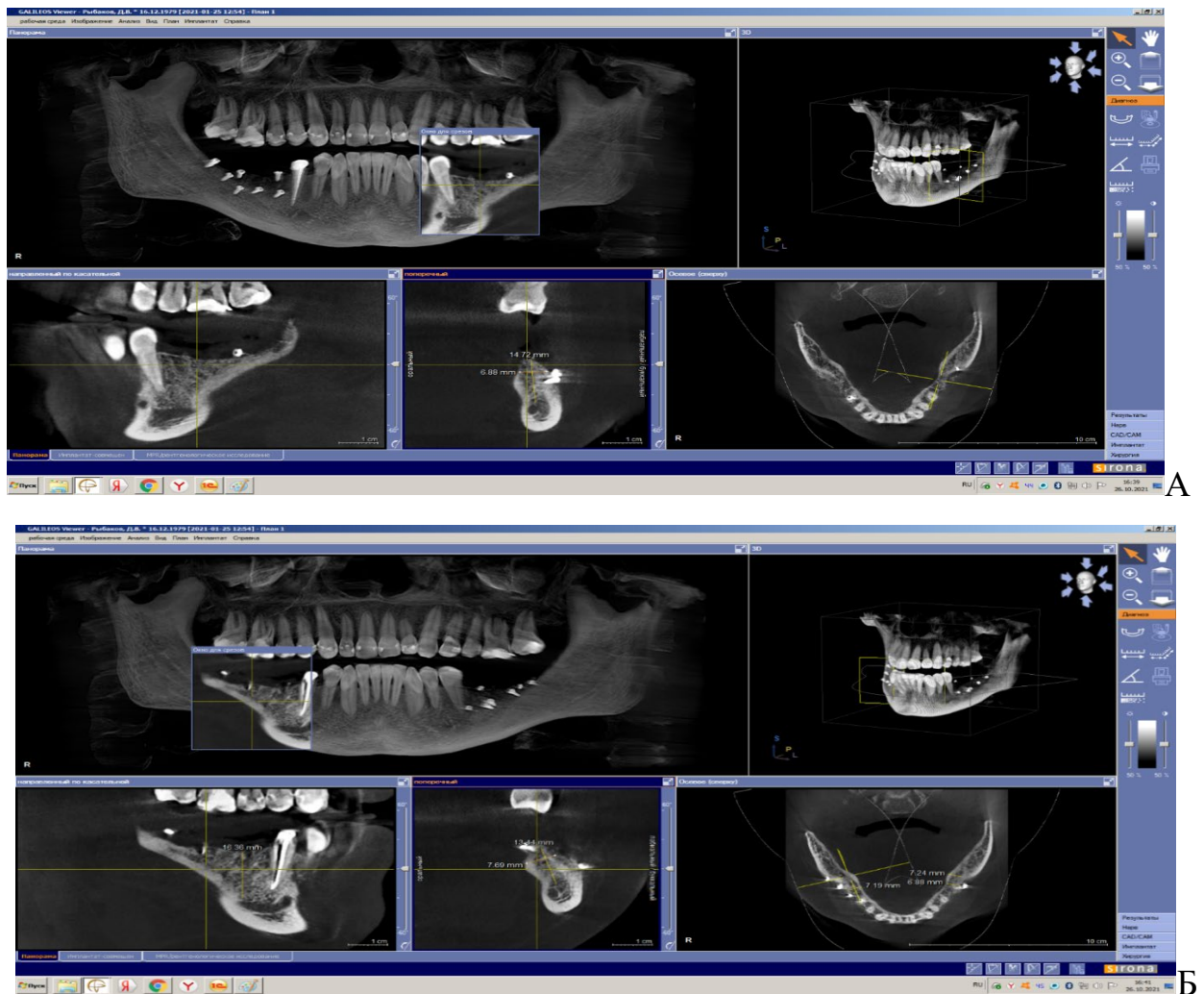


Рисунок 85. Скриншоты конусно-лучевой компьютерной томографии пациента Р. через 6 месяцев после реконструкции костной ткани нижней челюсти: А – сегмент 3.5-3.7; Б - сегмент 4.5-4.7.

Результаты гистоморфометрического исследования костного биоптата пациента Р. после остеозамещающей операции материалом из ксеногенного ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой.

Результаты гистоморфометрического исследования биоптата №1

На всей площади биоптата фрагменты остеопластического материала не обнаружены [рис.86]. Регенерат был представлен преимущественно пластинчатой [зрелой] костной тканью с рыхлой волокнистой соединительной тканью в межбалочном пространстве минимального объема и тканевым детритом, состоящим из костных опилок, покрытых фибрином.

Локально обнаружена умеренная воспалительная инфильтрация [рис. 87].

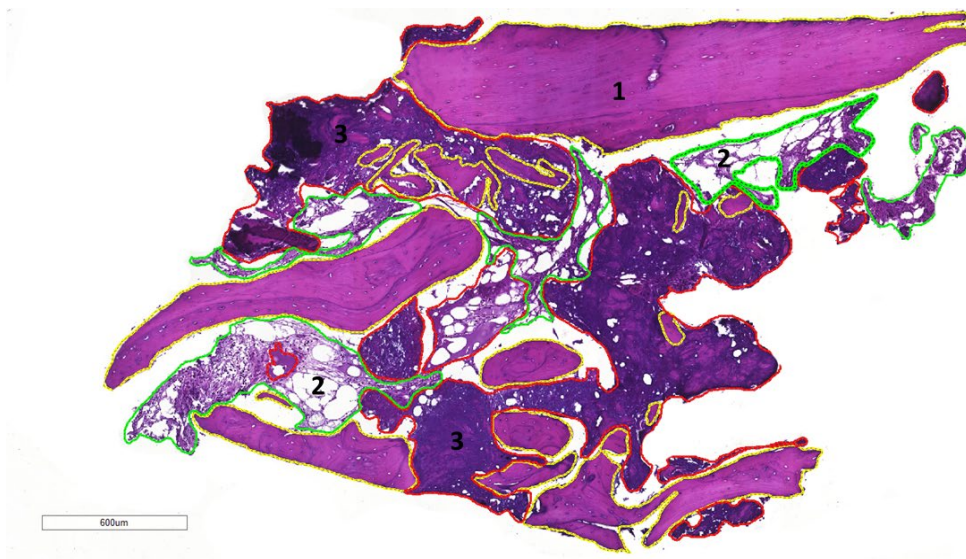


Рисунок 86.Общий вид биоптата [гистотопограмма] с выполненной сегментацией структур: 1 – вновь образованная костная ткань; 2 – рыхлая волокнистая соединительная ткань с высоким содержанием адипоцитов; 3 – тканевый детрит, представленный костной стружкой и фибрином. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув. x200

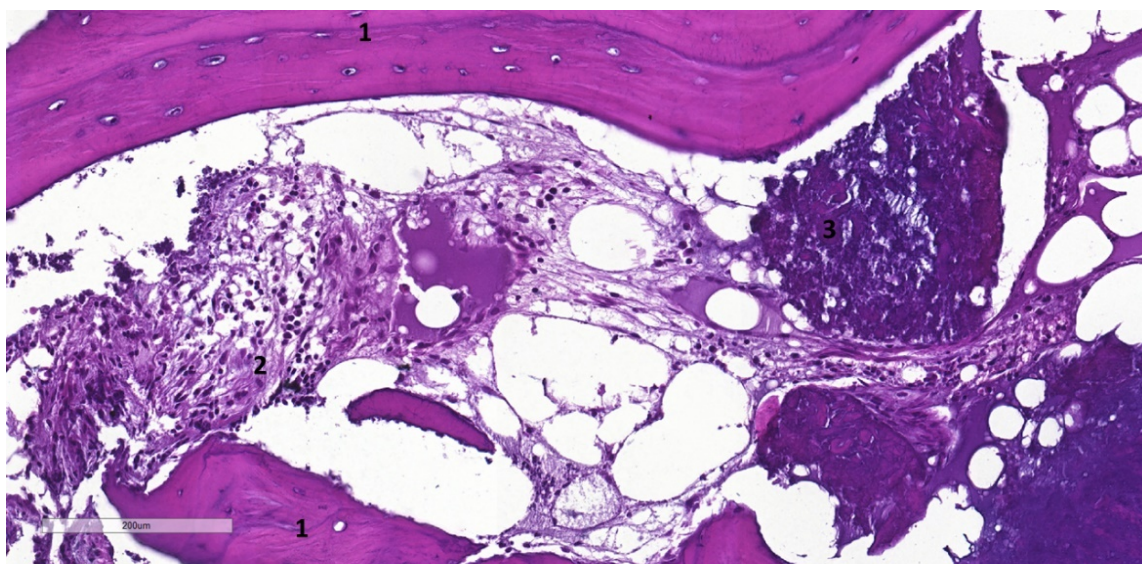


Рисунок 87. Участок воспалительной инфильтрации: 1 – вновь образованная пластинчатая [зрелая] костная ткань; 2 – фиброзная ткань, инфильтрированная лимфоцитами; 3 – тканевый детрит, представленный костной стружкой и фибрином. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув. x400

Биоптат представлен костным регенератом, состоящим преимущественно из костной ткани пластинчатого строения [42,68 % от общей площади] и тканевого детрита [40,44 % от общей площади] с умеренной локальной воспалительной инфильтрацией [табл.19]. Нельзя исключить, что биоптат забран из интактной зоны.

Таблица 19- Доли основных элементов регенерата в общей площади гистологического препарата

Доля костной ткани в общей площади из нее:	42,68 %
• доля пластинчатой [зрелой]	98,5 %
• доля ретикулофиброзной [незрелой]	1,5 %
Доля волокнистой соединительной ткани в общей площади	16,88 %
Доля площади биоптата, занятая тканевым детритом	40,44 %
Доля сохранившихся фрагментов остеопластического материала в общей площади	0 %

Результаты гистоморфометрического исследования биоптата №2

На всей площади биоптата фрагменты остеопластического материала не обнаружены [рис.88].

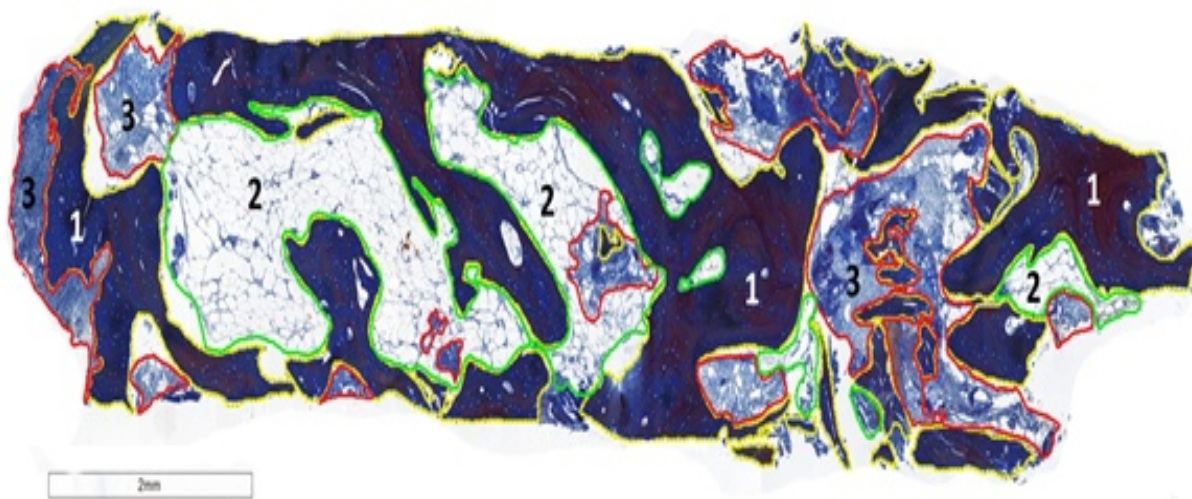


Рисунок 88. Общий вид биоптата [гистотопограмма] с выполненной сегментацией структур: 1 – вновь образованная костная ткань; 2 – рыхлая волокнистая соединительная ткань с высоким содержанием адипоцитов; 3 – фиброзная ткань. Окраска: Трихром по Маллори. Ув.х200

Регенерат представлен преимущественно пластинчатой [зрелой] костью с рыхлой волокнистой соединительной тканью в межбалочном пространстве минимального объема, и фиброзной тканью [рис. 89].

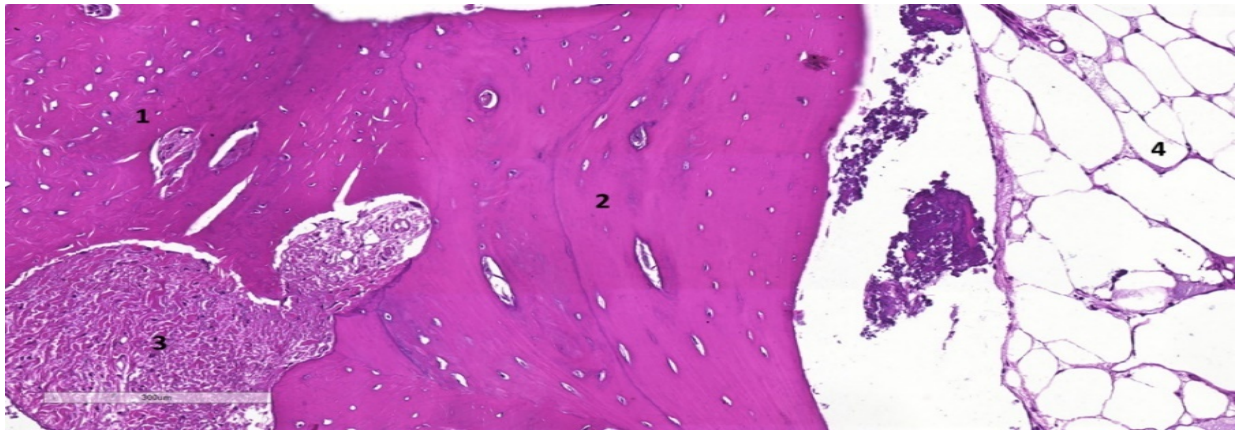


Рисунок 89. Структуры костного регенерата: 1 – вновь образованная ретикулофиброзная [молодая] костная ткань; 2 – вновь образованная пластинчатая [зрелая] костная ткань; 3 – фиброзная ткань; 4 – рыхлая волокнистая соединительная ткань с высоким содержанием адипоцитов. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув. x200

Локально обнаружен шовный материал, окружённый группой гигантских многоядерных клеток и лимфоцитарным инфильтратом [рис. 90].

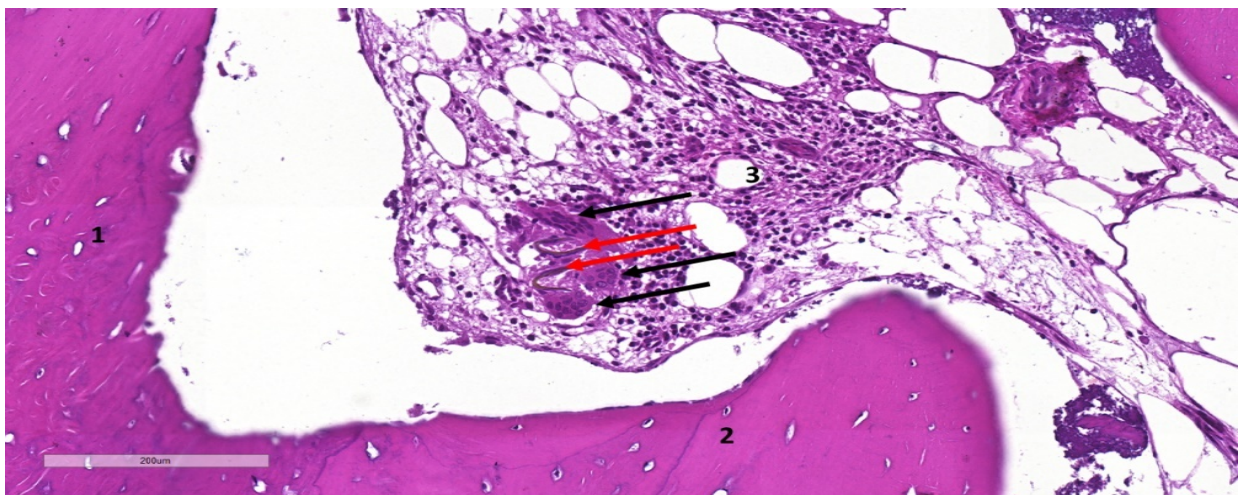


Рисунок 90. Участок воспалительной инфильтрации: 1 – вновь образованная ретикулофиброзная [молодая] костная ткань; 2 – вновь образованная пластинчатая [зрелая] костная ткань; 3 – фиброзная ткань, массивовано инфильтрированная лимфоцитами; стрелки: красные – хирургические нити; черные – гигантские многоядерные клетки. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув. x400

Исследование показало, что биоптат представлен костным регенератом, состоящим преимущественно из костной ткани пластинчатого строения [52,48% от общей площади] и рыхлой волокнистой соединительной ткани [28,75% от общей площади] с локальной воспалительной инфильтрацией. Нельзя исключить, что биоптат забран из интактной зоны [табл.20].

Таблица 20- Доли основных элементов регенерата в общей площади гистологического препарата

Доля костной ткани в общей площади из нее:	52,48 %
• доля пластинчатой [зрелой]	90,5 %
• доля ретикулофиброзной [незрелой]	9,5 %
Доля волокнистой соединительной ткани в общей площади	28,75 %
Доля фиброзной соединительной ткани	18,76 %
Доля сохранившихся фрагментов остеопластического материала в общей площади	0 %

Результаты гистоморфометрического исследования костного биоптата пациента Р. после остеозамещающей операции материалом ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой.

Результаты гистоморфометрического исследования биоптата №1

На всей площади биоптата фрагменты остеопластического материала не обнаружены [рис.91].Регенерат представлен преимущественно пластинчатой [зрелой] костью с рыхлой волокнистой соединительной тканью в межбалочном пространстве минимального объема [рис. 92]. Воспалительной инфильтрации нет.

