

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)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора медицинских наук

Москва – 2023

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И. Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО МГМСУ имени А.И. Евдокимова Минздрава России)

Научный консультант:

Заслуженный врач РФ,
доктор медицинских наук, профессор

Базикян Эрнест Арамович

Официальные оппоненты:

Лепилин Александр Викторович – доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет имени В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра стоматологии хирургической и челюстно-лицевой хирургии, заведующий кафедрой

Путь Владимир Анатольевич - доктор медицинских наук, профессор, федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет), кафедра онкологии, радиотерапии и реконструктивной хирургии, профессор кафедры

Сипкин Александр Михайлович – доктор медицинских наук, государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт имени М.Ф. Владимирского» Министерства здравоохранения Московской области, отделение челюстно-лицевой хирургии, руководитель отделения, кафедра челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии факультета усовершенствования врачей, заведующий кафедрой

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»

Защита диссертации состоится « 17 » октября 2023 года в 14:00 часов на заседании диссертационного совета 21.2.016.06, созданного на базе ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России, по адресу 127006, г. Москва, ул. Долгоруковская, д.4.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБОУ ВО МГМСУ им. А.И. Евдокимова Минздрава России (127206, г. Москва, ул. Вучетича, д.10, стр. 2) и на сайте <https://dissov.msmsu-portal.ru>

Автореферат разослан « ____ » _____ 2023 года

Ученый секретарь диссертационного совета,
доктор медицинских наук,
профессор

Атрушкевич Виктория Геннадьевна

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 [Диланян М.Х., 2014; Кулаков А.А. с соавт., 2016; Ирьянов Ю.М., 2017; Любченко А.В., 2018; Бороздкин Л.Л., 2022]. 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 [Мальшева Н.А., 2015; Горшенев В.Н. с соавт., 2019; Корель А.В., Кузнецов С.Б., 2019]. 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 [Калакуцкий Н.В., Герасимов А.С., 2010; Садиллина С.В., 2018]. В условиях «остеогенной недостаточности», связанной как с низкими остеогенными потенциальными зонами дефекта, так и системными факторами, возможности костной пластики с применением общепринятых подходов выглядят еще менее обнадеживающими [Плакса И.Л. с соавт., 2018].

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 [Абаева А.В., 2020]. Биоинженерные конструкции включают применение инженерных принципов и концепций проектирования в медицине и биологии для целей здравоохранения [Решетов И.В., 2016; Бозо И.Я., 2017].

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 [Адда Ф., 2005; Жур К.В. с соавт., 2010; Иванов П.Ю. с соавт., 2011]. Данная технология нашла применение при выполнении регенеративных вмешательств в имплантологии, пародонтологии, а также в пластической хирургии, офтальмологии, сердечнососудистой хирургии, дерматологии и ортопедии [Грудянов А.И., 2012; Бухарова Т.Б., 2014; Зорин В.Л., Зорина А.И., 2009, 2014; Базикян Э.А. с соавт., 2016, 2018, 2020; Yamada Y., et al., 2006]. 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 [Кулаков А.А. с соавт., 2017]. Использование собственной крови пациента говорит в пользу безопасности данной технологии, что подтверждается несколькими миллионами проведенных вмешательств, с привлечением описываемого метода [Базикян Э.А. с соавт., 2016].

Благодаря прогрессу в технологиях молекулярного клонирования, сегодня появилась возможность синтеза человеческих рекомбинантных факторов роста в нужном для клинического применения объеме [Ламовская Н.В. с соавт., 2010; Дробышев, А.Ю. с соавт., 2011; Хлусов И.А. с соавт., 2011]. 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 [Усиков Д.В., 2014; Jones E., Yang X., 2011]. К этим факторам в первую очередь следует отнести тромбоцитарный фактор роста, костные морфогенетические белки, фактор роста фибробластов [Арутюнян И.В. с соавт., 2013; Бозо И.Я. с соавт., 2016; Базикян Э.А. с соавт., 2017; Jain R.K., 2003]. 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 [Leppänen V.M., et al., 2013]. Данные многофункциональные молекулы способны вызывать эктопическое остеобразование *de novo* и модулировать экспрессию остеобластами некоторых белков, включая коллаген и щелочную фосфатазу [Григорян А.С., Шевченко К.Г., 2011; Деев, Р.В. с соавт., 2013]. 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 [Волчков С.Е. с соавт., 2010; Зорин В.Л. с соавт., 2013; Бухарова Т.Б., 2014; Fortier L.A., 2005]. Наиболее частыми источниками их выделения являются костный мозг и подкожная жировая ткань, что связано с дополнительной хирургической инвазией для пациента [Дробышев, А.Ю. с соавт., 2011; Терновой Ю.В., 2013; Бухарова Т.Б., 2014; Zuk P.A., et al., 2001]. 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 [Зорин В.Л., Зорина А.И., 2009]. 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 [Зорин В.Л. с соавт., 2017; El-Sayed K. M. F., et al., 2012].

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» [geneactivated matrix, GAM] [Кулаков А.А., Григорьян А.С., 2014; Деев Р.В. с соавт., 2015; Деев Р.В. с соавт., 2015; Бозо И.Я., 2017; Bonadio J., et al., 1999]

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 [Кулаков А.А., Григорьян А.С., 2014; Деев Р.В. с соавт., 2015; Бозо И.Я., 2016, 2017; Bonadio J., et al., 1999], 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 двухкассетной 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 № 2729365C1, 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» [John Wiley & Sons, 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 персонифицированным 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 Шиншилла 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.