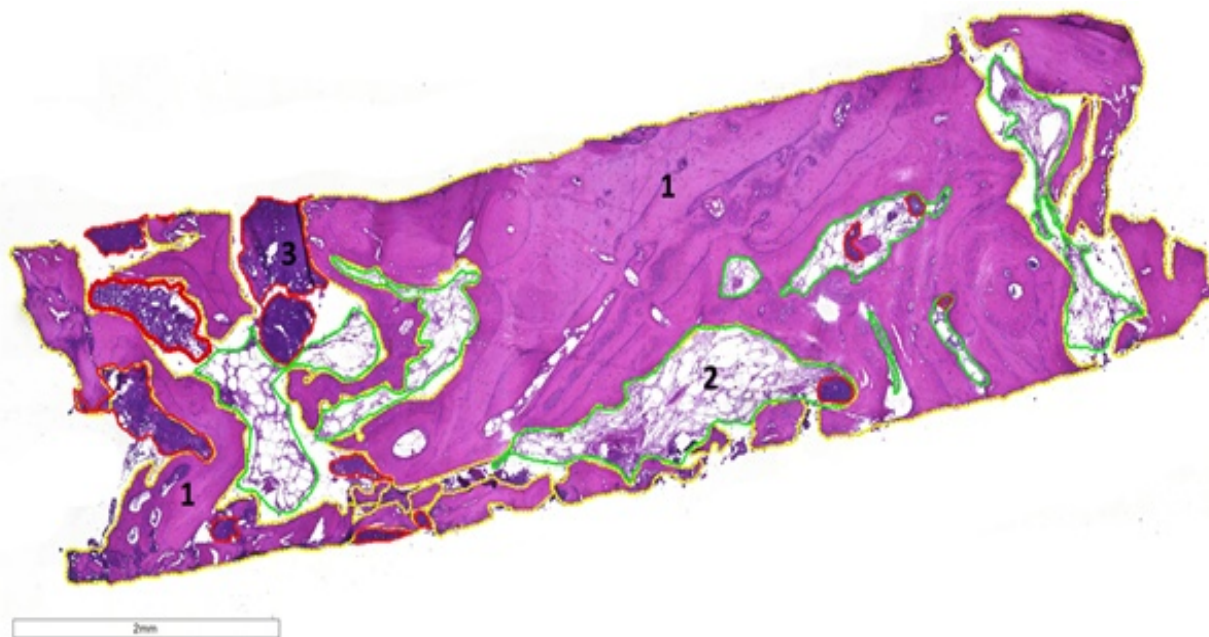


Рисунок 91.Общий вид биоптата [гистотопограмма] с выполненной сегментацией структур: 1 – вновь образованная костная ткань; 2 – рыхлая волокнистая соединительная ткань; 3 – тканевый детрит. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув. x200

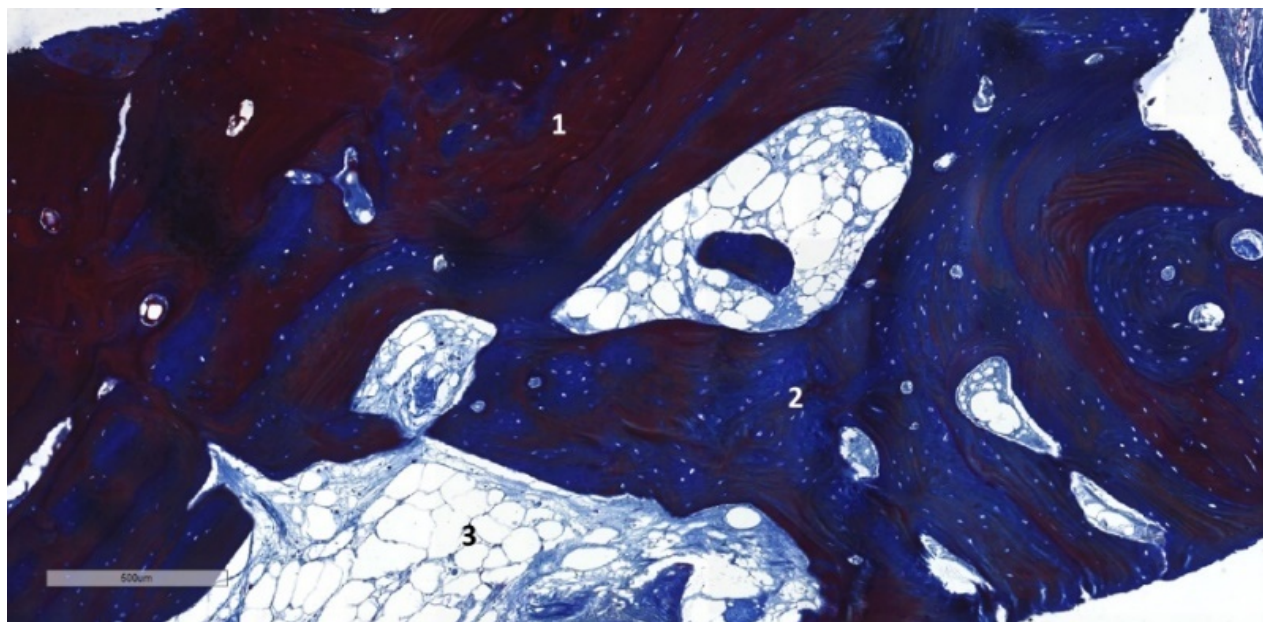


Рисунок 92.Структуры костного регенерата: 1 – вновь образованная пластинчатая [зрелая] костная ткань; 2 – костная ткань смешанного строения; 3 – рыхлая волокнистая соединительная ткань. Окраска: Трихром по Маллори. Ув. x400

Анализ костного регенерата показал, что он состоит преимущественно из костной ткани пластинчатого строения [76,40 % от общей площади] и рыхлой волокнистой соединительной ткани [16,99 % от общей площади] без признаков воспалительной инфильтрации [табл.21].

Таблица 21 - Доли основных элементов регенерата в общей площади гистологического препарата

Доля костной ткани в общей площади	76,40 %
из нее:	
• доля пластинчатой [зрелой]	95,5 %
• доля ретикулофиброзной [незрелой]	4,5 %
Доля волокнистой соединительной ткани в общей площади	16,99 %
Доля сохранившихся фрагментов остеопластического материала в общей площади	0 %
Доля площади биоптата, занятая тканевым детритом	6,61 %

Результаты гистоморфометрического исследования биоптата №2

На всей площади биоптата фрагменты остеопластического материала не обнаружены [рис.93].



Рисунок 93. Общий вид биоптата [гистотопограмма] с выполненной сегментацией структур: 1 – вновь образованная костная ткань; 2 – рыхлая волокнистая соединительная ткань; 3 – тканевый детрит. Окраска: Гематоксилин и эозин. Ув. x200

Регенерат представлен преимущественно пластинчатой [зрелой] костью с рыхлой волокнистой соединительной тканью в межбалочном пространстве минимального объема [рис. 94]. Воспалительной инфильтрации нет.

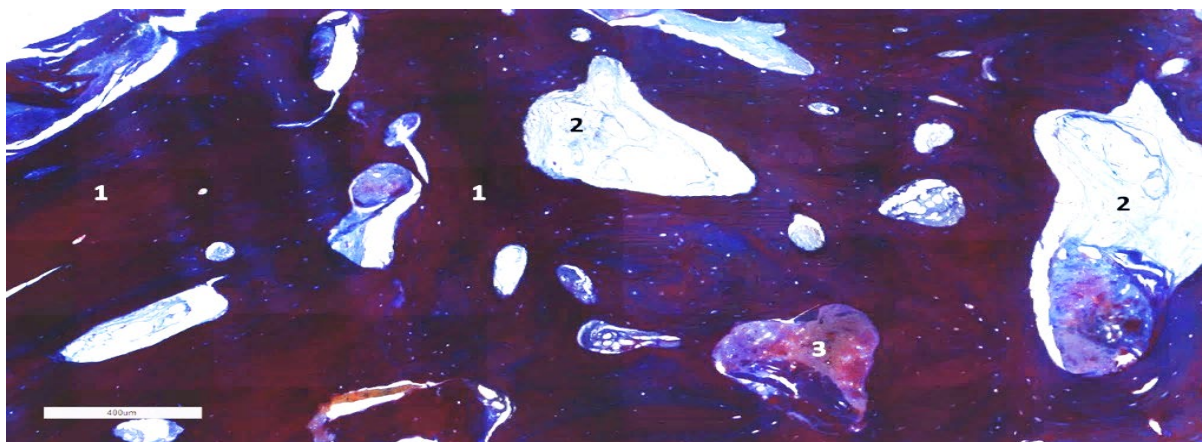


Рисунок 94. Структуры костного регенерата: 1 – вновь образованная пластинчатая [зрелая] костная ткань; 2 – рыхлая волокнистая соединительная ткань; 3 – тканевый детрит. Окраска: Трихром по Маллори. Ув. x200

Биоптат представлен костным регенератом, состоящим преимущественно из костной ткани пластинчатого строения [83,65 % от общей площади] и рыхлой волокнистой соединительной ткани [4,08 % от общей площади][табл.22].

Таблица 22- Доли основных элементов регенерата в общей площади гистологического препарата

Доля костной ткани в общей площади	83,65%
из нее:	
• доля пластинчатой [зрелой]	97,5 %
• доля ретикулофиброзной [незрелой]	2,5 %
Доля волокнистой соединительной ткани в общей площади	4,08 %
Доля сохранившихся фрагментов остеопластического материала в общей площади	0 %
Доля площади биоптата, занятая тканевым детритом	12,27 %

ГЛАВА VII. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Дефекты костей лицевого скелета, образующиеся в результате травм, воспалительных процессов, после удаления новообразований, оперативных вмешательств в повседневной клинической практике замещаются аллогенными, аутогенными или синтетическими материалами, применение которых имеют как преимущества, так и недостатки. В этих хирургических процедурах применение аутотрансплантатов по-прежнему считаются «золотым стандартом» из-за позитивного сочетания остеогенных, остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств. Однако аутотрансплантация имеет некоторые недостатки, например, болезненность донорского участка и ограниченный объём материала доступного для трансплантации. В некоторых случаях костные заменители, такие как аллотрансплантаты, ксенотрансплантаты и аллопласты, используются в качестве альтернативы аутологичным костным трансплантатам, но эти костные заменители не обладают остеогенным, остеоиндуктивным и ангиогенным потенциалом.

Не теряют актуальности работы, посвященные сравнению свойств различных аллогенных декальцинированных материалов и остеопластических материалов других групп применяемых для устранения дефектов челюстных костей. Практический интерес связан с предполагаемой интенсификацией процессов костной перестройки, обусловленной введением деминерализованных аллотрансплантатов. Тем не менее, анализ данных литературы не вносит окончательной ясности о целесообразности использования тех или иных материалов. Оптимизация биологических свойств остеопластических материалов предусматривает включение в их состав веществ, как прямо влияющих на метаболизм тканей, так и индуцирующих формирование утраченных структур. С этой целью применяются клеточные технологии, которые в последнее время у исследователей выходят на передний план. Однако, возможности их применения у пациентов ограничены в связи с неизвестностью дальнейших

реакций в организме. Это заставляет исследователей заниматься изучением только клеточных суспензий.

Историческая зависимость от исследования *in vitro* свойств стволовых клеток для определения их функций *in vivo* и потенциальных терапевтических применений неизбежно может привести к неправильному пониманию природы и реакции этих клеток. Представление о том, что один источник стволовых клеток может подходить для всех тканей, недостаточно аргументировано. Стволовые клетки в условиях *in vitro* ведут себя обычным образом, потому что их дифференцировка искусственно регулируется, тогда как в естественной среде их поведение и дифференцировку строго ограничивает иерархия биологических законов.

В связи с этим, необходимо лучшее понимание работы регуляторных механизмов *in vivo*, которые управляют специализированными типами клеток, например, дифференцировкой одонтобластов из стволовых клеток пульпы зуба или остеобластов из стволовых клеток костной ткани. Эта информация не только будет определять будущий прогресс в модуляции механизмов репарации костной ткани *in vivo*, но также поможет использовать стволовые клетки в терапевтических целях. Очевидно, что получение регенеративных клеток из тканей ротовой полости, обладающих иммунорегуляторными, клоногенными и пролиферативными свойствами, широким дифференцировочным потенциалом, не может не представлять интереса для стоматологии, поскольку открывается возможность создания универсального терапевтического клеточного продукта для лечения самого широкого спектра заболеваний [38].

Стволовые клетки из тканей ротовой полости выполняют важную роль в гомеостазе и процессах гистогенеза тканей. В пульпе зуба эти клетки остаются активными на протяжении всей жизни и генерируют одонтобласты для восстановления поврежденного дентина, в то время как стволовые клетки, расположенные в периодонтальной связке, также выполняют свою роль в репарации тканей, и могут участвовать в обменных реакциях в тканях

пародонта. К сожалению, не все ткани зуба подлежат восстановлению или замене. Такие клетки как амелобласты, образующие эмаль, эпителиального происхождения, редуцируются при прорезывании зубов, и поэтому повреждение эмали не восстанавливается естественным путем. Таким образом, понимание свойств различных постоянных популяций внутриротовых стволовых клеток может помочь в разработке новых направлений в исследованиях и их применения в клинике, для реализации потенциала этих клеток в регенеративной медицине. Можно считать, что методы лечения в стоматологии на основе стволовых клеток все еще находятся в зачаточном состоянии, и, прежде чем перейти к клиническим исследованиям, необходимо провести больше экспериментальных работ.

Первая экспериментальная часть исследования была проведена *in vitro* на 175 образцов клеточных культур человека, выделенных из тканей верхней и нижней челюсти человека –оболочки Гертвига, надкостницы и костной ткани. Их остеогенность и колониобразование определялись по степени окрашивания образованного минерализованного матрикса ализариновым красным, и доля позитивных по ЩФ клеток тетразолием нитро-голубым. Установлены значимые остеогенные потенции стволовых клеток, выделенных из волокон периодонта, и активное колониобразование у стволовых клеток, выделенных из надкостницы. Выявлена максимально значимая эффективность колониобразования и остеогенные потенции у стволовых клеток, выделенных из нижней челюсти, а активный синтез ЩФ наблюдался в культурах клеток, выделенных из верхней челюсти. Полученные данные подтверждаются исследованиями В.А. Китаева [2007], С.А. Павлова [2011] и Н.А. Малышевой [2015], которые установили различия в белковом составе костной ткани челюстей человека в зависимости от расположения на челюстях и половой принадлежности [93, 118, 127]. Было установлено, что культуры стволовых клеток, полученные из костного материала доноров молодой возрастной группы, обладают более высокой способностью к колониобразованию [55,3%]и формированию очагов

кальцификации[70%]. Также установленная нами наиболее эффективная остеогенная потенция у стволовых клеток эпителия, выделенных из оболочки Гертвига нижней челюсти, может являться существенным моментом для разработок в данном направлении.

Проведенные нами исследования с мезенхимальными стволовыми клетками, выделенными из биоптатов десны 24 кроликов, показали, что фибробласты не обладают фенотипичностью в отношении других типов клеток. Это подтверждает наличие у них перспективной потенции, то есть способности развиваться в разных направлениях, что очень важно для обеспечения формирования специфичной тканевой структуры, необходимой для регенерации поврежденного участка. С другой стороны, мезенхимальные стволовые клетки десны показали высокую экспрессию белков, свойственную для матрикса соединительной ткани, что подтверждает у них значимый биосинтетический потенциал. При этом установлена возможность дифференцировки стволовых клеток десны в остеогенные, хондрогенные и адипогенные клетки, то есть клетки-прародители мезенхимы. Кроме того, фибробластический дифферон ткани десны может служить новым инструментом для изучения механизмов фенотипа подобного мезенхимальным стволовым клетками их мультилинейной дифференцировки в мезодермальном направлении [20, 35, 36].

Таким образом, стволовые клетки десны показали способность к плюрипотентной дифференцировке в мезенхимном направлении, и их способность к колониобразованию превосходит все стволовые клетки из других внутриротовых источников. Проведенный анализ клеточного потенциала ткани десны подтверждает наличие в ней фибробластных клеток, отличающихся высокой дифференцировкой и репаративной способностью, в количестве, достаточном для эффективного применения с целью восстановления поврежденных тканей. Это позволило рассмотреть десну на основе стромальных клеток в качестве чрезвычайно перспективного тканевого источника клеточного материала для использования в

регенеративной медицине индуцированных плюрипотентных клеток [33]. Результаты таких исследований очень перспективны в плане разработки инновационных методов восстановления тканей и органов челюстно-лицевой области, лечения ряда генетических заболеваний.

Технологии инженерии костной ткани являются многообещающей альтернативой использованию аутологичных костных трансплантатов для восстановления костных дефектов в челюстно-лицевой области [34]. Однако для успешной регенерации кости необходима ее адекватная васкуляризация. Поэтому разработка биологических моделей *in vivo*, имитирующих среду костного дефекта, могут способствовать новым стратегиям в инженерии костной ткани. Успешная васкуляризация имплантированного материала зависит от скоординированной последовательности различных гуморальных и клеточных механизмов и, в частности, от тесного взаимодействия между тканью хозяина и имплантированным трансплантатом. Этот процесс позволяет тканям расти и восстанавливаться за счет расширения и ремоделирования сети кровеносных сосудов.

Переломным моментом в развитии подходов к созданию биоинженерных конструкций послужило наделение их активными компонентами, призванными индуцировать и поддерживать восстановительный процесс на высоком уровне за счет выраженных остеогенных и остеоиндуцирующих свойств. Иными словами, данный подход основан на получении изделия по следующей формуле: «носитель [простой остеопластический материал, в том числе биополимерный] + активный компонент». Эта идея легла в основу создания остеопластических материалов «новых поколений» в рамках постгеномных, клеточных и генных технологий [37].

Разработки в области тканевой инженерии привели к появлению новых и лучших вариантов лечения, основанных на «инженерии костной ткани». В

этом подходе каркас с стволовыми клетками и/или остеопрогениторными клетками внешнего источника имплантируется в место костного дефекта.

Экспериментальные исследования *in vivo* по имплантированию тканеинженерных конструкций были проведены на 47 кроликах, которые доказали биосовместимость неорганического носителя и активных компонентов с биологической средой, подтвержденная отсутствием признаков воспаления и лимфоцитарной инфильтрации в участках регенерации кости, при этом стволовые клетки явились индукторами биологических процессов, направленных на формирование тканевого матрикса.

Активными компонентами тканеинженерных конструкций выступали аутологичные стволовые клетки, выделенные из внеротовых тканей, и аутологичный фибрин, обогащенный тромбоцитами. Ранее было показано, что клеточные носители на основе аутологичного и ксеногенного фибрина обеспечивают равномерное распределение недифференцированных стволовых клеток [64, 69]. В качестве неорганического матрикса в наших исследованиях использовался коммерческий синтетический трикальцийфосфат $[Ca_3[PO_4]_2]$ [14].

На экспериментальных моделях нами было показано, что мезенхимальные клетки десны с искусственным фибриновым гелем на носителе из ТКФ обладает ускоренным ангиогенным и остеогенным потенциалом, что определяет его индуктивные свойства. Проведенный нами гистологический анализ показал, что процесс регенерации костной ткани при использовании материалов с индуктивными свойствами начинается в периферических участках, а затем данный процесс перемещается в центр регенерата. Однако, полной консолидации костного дефекта не наблюдалось ни в одной из разработанной нами экспериментальных групп, поэтому к поздним срокам остеогенеза различия между группами становились статистически недостоверными.

При применении нового носителя диоксида церия с аутологичным фибрином, обогащенного тромбоцитами морфологическое и иммуногистохимическое исследования аутопсийного материала животных показали, что по сравнению с ксеногенным материалом имеются отличия в формировании костного матрикса. И если экспериментальный биоматериал из диоксида церия с аутологичным фибрином, обогащенного тромбоцитами, на ранних сроках показал ускоренные процессы формирования костного матрикса и стимулировал его образование сходного как с компактной, так и с губчатой костной тканью, ксеногенный остеозамещающий материал на поздних этапах созревания кости вызывает формирование структуры близкой к кортикальной кости. Биоинженерная конструкция по сравнению с ксеногенной стружкой спровоцировала на начальных этапах более активные протеолитические процессы, а затем их затухание и завершение формирования кости в участках дефекта костной ткани экспериментальных животных.

Следующим экспериментальным исследованием было изучение влияния на остеогенез двухкассетной биоинженерной конструкции на основе октакальцифосфата $[Ca_8H_2[PO_4]_6 \cdot 5H_2O \cdot OCP]$ и активного вещества из ген-активированных факторов роста эндотелия сосудов [VEGF] и фактора роста стромальных клеток-1 α [SDF-1 α], который показал активный васкулогенез в периферической и центральной части дефекта уже на 45-60 сутки. При этом на 90 сутки у животных, которым имплантировали ОКФ+VEGF+SDF-1 α , полностью консолидировался дефект теменной кости, тогда как у животных группы сравнения с имплантированным ОКФ выявлялся неполный остеогенез, выражающийся в наличии плотной волокнистой соединительной ткани с большим количеством кровеносных сосудов. Ранее при исследовании *in vitro* однокассетной конструкции, содержащей VEGF и SDF, было показано, что наличие данных активных веществ в 2-6 раз усиливает адгезию и миграцию пролиферирующих эндотелиальных клеток и циркулирующих ангиогенных клеток [180].

Таким образом, данные эксперимента свидетельствуют о наличии индуктивных свойств у исследуемого двухкассетного ген-активированного материала ОКФ+VEGF+SDF-1 α .

Исследования биоматериалов получает широкое распространение на фоне улучшения хирургических методик и инструментария, что позволяет эффективно и качественно устанавливать дентальные имплантаты.

Выживаемость дентальных имплантатов во многом определяет степень остеинтеграции с образованием костной ткани в достаточном объеме[24]. После удаления зуба в течение 3-6 месяцев имеется риск уменьшения высоты на 1,5–2 мм и ширины альвеолярной кости на 40–50%, обусловленный развитием пародонтита или травматическим приложением сил жевания [259, 306]. Частичная или полная адентия за трехлетний период сопровождается убылью костной ткани альвеолярного отростка на 40-60%, что осложняет установку дентальных имплантатов[185].

У пациентов с дефектами челюстей был имплантирован новый сертифицированный отечественный остеозамещающий биоматериал «Гистографт», представляющий собой однокассетную биоинженерную конструкцию на основе ген-активированного материала ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой[основная группа]. Пациентам группы сравнения был имплантирован материал «BioOss» из ксеногенного ГАП с добавлением аутокости.

Замеры параметров изменения костного объема до и через 6 месяцев после операции вычисленные при обработке файлов конусно-лучевой компьютерной томографии, показали, что у пациентов, которым имплантировали в челюстной дефект ген-активированный материал ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой высота [в 2,21 раза] и ширина [в 2,1 раза] новообразованной костной ткани была выше, чем у пациентов, которым имплантировали ксеногенный ГАП в сочетании с аутологичной костной стружкой [в 1,53 и 1,7 раз соответственно]. Клинические параметры объективных и субъективных показателей, таких

как выраженность боли и степень инфильтрации тканей не выявили разницу в течении заживления раневого процесса у пациентов в зависимости от имплантированного им остеозамещающего материала.

Иммуногистохимический анализ с использованием клеточных маркеров Ki-67, CD163⁺ клеток, CD31⁺ клеток показал, что при применении однокассетной биоинженерной конструкции ОКФ+VEGF в сочетании с аутологичной костной стружкой отсутствует воспалительная реакция, выявлена резорбция материала за счёт гигантских многоядерных клеток, новообразовавшиеся кровеносные сосуды обуславливают активный рост и remodelирование костной ткани в области реконструкции, при этом доля новообразованной кости двукратно превышает исходные данные. Однако, к 6-ти месяцам не наблюдается полного формирования сцепленной каркасной системы балок регенерата, несмотря на высокую долю пластинчатой костной ткани, что свидетельствует о слабых механических свойствах новообразованной костной ткани в эти сроки.

Исходя из вышеизложенного, в настоящей работе было продемонстрировано несколько новых методик с применением различных комбинаций остеозамещающих материалов, которые показали эффективный остеосинтез с образованием плотной губчатой кости. В то же время, сроки остеогенеза требуют индивидуального подхода и контроля при реконструкции костной ткани челюстей. Использование аутологичного биоматериала клеточного происхождения для регенерации кости является новым приоритетом для изменения протоколов лечения хирургических пациентов в ближайшей перспективе. Тем ни менее, ген-активированные остеозамещающие материалы также позволяют рассматривать их в свете современных разработок для восстановления костной ткани. Поэтому необходимы дальнейшие исследования с включением новых молекул в состав биоматериалов, которые обеспечат быструю регенерацию кости и высокую выживаемость дентальных имплантатов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ремоделирование костной ткани с применением биоинженерного материала на основе ген-активированного матрикса с факторами роста и тканеинженерных конструкций с включением аутологичных стромальных мезенхимальных клеток относится к современным моделям превентивной медицины, которая направлена на индивидуализированный подход к профилактике и лечению пациента.

Применение стволовых клеток у человека, однако, имеет ряд ограничений, связанных с невозможностью осуществлять контроль за их дифференцировкой и миграцией в участках повреждения тканей. Проведенное исследование с привлечением стволовых клеток, полученных из внутриротовых источников, показало, что они могут стать полноценными участниками репарации тканей и требуют дальнейшей разработки и внедрения как эффективных стратегий оптимизации остеогенеза.

Тканеинженерная конструкция с аутологичным фибрином, насыщенного тромбоцитами, с основой из диоксида церия выявила в эксперименте значительное опережение скорости формирования полноценной костной ткани по сравнению с ксеногенным бесклеточным биоматериалом.

Применение для восстановления дефектов челюстей пациентов однокассетной биоинженерной конструкции, состоящей из гранул октакальциевого фосфата и плазмидной ДНК с геном, кодирующим фактор роста эндотелия сосудов, показало индуктивный эффект при формировании костного матрикса. При этом отмечается, что ген-активирующий материал стимулирует пути остеосинтеза уже на ранних этапах, который физиологически закреплен за стандартной триадой – резорбцией кости, ангиогенезом и формированием нового костного матрикса.

Применение данной методики позволило получить более плотную по своей структуре костную ткань, сходную с нативной костью. Клинические показатели и гистологические данные не выявили существенных реакций со

стороны тканей, которые соприкасались с ген-активированным материалом, что свидетельствует о его биосовместимости.

Ксеногенный остеозамещающий материал, состоящий только из гидроксиапатита, запускает процессы остеогенеза со значительным опозданием и не успевает к 6 месяцам сформировать полноценную костную структуру. Однако, это не следует рассматривать как недостаток данного материала, так как медицинские задачи он выполняет в полной мере.

Инновационные исследования с применением отечественных биоматериалов для регенерации костной ткани показало направление стратегий в реконструктивной хирургии челюстей с помощью однокассетной биоинженерной конструкции, состоящей из гранул октакальциевого фосфата и плазмидной ДНК с геном, кодирующим фактор роста эндотелия сосудов, который имитирует сходные аспекты ремоделирования нативной костной ткани.

ВЫВОДЫ

1. Исследования культур аутологичных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из внутриротовых тканей показало, что наибольший остеогенный потенциал имеется у эпителиальных клеток оболочки Гертвига, а клоногенный - у мезенхимальных клеток десны.

2. Клетки, выделенные из волокон надкостницы нижней челюсти, оказались самыми способными к дифференциации и пролиферации в остеогенном направлении. Культуры клеток, полученные из внутриротовых источников доноров молодого возраста, обладают большей клоногенной [55,3%] и остеогенной потенцией [70%] по сравнению с донорами старших возрастных групп.

3. Фибробласты, выделенные из десны человека, обладают способностью дифференцироваться в osteo-, хондро- и адипогенном направлениях на всех 4х пассажах. Они по эффективности колонеобразования [75%] превосходят все другие изученные мезенхимальные стволовые клетки из внутриротовых источников.

4. Имплантация костнозамещающего материала на основе трикальцийфосфата с включением фибринового геля и аутологичных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток обеспечивает более выраженные остеиндуктивные процессы в зоне репарации, в особенности в периферической зоне дефекта, демонстрируя 52% новообразованной кости в данной экспериментальной группе по сравнению с группой, где имплантировался материал, содержащий трикальцийфосфат с мультипотентными мезенхимальными стволовыми клетками [44%], и 38% новообразованной кости при имплантации трикальцийфосфата без активных компонентов.

5. Применение в эксперименте тканеинженерной конструкции на основе нанодисперсного диоксида церия с аутологичным фибриновым матриксом, обогащенного тромбоцитами в образцах костной ткани опытных животных показало увеличенную активность матриксной металлопротеиназы-9 на фоне

понижения тканевого ингибитора матриксных металлопротеиназ-1 на 15 и 55 сутки регенерации кости, что свидетельствует об активном процессе ремоделирования костной ткани.

6. При применении однокассетной и двухкассетной биоинженерных конструкций на основе синтетического октакальцийфосфата, активированного плазмидной дезоксирибонуклеиновой кислотой с генами сосудистого фактора роста и стромального фактора роста-1 α объемная доля сосудов в костном регенерате животных на 30-60 дни репарации достигала 3%; доля привлеченных гигантских клеток составила 91%; на 45-60 сутки уровень остеогенеза колебался от 7,18 до 3,36% и полного восстановления целостности теменных костей животных к 90 суткам, что значительно выше относительно материала, состоящего только из октакальцийфосфата- 2,3%, 57%, от 4,89 до 2,25% соответственно.

7. Сравнение биопсийного материала костной ткани пациентов через 6 месяцев после имплантации в костный дефект челюстей однокассетной биоинженерной конструкции на основе синтетического октакальцийфосфата в сочетании с аутологичной костной стружкой, активированного плазмидной дезоксирибонуклеиновой кислотой с генами сосудистого фактора роста, показало увеличение объема новообразованной костной ткани по высоте в 1,53 раза и ширине в в 1,7 раза, количества новообразованной костной ткани в 1,6 раз, незрелой ретикулофиброзной ткани в 6,1 раз, резорбции остеопластического материала и уплотнение волокон коллагена в 1,5 раза, что значительно больше полученных результатов у пациентов, которым имплантировали материал, состоящего только из ксеногенного гидроксиапатита, в сочетании с аутологичной костной стружкой.

8. Разработан и внедрен новый алгоритм комплексного лечения утраченных костных структур челюстей пациентов с применением однокассетной биоинженерной конструкции, который позволяет получить достаточный объем костной ткани для повышения выживаемости дентальных имплантатов, снизить риск развития осложнений в

послеоперационном периоде, что определяет эффективность оказания стоматологической помощи пациентам с частичной и полной адентией.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Применение однокассетной биоинженерной конструкции на основе синтетического октакальцийфосфата, активированного плазмидной дезоксирибонуклеиновой кислотой с генами сосудистого фактора роста показано для восполнения объема костной ткани как самостоятельная операция, которая предшествует имплантации, или может проводиться одновременно с установкой имплантатов. Материал может применяться в сочетании с аутологичной костной стружкой.

2. Применение однокассетной биоинженерной конструкции на основе синтетического октакальцийфосфата, активированного плазмидной дезоксирибонуклеиновой кислотой с генами сосудистого фактора роста в сочетании с аутологичной костной стружкой возможно в случаях выраженной атрофии костной ткани челюстей, в особенности при наличии дефектов сложной конфигурации.

3. Для предупреждения рисков развития послеоперационной воспалительной реакции на этапе установки дентальных имплантатов можно применять иммуногистохимический анализ с использованием клеточных маркеров Ki-67.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абаева, В.А. Технологии получения и перспективы применения индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в персонифицированной [персонализированной] медицине/В.А. Абаева, Р.М. Абдуллаев, М.В. Агаева [и др.]//Молодой ученый. – 2020. - №50[340]. – С.373-374.
2. Адда, Ф. Стимуляция рубцевания в переимплантологии. F.R.P. - тромбоциты с высоким содержанием фибрина /Ф. Адда // Пародонтология. - 2005. - № 4 [37]. - С. 38-38.
3. Акопян, А.С. Некоторые актуальные проблемы клинических исследований стволовых клеток/ А.С. Акопян, Д.Ю. Белоусов, М.Р. Рысулы, А.В. Куликов // Качественная клиническая практика. – 2010. – №1. – С. 22-28.
4. Алексеева, И.С. Результаты клинико-экспериментального исследования по использованию комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани для восстановления дефектов костной ткани/И.С. Алексеева, А.А. Кулаков, Д.В. Гольдштейн, А.В. Волков, А.И. Шураев// Российский биотерапевтический журнал. - 2012. - Т. 11. № 4. - С. 67-69.
5. Арутюнян, И.В. Роль рецепторов VEGF-A165 в ангиогенезе /И.В. Арутюнян, Е.Ю. Кананыхина, А.В. Макаров //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. VIII, № 1. – С. 12-18.
6. Базилян, Э.А. Направленная тканевая регенерация в дентальной имплантологии / Э.А. Базилян, Б.С. Смбатян // Клиническая стоматология. - 2008. - № 3 [47]. - С. 42-48
7. Базилян, Э.А. Восстановление костной ткани методом пересадки костных блоков (часть 2) / Э.А. Базилян, Б.С. Смбатян // Клиническая стоматология. - 2009. - № 1 [49]. - С. 44-52.

8. Базилян, Э.А. Обогащенный тромбоцитами фибрин: Использование потенциала L-PRF для стимуляции репаративной регенерации костной ткани/ Э.А. Базилян, И.И. Тарба, Г.А. Воложин, В.Л. Зорин //Российский Вестник Дентальной Имплантологии. -2016. - № 2 [34]. - С. 79-83

9. Базилян, Э.А. Перспективы применения тканеинженерных костных графтов при реконструктивных вмешательствах на челюстных костях/ Э.А. Базилян, Г.А. Воложин, И.И. Тарба //DentalForum. – 2019. - №3[74]. – С.26-30.

10. Базилян, Э.А. Результаты клинического применения тканеинженерной композиции и аутологичного фибрина, обогащенного лейкоцитами и тромбоцитами/ Э.А. Базилян, И.И. Тарба, Г.А. Воложин // DentalForum. – 2018. - №4. – С.13-13.

11. Базилян, Э.А. Сравнительный анализ применения в клинической практике, обогащенного лейкоцитами и тромбоцитами фибринового сгустка при заполнении лунок удаленных зубов/ Э.А. Базилян, И.И. Тарба, Г.А. Воложин //Российская стоматология. - 2020. - Т.13, №1. - С.16-17.

12. Байдик, О.Д. Тканевая инженерия в стоматологии / О.Д. Байдик, М.А. Титаренко, П.Г. Сысолятин // Стоматология. - 2015. - Т. 94. - № 2. - С. 65–68.

13. Баласанова, К.В. Создание тканеинженерной конструкции для восстановления костной ткани в челюстно-лицевой хирургии / К.В. Баласанова, Н.М. Золотопуп, П.А. Елистратов // В книге: Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине. Материалы III международной научно-практической конференции, М., 2012. - С. 261–263.

14. Баринов, С.М. Остеоиндуктивные керамические материалы для восстановления костных тканей: октакальциевый фосфат/ С.М. Баринов, В.С.Комлев //Материаловедение. - 2009. - №10. - С.34-41.

15. Бармашева, А.А. Сравнительное исследование влияния дермальных фибробластов и мультипотентных мезенхимных стромальных клеток,

заклученных в коллагеновый гель, на регенерацию десны / А.А. Бармашева, Н.С. Николаенко, И.А. Самусенко // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2013. - Т. 8. - № 2. - С. 35–43.

16. Барон, А. Регенеративные технологии в стоматологии: науч.-практ. рук/ А. Барон, У. Нанмарк; пер. с англ. под ред. С.Д. Арутюнова. – М.: Практическая медицина, 2015. – 184 с.

17. Беликова, К.М. Терапевтическое клонирование с позиций положений законодательства об интеллектуальной собственности стран БРИКС/К.М. Беликова//Вестник Российской академии интеллектуальной собственности и Российского авторского общества. – 2020. - №2. – С.70-82.

18. Белоусов, Ю.Б. Некоторые актуальные проблемы клинических исследований стволовых клеток/Ю.Б. Белоусов// Этическая экспертиза биомедицинских исследований. - 2005. - Т. 7, № 1. - С. 131-138.

19. Белякова, А.С. Особенности дентальной имплантации у мужчин при комплексной антиостеопоретической терапии /А.С. Белякова, Л.С. Козлова // в сборнике материалов XXII Российского национального конгресса «Человек и лекарство». Москва, 6–10 апреля 2015 г. – С. 21-22.

20. Бозо, И. Биологическое действие тканеинженерных костных графтов из трикальция фосфата и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в ортотопических условиях *in vivo*/И. Бозо, Г. Воложин, Р. Деев [и др.] // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2015. - №4. – С.144-150.