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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методики получения биоматериала из внутриротовых источников пациентов и культивирования клеток

У 25 пациентов после удаления ретинированных дистопированных третьих моляров верхней челюсти выделяли из фрагментов бугра 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 зуба, отсекая поврежденный фрагмент размером 5x5 мм. Полученный клеточный материал из тканевых биоптатов выделяли и инкубировали 7 дней при 37⁰С и 5% CO₂. В культурах клеток определяли активность щелочной фосфатазы по методу J. McGadey [1970] и образование центров минерализации путем окрашивания ализариновым красным. Выполняли фенотипирование культур фибробластов на проточном цитометре BD FACS Canto II [США] и для идентификации и характеристики культивируемых клеток применяли набор моноклональных антител (CD) 14, 13, 34, 44, 45, 54, 73, 90, 105, 116, 117 [BD Bioscience, США]. Эффективность колониеобразования рассчитывали по формуле: $N_{кол}/N_{кл} * 100\%$, где $N_{кол}$ – число образовавшихся колоний; $N_{кл}$ – число эксплантированных клеток. Культуры клеток наблюдали с помощью инвертированного фазово-контрастного микроскопа Diavert [Nikon, Япония]. Фотографии делали цифровой камерой Nikon D70. Цифровое усиление контраста проводили с помощью программы Image J.

Методики проведения экспериментов на животных

Перед оперативным вмешательством всем животным внутримышечно осуществляли премедикацию и инфильтровали раствором Ультракаина в объеме 1,7 мл рабочую зону. Для получения дефекта в теменной кости черепа 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.1, А]. Для получения костного дефекта на челюсти проводили разрез мягких тканей по длине нижнего края нижней челюсти, отслаивали тканевой лоскут до обнажения кости. С обеих сторон челюстей высверливали отверстие при помощи бора с водяным охлаждением на глубину 4 мм и внешним диаметром 5 мм [рис.1, Б]. Имплантацию остеопластических материалов животным выполняли по разработанному лабораторному протоколу в соответствии с ISO [стандарт ISO 7405: 1997]: в дефекты костной ткани с правой стороны имплантировали экспериментальные

остеопластические материалы, а в дефект, сформированный с левой стороны, вносили основной матрикс-носитель. Операционные раны ушивали послойно узловыми швами Vicryl 5,0 [надкостница, апоневроз], Monosyn 5,0 [кожа].



А) Костные дефекты теменных костей черепа кролика Б) Костный дефект на нижней челюсти кролика

Рисунок 1 - Сформированные костные дефекты после остеостомии трепаном

Методики создания остеозамещающих биоматериалов

Первую тканеинженерную конструкцию [ТИК] получали из *трикальцийфосфата* [ТКФ] в виде гранул размером 150 -250 мкм [ЗАО «Полистом», регистрационный №ФСР 2011/11988 от 04.03.2013], *фибринового клея* [ФК] [Тиссукол Кит, Вахтер, Австрия] и *аутологичных мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток фибробластов десны* [ММСК], которые выделяли и культивировали у животных. Полученную смесь клеток и ТКФ помещали в стерильные пробирки с номером, соответствующим коду донора. Готовую ТИК не позднее 12 часов с момента приготовления вносили в дефект.

Вторую ТИК изготавливали из полимерных микрокапсул *цитратного диоксида церия* [CeO₂] и *аутологичного фибрина, обогащенного тромбоцитами* [PRP]. Кровь получали в пробирку из боковой вены уха кролика, удаляли плазму крови. К 0,5 мл обогащенной тромбоцитами смеси добавляли 50 мкл суспензии CeO₂, по 100 мкл 2% Тромбина и Ренампластина до образования сгустка. Полученный материал CeO₂+PRP отпечатывали в простерилизованной чашке Петри и имплантировали в дефект кости.

Биоинженерную двухкассетную ген-активированную конструкцию изготавливали из гранул *октакальцийфосфата* [ОКФ] $\text{Ca}_8\text{H}_2[\text{PO}_4]_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ диаметром 500–1000 мкм с пористостью до 70%, *плазмидной ДНК с геном, кодирующего фактор роста эндотелия сосудов* [VEGF] и *фактора стромальных клеток-1 α* [SDF-1 α]. 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]. Совмещение компонентов проводили по разработанному лабораторному протоколу [Деев Р.В. с соавт., 2013; Исаев А.А., с соавт., 2013].

Животных декапитировали передозировкой препарата Золетил-100 в дозе 50 мг/кг на сроках, представленных в таблице 1. После декапитации животных хирургическим режущим инструментом вдоль шва иссекали кожу животного, откидывали лоскут, обнажали костный фрагмент. Острыми ножницами отсекали фрагмент с костным регенератом.

Таблица 1 - Количество животных, сроки и методы исследования регенератов костной ткани

Всего	Имплантируемый биоматериал		Сроки исследования (сутки)	Методики исследования
	Правая сторона	Левая сторона		
27	ТКФ+ММСК ТКФ+ФК ТКФ+ФК +ММСК	ТКФ	30, 60, 120 (по 9 особей)	конусно-лучевая компьютерная томография; гистологические
20	PRF+ CeO2	Bio-oss	15, 25, 35, 45 и 55 (по 4 особи)	гистологические; иммуногистохимические
54	ОКФ+VEGF+SDF-1 α	ОКФ	30, 60, 90 (по 18 особей)	гистологические; гистоморфометрические изображения; морфометрическая оценка

Методика гистологического исследования костного регенерата

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. Все изготовленные препараты подвергали сканированию на «Mirax scanner» [Carl Zeiss]. Полученные при различных увеличениях цифровые изображения анализировали на микроскопе Leica DM2500 с цифровой камерой Leica EC5.

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

Аутопаты теменных костей черепа, содержащихся в 4% растворе нейтрального формалина исследовали на томографе J. Morita 3D Accuitomo 170 [«J. Morita Corporation», Япония] и анализировали при помощи Planmeca Romexis viewer [«Planmeca Oy», Финляндия]. Плотность регенерата измеряли в аксиальной плоскости в относительных единицах, приближенных к единицам Хаунсфилда [HU]. Измеряли объем губчатой кости, объем кортикальной кости, среднюю ширину трабекул, поверхность резорбции по методу А.В. Волкова [2017]. Обработка полученных данных выполнялась в программе R version 3.0.3.