21. Бозо, И.Я. Разработка и применение ген-активированного остеопластического материала для замещения костных дефектов: дис. ...канд. мед.наук /И.Я. Бозо. - ФГБНУ «ИЭМ», Москва, 2017. – 203 с.

22. Бозо, И.Я. Сравнительная оценка биологической активности ген-активированных остеопластических материалов из октакальциевого фосфата и плазмидных ДНК, несущих гены VEGF и SDF: часть 1 - *in vitro* / И.Я. Бозо, К. Юрьева, А.Ю. Дробышев, С.И. Рожков, Г.А.Воложин [и др.]//Гены и клетки. – 2016. – Том 11, №4. – С. 34-42.

23. Бозо, И.Я. Сравнительная оценка биологической активности ген-активированных остеопластических материалов из октакальциевого фосфата и плазмидных ДНК, несущих гены VEGF и SDF: часть 2 - *in vivo*/ И.Я. Бозо, С.И. Рожков, В.С. Комлев, Г.А. Воложин [и др.]//Гены и клетки. – 2017. – Том 12, №4. – С.39-46.

24. Бозо, И.Я. Эффективность ген-активированного остеопластического материала на основе октакальциевого фосфата и плазмидной ДНК с геном VEGF в восполнении "критических" костных дефектов/ И.Я. Бозо, Р.В. Деев, А.Ю. Дробышев, В.С. Комлев, С.И. Рожков, И.И. Еремин, И.Г. Далгатов, Г.А.Воложин [и др.]//Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2015. - №1. – С. 35-42.

25. Бороздкин, Л.Л. Разработка и применение модифицированной биорезорбируемой мембраны на полимерной основе, обработанной гидрозолю наночастиц серебра: дис. ...канд. мед.наук: 3.1.7/Бороздкин Леонид Леонидович. – ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, 2022. – 139 с.

26. Бухарова, Т.Б. Разработка тканеинженерной конструкции на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани, полилактидных носителей и тромбоцитарного геля для восполнения костного дефекта: автореф. дис. ... канд. биол. наук / Т.Б. Бухарова. – НИИ Морфологии человека, Москва, 2014. – 26 с.

27. Вахрушев, И.В. Разработка тканеинженерных имплантов для регенерации костной ткани на основе полилактогликолидных скаффолдов нового поколения и мультипотентных мезенхимальных клеток пульпы молочного зуба [SHED - клеток]/И.В. Вахрушев, Е.Н.Антонов, А.В. Попова [и др.]// Клеточные технологии в биологии и медицине. Издательство РАМН. - 2012. - № 1. - С. 29-33.

28. Вахрушев, И.В. Тканеинженерные конструкции для регенеративной медицины на основе мезенхимальных клеток пульпы молочного зуба и полимерных матриксов нового поколения/И.В. Вахрушев, Е.Н. Антонов,

А.М.Суббот [и др.]// Курский научно-практический вестник человек и его здоровье. - 2017. - № 2. - С. 106-111.

29. Веремеев, А.В. Стромально-васкулярная фракция жировой ткани как альтернативный источник клеточного материала для регенеративной медицины /А.В. Веремеев, Р.Н. Болгарин, М.А. Петкова, Н. Кац, В.Г. Нестеренко // Гены & клетки. - 2016. - Том XI. - № 1. - С. 35-42.

30. Волков, А.В. К вопросу о безопасности остеопластических материалов/А.В. Волков// Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. - 2015. - № 1. - С. 46-51.

31. Волков, А.В. Морфология репаративного остеогенеза и остеointegrации в челюстно-лицевой хирургии: дис. ... докт. мед.наук/А.В. Волков. - ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов», Москва, 2019. - 261 с.

32. Володина, Д.Н. Клиническое применение остеопластического материала на основе костного недеминерализованного коллагена насыщенного сульфатированными гликозаминогликанами в хирургической стоматологии при замещении дефектов челюстных костей/Д.Н. Володина, А.М. Панин// Вопросы современной стоматологии: Сб. науч. тр. МГМСУ: к 90-летию со дня рожд. А.И. Дойникова. - М., 2008. - С. 171-173.

33. Воложин, Г. Остеогенные потенции недифференцированных клеток пародонтальных тканей/ Г. Воложин, Г. Мкртчян, А. Панин, А. Докторов, К. Десятниченко //Cathedra – стоматологическое образование. – 2011. - №36. - С.16-19.

34. Воложин, Г.А. Альтернативный источник стволовых клеток для тканеинженерных технологий в стоматологии/Г.А. Воложин, А.А. Докторов, К.С. Десятниченко, Г.В.Мкртчян//в сборнике материалов IV Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии», С.-Пб., 2010. – С.157-158.

35. Воложин, Г.А. Опыт применения кальций-фосфатных остеопластических материалов, активированных аутогенными

мультипотентными стромальными клетками из различных источников. Пилотное исследование/Г.А. Воложин, В.Л. Зорин, И.И. Еремин [и др.]// в сборнике материалов X Юбилейного всероссийского съезда травматологов-ортопедов, Москва, 16-19 сентября, 2014г. - С. 448-449.

36. Воложин, Г.А. Перспективы использования недифференцированных мультипотентных клеток, полученных из внутриротовых источников в составе тканеинженерных конструкций для устранения внутрикостных дефектов челюстей/ Г.А. Воложин, А.А. Докторов, С.Г. Курдюмов, Г.В. Мкртчян //в сборнике материалов Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Социальные аспекты современной российской стоматологии: опыт, проблемы, пути решения», Тверь, 2011. – С.99-100.

37. Воложин, Г.А. Оценка регенерации костной ткани пациентов после имплантации биоинженерного остеозамещающего материала на основе синтетического октакальцийфосфата, активированного плазмидной ДНК с геном сосудистого эндотелиального фактора роста. Г.А. Воложин, Э.А. Базилян, Р.В. Деев, И.Я. Бозо, Е.И. Пресняков / Эндодонтия Today. – 2021. - №19(4). – С.343-349.

38. Воложин, Г.А. Тестирование *in vitro* остеогенных потенциалов недифференцированных клеток пародонтальных тканей/ Г.А. Воложин, А.А. Докторов, К.С. Десятниченко [и др.]// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Том 5, №3. – С.21-21.

39. Волчков, С.Е. Определение оптимального источника ММСК для создания банка клеток /С.Е. Волчков, О.В. Тюмина, Л.Е. Волова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2010. - Т. 5, № 3. - С. 22.

40. Гаджиев, А.К. Клеточные технологии в регенерации пульпы зуба [экспериментальное исследование]: Автореф. дис. ... канд. мед.наук/А.К. Гаджиев. - ЦНИИС и ЧЛХ МЗ РФ, Москва, 2018. – 24 с.

41. Глазко, Т.Т. Эпигенетическая и мутационная изменчивость эмбриональных стволовых клеток/Т.Т. Глазко// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2010. - № 3. - С. 22-23.

42. Глотов, В.А. Тканеподобные образования с заданными биологическими свойствами на основе клеточной и тканевой инженерии *in vitro* эндотелиальных капиллярных сетей /В.А. Глотов // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: материалы IV Всероссийского симпозиума с международным участием, С.-Пб, 21–22 апреля 2010. – С. 159-159.

43. Гончаров, И.Ю. Применение гидроксиапола при восполнении костных дефектов челюстей и стимуляции остеогенеза. И.Ю. Гончаров, Э.А. Базилян, А.И.Бычков // Стоматология. - 1996. - Т. 75. № 5. - С. 54-56.

44. Гончаров, И.Ю. Повышение эффективности эндодонтоэндооссальной и эндооссальной имплантации с использованием гидроксиапола. И.Ю. Гончаров, Э.А. Базилян, А.И. Ушаков // Стоматология. - 1996. - Т. 75.№ 5. - С.42-44

45. Григорьян, А.С. Заживление костных дефектов ветви нижней челюсти кроликов под биоинженерными конструкциями из титана и золотого сплава с ксеногенными мезенхимальными стволовыми клетками / А.С. Григорьян, А.И. Воложин, Н.Н. Мальгинов, О.О. Янушевич, У.В. Вольперт// Стоматология. - 2009. - № 1. - С. 4-8.

46. Григорьян, А.С. Динамика остеогенетического процесса, вызванного инокуляцией аутогенных мезенхимальных стволовых клеток, выделенных из жировой ткани / А.С. Григорьян, А.А. Орлов, И.Н. Сабурин, В.С. Репин, С.Д.Сысоев // Стоматология. - 2015. - Т. 94, № 3. - С. 4-8.

47. Григорьян, А.С. Возможные молекулярные механизмы функционирования плазмидных конструкций, содержащих ген VEGF / А.С. Григорьян, К.Г. Шевченко // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. –Т. VI, № 3. – С. 24-28.

48. Грудянов, А.И. Стволовые клетки и возможности их применения в пародонтологии / А.И. Грудянов // Стоматология. - 2012. - Т. 91, № 1. - С. 71-75.

49. Гурин, А.Н. Влияние пористой структуры керамических гранул карбонатгидроксиапатита на формирование костного матрикса/А.Н. Гурин, А.Ю. Федотов // Вестник Российской Академии Медицинских Наук. Приложение: Материалы V конференции молодых ученых России с международным участием «Фундаментальные науки и прогресс клинической медицины». - 2008. - №6. - С.121-121.

50. Гурин, А.Н. Октакальций фосфат - прекурсор биологической минерализации, перспективный остеопластический материал/ А.Н. Гурин, В.С. Комлев, И.В. Фадеева, С.М. Баринов//Стоматология. - 2010. - № 4. - С.65-72.

51. Гурин, А.Н. Синтетические гранулы карбонатгидроксиапатита, их влияние на регенерацию костной ткани/ А.Н. Гурин, А.Ю. Федотов// «Биотехнология-2008». Сборник тезисов конференции -М., 2008. - С.405-405.

52. Гурин, А.Н. Сравнительная характеристика материалов на основе хитозана, альгината и фибрина в комплексе с бета-трикальцийфосфатом для остеопластики [экспериментально-морфологическое исследование] /А.Н. Гурин, В.С. Комлев, А.Ю. Федотов [и др.]// Стоматология. - 2014. - Т. 93, № 1. - С. 4-10.

53. Гурин, А.Н. Сравнительное исследование замещения дефектов костной ткани остеопластическими материалами на основе альфа- и бета-трикальцийфосфата /А.Н. Гурин, В.С. Комлев, И.В. Фадеева [и др.]// Стоматология. - 2012. Т. 91, № 6. - С. 16-21.

54. Деев, Р.В. Клеточные технологии в травматологии и ортопедии: пути развития /Р.В. Деев, А.А. Исаев, А.Ю. Кочиш, Р.М. Тихилов// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2007. - № 4. - С. 18-30.

55. Деев, Р.В. Ординарные и активированные остеопластические материалы / Р.В. Деев, А.Ю. Дробышев, И.Я. Бозо // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. - 2015. - № 1. - С. 51-65.

56. Деев, Р.В. Посттравматическая регенерация костной ткани при трансплантации культуры костномозговых стромальных клеток [экспериментальное исследование]: дис. ... канд. биол. наук/ Р.В. Деев. – СПб., 2006. – 175 с.

57. Деев, Р.В. Результаты применения генотерапевтического препарата «Неоваскулген» у пациентов с хронической ишемией нижних конечностей: 1 год наблюдений / Р.В. Деев, Р.Е. Калинин, Ю.В. Червяков [и др.]// Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. – 2011. – Т. 6, № 4. – С. 20-25.

58. Деев, Р.В. Создание и оценка биологического действия ген-активированного остеопластического материала, несущего ген VEGF человека / Р.В. Деев, А.Ю. Дробышев, И.Я. Бозо [и др.]// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 8, № 3. – С. 78-85.

59. Деев, Р.В. Судьба пересаженных в костную рану мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток /Р.В. Деев, И.Я. Бозо, Н.В. Цупкина[и др.]// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2010. - Т. 5, № 3. - С. 25-26.

60. Деев, Р.В. Тканеинженерный эквивалент кости: методологические основы создания и биологические свойства /Р.В. Деев, Н.В. Цупкина, И.Я. Бозо[и др.]// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2011. - Т. 6, № 1. - С. 62-67.

61. Десятниченко, К.С. Супрамолекулярный комплекс внеклеточного матрикса костной ткани, иницирующий биологическую минерализацию/К.С. Десятниченко, В.К.Леонтьев // Вестн. РАМН. - 2009. - № 8. - С. 40-45.

62. Десятниченко, К.С. Тенденции в конструировании тканеинженерных систем для остеопластики/К.С. Десятниченко, С.Г.Курдюмов // Клеточная трансплантология. Тканевая Инженерия. - 2008. - № 2. - С. 62-69.

63. Диланян, М.Х. Патофизиологическое обоснование применения остеопластического материала NORIAN CRS с одномоментной дентальной имплантацией (экспериментально-клиническое исследование): дисс. ... канд. мед.наук: 14.03.03; 14.01.14 / Диланян Мамикон Хачатурович. – Москва, 2014. – 118 с.

64. Домбровская, Ю.А. Оценка возможности создания фибриновых скаффолдов, заселенных стволовыми клетками пульпы зуба, для замещения костных дефектов челюсти/Ю.А. Домбровская, Н.И. Енукашвили, А.В.Котова [и др.]//Трансляционная медицина. – 2020. -Том7, №1. – С.59-69.

65. Дробышев, А.Ю. Клиническое исследование применения тканеинженерной конструкции на основе аутологичных стромальных клеток из жировой ткани у пациентов с дефицитом костной ткани в области альвеолярного отростка верхней челюсти и альвеолярной части нижней челюсти / А.Ю. Дробышев, К.А. Рубина, В.Ю. Сысоева [и др.]// Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2011. – Т. IV, № 4. – С. 764-772.

66. Дробышев, А.Ю. Экспериментальное обоснование и практическое применение отечественных биокомпозиционных материалов при костно-восстановительных операциях на челюстях: дис. ... докт. мед.наук/А.Ю. Дробышев. - Москва, ММСИ, 2001. - 237 с.

67. Дулаев, А.К. Оптимизация репаративного остеогенеза трансплантацией стромальных клеток костного мозга / А.К. Дулаев, Р.В.Деев, Н.С. Николаенко, Н.В. Цупкина, Г.П.Пинаев // Клеточная трансплантология. - 2004. - Т. 3. - С. 15-16.

68. Еремин, И. Возможности применения тканеинженерных костных графтов в челюстно-лицевой хирургии/И. Еремин, И. Бозо, Г. Воложин [и

др.]//Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2015. - №4. – С.151-157.

69. Жерносеченко, А. Выбор носителя и условий дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток для восстановления костной ткани/А. Жерносеченко, Я. Исайкина, Т. Михалевская // Наука и инновации. - 2019. - №5. - С. 58-61.

70. Жукоцкий, А.В. Проблемы контроля качества продукции клеточных технологий /А.В. Жукоцкий, А.В. Мелерзанов// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2010. - Т. 5, № 3. - С. 29-29.

71. Жур, К.В. Искусственный фибриновый сгусток – потенциальный материал для репарации повреждений хрящевой ткани мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками костного мозга человека / К.В. Жур, В.С. Костюнина, Н.В. Гончарова [и др.] // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: сборник тезисов IV Всероссийского симпозиума (СПб., 21-22 апреля 2010). - С. 64-65.

72. Захаров, Ю.М. Регуляция остеогенной дифференциации мезенхимальных стволовых клеток костного мозга / Ю.М. Захаров // Российский физиологический журнал им. И.М. Сеченова. - 2013. - Т. 99, № 4. - С. 417-432.

73. Зерницкий, А.Ю. Роль объема мягких тканей вокруг дентальных имплантатов в развитии периимплантита /А.Ю. Зерницкий, Е.Ю. Медведева// Институт стоматологии. - 2012. - № 1. - С. 80-81.

74. Золотовицкая, Н.Н. Применение клеточных культур фибробластов в лечении атрофических рубцов кожи [экспериментально-клиническое исследование]: дис. ... канд. мед.наук/ Н.Н. Золотовицкая. – Москва, РГМУ, 2007. – 188 с.

75. Золотухина, Е.Л. Стволовые клетки и перспективы их применения в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии/Е.Л. Золотухина//Young Scientist. - 2014. - № 6-2 [09]. - Р. 145-148.

76. Зорин В.Л. Патент РФ № RU №2418571. Биотрансплантат, способ его получения и способ лечения заболеваний пародонта: заявитель В.Л. Зорин, А.И. Зорина, дата опубл. 10.05.2011г.// Бюллетень. – 2011. – 15 с.

77. Зорин, В.Л. PRP в пластической хирургии. Что нового? / В.Л. Зорин, А.И.Зорина //Метаморфозы. - 2014. - №6. - С.1-5

78. Зорин, В.Л. Десна, как источник стромальных клеток с высоким дифференцировочным и репаративным потенциалом/В.Л. Зорин, А.И. Зорина, И.И. Еремин, Р.В. Деев, П.Б. Копнин, Г.А. Воложин [и др.]//Гены и клетки. – 2017. – Том 12, №2. – С.37-51.

79. Зорин, В.Л. Изучение возможности применения мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток, выделенных из десны человека, в составе тканеинженерного конструкта для восстановления костных тканей пародонта/ В.Л. Зорин, П.Б. Копнин, В.С. Комлев [и др.]//Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2013. - № 3. - С.28-29.

80. Зорин, В.Л. Изучение фенотипического профиля и остеогенных свойств фибробластов десны/В.Л. Зорин, А.И. Зорина, Г.А.Воложин [и др.]//Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Том 8, №3. – С.25-26.

81. Зорин, В.Л. Слизистая оболочка полости рта – новый источник получения миобластов/В.Л. Зорин, А.И. Зорина, И.И.Еремин [и др.]//Гены и клетки. – 2014. -Т.9, №3-1. – С.76-84.

82. Зорин, В.Л. Сравнительный анализ остеогенного потенциала мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток слизистой оболочки полости рта и костного мозга// В.Л. Зорин, А.И. Зорина, И.И.Еремин [и др.] // Гены и Клетки. - 2014. - №1. - С.14-18.

83. Зуева, Е.Е. Стволовые клетки. Некоторые биологические особенности и терапевтические возможности/Е.Е. Зуева, А.В. Куртова, Л.С. Комарова // Гематология. - 2005. - Т. 6. - С. 705-724.

84. Иванов, П.Ю. Применение богатой тромбоцитами плазмы для профилактики атрофии челюстей перед дентальной имплантацией / П.Ю.

Иванов, В.П. Журавлев, О.Г. Макеев //Вестник Уральской медицинской академической науки. - 2011. - Т. 1, № 33. - С. 76-78.

85. Иванов, С.Ю. Реконструктивная хирургия альвеолярной кости /С.Ю. Иванов, А.А. Мураев, Н.Ф. Ямуркова. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2016. – 360 с.

86. Иванюк, Д.И. Механизмы иммуномодулирующего действия мезенхимных стволовых клеток /Д.И. Иванюк, В.В. Турчин, А.В. Попандопуло, В.К. Гринь// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2011. - Т. 6, № 2. - С. 27-31.

87. Иванюк, Е.Э. Субпопуляции макрофагов и мезенхимные стволовые клетки в регуляции ремоделирования костной ткани/Е.Э. Иванюк, С.В. Надеждин, Л.А. Покровская [и др.]//Цитология. – 2018. – Т.60, №4. – С.252-261.

88. Ирьянов, Ю.М. Направленный остеогенез при имплантации в полостной дефект кости сетчатых конструкций из никилида титана / Ю.М. Ирьянов, О.В. Дюрягина // Современные технологии медицины. – 2017. – № 9 (2). – С. 68–74.

89. Исаев, А.А. Патент РФ на изобретение №2519326. Биокompозит для обеспечения восстановительных процессов после повреждения у млекопитающего, способ его получения [варианты] и применения/А.А. Исаев, С.Л. Киселев, Деев Р.В., И.Я. Бозо [и др.]; заявитель Общество с ограниченной ответственностью «НекстГен». - № 2011153873/15 от 29.12.2011г., опублик. 10.07.2013г. Бюллетень. – 2013. – 4 с.

90. Калакуцкий, Н.В. Современные технологии при реконструкции нижней челюсти реваскуляризованными аутотрансплантатами /Н.В. Калакуцкий, А.С. Герасимов // Анналы пласт., реконструктив. и эстет.хирургии. - 2010. - № 4. - С. 16-22.

91. Камилов, Ф.Х. Клеточно-молекулярные механизмы ремоделирования костной ткани и ее регуляция /Ф.Х. Камилов, Е.Р. Фаршатова, Д.А. Еникеев// Фундаментальные исследования. - 2014. - № 7. - С. 836-842.

92. Киселева, Е.В. Перспективы использования стволовых клеток в реконструкции черепно-лицевого скелета / Е.В. Киселева, А.В. Васильев, А.И. Воложин, С.Е. Черняев // Стоматология. – 2009. – Т. 88. – № 4. – С. 77–81.

93. Китаев, В.А. Клинико-биохимическая оценка результатов дентальной имплантации: дис. ... канд. мед.наук/В.А. Китаев. - Москва, МГМСУ. - 2007. - 127 с.

94. Кобзева, И.В. Современные представления о диагностике и реконструктивно-восстановительном лечении пациентов с посттравматическими дефектами и деформациями костей лицевого скелета / И.В.Кобзева, Л.Х.Дубина, А.Ю.Дробышев, Д.В.Давыдов, И.И.Якименко// Вестник экспериментальной и клинической хирургии. – 2012. – Т.V, № 1. – С. 181-185.

95. Корель, А.В. Влияние структурно-функциональных свойств деминерализованного костного матрикса на возможность заселения его клетками и на их жизнеспособность с целью создания эффективных тканеинженерных конструкций/А.В. Корель, А.А. Воропаева, Л.А. Черданцева, И.А. Кириллова//Практическая медицина. – 2019. – Т.17, №1. – С.73-75.

96. Корель, А.В. Тканеинженерные стратегии для восстановления дефектов костной ткани. Современное состояние вопроса/А.В. Корель, С.Б. Кузнецов// Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2019. - №4. – С.228-234.

97. Коржевский, Д.Э. Морфологическая диагностика: подготовка материала для морфологического исследования и электронной микроскопии: руководство / Д.Э. Коржевский [и др.] // Под ред. Э.Д. Коржевского. СПб: СпецЛит, 2013. – 127 с.

98. Коровин, А.Е. Клеточная трансплантология как одно из основных направлений биомедицинских клеточных технологий/А.Е. Коровин, В.А.

Горичный, М.О.Соколова [и др.]//Клиническая патофизиология. – 2019. – Т.25, №2. – С.13-20.

99. Косенко, К.Н. Стволовые клетки в стоматологии [обзор литературы] / К.Н. Косенко // Вестн. стоматологии. - 2011. - № 3. - С. 85-88.

100. Кузнецов, С.А. Образование костной ткани путем трансплантации стромальных клеток костного мозга и эмбриональных стволовых клеток человека / С.А. Кузнецов, Н.Черман, М. Манкани, П. Герон Робей// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. - Т. 5, № 3. - С. 35–36.

101. Кузнецова, Д.С. Костные имплантаты на основе скаффолдов и клеточных систем в тканевой инженерии [обзор]/Д.С. Кузнецова, П.С. Тимашев, В.Н. Баграташвили, Е.В. Загайнова// Современные технологии в медицине. -2014. - Т. 6, № 4. - С. 201-212.

102. Кузнецова, Л.В. Применение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток в стоматологии/ Л.В. Кузнецова, И.Ю. Малышев, О.О. Янушевич // Российская стоматология. - 2017. - Т. 10, № 2. - С. 49-57.

103. Кулаков, А.А. Биodeградируемые полимерные материалы медицинского назначения [основные направления исследований и перспективы развития] / А.А. Кулаков, А.С. Григорьян // Стоматология. – 2014. – Т. 93, № 2. – С. 63–66.

104. Кулаков, А.А. Реакция тканевых элементов кости на имплантацию синтетических биорезорбируемых материалов на основе молочной и 247 гликолевой кислот / А.А. Кулаков, А.С. Григорьян // Стоматология. – 2014. – Т. 93, № 4. – С. 4–7.

105. Кулаков, А.А. Регенерация пульпы зуба с использованием аутологичных мезенхимальных стволовых клеток пульпы и обогащенной тромбоцитами плазмы/А.А. Кулаков, Д.В. Гольдштейн, Е.К. Кречина, А.В. Волков, А.К. Гаджиев // Стоматология. – 2017. - №6. – С. 12-16.

106. Кулаков, А.А. Реконструкция при значительной атрофии верхней и нижней челюсти с помощью аутокостных трансплантатов /А.А. Кулаков,

М.А. Амхадова, В.М. Королев // Пародонтология. - 2008. - № 1 [46]. - С. 49-53.

107. Кулаков, А.А. Современные подходы к применению метода дентальной имплантации при атрофии и дефектах костной ткани челюстей / А.А. Кулаков, Р.Ш.Гветадзе, Т.В. Брайловская, А.А. Харьковская, Л.С.Дзиковицкая // Стоматология. – 2017. – Т. 96, № 1. – С. 43–45.

108. Лагарькова, М.А. Такие разные стволовые клетки/М.А. Лагарькова//Биохимия. – 2020. – Т.84, №3. – С.293-296.

109. Ламовская Н.В. Влияние ростовых факторов на эндотелиальную дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток человека *in vitro* / Н.В. Ламовская, М.М. Зафранская, Г.Я. Хулуп // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. V, № 3. – С. 36–37.

110. Литвинова, Л.С. Остеогенные и ангиогенные свойства гепарина как системы доставки биомолекул при биоинженерии кости: краткий критический обзор/ Л.С. Литвинова, К.А Юрова, О.Г Хазиахматова [и др.]// Биомедицинская химия. -2020. -Том 66, вып. 6. - С. 431-436.

111. Лосев, В.Ф. Применение пористого минералнаполненного полилактида с мезенхимальными стромальными клетками костного мозга для стимуляции остеогенеза [экспериментальное исследование]: автореф. дис. ... канд. мед.наук / В.Ф. Лосев. – Москва, ЦНИИС и ЧЛХ, 2009. – 25 с.

112. Лукина, Г.И. Возможности использования нанокристаллического SeO_2 при дефектах костной ткани/Г.И. Лукина, А.В. Лукин, А.Е. Баранчиков [и др.]// Медицинский вестник Северного Кавказа. -2018. - Т. 13, № 4. - С.641-645.

113. Лызиков, А.Н. Стволовые клетки в регенеративной медицине: достижения и перспективы / А.Н.Лызиков // Проблемы здоровья и экологии. - 2015. - № 3. - С. 45-45.

114. Любченко, А.В. Изучение репаративных процессов костной ткани крыс с использованием остеотропного материала «Клипдент ПЛ» и мембраны «Клипдент МК» компании «ВЛАДМИВА», Россия

(экспериментальноморфологическое исследование) / А.В. Любченко, Н.С. Кравцов, В.Ф. Посохова [и др.] // Институт стоматологии. – 2018. – № 32 (79). – С. 104–105.

115. Люндуп, А.В. Методы тканевой инженерии костной ткани в челюстно-лицевой хирургии / А.В. Люндуп, Ю.А. Медведев, К.В. Баласанова [и др.]// Вестник Российской академии медицинских наук. – 2013. – № 5. – С. 10–15.

116. Майбородин, И.В. Влияние аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения на регенерацию поврежденной кости нижней челюсти крыс /И.В. Майбородин, В.А. Матвеева, И.С. Колесников [и др.]// Стоматология. – 2012. – Т. 91, № 1. – С. 5–8.

117. Малышев, И.Ю. Тканевая инженерия зуба: направления развития, достижения и нерешенные проблемы / И.Ю. Малышев, О.О. Янушевич // Стоматология. – 2017. – Т. 96. – № 4. – С. 72–79.

118. Малышева, Н.А. Оценка репаративного остеогенеза при устранении дефектов и деформаций альвеолярного отростка [части] челюстей композицией из аутотрансплантата и ксеноматериалов: дис. ... канд. мед.наук/Н.А. Малышева. – Москва, МГМСУ, 2015. - 152 с.

119. Мамонов, В.Е. Роль мультипотентных мезенхимных стромальных клеток из костного мозга в восстановлении больших костных дефектов / В.Е. Мамонов, Н.В. Сац, И.Н. Шипунова [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. - 2010. - Т. 5, № 3. - С. 38–39.

120. Мезен, Н.И. Стволовые клетки: учебно-методическое пособие / Н.И. Мезен, З. Б. Квачева, Л. М. Сычик. - Минск: БГМУ, 2008. - 36 с.

121. Мирошниченко, В.В. Применение клеточных технологий в практической стоматологии / В.В. Мирошниченко, А.В. Урамаева // Университетская медицина Урала. – 2018. – Т. 4, № 1. – С. 70–73.

122. Мкртчян Г.В. Тестирование *in vitro* остеопластического материала в гелевой форме/Г.В. Мкртчян, К.С. Десятниченко, А.А. Докторов, С.Г.

Курдюмов, Г.А. Воложин [и др.]// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Том 5, №3. – С.42-42.

123. Мкртчян, Г.В. К вопросу о зависимости остеогенных потенциалов недифференцированных клеток из биоптатов губчатой кости челюстей от возраста донора/ Г.В. Мкртчян, Г.А. Воложин, А.А. Докторов.ю К.С. Десятниченко//Пародонтология. – 2011. – Том 16, №1[58]. – С.11-15.

124. Мураев, А.А. Изучение биологических свойств нового остеопластического материала на основе недеминерализованного коллагена, содержащего фактор роста эндотелия сосудов, при замещении костных дефектов / А.А. Мураев, С.Ю. Иванов, А.А. Артифексова [и др.]// Современные технологии в медицине. – 2012. – № 1. – С. 21-26.

125. Нака, К.О. Нобелевская премия Яманака Синъя как повод для переосмысления роли науки и мессии ученого в Японии/К.О. Нака//Ежегодник Япония. – 2015. – Т.44. – С.92-103.

126. Нецадим, Д.В. Исследование влияния липосом с декстразидом на экспрессию металлопротеиназ MMP-1 И MMP-9 макрофагами *in vitro*/ Д.В. Нецадим, С.А. Архипов, В.А. Шкурупий, Е.С. Ахраменко, А.В. Троицкий // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 8-2. – С. 198-202

127. Павлов, С.А. Изучение маркеров остеогенеза регенератов костной ткани челюстей после имплантации остеопластических материалов: автореф. дис. ... канд. мед.наук/С.А. Павлов. - Москва, МГМСУ, 2011. - 24 с.

128. Панин, А.М. Лечение хронических форм пародонтита средней и тяжелой степени с использованием остеопластических материалов/А.М. Панин, Г.А. Воложин, А.С. Баскова, К.С. Десятниченко, Д.В. Басков //Пародонтология. – 2015. - №1[4]. – С.50-60.

129. Парфенова, Е.В. Поиск новых «инструментов» для терапевтического ангиогенеза / Е.В. Парфенова// Молекулярная медицина. – 2006. – № 2. – С. 10–23.

130. Паюшина, О.В. Мезенхимные стромальные клетки из эмбриональных и дефинитивных источников: фенотипические и функциональные особенности: дис. ... д.б.н./ О.В. Паюшина, МГУ им. М.В. Ломоносова. - Москва, 2015. - 328 с.

131. Петренко, А.Ю. Перспективы применения в трансплантологии мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток в составе гидрогелей, микросфер и широкопористых криогелей на основе альгината / А.Ю. Петренко, Ю.А. Петренко, А.И.Правдюк [и др.] // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: сб. тез. IV Всерос. симпоз., СПб., 21–22 апреля 2010. – С. 176–177.

132. Петренко, А.Ю. Стволовые клетки. Свойства и перспективы клинического применения/ А.Ю. Петренко, Ю.А. Хунов, Э.Н. Иванов - Луганск, 2011: ООО “Пресс-Экспресс”, 368 с.

133. Пинаев, Г.П. Клеточная биотехнология: учебное пособие / Г.П. Пинаев, М.И. Блинова, Н.С. Николаенко - СПб.: Изд-во Политехн. ун-та. - 2011. - С. 202-206.

134. Плакса, И.Л. Регенерационный гистогенез в посттравматических параоссальных гематомах у человека / И.Л. Плакса [и др.]// в сборнике трудов Вопросы морфологии XXI «Гистогенез, реактивность и регенерация тканей», вып. 5, С.-Пб., 2018. - С. 191-196.

135. Полякова, М.В. Фармацевтическое использование стволовых клеток: современные технологии и новые виды промышленного применения/М.В. Полякова//в сб. мат-лов I Международной научно-практической конференции. Под общ.ред.проф.С.В. Беспаловой.– 2018. – С.101-102.

136. Решетов, И.В. Разработка трехмерного биосовместимого матрикса для задач реконструктивной хирургии / И.В. Решетов, О.И. Старцева, А.Л. Истранов [и др.]/ Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии. – 2016. – № 2. – С. 85–95.

137. Решетов, И.В. Современные биоинженерные конструкции для реконструкции костной ткани / И.В. Решетов, А.С. Зелянин, В.В. Филиппов [и др.]// *Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии.* – 2016. – № 1. – С. 50–59.

138. Ризванов, А.А. Патент РФ №2557385 от 24.06.2015. Кодон-оптимизированные последовательности фармацевтическая композиция для восстановления кровеносных сосудов: А.А. Ризванов, В.В. Соловьева, И.И. Салафутдинов, А.А.Исаев, Р.В. Деев, И.Я. Бозо: заявитель Общество с ограниченной ответственностью «НекстГен»: заявка №2014124845/10А от 18.06.2014//*Бюллетень.* – 2015.– 7с.

139. Рубникович, С.П. Применение мезенхимальных стволовых клеток в лечении рецессии десны в эксперименте/ С.П. Рубникович, Ю.Л.Денисова, В.А. Андреева, Г.Ю. Панасенкова, И.С. Хомич// *Кубанский научный медицинский вестник.* - 2018. - № 25 [5]. - С. 83-92.

140. Рубникович, С.П. Применение стволовых клеток в стоматологии/ С.П. Рубникович, Г.Ю.Панасенкова // *Стоматология. Эстетика. Инновации.* - 2019. - Т. 3, № 2. - С. 144-155.

141. Рубникович, С.П. Стоматологические клеточные биотехнологии в лечении болезней периодонта/ С.П. Рубникович, И.Д.Волотовский, Ю.Л.Денисова [и др.]// *Стоматология. Эстетика. Инновации.* - 2019. - Т. 3, № 2. - С. 136-143.

142. Садилина, С.В. Обоснование различных методов костной пластики альвеолярного отростка верхней челюсти и альвеолярной части нижней челюсти при подготовке к протезированию зубов: дис. ...канд. мед.наук /С.В.Садилина, С.-Пб., 2018. – 194 с.

143. Садовой, М.А. Клеточные матрицы [скаффолды] для целей регенерации кости: современное состояние проблемы/М.А. Садовой, П.М. Ларионов, А.Г. Самохин, О.М. Рожнова//*Хирургия позвоночника.* – 2014. – №2. – С.79-86.

144. Самойлова, Е.М. Репрограммирование клеток с сохранением эпигенетического возраста: преимущество или ограничение? /Е.М.Самойлова, В.П. Баклаушев//Биохимия. – 2020. – Т.85, №9. – С.1240-1255.

145. Самчук, Д.П. Сравнительный анализ секреторного профиля мезенхимальных стромальных клеток десны человека, дифференцированных в миогенном направлении/Д.П. Самчук, А.А.Пулин, А.И. Еремин [и др.]//Гены и клетки. – 2015. -Т.10, №3. – С.94-105.

146. Саркисов, Д.С. Микроскопическая техника: руководство для врачей и лаборантов / Под ред. Д.С. Саркисова, Ю.Л. Перова. – М.: «Медицина», 1996. – С. 544.

147. Семенов, М.Г. Перспективы применения стволовых клеток в реконструктивно-восстановительной хирургии челюстно-лицевой области / М.Г. Семенов, Ю.В. Степанова, Д.О. Трошичева // Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста. – 2016. – Т.4, № 4. – С. 84–92.

148. Семченко, В.В. Фундаментальные и клинические аспекты регенеративной биологии и медицины / В.В. Семченко, С.С. Степанов, Н.М.Дюрягин [и др.] // Вестник Уральской медицинской академической науки. – 2013. – № 4 [46]. – С. 138–141.

149. Тарасенко, С.В. Применение синтетических остеопластических материалов для увеличения параметров альвеолярной кости челюстей перед дентальной имплантацией / С.В. Тарасенко, А.М. Ершова // Стоматология. – 2017. – Т. 96, № 2. – С. 70–74.