Методика иммуногистохимического исследования

Постановку иммуногистохимических реакций парафиновых срезов осуществляли в аутостейнере Thermo Scientific [Великобритания]. В качестве первичных использовали антитела к MMP-9 и TIMP-1 [Spring Bioscience Corporation, USA]. 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 Д.В. Нещадим с соавт.[2016].

Методики клинического исследования

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.2]. 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 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 2 – 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	8
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 от 1 до 6 мм [нет возможности установить короткие имплантаты]; Ширина костной ткани от 1 до 4 мм [нет возможности установить узкие имплантаты]; Минимальная высота аугментации по высоте – 3

мм; Минимальная высота аугментации по ширине – 2 мм; Максимальная высота аугментации по высоте – 8 мм; Максимальная 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; 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.

Методика проведения хирургической операции с имплантацией остеозамещающего материала

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 и вертикальный разрез в области медиально-расположенного зуба и отслаивание слизисто-надкостничного лоскута. 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, необходимым для заполнения дефекта челюсти и последующей отсроченной установки дентальных имплантатов [высотой не менее 10 мм]. Закрывали мембраной, фиксировали титановыми пинами и ушивали рану нитью Vicryl 5-0. 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.

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 данных по наличию инфильтрации (от 0 до 3 баллов), болевых симптомов (от 1 до 100 баллов) и гиперемии (от 0 до 3 баллов); - 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.

Методика получения биопсийного материала на хирургическом этапе установки денального 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]. Биоптат кости извлекали из внутренней части трепана, затем помещали в пробирку со средой [Гистофор; Биовитрум, Россия]. Образцы биоптатов костной ткани подвергались гистологическому [см. методику выше], гистоморфометрическому [см. методику выше] и иммуногистохимическому

исследованию. 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.

Методика иммуногистохимического исследования биопсийного материала пациентов

В иммуногистохимическом исследовании образцов костного регенерата применяли антитела Ki-67 и α -SMA [DAKO, Дания]. Визуализировали иммунные комплексы путем применения Universal LSAB2 [DAKO, Дания]. Срезы с поставленными иммуногистохимическими реакциями докрашивали гематоксилином Майера. За положительную реакцию с Ki-67 принимали четкое ядерное окрашивание. Все изготовленные препараты подвергались сканированию [Mirax scanner, Carl Zeiss, Германия], цифровые изображения анализировали на различных увеличениях.

Методики статистической обработки результатов исследования

Все полученные цифровые результаты исследования подвергались статистической обработке с использованием приложений Excel и Statistica 10.0. Для проверки гипотезы о различии средних двух групп применялся критерий Стьюдента [Т], для множественных сравнений среди непараметрических критериев U Манна-Уитни, для сравнения количественных параметров в пределах одной группы критерий Вилкоксона. Во всех случаях уровень статистической значимости различий был принят за $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Раздел I. Экспериментальные исследования *in vitro*

Наибольшая эффективность колониеобразования обнаруживалась у клеток надкостницы [58%]. По способности к колониеобразованию СК, выделенные из оболочки Гертвига, уступают МСК, выделенным из надкостницы: 58% против 46% и 54%. Культуры МСК из костной ткани показали низкую способность к колониеобразованию [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 подтверждает способность СК оболочки Гертвига образовывать центры минерализации [табл.3].

Таблица 3 - Сравнительная характеристика свойств культур стволовых клеток, полученных из внутриротовых источников пациентов

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

Высокая активность ЩФ обнаруживалась в 50% образцах культуры СК, полученных у молодых пациентов, а у пациентов старшей возрастной группы только в 41,7% образцах [табл.4]. Эффективность колониобразования в культурах МСК, выделенных у молодых пациентов, достигала 55,3%, а у лиц пожилого возраста была в 2 раза меньше [27,3%].

Таблица 4 - 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 колониобразования [%]	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.

Анализ иммунофенотипа клеток, выделенных из десны человека, показал наличие только мезенхимных маркеров [CD73, CD90, CD105], которые секретировали коллагеновые белки I и III типа, эластин и виментин, которые обладали очень высоким уровнем экспрессии [$>99\%$]. Эффективность колониеобразования фибробластов десны составила в среднем $75\pm 6\%$ и доля плотных колоний в 5-10 раз превышала доли смешанных и диффузных колоний. Иммунофлуорометрический анализ показал, что белки агрекан [хондрогенный], остеокальцин [остеогенный] и FAB4 [адипогенный], детектируются в фибробластных клетках, выделенных из тканей десны.

Раздел 2. Экспериментальные исследования *in vivo*

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

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.2]. 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 $921,6\pm 124,1$ HU и $1001\pm 132,6$ HU, то на опытной стороне с ТКФ+ММСК и ТКФ+ФК+ММСК, напротив, увеличение на $238,4\pm 83,8$ HU и $536,5\pm 146,1$ HU 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. Значительный прирост костной ткани в центральном участке на сроках от 60 до 120 суток выявлялся в дефекте с ТКФ+ФК+ММСК.