150. Тарба, И.И. Замещение костных дефектов челюстных костей посредством применения разработанной тканеинженерной конструкций/И.И. Тарба, Э.А. Базикян, Г.А. Воложин //Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2017. – Том 62, №4. – С.239-240.

151. Татаренко-Козмина, Т.Ю. Применение мезенхиальных стромальных клеток, нанесенных на композиционные материалы для

оптимизации регенерации костной ткани/Т.Ю. Татаренко-Козмина, В.Н. Матвеева, В.Ф. Лосев, С.В. Холодов, Н.Н. Мальгинов // «Патологическая физиология и экспериментальная терапия». -2007. - № 1. - С.8-10.

152. Тер-Асатуров, Г.П. Экспериментальная оценка биологических материалов, используемых в реконструктивной хирургии / Г.П. Тер-Асатуров, А.Т. Бигвава, А.Ю. Рябов, Ю.Б. Юрасова, М.В. Лекишвили // Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: сборник тезисов IV Всерос. симпозиума. (СПб., 21-22 апреля 2010). - С. 125-128.

153. Терновой, Ю.В. Оценка влияния стромальных клеток жировой ткани на ангиогенез в тканях пародонта: экспериментальное исследование: автореф. дис. ... канд. мед. наук/ Ю.В. Терновой. - Москва, ЦНИИС и ЧЛХ. - 2013. - 25 с.

154. Усиков, Д.В. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации костной ткани челюстей /Д.В. Усиков, А.К. Иорданишвили, Д.В. Балин, Е.В. Шенгелия. - СПб.: Нордмедиздат, 2014. – 144 с.

155. Фионова, Э.В. Анализ репаративных процессов в нижней челюсти при использовании модифицированных остеопластических материалов серии «Гапкол» с мезенхимальными стволовыми клетками: дис. ... канд. мед. наук /Э.В. Фионова - Москва, МГМСУ, 2008. - 135 с.

156. Фионова, Э.В. Репаративные процессы в нижней челюсти кроликов при использовании остеопластического материала «Индост» пластины с мезенхимальными стромальными клетками/ Э.В. Фионова, К.С. Десятниченко, А.А. Докторов, А.И. Воложин // Cathedra. -2008. - Т.7. - №1. - С.16-20.

157. Фролова, Е.Н. Заживление костного дефекта в челюсти кроликов под влиянием ксеногенных мезенхимальных стволовых клеток костного мозга, культивированных на титановых носителях / Е.Н. Фролова, Н.Н. Мальгинов, А.С. Григорьян [и др.] // Российский стоматологический журнал. – 2008. – № 3. – С. 12–14.

158. Хлусов, И.А. Концепция «ниша – рельеф» для стволовых клеток как основа биомиметического подхода к инженерии костной и кроветворной тканей /И.А. Хлусов, Н.М. Шевцова, М.Ю. Хлусова [и др.]// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 4, № 2. – С. 55–64.

159. Цициашвили, А.М. Биомодель костной ткани и ксеногенного костного трансплантата: механические свойства/А.М. Цициашвили, А.М. Панин, С.Д. Арутюнов [и др.]//Российский стоматологический журнал. – 2019. – Т.23, №6. – С.254-262.

160. Цициашвили, А.М. Остеоинтеграция дентальных имплантатов в условиях увеличенного объема костной ткани методом ротации костного лоскута. Клинические наблюдения/А.М. Цициашвили, А.М. Панин//Стоматология. – 2018. – Т.97, №2. – С.44-48.

161. Цыганова, И.В. Комплексное лечение больных генерализованным пародонтиом с применением метода направленной регенерации альвеолярного отростка/И.В. Цыганова, В.Ф. Куцевляк, В.И. Куцевляк//Вестник стоматологии. -2015. -№3[92]. – С.37-40.

162. Чайлахян, Р.К. Действие нетермической газовой плазмы на пролиферативную активность и адгезивные свойства мультипотентных стромальных клеток к матриксам, разработанным для тканеинженерных конструкций/Р.К. Чайлахян, А.Г.Грошева, Ю.В.Герасимов [и др.]//Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2019. - №1. – С.69-76.

163. Чеканов, А.В. Создание остеоиндуктивных материалов нового поколения для регенерации костной ткани на основе рекомбинантных морфогенетических белков семейства BMP /А.В. Чеканов, И.С. Фадеева, В.С. Акатов, М.Е. Соловьева// Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: сборник тезисов IV Всероссийский симпозиум, СПб., 21–22 апреля 2010. – С. 199–200.

164. Шаповалова, Е.Ю. Актуальные вопросы гистологии. Регенеративные возможности тканей и органов/ Е. Ю. Шаповалова, С. В.

Харченко, Е. И. Купша, Ю. Г. Барановский. - Симферополь: ДИАЙПИ, 2017. - 128 с.:ил.

165. Швальб, П.Г. Эффективность и безопасность применения препарата «Неоваскулген» в комплексной терапии пациентов с хронической ишемией нижних конечностей [Шь-III фаза клинических исследований] / П.Г. Швальб, А.В. Гавриленко, Р.Е. Калинин [и др.]// Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, № 3. – С. 76-83.

166. Швырков, М.Б. Стадийность регенерации кости и основы фармакологической коррекции репаративного остеогенеза нижней челюсти / М.Б. Швырков // Стоматология. – 2012. – Т. 91. – № 1. – С. 9–12.

167. Шишацкая, Е.И. Полигидроксиалканоаты как матрикс в клеточных технологиях / Е.И. Шишацкая, Т.Г. Волова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Том V, № 3. – С. 55–56.

168. Шумилова, А.А. Потенциал биоразрушаемых полигидроксиалканоатов в качестве костнопластических материалов: Дис. ... канд. мед.наук/А.А. Шумилова. - Красноярск, «Сибирский Федеральный Университет», 2015. – 145 с.

169. Щаницын, В.А. Современные концепции стимуляции регенерации костной ткани с использованием биологически активных скаффолдов/В.А. Щаницын, А. Н. Иванов, В. Ю. Ульянов, И. А. Норкин // Цитология. -2019. - Том 61, № 1. - С. 16–34.

170. Яременко, А.И. Возможности применения полимерной матрицы на основе хитозана для возмещения дефекта верхней челюсти. Экспериментальное исследование /А.И. Яременко, Д.Н. Суслов, А.В. Лысенко, П.В. Попрядухин, В.Е.Юдин// Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2016. – № 5–2. – С. 259–261.

171. Яременко, А.И. Современные остеопластические и остеокондуктивные материалы. Состояние проблемы. Перспективы применения в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии / А.И. Яременко,

Д.В. Галецкий, В.О. Королев // Институт стоматологии. – 2011. – № 2 [51]. – С. 70–71.

172. Ярыгин, Е.И. Использование клеток пуповинной крови крыс при воспалительно-деструктивных процессах периодонта [экспериментальное исследование]: Автореф. дис. ...канд. мед.наук/Е.И. Ярыгин//Москва, Первый МГМУ им. И. М. Сеченова Минздрава России, 2015. – 24 с.

173. Alhadlaq, A. Adult stem cell driven genesis of human-shaped articular condyle/A. Alhadlaq, J.H. Elisseeff, L.Hong [et al.]// Ann. Biomed. Eng. – 2004. – Vol.32. – P.911–923.

174. Alhadlaq, A. Engineered adipose tissue from human mesenchymal stem cells maintains predefined shape and dimension: Implications in soft tissue augmentation and reconstruction/A. Alhadlaq, M. Tang, J.J. Mao// Tissue Eng. – 2005. – Vol.11. – P.556–566.

175. Alhadlaq, A. Tissue-engineered neogenesis of human-shaped mandibular condyle from rat mesenchymal stem cells/ A. Alhadlaq, J.J. Mao //Dent. Res.– 2003. – Vol. 82. – P.951–956.

176. Al-Munajjed, A.A. Development of a biomimetic collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering using a SBF immersion technique/A.A. Al-Munajjed, N.A. Plunkett, J.P. Gleeson, T. Weber, C. Jungreuthmayer, T. Levingstone, J. Hammer, F.J. O'Brien //Biomed. Mater Res. B Appl. Biomater.– 2009. – Vol.90[2]. – P.584–591.

177. Al-Munajjed, A.A. Influence of a novel calcium-phosphate coating on the mechanical properties of highly porous collagen scaffolds for bone repair/ A.A. Al-Munajjed, F.J.O'Brien //Mech. Behav. Biomed. Mater. – 2009. – Vol.2[2].– P.138–146.

178. Al-Sharabi, N. Conditioned medium from human bone marrow stromal cells attenuates initial inflammatory reactions in dental pulp tissue/ N. Al-Sharabi, M. Mustafa, M. Ueda, Y. Xue, K. Mustafa, I. Fristad // Dental Traumatology. – 2017. – Vol.33[1]. – P.19–26.

179. Amuk, N.G. Effects of cell-mediated osteoprotegerin gene transfer and mesenchymal stem cell applications on orthodontically induced root resorption of rat teeth/ N.G. Amuk, G. Kurt, Y. Baran [et al.]// *European Journal of Orthodontics*. – 2017. – Vol.39[3]. – P.235–242.

180. Anderson, E.M. Local delivery of VEGF and SDF enhances endothelial progenitor cell recruitment and resultant recovery from ischemia/E.M. Anderson, B.J. Kwee, S.A. Lewin, T. Raimondo, M. Mehta, D.J.Mooney// *Tissue Eng. Part A*. - 2015. - Vol.21[7-8]:1217-27.

181. Arkudas, A. Axial prevascularization of porous matrices using an arteriovenous loop promotes survival and differentiation of transplanted autologous osteoblasts/ A. Arkudas, J.P. Beier, K.Heidner [et al.]// *Tissue Eng*. – 2007. – Vol.13. – P.1549–1560.

182. Atluri, K. Nanoplex-Mediated Codelivery of Fibroblast Growth Factor and Bone Morphogenetic Protein Genes Promotes Osteogenesis in Human Adipocyte-Derived Mesenchymal Stem Cells/ K. Atluri, D. Seabold, L. Hong, S. Elangovan, A.K. Salem // *Molecular pharmaceutics*.– 2015. -Vol.12[8]. – P.3032-3042

183. Avilés, M.O. The contribution of plasmid design and release to in vivo gene expression following delivery from cationic polymer modified scaffolds/ M.O. Avilés, C.H. Lin, M. Zelivyanskaya, J.G. Graham, R.M. Boehler, P.B. Messersmith, L.D. Shea // *Biomaterials*. – 2010. – Vol.31[6]. – P.1140–1147.

184. Baksh,D. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy/D. Baksh, L. Song, R.S. Tuan // *Cell Mol. Med*. - 2004. – Vol.8. – P.301-316.

185. Bernstein, S. Vertical bone augmentation: Where are we now?/ S. Bernstein, J. Cooke, P. Fotek, H.L.Wang // *Implant Dent*. - 2006. - Vol.15. - P.219–228.

186. Bluteau, G. Stem cells for tooth engineering/ G. Bluteau, H.U. Luder, C. De Bari, T.A. Mitsiadis // *Eur Cell Mater*. – 2008. – Vol.16. – P.1–9.

187. Boink, M.A. Different wound healing properties of dermis, adipose, and gingiva mesenchymal stromal cells/ M.A. Boink, L.J. van den Broek, S. Roffel, K. Nazmi, J.G. Bolscher, A. Gefen, E.C. Veerman, S.Gibbs // *Wound Repair Regen.* – 2016. – Vol.24. – P.100–109.

188. Bonadio, J. Localized, direct plasmid gene delivery in vivo: prolonged therapy results in reproducible tissue regeneration/ J. Bonadio, E. Smiley, P. Patil, S. Goldstein // *Nature medicine.* – 1999. – Vol. 5[7]. – P.753–759.

189. Bonadio, J. Review: local gene delivery for tissue regeneration/ J. Bonadio// *Regenerative medicine.* – 2000. – Vol.1[2]. – P.25–29.

190. Bose, S. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds/ S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay // *Trends in biotechnology.*– 2012. – Vol.30[10]. – P.546–554.

191. Bruder, S.P. Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells /S.P. Bruder, A.A. Kurth, M. Shea, W.C. Hayes, N. Jaiswal, S. Kadiyala // *Orthopaedic Research.* – 1998. – Vol.16[2]. – P.155–162.

192. Campoccia, D. Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification/ D. Campoccia, P. Doherty, M. Radice, P. Brun, G. Abatangelo, D.F.Williams // *Biomaterials.* – 1998. – Vol.19[23]. – P.2101–2127.

193. Carano, R.A.D. Angiogenesis and bone repair/ R.A.D. Carano, E.H.Filvaroff // *Drug Discov Today.* – 2003. – Vol.8. – P.980–989.

194. Choong, C.S.N. Co-culture of bone marrow fibroblasts and endothelial cells on modified polycaprolac-tone substrates for enhanced potentials in bone tissue engineering/ C.S.N. Choong, D.W. Hutmacher, J.T. Triffitt // *Tissue Eng.* – 2006. – Vol.12. – P.2521–2531.

195. d’Aquino, R. Human mandible bone defect repair by the grafting of dental pulp stem/progenitor cells and collagen sponge biocomplexes/ R. d’Aquino, A. De Rosa, V. Lanza, V. Tirino, L. Laino, A. Graziano, V. Desiderio, G. Laino, G.Papaccio // *Eur. Cell Mater.*– 2009. – Vol.18. – P.75–83.

196. De Laporte, L. Matrices and scaffolds for DNA delivery in tissue engineering/ L. De Laporte, L.D. Shea // *Adv. Drug. Deliv. Rev.*– 2007. – Vol.59[4–5]. – P.292–307.

197. Do, A.V. Controlled and Sequential Delivery of Fluorophores from 3D Printed Alginate-PLGA Tubes/ A.V. Do, A. Akkouch, B. Green, I. Ozbolat, A. Debabneh, S. Geary, A.K.Salem // *Annals of biomedical engineering.*– 2017. - Vol.45. – P.297–305

198. Doukas, J. Delivery of FGF genes to wound repair cells enhances arteriogenesis and myogenesis in skeletal muscle/ J. Doukas, K. Blease, D. Craig, C. Ma, L.A. Chandler, B.A. Sosnowski, G.F.Pierce // *Mol. Ther.*– 2002. – Vol.5[5 Pt 1]. – P.517–527.

199. Dowding, J.M. Cerium oxide nanoparticles accelerate the decay of peroxynitrite [ONOO⁻]/ J.M. Dowding, S. Seal, W.T. Self // *Drug Delivery and Translational Research.* - 2013. - Vol. 3, Iss. 4. - P. 375–379.

200. Du J. Allogeneic bone marrow mesenchymal stem cell transplantation for periodontal regeneration/J. Du [et al.]// *Dental Research.* – 2014. – Vol.93[2]. – P.183–188.

201. Elangovan, S. The enhancement of bone regeneration by gene activated matrix encoding for platelet derived growth factor/ S. Elangovan, S.R. D'Mello, L. Hong [et al.]// *Biomaterials.* – 2014. – Vol.35[2]. – P.737–747.

202. El-Sayed, F. Adult mesenchymal stem cells explored in the dental field. In: Weyand B., Dominici M., Hass R., Jacobs R., Kasper C., editors. *Mesenchymal Stem Cells - Basics and Clinical Application II.* Vol. 130/ F. El-Sayed, C. Dörfer, F. Fändrich, F. Gieseler, M.H. Moustafa, H. Ungefroren // Berlin, Heidelberg: Springer; 2012.- P.89–103.

203. El-Sayed F., K.M. Animal models for periodontal tissue engineering: a knowledge-generating process/ K.M. Fawzy El-Sayed, C.E. Dörfer // *Tissue Engineering Part C: Methods.* – 2017. – Vol.23[12]. – P.900–925.

204. Eremin, I. Autologous gingival multipotent mesenchymal stromal cells and adipose-derived regenerative cells for maxillofacial reconstruction: pilot study/

I. Eremin, V. Zorin, R. Deev, G. Volozhin [et al.]// *Tissue Eng. Regen. Med.* – 2014. - Vol. 8 [Suppl. 1]. – P. 439-439.

205. Fehrer, C. Reduced oxygen tension attenuates differentiation capacity of human mesenchymal stem cells and prolongs their lifespan/ C. Fehrer, R. Brunauer, G. Laschober [et al.]// *Aging Cell.* – 2007. – Vol.6. – P.745–757.

206. Fortier, L.A. Stem cells, classifications, controversies and clinical applications/ L.A. Fortier // *Vet Surg.*– 2005. – Vol.34. – P.415–423.

207. Friesenbichler, J. Adverse reactions of artificial bone graft substitutes: Lessons learned from using tricalcium phosphate geneXR/J. Friesenbichler, W. Maurer-Ertl, P. Sadoghi [et al.]// *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 2014. - Vol.472. – P.976–682.

208. Gao, X. Immunomodulatory role of stem cells from human exfoliated deciduous teeth on periodontal regeneration/X. Gao, Z. Shen, M. Guan [et al.]// *Tissue Engineering Part A.* – 2018. – Vol.24[17-18]. – P.1341–1353.

209. Gardner, R.L. Stem cells: Potency, plasticity and public perception/ R.L.Gardner // *Anat.*– 2002. – Vol.200. – P.277–282.

210. Gill, D.R. The prefabrication of a bone graft in a rat model/ D.R. Gill, D.C. Ireland, J.V. Hurley, W.A. Morrison // *Hand Surg.* – 1998. – Vol.23. – P.312–321.

211. Glass, C.K. Molecular control of activation and priming in macrophages/ C.K. Glass, G. Natoli // *Nature Immunology.* – 2016. – Vol.17[1]. – P.26–33.

212. Gleeson, J.P. Addition of hydroxyapatite improves stiffness, interconnectivity and osteogenic potential of a highly porous collagen-based scaffold for bone tissue regeneration/ J.P. Gleeson, N.A. Plunkett, F.J. O'Brien // *Eur. Cell Mater.*– 2010. – Vol.20. – P.218–230.

213. Grayson, W.L. Engineering anatomically shaped human bone grafts/ W.L. Grayson, M. Fröhlich, K. Yeager [et al.]// *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*– 2010. – Vol.107. – P.3299–3304.

214. Grayson, W.L. Hypoxia enhances proliferation and tissue formation of human mesenchymal stem cells/ W.L. Grayson, F. Zhao, B. Bunnell, T.Ma // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*– 2007. – Vol.358. – P.948–953.

215. Graziano, A. Dental pulp stem cells: A promising tool for bone regeneration/ A. Graziano, R. d'Aquino, G. Laino, G.Papaccio // *Stem Cell Rev.*– 2008. – Vol.4. – P.21–26.

216. Gronthos, S. Molecular and cellular characterisation of highly purified stromal stem cells derived from human bone marrow/ S. Gronthos,A.C. Zannettino, S.J. Hay, S. Shi, S.E. Graves, A. Kortessidis, P.J. Simmons // *Cell Sci.*- 2003. – Vol.116. – P.1827-1835.

217. Gronthos,S. Postnatal human dental pulp stem cells [DPSCs] in vitro and in vivo/S. Gronthos, M. Mankani, J. Brahim, P.G. Robey, S. Shi // *Proc Natl Acad Sci USA* 97. - 2000. – P.13625-13630.

218. Gronthos, S. Stem cell properties of human dental pulp stem cells/ S. Gronthos, J. Brahim, W. Li, L.W. Fisher, N. Cherman, A. Boyde, P. DenBesten, P.G. Robey, S. Shi // *Dent Res.*– 2002. – Vol.81. – P.531–535.

219. Guo, T. Porous chitosan-gelatin scaffold containing plasmid DNA encoding transforming growth factor-beta1 for chondrocytes proliferation/T. Guo, J. Zhao, J. Chang, Z. Ding, H. Hong, J. Chen, J. Zhang// *Biomaterials.* – 2006. – Vol.27[7]. – P.1095–1103.

220. Gurdon, J.B. The first half-century of nuclear transplantation/ J.B. Gurdon, J.A. Byrne // *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*– 2003. – Vol.100. – P.8048–8052.

221. Hajishengallis, G. The keystone-pathogen hypothesis/G.Hajishengallis, R.P. Darveau, M.A. Curtis // *Nature Reviews Microbiology.*– 2012. – Vol.10[10]. – P.717–725.

222. Hayflick, L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains/ L. Hayflick// *Exp. Cell Res.* – 1965. – Vol.37. – P.614–636.

223. Hiraoka, Y. Fabrication and biocompatibility of collagen sponge reinforced with poly[glycolic acid] fiber/ Y. Hiraoka, Y. Kimura, H. Ueda, Y.Tabata // Tissue Eng.– 2003. – Vol.9[6]. – P.1101–1112.

224. Hirst, S.M. Anti-inflammatory properties of cerium oxide nanoparticles / S.M. Hirst, A.S. Karakoti, R.D. Tyler, N. Sriranganathan, S. Seal, C.M. Reilly// Nanotherapeutics. -2009. - Vol. 5[24]. - P. 2848–2856.

225. Horn, N.A. Cancer gene therapy using plasmid DNA: purification of DNA for human clinical trials/ N.A. Horn, J.A. Meek, G. Budahazi, M. Marquet // Hum. Gene Ther. – 1995. – Vol.6[5]. – P.565–573.

226. Hosseinkhani, H. Enhanced ectopic bone formation using a combination of plasmid DNA impregnation into 3-D scaffold and bioreactor perfusion culture/ H. Hosseinkhani, M. Yamamoto, Y. Inatsugu, Y. Hiraoka, S. Inoue, H. Shimokawa, Y.Tabata //Biomaterials. – 2006. – Vol.27[8]. – P.1387–1398.

227. Huang, C.-Y.C. Plasticity of stem cells derived from adult periodontal ligament/ C.-Y.C. Huang [et al.]//Regenerative Medicine. – 2009. – Vol.4[6]. – P.809–821.

228. Huang, G.T. A paradigm shift in endodontic management of immature teeth: Conservation of stem cells for regeneration/ G.T.Huang //Dent. – 2008. – Vol.36. – P.379–386.

229. Huang, G.T. Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs those from other sources: Their biology and role in regenerative medicine/ G.T. Huang, S. Gronthos, S. Shi //Dent Res. – 2009. – Vol.88. – P.792–806.

230. Huang, G.T. Stem/progenitor cell-mediated *de novo* regeneration of dental pulp with newly deposited continuous layer of dentin in an *in vivo* model/ G.T. Huang, T. Yamaza, L.D. Shea, F. Djouad, N.Z. Kuhn, R.S. Tuan, S. Shi // Tissue Eng. Part A. - [2009]. – Vol.16. – P.605–615.

231. Huang, Y.C. Fabrication and in vitro testing of polymeric delivery system for condensed DNA/ Y.C. Huang, M. Connell, Y. Park, D.J. Mooney, K.G.Rice //Biomed. Mater Res. A.– 2003. – Vol.67[4]. – P.1384–1392.

232. Iguchi, S. Effect of local bone marrow stromal cell administration on ligature-induced periodontitis in mice/S. Iguchi, D. Suzuki, E. Kawano [et al.]// Oral Science. – 2017. – Vol.59[4]. – P.629–637.

233. International Organization for Standardization [ISO]. ISO 7405: Dentistry–Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry–Test methods for dental materials. Geneva, Switzerland: ISO; 1997.

234. Iohara, K. Dentin regeneration by dental pulp stem cell therapy with recombinant human bone morphogenetic protein 2/K. Iohara, M. Nakashima, M. Ito, M. Ishikawa, A. Nakasima, A. Akamine //Dent Res. – 2004. – Vol.83. – P.590–595.

235. Ivanov, V.K. Synthesis and thermal stability of nanocrystalline ceria sols stabilized by citric and polyacrylic acid/ V.K. Ivanov, O.S. Polezhaeva, A.S. Shaporev, A.E. Baranchikov, A.B. Shcherbakov, A.V.Usatenko // Russian Journal of Inorganic Chemistry. -2010. – Vol.55[3]. – P. 328-332.

236. Iwata, T. Periodontal regeneration with multi-layered periodontal ligament-derived cell sheet in a canine model/ T. Iwata, M. Yamato, H. Tsuchioka, R. Takagi, S. Mukobata, K. Washio, T. Okano, I. Ishikawa // Biomaterials.– 2009. – Vol.30. – P.2716–2723.

237. Jain, R.K. Molecular regulation of vessel maturation/ R.K.Jain // Nat Med.– 2003. – Vol.9. – P.685–693.

238. Jang, J.H. Plasmid delivery in vivo from porous tissue-engineering scaffolds: transgene expression and cellular transfection/ J.H. Jang, C.B. Rives, L.D. Shea //Mol Ther.– 2005. – Vol.12[3]. – P.475–483.

239. Jones, E. Mesenchymal stem cells and bone regeneration:current status/ E. Jones, X.Yang // Injury.– 2011. – Vol. 42[6]. – P.562–568.

240. Kaigler, D. Endothelial cell modulation of bone marrow stromal cell osteogenic potential/ D. Kaigler, P.H. Krebsbach, E.R. West, K. Horger, Y.C. Huang, D.J. Mooney // FASEB. – 2005. – Vol.19. – P.665–667.

241. Kaigler, D. Transplanted endothelial cells enhance orthotopic bone regeneration/ D. Kaigler, P.H. Krebsbach, Z. Wang, E.R. West, K. Horger, D.J. Mooney //Dent Res. – 2006. – Vol.85. – P.633–637.

242. Kawaguchi, H. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells/ H. Kawaguchi, A. Hirachi, N. Hasegawa [et al.]//Periodontol.– 2004. – Vol.75. – P.1281–1287.

243. Kawamura, K. Experimental study of vascularized tissue-engineered bone grafts/ K. Kawamura, H. Yajima, H. Ohgushi, Y. Tomita, Y. Kobata, K. Shigematsu, Y. Takakura //Plast. Reconstr. Surg. – 2006. – Vol.117. – P.1471–1479.

244. Keller, G.M. In vitro differentiation of embryonic stem cells/ G.M. Keller //Curr. Opin. Cell Biol.– 1995. – Vol.7. – P.862–869.

245. Kessler, P.D. Gene delivery to skeletal muscle results in sustained expression and systemic delivery of a therapeutic protein/ P.D. Kessler, G.M. Podsakoff, X. Chen [et al.]// Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.– 1996. – Vol.93[24]. – P.14082–14087.

246. Kneser, U. Tissue engineering of bone: the reconstructive surgeon's point of view/ U. Kneser, D.J. Schaefer, E. Polykandriotis, R.E.Horch //Cell Mol. Med. – 2006. – Vol.10. – P.7–19.

247. Kolf, C. Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation/ C. Kolf, E. Cho, R. Tuan // Arthritis Res. Ther. - 2007. – Vol.9. – P.204-204.

248. Langenbach, F. Osteogenic differentiation influences stem cell migration out of scaffold-free microspheres/ F. Langenbach, C. Naujoks, P.V. Kersten-Thiele, K. Berr, R.A. Depprich, N.R. Kübler, G. Kögler, J. Handschel// Tissue Eng. Part A.– 2010. – Vol.16. – P.759–766.

249. Langer, R. Drug delivery and targeting/ R. Langer // Nature.– 1998. – Vol.392 [6679 Suppl]. – P.5–10.

250. Langer, R. Tissue engineering/ R. Langer, J.P. Vacanti // Science. – 1993. – Vol.260 [5110]. – P.920–926.

251. Laschke, M.W. Angiogenesis in tissue engineering: Breathing life into constructed tissue substitutes/ M.W. Laschke, Y. Harder, M. Amon [et al.]// *Tissue Eng.*– 2006. – Vol.12. – P.2093–2104

252. Lendeckel, S. Autologous stem cells [adipose] and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: Case report/ S. Lendeckel, A. Jödicke, P. Christophis [et al.]//*Craniofac. Surg.*– 2004. – Vol.32. – P.370–373.

253. Leppänen, V.M.Structural and mechanistic insights into VEGF receptor 3 ligand binding and activation/ V.M.Leppänen, D. Tvorogov, K. Kisko [et al.]//*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* -2013. – Vol. 110. – P.12960-12965.

254. Levenberg S. Engineering vascularized skeletal muscle tissue/ S. Levenberg, J. Rouwkema, M. Macdonald [et al.]// *Nat Biotechnol.*– 2005. – Vol.23.-P.879–884.

255. Li, Y. Resveratrol-conjugated poly-epsilon-caprolactone facilitates in vitro mineralization and in vivo bone regeneration/ Y. Li, S. Danmark, U. Edlund [et al.]// *Acta Biomaterialia.* – 2011. – Vol.7[2]. – P.751–758.

256. Li, Z. Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells/ Z. Li, C.M. Jiang, S. An [et al.]// *Oral Diseases.* – 2013. – Vol.20[1].-P.25–34.

257. Lieberman, J.R. The effect of regional gene therapy with bone morphogenetic protein-2- producing bone-marrow cells on the repair of segmental femoral defects in rats/ J.R. Lieberman, A. Daluiski, S. Stevenson [et al.]// *Bone and Joint Surgery - Series A.* – 1999. – Vol.81[7]. – P.905–917.

258. Lisignoli, G. Basic fibroblast growth factor enhances in vitro mineralization of rat bone marrow stromal cells grown on non-woven hyaluronic acid based polymer scaffold/ G. Lisignoli, N. Zini, G. Remiddi [et al.]// *Biomaterials.* – 2001. – Vol.22[15]. – P.2095–2105.

259. Liu J. Mechanisms of guided bone regeneration: A review/ J. Liu, D.G.Kerns // *Open Dent. J.* - 2014. - Vol.8. - P.56–65.

260. Liu, X. Porogen-induced surface modification of nano-fibrous poly[L-lactic acid] scaffolds for tissue engineering/ X. Liu, Y. Won, P.X. Ma //Biomaterials. – 2006. – Vol.27[21]. – P.3980–3987.

261. Liu, Y. Disulfide-crosslinked hyaluronan–gelatin sponge: Growth of fibrous tissue in vivo/ Y. Liu, X.Z. Shu, S.D. Gray, G.D.Prestwich //Biomedical Materials Research Part A. – 2004. – Vol.68A[1]. – P.142–149.

262. Liu, Y. Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine/ Y. Liu, Y. Zheng, G. Ding [et al.]// Stem Cells.– 2008.-Vol.26. – P.1065–1073.

263. Mao, J.J. Craniofacial tissue engineering by stem cells/ J.J. Mao, W.V. Giannobile, J.A. Helms, S.J. Hollister, P.H. Krebsbach, M.T. Longaker, S.Shi //Dent Res. – 2006. – Vol.85. – P.966–979.

264. Marei, M.K. Experimental formation of periodontal structure around titanium implants utilizing bone marrow mesenchymal stem cells: A pilot study/ M.K. Marei, M.M. Saad, A.M. El-Ashwah, R.M. El-Backly, M.A. Al-Khodary//Oral Implantol. – 2009. -Vol.35. – P.106–129.

265. Mareschi, K. Isolation of human mesenchymal stem cells: bone marrow versus umbilical cord blood/K. Mareschi, E. Biasin, W. Piacibello [et al.]//Haematologica. - 2001. – Vol.86. – P.1099-1100.

266. Marolt, D. Bone and cartilage tissue constructs grown using human bone marrow stromal cells, silk scaffolds and rotating bioreactors/ D. Marolt, A. Augst, L.E. Freed [et al.]// Biomaterials.– 2006. – Vol.27. – P.6138–6149.

267. Marrelli, M. Cells isolated from human periapical cysts express mesenchymal stem cell-like properties/M. Marrelli, F. Paduano, M. Tatullo// *Biological Sciences*. – 2013. – Vol.9[10]. – P.1070–1078.

268. Marrelli, M. Human periapical cyst–mesenchymal stem cells differentiate into neuronal cells/ M. Marrelli, F. Paduano, M. Tatullo //Dental Research. – 2015. – Vol.94 [6]. – P.843–852.

269. Martin-Rendon, E. Transcriptional profiling of human cord blood CD133+ and cultured bone marrow mesenchymal stem cells in response to

hypoxia/ E. Martin-Rendon, S.J. Hale, D. Ryan [et al.]// *Stem Cells*. – 2007. – Vol.25. – P.1003–1012.

270. Marynka-Kalmani, K. The lamina propria of adult human oral mucosa harbors a novel stem cell population/K. Marynka-Kalmani, S. Treves, M. Yafee, H. Rachima, Y. Gafni, M.A. Cohen, S. Pitaru // *Stem Cells*. – 2010. – Vol.28[5]. – P.984–995.

271. McGadey, J. A tetrazolium method for non-specific alkaline phosphatase/ J. McGadey // *Histochemie*. - 1970. – Vol.23. – P. 180-184.

272. Melzer, C. Concise Review: Crosstalk of mesenchymal stroma/stem-like cells with cancer cells. Provides therapeutic potential/ C. Melzer, J. von der Ohe, R. Hass // *Stem Cells*. – 2018. – Vol.36. – P.951–968.

273. Meury, T. Human endothelial cells inhibit BMSC differentiation into mature osteoblasts *in vitro* by interfering with osterix expression/ T. Meury, S. Verrier, M. Alini // *Cell Biochem*. – 2006. – Vol.98. – P.992–1006.

274. Miranville, A. Improvement of postnatal neovascularization by human adipose tissue-derived stem cells/ A. Miranville, C. Heeschen, C. Sengenès, C.A. Curat, R. Busse, A. Bouloumié// *Circulation*. – 2004. – Vol.110. – P.349–355.

275. Miser, A.W. The prevalence of pain in a pediatric and young adult cancer population/A.W. Miser, J.A. Dothage, R.A. Wesley, J.S. Miser // *Pain*. – 1987. – Vol.29. – P.73–83.

276. Mitrano, T.I. Culture and characterization of mesenchymal stem cells from human gingival tissue/T.I. Mitrano, MS Grob, F Carrión, E. Nova-Lamperti, P.A. Luz, F.S. Fierro, A. Quintero, A. Chaparro, A. Sanz // *Periodontology*. – 2010. – Vol.81[6]. – P.917–925.

277. Miura, M. SHED: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth/ M. Miura, S. Gronthos, M. Zhao, B. Lu, L.W. Fisher, P.G. Robey, S. Shi // *Proc. Natl. Acad. Sci*. – 2003. – Vol.100. P.5807–5812.

278. Morszeck, C. Isolation of precursor cells [PCs] from human dental follicle of wisdom teeth/ C. Morszeck, W. Götz, J. Schierholz [et al.]// *Matrix Biol*. – 2005. – Vol.24. – P.155–165.

279. Morsczeck, C. Somatic stem cells for regenerative dentistry/ C. Morsczeck, G. Schmalz, T.E. Reichert, F. Völlner, K. Galler, O. Driemel// Clin. Oral Investig. - 2008. – Vol.12. – P.113-118.

280. Moslemi, N. Periosteal Releasing Incision With Diode Laser in Guided Bone Regeneration Procedure: A Case Series/ N. Moslemi, A. Khorsand, S. Torabi, A. Shahnaz, Y. Soleimani Shayesteh, R.Fekrazad //Lasers Med. Sci. – 2016. -Vol.7[4]. – P.259-264.

281. Muire, P.J. Time course of immune response and immunomodulation during normal and delayed healing of musculoskeletal wounds/ P.J. Muire, L.H. Mangum, J.C.Wenke //Front. Immunol. - 2020. – Vol. 11. – P. 1056-1056.

282. Murphy, C.M. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering/ C.M. Murphy, M.G. Haugh, F.J. O'Brien // Biomaterials.– 2010. – Vol.31[3]. – P.461–466.

283. Murphy, W.L. Bone regeneration via a mineral substrate and induced angiogenesis/ W.L. Murphy, C.A. Simmons, D. Kaigler, D.J.Mooney //Dent Res.– 2004. – Vol.83. – P.204–210.

284. Murphy, W.L. Salt fusion: an approach to improve pore interconnectivity within tissue engineering scaffolds/ W.L. Murphy, R.G. Dennis, J.L. Kileny, D.J.Mooney // Tissue Eng. – 2002. – Vol.8[1]. – P.43–52.

285. Nada, O.A. Stem cells from the apical papilla [SCAP] as a tool for endogenous tissue regeneration/O.A. Nada, R.M.El Backly//Front Bioeng Biotechnol. – 2018. – Vol.6. – P.103-103.

286. Nagatomo, K. Stem cell properties of human periodontal ligament cells/ K. Nagatomo, M. Komaki, I. Sekiya, Y. Sakaguchi, K. Noguchi, S. Oda, T. Muneta, I. Ishikawa //Periodontal Res. – 2006. – Vol.41. – P.303–310.