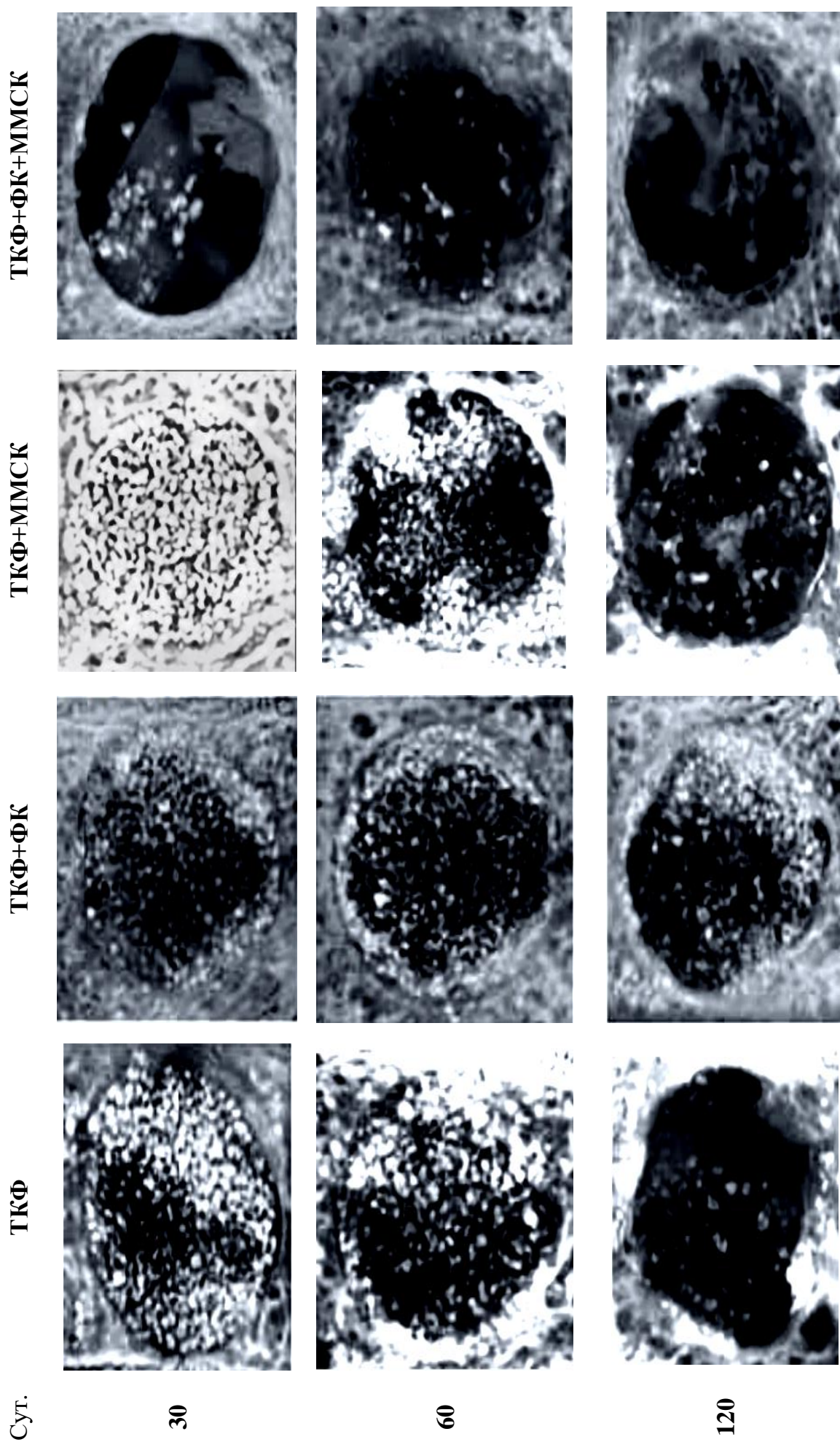


Рисунок 2 - Близкофокусная рентгенография дефектов теменных костей кролика в динамике после имплантации различных остеозамещающих материалов

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 [рис. 3]. 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.

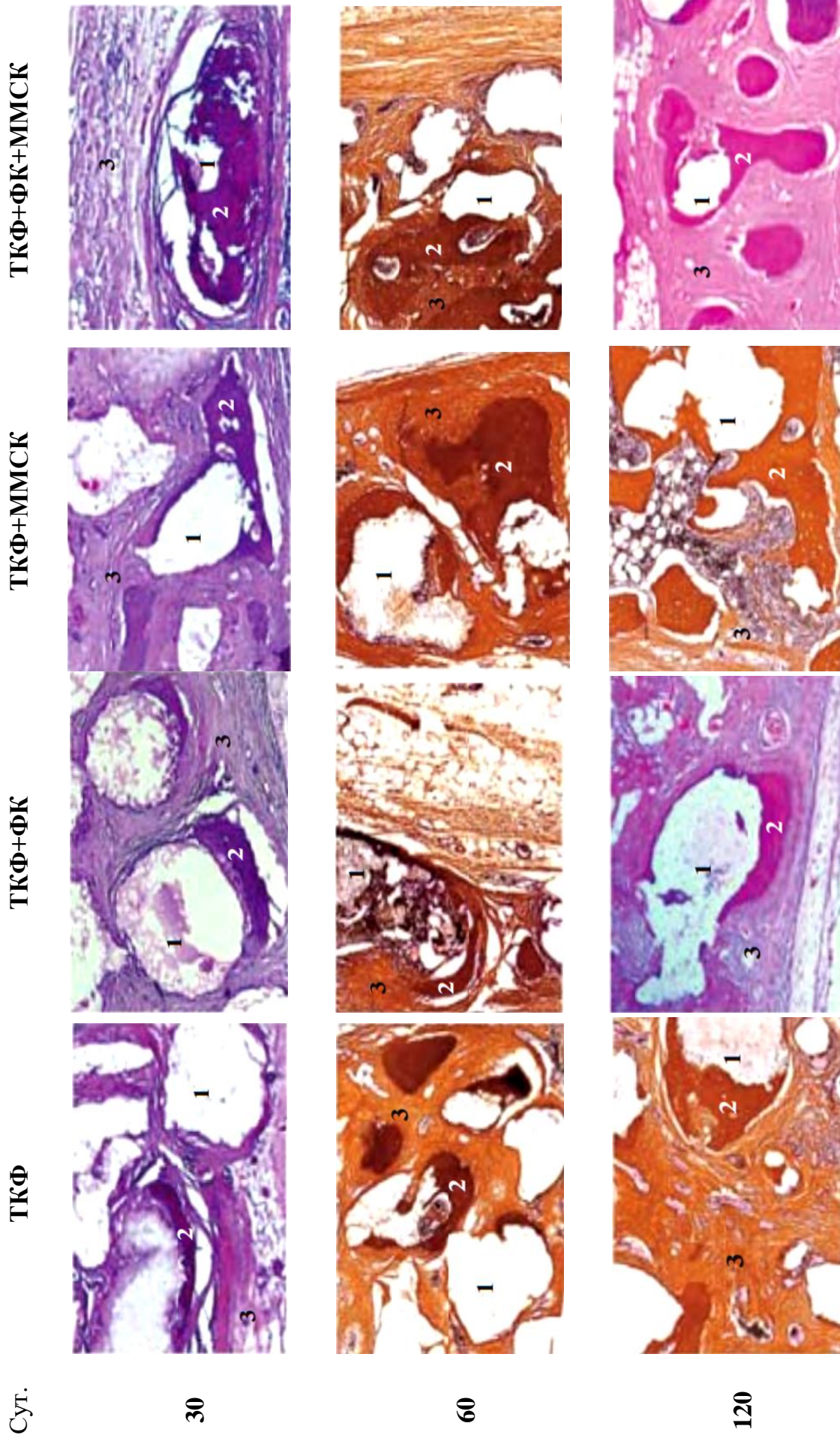


Рисунок 3 – Гистологическая картина дефектов темных костей кролика. Обозначения: 1 – фрагменты материалов, 2 – новообразованная костная ткань, 3 – волокнистая соединительная ткань. Окразка: Гематоксилином и эозином, серебрение по Гордону. Ув. х40

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

В зоне дефекта челюсти животных через 15 суток, в которую была имплантирована ТИК 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. 4]. После имплантации ТИК на 25 сутки показало в участке дефекта в зоне соединительного матрикса просматривается расширение костной консоли, окруженной остеобластами и частично видимыми остеокластами.

На 35 сутки регенерации дефекта челюстей после имплантации ТИК выявлялась чистая зона без лизированных фрагментов костной ткани и сформированными костными консолями, окруженных подавляющим числом остеобластов. Регенерация костного дефекта челюсти на 45 сутки после имплантации материала PRF с nanoCeO_2 , главным гистологическим отличием является очаговое формирование костных балок, окруженных большим числом остеобластов и остеокластов, отсутствие узелков. После имплантации ТИК на 55 сутки в челюстной дефект в этот срок наблюдения выявлялись зоны губчатой кости, межующиеся соединительнотканым матриксом между костными консолями, окруженных остеокластоподобными клетками. Процессы регенерации костной ткани интенсифицируются, образуя большой объем костной ткани морфологически идентичной нативной кости, уменьшается количество грануляционной ткани, что свидетельствует о стимулирующем действии ТИК.

Иммуногистохимический и морфометрический анализ окрашенных зон показал активную экспрессию ММП-9 на стороне дефектов, заполненных ТИК, 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.