287. Nakahara, T. In situ tissue engineering of periodontal tissues by seeding with periodontal ligament-derived cells/ T. Nakahara, T. Nakamura, E. Kobayashi, K. Kuremoto, T. Matsuno, Y. Tabata, K. Eto, Y. Shimizu// Tissue Eng.– 2004. – Vol.10. – P.537–544.

288. Nishino, Y. Stem cells from human exfoliated deciduous teeth [SHED] enhance wound healing and the possibility of novel cell therapy/ Y. Nishino, Y. Yamada, K. Ebisawa [et al.]// *Cytherapy*. – 2011. – Vol.13. – P.598–605.

289. Nowotny, J. Translation of cell therapy into clinical practice: Validation of an application procedure for bone marrow progenitor cells and platelet rich plasma/ J. Nowotny, J. Farack, C. Vater, M. Johnsen, M. Gelinsky, T. Tonn, P.Kasten // *Appl Biomater Funct Mater.*- 2015. – Vol.14. – P.1–8.

290. O'Brien, F.J. Influence of freezing rate on pore structure in freeze-dried collagen-GAG scaffolds/ F.J. O'Brien, B.A. Harley, I.V. Yannas, L.Gibson // *Biomaterials.*– 2004. – Vol.25 [6]. – P.1077–1086.

291. Orsi, S. Cell recruitment and transfection in gene activated collagen matrix/ S. Orsi, A. De Capua, D. Guarnieri, D. Marasco, P.A. Netti // *Biomaterials.*– 2010. – Vol.31[3]. – P.570–576.

292. Paster, B.J. Bacterial diversity in human subgingival plaque/B.J. Paster, S.K. Boches, J.L. Galvin [et al.]//*Bacteriology*. – 2001. – Vol.183[12]. – P.3770–3783.

293. Pelissier, P. Influences of vascularization and osteogenic cells on heterotopic bone formation within a madreporic ceramic in rats/P. Pelissier, F. Villars, S. Mathoulin-Pelissier, R. Bareille, M.H. Lafage-Proust, J.Vilamitjana-Amedee // *Plast. Reconstr. Surg.*– 2003. – Vol.111. – P.1932–1941.

294. Penarrocha, M. Pain and inflammation after periapical surgery in 60 patients/ M. Penarrocha, B. Garcia, E. Marti, J. Balaguer//*Oral Maxillofac.Surg.* – 2006. – Vol.64. – P.429–433.

295. Peters, M.C. Engineering vascular networks in porous polymer matrices/ M.C. Peters, P.J. Polverini, D.J. Mooney//*Biomed Mater Res.* – 2002. – Vol.60. – P.668–678.

296. Phillips, P.G. Hypoxia induces capillary network formation in cultured bovine pulmonary microvessel endothelial cells/ P.G. Phillips, L.M. Birnby, A. Narendran //*Am J Physiol.*– 1995. – Vol.268. – P.789–800.

297. Planat-Benard, V. Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives/ V. Planat-Benard, J.S. Silvestre, B. Cousin [et al.]// *Circulation*.– 2004. – Vol.109. – P.656–663.

298. Polykandriotis, E. Autonomously vascularized cellular constructs in tissue engineering: opening a new perspective for biomedical science/ E. Polykandriotis, A. Arkudas, R.E. Horch, M. Stürzl, U.Kneser // *Cell Mol. Med.*– 2007. – Vol.11. – P.6–20.

299. Popov, A.L. Radioprotective effect of ultra-small citrate-stabilized cerium oxide nanoparticles in vitro and in vivo / A.L. Popov, Z. Si, N.R. Popova [et al.]// *RSC Advances*. - 2016. - Vol. 6[108]. - P. 41-49.

300. Porada, C.D. Adult mesenchymal stem cells: a pluripotent population with multiple applications/ C.D. Porada, E.D. Zanjani, G. Almeida-Porad // *Curr. Stem. Cell Res. Ther.* - 2006.– Vol.1. – P.365-369.

301. Proksch, S. Shaping oral cell plasticity to osteogenic differentiation by human mesenchymal stem cell coculture/S. Proksch, T. Steinberg, K. Vach, E. Hellwig, P.Tomakidi// *Cell and Tissue Research*. – 2014. – Vol.356[1]. – P.159–170.

302. Putnam, A.J. Tissue engineering using synthetic extracellular matrices/ A.J. Putnam, D.J.Mooney // *Nat. Med.* – 1996. – Vol.2[7]. – P.824–826.

303. Radice, M. Hyaluronan-based biopolymers as delivery vehicles for bone-marrow-derived mesenchymal progenitors/M. Radice, P. Brun, R. Cortivo, R. Scapinelli, C. Battaliard, G. Abatangelo // *Biomedical materials research*.– 2000. – Vol.50[2]. – P.101–109.

304. Richardson, T.P. Polymeric system for dual growth factor delivery/ T.P. Richardson, M.C. Peters, A.B. Ennett, D.J. Mooney// *Nat Biotechnol.*– 2001. – Vol.19. – P.1029–1034.

305. Rouwkema, J. Endothelial cells assemble into a 3-dimensional prevascular network in a bone tissue engineering construct/ J. Rouwkema, J. De Boer, C.A. Van Blitterswijk// *Tissue Eng.*– 2006. – Vol.12. – P.2685–2693.

306. Schropp, L. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study/ L. Schropp, A. Wenzel, L. Kostopoulos, T. Karring// *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* - 2003. - Vol.23. - P.313–323.

307. Seo, B.M. Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament/ B.M. Seo, M. Miura, S. Gronthos [et al.]// *Lancet.*– 2004. – Vol.364. – P.149–155.

308. Shcherbakov A.B. Advances and prospects of using nanocrystalline ceria in prolongation of lifespan and healthy aging/ A.B. Shcherbakov, N.M. Zholobak, N.Y.Spivak [et al.]// *Russian Journal Inorganic Chemistry.* - 2015. - Vol. 60. - P. 1595–1625/

309. Shea, L.D. DNA delivery from polymer matrices for tissue engineering / L.D. Shea, E. Smiley, J. Bonadio, D.J.Mooney// *Nat. Biotechnol.*– 1999. – Vol.17[6]. – P.551–554.

310. Shekunova, T.O. Deactivation of Singlet Oxygen by Cerium Oxide Nanoparticles/ T.O. Shekunova, L.A. Lapkina, A.B. Shcherbakov, I.N. Meshkov [et al.]// *Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* -2019. - Vol. 382. - P. 111925-111925.

311. Sheridan, M.H. Bioabsorbable polymer scaffolds for tissue engineering capable of sustained growth factor delivery/ M.H. Sheridan, L.D. Shea, M.C. Peters, D.J.Mooney // *Controlled Release.* – 2000. – Vol.64[1–3]. – P.91–102.

312. Shiraishi, N. Preparation and characterization of porous alginate scaffolds containing various amounts of octacalcium phosphate [OCP] crystals/ N. Shiraishi, T. Anada, Y. Honda, T. Masuda, K. Sasaki, O. Suzuki// *Mater Sci. Mater Med.*– 2010 . – Vol.21[3]. – P.907–914.

313. Sonoyama, W. Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: A pilot study/ W. Sonoyama, Y. Liu, T. Yamaza, R.S. Tuan, S. Wang, S. Shi, G.T. Huang// *Endod.*– 2008. – Vol.34. – P.166–171.

314. Sonoyama, W. Mesenchymal stem cell-mediated functional tooth regeneration in Swine/W. Sonoyama, Y. Liu, D. Fang [et al.]// *PLoS*. - 2006. – Vol.1. – P.79-79.

315. Takahashi, K. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors/ K. Takahashi, S. Yamanaka // *Cell*.– 2006. – Vol.126. – P.663–676.

316. Tang, L. Characterization of mesenchymal stem cells from human normal and hyperplastic gingiva/ L. Tang, N. Li, H. Xie, Y. Jin // *Cellular Physiology*.– 2011. – Vol. 226[3]. – P.832–842.

317. Tatullo, M. Dental pulp stem cells and human periapical cyst mesenchymal stem cells in bone tissue regeneration: comparison of basal and osteogenic differentiated gene expression of a newly discovered mesenchymal stem cell lineage/ M. Tatullo, G. Falisi, M. Amantea, C. Rastelli, F. Paduano, M. Marrelli // *Biological Regulators and Homeostatic Agents*. – 2015. – Vol.29[3]. – P.713–718.

318. Tatullo, M. Human periapical cyst-derived stem cells can be a smart “lab-on-a-cell” to investigate neurodegenerative diseases and the related alteration of the exosomes’ content/ M. Tatullo, B. Codispoti, G. Spagnuolo, B. Zavan // *Brain Sciences*.– 2019. – Vol.9[12]. – P.358-358.

319. Tatullo, M. Potential use of human periapical cyst-mesenchymal stem cells [hPCy-MSCs] as a novel stem cell source for regenerative medicine applications/ M. Tatullo, B. Codispoti, A. Pacifici, F. Palmieri, M. Marrelli, L. Pacifici, F. Paduano // *Frontiers in Cell and Developmental Biology*.– 2017. – Vol.5. - P. 103-103.

320. Terrell, T.G. Pathology of recombinant human transforming growth factor-beta 1 in rats and rabbits/ T.G. Terrell, P.K. Working, C.P. Chow, J.D.Green// *Int Rev Exp Pathol*.– 1993. – Vol.34 [Pt B]. – P.43–67.

321. Thomson, J.A. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts/ J.A. Thomson, J. Itskovitz-Eldor, S.S. Shapiro [et al.] // *Science*. – 1998. – Vol.282. – P.1145–1147.

322. Tierney, C.M. The effects of collagen concentration and crosslink density on the biological, structural and mechanical properties of collagen-GAG scaffolds for bone tissue engineering/ C.M. Tierney, M.G. Haugh, J. Liedl, F. Mulcahy, B. Hayes, F.J. O'Brien // *Mech. Behav. Biomed. Mater.*— 2009. — Vol.2[2]. — P.202–209.

323. Tremblay, P.L. Inosculation of tissue-engineered capillaries with the host's vasculature in a reconstructed skin transplanted on mice/ P.L. Tremblay, V. Hudon, F. Berthod, L. Germain, F.A. Auger // *Am J. Transplant.*— 2005. — Vol.5. — P.1002–1010.

324. Trubiani, O. Regenerative potential of human periodontal ligament derived stem cells on three-dimensional biomaterials: A morphological report/O. Trubiani, R. Brunauer, G. Laschober [et al.] // *Biomed Mater Res A.* — 2008. — Vol.87. — P.986–993.

325. Tyrone, J.W. Collagen-embedded platelet-derived growth factor DNA plasmid promotes wound healing in a dermal ulcer model/ J.W. Tyrone, J.E. Mogford, L.A. Chandler, C. Ma, Y. Xia, G.F. Pierce, T.A. Mustoe // *Surg Res.* — 2000. — Vol.93[2]. — P.230–236.

326. Tziafas, D. Designing new treatment strategies in vital pulp therapy/ D. Tziafas, A.J. Smith, H. Lesot // *Dent.* — 2000. — Vol.28. — P.77–92.

327. Unger, R.E. Tissue-like self-assembly in cocultures of endothelial cells and osteoblasts and the formation of microcapillary-like structures on three-dimensional porous biomaterials/ R.E. Unger, A. Sartoris, K. Peters [et al.] // *Biomaterials.* — 2007. — Vol.28. — P.3965–3976.

328. Valarmathi, M.T. A three-dimensional tubular scaffold that modulates the osteogenic and vasculogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells/ M.T. Valarmathi, M.J. Yost, R.L. Goodwin, J.D. Potts // *Tissue Eng. Part A.* — 2008. — Vol.14. — P.491–504.

329. Villars, F. Effect of HUVEC on human osteoprogenitor cell differentiation needs heterotypic gap junction communication/ F. Villars, B.

Guillotin, T. Amédée, S. Dutoya, L. Bordenave, R. Bareille, J. Amédée // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* – 2002. – Vol.282. – P.775–785.

330. Widera, D. Adult palatum as a novel source of neural crest-related stem cells/D.Widera, C. Zander, M. Heidbreder [et al.]// *Stem Cells.*–2009. – Vol.27[8]. – P.1899–1910.

331. Wu, D.C. Embryonic stem cell transplantation: Potential applicability in cell replacement therapy and regenerative medicine / D.C. Wu, A.S. Boyd, K.J. Wood // *Front Biosci.*– 2007. – Vol.12. – P.4525–4535.

332. Xu, X. Gingivae contain neural-crest- and mesoderm-derived mesenchymal stem cells/ X. Xu, C. Chen, K. Akiyama, Y. Chai, A.D. Le, Z. Wang, S. Shi // *Dent Res.*– 2013. – Vol.92. – P.825–832.

333. Xu, Y. *In vitro* expansion of adipose-derived adult stromal cells in hypoxia enhances early chondrogenesis/ Y. Xu, P. Malladi, M. Chiou, E. Bekerman, A.J. Giaccia, M.T. Longaker// *Tissue Eng.*– 2007. – Vol.13. – P.2981–2993.

334. Yamada, Y. A novel approach to periodontal tissue regeneration with mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma using tissue engineering technology: A clinical case report/Y. Yamada, M. Ueda, H. Hibi, S.Baba // *Int J Periodontics Restorative Dent.* – 2006. – Vol.26. – P.363–369.

335. Yang, F. Stromal-cell-derived factor [sdf] 1-alpha overexpression promotes bone regeneration by osteogenesis and angiogenesis in osteonecrosis of the femoral head/F. Yang, T. Yamaza, L.D. Shea, F. Djouad, N.Z. Kuhn, R.S. Tuan, S. Shi // *Cell Physiol. Biochem.* – 2018. – Vol/46[6]. – P.2561-2575.

336. Yannas, I.V. Tissue and organ regeneration in adults/ I.V. Yannas - Springer; 2001.-P. 278-321.

337. Zeltinger, J. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition/ J. Zeltinger, J.K. Sherwood, D.A. Graham, R. Müller, L.G.Griffith // *Tissue engineering.*– 2001. – Vol.7[5]. – P.557–572.

338. Zhang, X.Q. Conjugation of polyamidoamine dendrimers on biodegradable microparticles for nonviral gene delivery/ X.Q. Zhang, J. Intra, A.K. Salem // *Bioconjug Chem.*– 2007. – Vol.18[6]. – P.2068–2076.

339. Zhang, Y. Therapeutic effect of bone marrow mesenchymal stem cells pretreated with acetylsalicylic acid on experimental periodontitis in rats/Y. Zhang, Y. Xiong, X. Chen, C. Chen, Z. Zhu, L.Li // *International Immunopharmacology.*– 2018. – Vol.54. – P.320–328.

340. Zhou, L-I. Oral Mesenchymal Stem/Progenitor Cells: The Immunomodulatory Masters/ L-I. Zhou, W. Liu, Y.M. Wu, W.L. Sun, C.E. Dörfer, K.M.F. El-Sayed // *Stem Cells Int.* – 2020. – Vol.2020. – P.1327405.

341. Zuk, P.A. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies/ P.A. Zuk, M. Zhu, H. Mizuno [et al.]// *Tissue Eng.* - 2001. – Vol.7. – P.211-228.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

в/ч	верхняя челюсть
ГАП	гидроксиапатит
ДКФД	дикальцийфосфат дигидрат
ДМЕМ	модифицированная по способу Дульбекко среда Игла с высоким содержанием глюкозы и добавкой GlutaMAX™
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИГХ	иммуногистохимические реакции
КО	костная ткань челюстей
ММП	матриксная металлопротеиназа
ММСК	мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки
мРНК	матричной рибонуклеиновой кислоты
МСК	мезенхимальные стволовые клетки
н/ч	нижняя челюсть
НК	надкостница
ОГ	оболочка Гертвига
ОКФ	октакальцийфосфат
рДНК	рекомбинантная дезоксирибонуклеиновая кислота
СК	стволовые клетки
ТИК	тканеинженерная конструкция
ТИМП-1	тканевой ингибитор матриксной металлопротеиназы-1
ТКФ	трикальцийфосфат
ЩФ	щелочная фосфатаза
ЭДТА	этилендиаминтетрауксусная кислота
ADSC	стволовые клетки жировой ткани
APSC	стволовые клетки-предшественники апикального сосочка
BM-MSC	стволовые клетки костного мозга
BMP	Костный морфогенетический белок
CeO ₂	Диоксид церия
COX	циклооксигеназа
DFPC	стволовые клетки-предшественники зубного фолликула
DPSC	стволовые клетки-предшественники пульпы зуба
dPTFE	мембрана из высокоплотного политетрофторэтилена
<i>ex vivo</i>	тестирование тканей/клеток, извлеченных из живого организма
FGF	фактор роста фибробластов
GAM	ген-активированный матрикс
GMSC	стволовые клетки-предшественники альвеолярного сосочка/ десны
GMSCs	стволовые клетки-предшественники бугра верхней челюсти
hADMSC	мезенхимальные стволовые клетки жировой ткани

	человека
H-GMSC	стволовые клетки-предшественники кератинизированного эпителия
hPCy- MSCs	стволовые клетки-предшественники периапикальной кисты
HU	единица Хаунсфилда
HUVEC	стволовые клетки эндотелия пупочной вены человека
IL	интерлейкин
IPS	индуцированные плюрипотентные стволовые клетки
<i>in situ</i>	тестирование тканей/клеток, выделенных из организма, их разделение и помещение обратно в организм
<i>in vitro</i>	тестирование тканей/клеток, выращенных вне организма
<i>in vivo</i>	тестирование на живом организме
M-GMSC	стволовые клетки-предшественники мезенхимальной ткани
N-GMSC	стволовые клетки-предшественники нервной ткани
NO	оксид азота
OESC	стволовые клетки-предшественники слизистой оболочки рта
OPG	остеопротегерин
PCL	поликапролактон
PDGF	фактор роста тромбоцитов
PDLSC	стволовые клетки-предшественники волокон периодонта
PGA	полигликолид
PLA	полилактид
PLGA	полилактик-когликолевая кислота
PLLA	поли-L-лактат
pNC-SC	стволовые клетки-предшественники небной складки
PRF	обогащенный тромбоцитами фибрин
RANKL	растворимый рецептор лиганда ядерного фактора каппа В
ROS	реактивные формы кислорода
Runx-2	связанный с Runx фактор транскрипции-2
SDF-1 α	фактор стромальных клеток-1 α
SHED	стволовые клетки-предшественники пульпы молочных зубов в стадии резорбции
TGF	трансформирующий фактор роста
TNF	фактор некроза опухоли
VEGF	фактор роста эндотелия