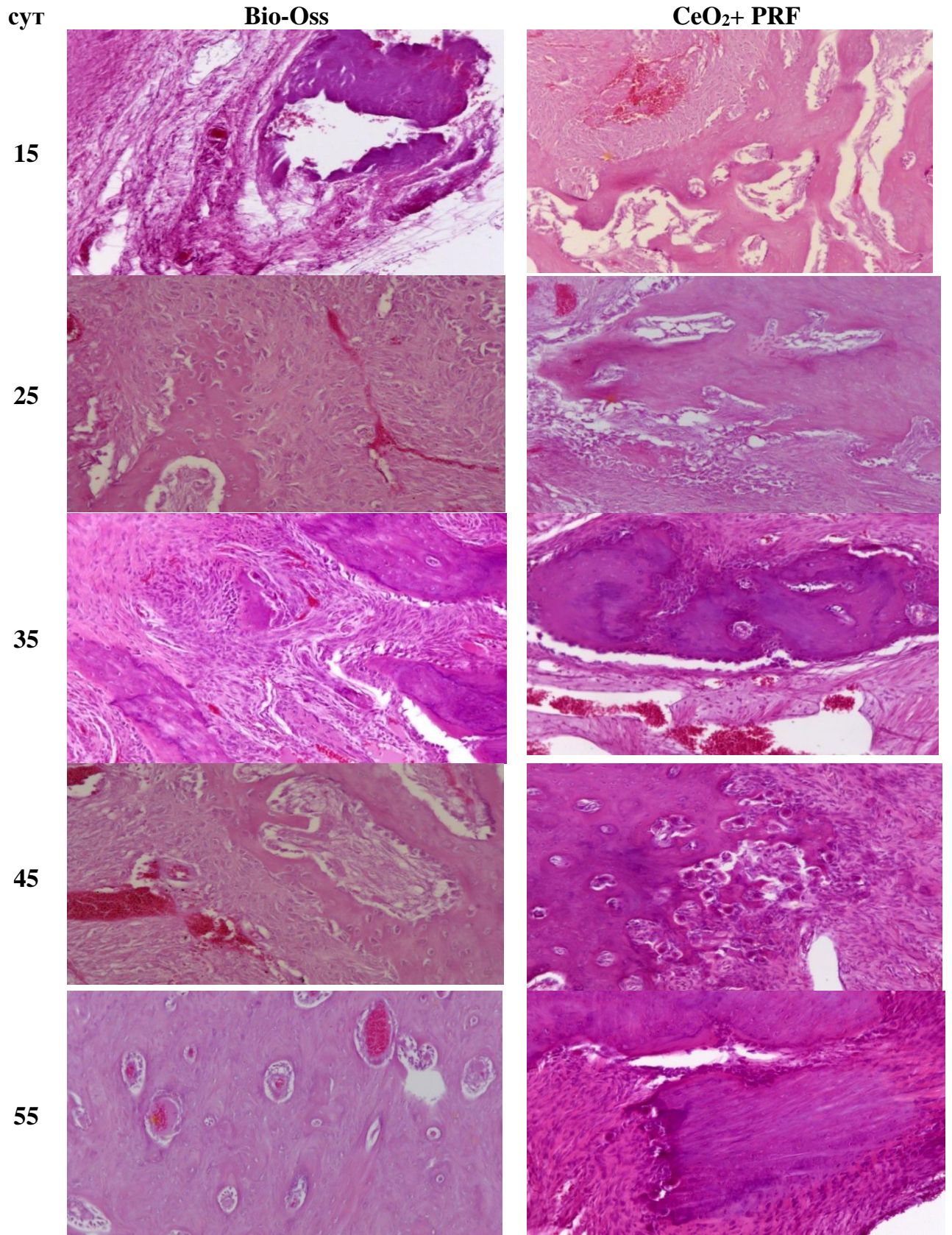


Рисунок 4 - Гистотопограмма поперечного сечения челюсти кролика.

Окраска: Гематоксилин-эозин. Ув. x120

**Результаты имплантации экспериментальным животным
двухкассетной биоинженерной конструкции на основе октакальцийфосфата,
активированного плазмидной ДНК с генами факторов роста эндотелия и
стромальных клеток -1 α**

Морфологическое исследование показало, что 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.

При морфометрическом исследовании **основных компонентов костного регенерата** на 30, 45, 60, 90 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 [табл.5]..

При морфометрическом исследовании **основных свойств остеопластического материала** [остеоиндукция, остеокондукция, эрозивная резорбция] на 30 сутки эксперимента выявлено, что у материала ОКФ+VEGF+SDF-1 α индуктивные свойства [MatBS/BS] достоверно выше [$p < 0,05$]. Достоверных отличий по относительной площади эрозии материала [Mat.ES/Mat.S] во все сроки наблюдения не было выявлено.

Определение **основных показателей остеогенеза** в образцах с имплантированными ОКФ+VEGF+SDF-1 α основной показатель костного баланса [BV] на всех сроках достоверно превышает значения, полученные в образцах с ОКФ.

Морфометрическая оценка **клеточного состава** костных регенератов показало, что количество 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.

Таблица 5 - Относительные объемные доли [%] основных структурных компонентов костных регенератов [M±m]

Сроки [сут]	30			45			60			90		
Материал/ Параметры	OKФ+ VEGF+SDF- 1α	OKФ	OKФ+ VEGF+SDF- 1α	OKФ	OKФ	OKФ+ VEGF+SDF- 1α	OKФ	OKФ	OKФ+ VEGF+SDF- 1α	OKФ	OKФ	
BV/TV	32,0±0,82*	11,0±1,08*	38,0±3,30**	19,0±0,82	19,0±0,82	40,0±0,82**	26,5±1,50	26,5±1,50	36,5±0,50*	31,0±2,00*	31,0±2,00*	
Adv/TV	20,5±11,0*	19,2±9,25	1,50±0,50	1,00±0,25	1,00±0,25	1,46±0,11	1,30±0,15	1,30±0,15	2,00±0,02	1,50±0,10	1,50±0,10	
MatV/TV	41,0±1,25	37,0±1,63	24,0±1,73	39,0±1,63**	39,0±1,63**	39,0±2,05	39,5±0,50	39,5±0,50	32,5±1,50	32,0±3,00	32,0±3,00	
Fb.V/TV	23,0±0,94*	28,0±1,60*	31,2±1,73	35,0±1,84	35,0±1,84	15,0±4,19	28,0±1,00*	28,0±1,00*	21,0±1,00*	27,0±1,00*	27,0±1,00*	
VsV/TV	3,00±0,31	2,20±0,22	3,00±0,12	2,30±0,12	2,30±0,12	3,20±0,12	2,60±0,15	2,60±0,15	2,50±0,50	2,25±0,25	2,25±0,25	
MatBS/BS	41,5±1,31**	11,0±1,19	36,0±2,76*	31,2±2,08*	31,2±2,08*	55,4±5,50**	30,5±2,05	30,5±2,05	50,6±7,80*	17,1±16,8	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	0,80±0,07	0,64±0,07*	0,42±0,07	0,42±0,07	0,33±0,02	0,29±0,04	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*	49,0±2,25*	20,8±0,33	21,4±0,15	21,4±0,15	20,3±2,25*	13,4±1,06	13,4±1,06	
Mat.ES/Mat.S	9,00±0,21	8,70±0,32	9,20±0,19	9,10±0,24	9,10±0,24	4,34±0,67	4,80±0,43	4,80±0,43	4,67±0,23	5,00±0,20	5,00±0,20	
BB	18,3±1,09	20,1±3,94	7,18±0,80**	4,89±0,55	4,89±0,55	7,41±0,94*	3,56±0,82	3,56±0,82	3,36±0,08*	2,25±1,00	2,25±1,00	
B.Ob.S/BS	1,33±0,02**	0,11±0,04	1,35±0,03*	1,09±0,02	1,09±0,02	2,18±0,05*	1,23±0,33	1,23±0,33	0,60±0,02*	0,47±0,03	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	0,81±0,07	0,64±0,07*	0,42±0,07	0,42±0,07	0,33±0,02	0,29±0,04	0,29±0,04	
N.Ob	3,00**	0,40	7,00	0,80	0,80	7,00**	0,50	0,50	7,00	0,50	0,50	
N.Oc	1,00	0,40	2,00	0,50	0,50	1,00	0,50	0,50	2,00	0,50	0,50	
N.Mat.Ob	46,0**	1,60	12,0	1,70	1,70	18,0**	0,90	0,90	11,0	1,70	1,70	
N.Mat.Gc	73,0**	2,90	124	12,2	12,2	135	3,30	3,30	135	3,70	3,70	
N.Mf	30,0	2,60	28,0	1,70	1,70	17,0	0,50	0,50	17,0	1,20	1,20	

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. 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]; BB - Костный баланс; B.Ob.S – Остеобластическая поверхность; Mat.Ob.S - Относительная площадь, занимаемая остеобластами на поверхности материала; 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.

Раздел 3. Результаты клинического исследования

Клинический осмотр включал оценку болевого симптома и инфильтрацию в области раны. Показатели этих процессов оценивали в баллах [табл.6].

Таблица 6 – 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	Инфильтр ация	Гипере мия	Болевые симпто мы	Инфильтр ация	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.

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 [табл.7]. 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.

Таблица 7 – Размеры альвеолярного гребня (мм) у пациентов до и после реконструкции остеозамещающими материалами [M±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.

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. Мощные трабекулы располагаются разрозненно и не формируют каркасную сеть. 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 остеоидом, соединительной тканью. Некоторые гранулы окружены тканевым детритом, определяются большие оптически пустые вакуоли, называемые зонами резорбции. Клетки, резорбирующие материал, не выявлены.

У пациентов группы сравнения, которым проводилась реконструкция костной ткани челюстей ксеногенным ГАП биоптат был представлен костным регенератом смешанного строения, состоящим преимущественно из волокнистой соединительной ткани с различной упорядоченностью коллагеновых волокон. 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. 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. Обращают на себя внимание признаки биорезорбции ксеногенного ГАП. Поверхность остаточных фрагментов узурирована, в ряде полей зрения встречаются резорбирующие материал клетки, включая гигантские многоядерные.

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.5]. Это подтверждается данными активного прироста зрелой костной ткани у пациентов, которым имплантировали остеозамещающий материал ОКФ+VEGF [рис.6]. При этом через 6 месяцев после реконструкции костной ткани ксеногенным ГАП, 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. 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.7].

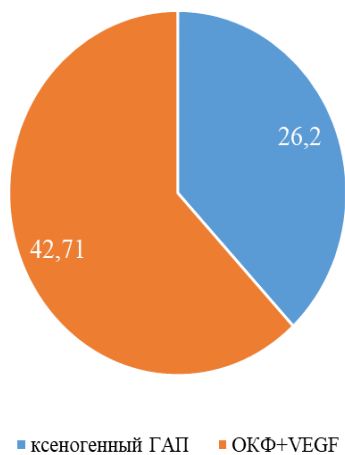


Рисунок 5 - Доля новообразованной костной ткани в общей площади [%]

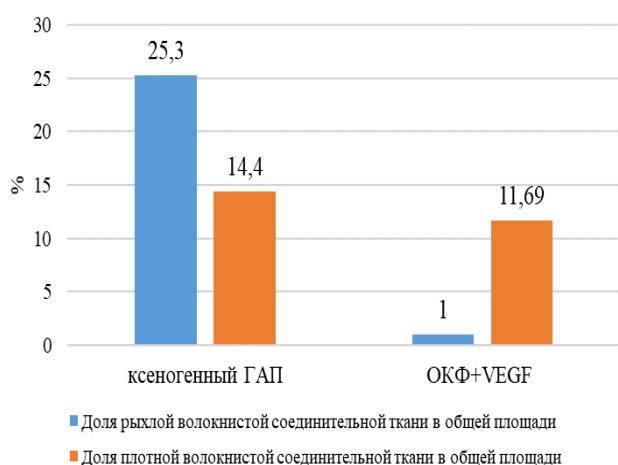


Рисунок 7 - Структура соединительнотканного волокна в биоптате новообразованной костной ткани

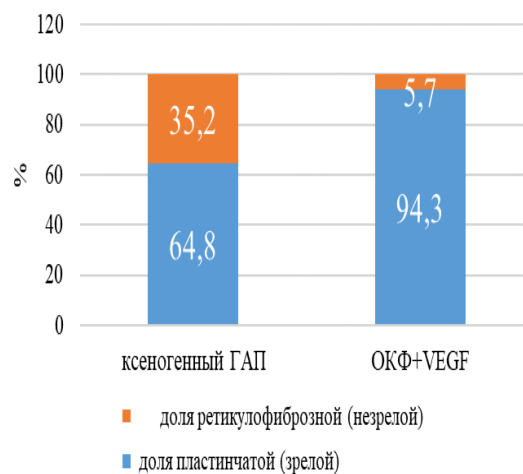


Рисунок 6 - Степень зрелости новообразованной костной ткани

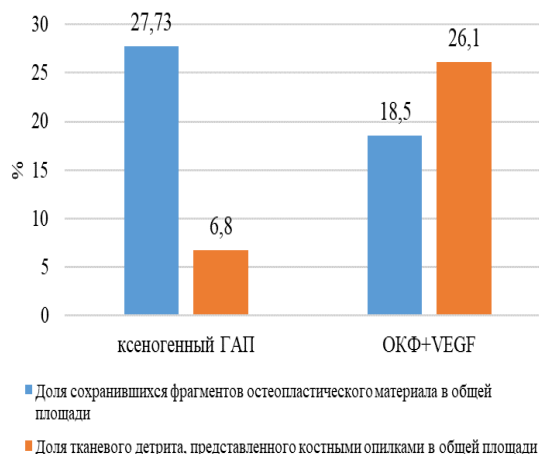


Рисунок 8 - Содержание детрита и фрагментов остеопластического материала в биоптате новообразованной костной ткани

У пациентов, которым имплантировали остеозамещающий материал ОКФ+VEGF 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 [11,7% против 14,4%]. Доля сохранившихся фрагментов материала была выше в образцах

с имплантированным ГАП [27,7%], что свидетельствует о его низкой резорбции по сравнению с материалом из ОКФ+VEGF [рис.8].

Доля тканевого детрита была больше после имплантации материала ОКФ+VEGF [26,1%], а после имплантации ксеногенного ГАП доля тканевого детрита была крайне низкая [6,8%].

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.9]. Иммуногистохимическое выявление эндотелия [CD31⁺] показало различия в характере и распределении сосудов по сравнению с предыдущим регенератом [рис. 13].

В объеме тканей были сформированы многочисленные капилляроподобные 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. При иммуногистохимическом исследовании с антителами к CD163 выявлено небольшое число M2-регуляторных макрофагов. Они характеризовались относительно небольшим диаметром, малым количеством коротких отростков. 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. 9]. Обнаруживаются единичные одноядерные клетки с ядерным паттерном окрашивания, которые расположены дискретно в составе реактивно измененной соединительной ткани регенерата в окружении остатков костнопластического материала.

Антитела к CD31 давали положительную реакцию с эндотелиоцитами кровеносных сосудов регенерата, а также единичными одноядерными шаровидными клетками рыхлой соединительной ткани. Кровеносные сосуды

характеризовались тонкой стенкой и по структурным особенностям наиболее соответствовали венам.

Определение цитогедеза 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.

Для реакции характерен, прежде всего, цитоплазматический и мембранный паттерн окрашивания. CD163⁺ клетки представляют собой крупные отростчатые клетки размером 20-25 мкм 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. Отростчатые клетки локализованы вблизи кровеносных сосудов и одновременно – рядом с новообразованными объемами костной ткани.

Ксеногенный ГАП

ОКФ+VEGF

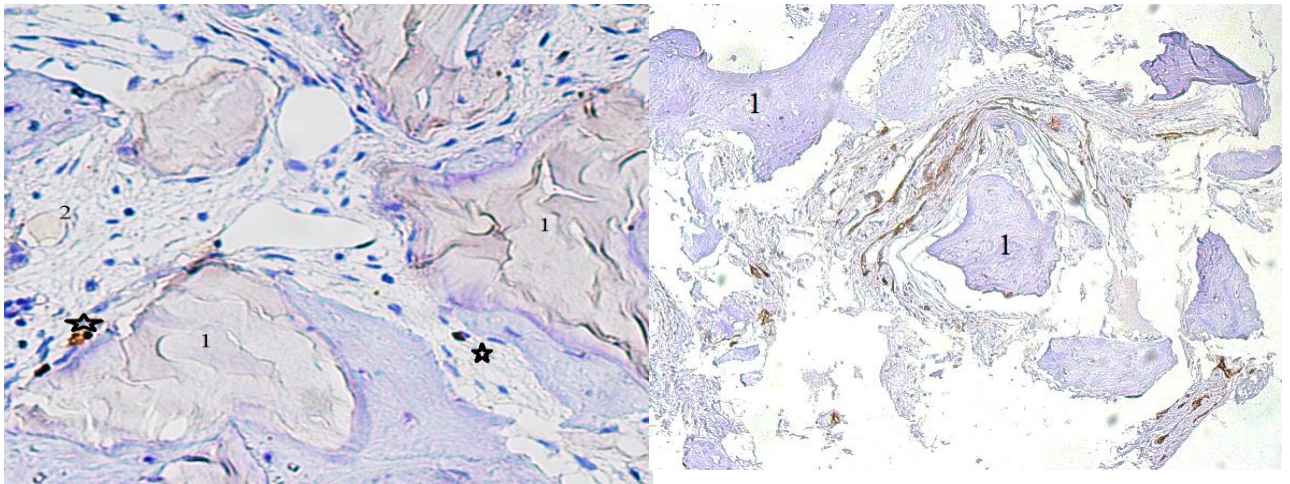


Рисунок 9 - Иммуногистохимическая реакция с антителами к Ki-67: * - положительно окрашенные клетки; 1 – фрагменты материала; 2 – реактивно измененная соединительная ткань. Продукт реакции коричневого цвета. Докраска:

Гематоксилин. Ув. х400

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 [70%] по сравнению с донорами старших возрастных групп.

3. Фибробласты, выделенные из десны человека, обладают способностью дифференцироваться в остео-, 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 остеоиндуктивные 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 однокасетной и двухкасетной 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 денальных 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 публикаций

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

Статьи в журналах, рекомендованных ВАК Минобрнауки 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 потенции 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., Далгатов 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 трикальция фосфата 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. Базилян 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., Базилян 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. Базилян 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. Базилян 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. Базилян 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.

Публикации в других изданиях

23. Eremin I., Zorin V., Deev R., Volozgin 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, Grigoriy Volozhin, 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, Abraamyаn 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., Volozgin 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., Volozgin 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., Базилян 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.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

в/ч	верхняя челюсть
ГАП	гидроксиапатит
ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
КО	костная ткань челюстей
ММП	матриксная металлопротеиназа
ММСК	мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки
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
CeO ₂	Диоксид церия
HU	единица Хаунсфилда
<i>in vitro</i>	тестирование тканей/клеток, выращенных вне организма
<i>in vivo</i>	тестирование на живом организме
PRF	обогащенный тромбоцитами фибрин
SDF-1 α	фактор стромальных клеток-1 α
VEGF	фактор роста эндотелия

Подписано в печать: 27.06.2023
Объем: 1,5 усл.п.л.
Тираж: 100 экз. Заказ № 6931
Отпечатано в типографии «Реглет»
117485, г. Москва, ул. Профсоюзная, д.102, стр. 1
(495) 973-28-32 www.reglet.ru