

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ  
ИМЕНИ ПАТРИСА ЛУМУМБЫ

*На правах рукописи*

**Асфаров Теймур Фаик оглы**

РАЗРАБОТКА ОСТЕПЛАСТИЧЕСКОГО БИОМАТЕРИАЛА С  
ОСТЕОИНДУКТИВНЫМИ СВОЙСТВАМИ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ  
КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ ЧЕЛЮСТЕЙ  
(Экспериментальное исследование)

3.1.7. Стоматология

Диссертация

на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Д.м.н., профессор, член-корреспондент РАН

Иванов Сергей Юрьевич

Научный консультант:

д.м.н., доцент

Волков Алексей Вадимович

Москва – 2024

## Оглавление

ВВЕДЕНИЕ .....	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	122
1.1. Мезенхимальные стволовые клетки и клеточно-генетический уровень репаративных процессов костной ткани .....	12
1.2. Современные биоконпозиционные материалы, барьерные мембраны, используемые при реконструктивных операциях в полости рта .....	17
1.3. Симвастатин – основные направления применения. Клеточно-генетическая связь с регенерацией и воспалением .....	23
1.4. Основания применения симвастатина при реконструктивных операциях в полости рта.....	27
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ .....	32
2.1. Методы лабораторных исследований .....	32
2.1.1. Реактивы и оборудование .....	32
2.1.2. Получение полимерных матриксов и изучение их свойств .....	32
2.1.3. Оценка активности щелочной фосфатазы.....	35
2.2 Исследование регенерации критических костных дефектов <i>in vivo</i> .....	36
2.2.1 Методика операции .....	37
2.2.2 Использование флюоресцентных меток для изучения скорости регенерации костных дефектов .....	38
2.2.3 Гистологическое исследование .....	40
2.3. Рентгенологическое исследование регенерации костных дефектов .....	41
2.4. Статистическая обработка гистологических данных .....	42
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ .....	44
3.1. Результаты лабораторных исследований .....	44

3.1.1. Морфология пленок и матриксов на основе поли-3-оксибутирата с включенным симвастатином .....	44
3.1.3. Исследование на цитотоксичность плёнок и матриксов .....	50
3.1.4. Активность щелочной фосфатазы при росте клеток на матриксах. ....	52
3.2. Результаты световой микроскопии недеминерализованных костных шлифов.....	56
3.3 Результаты морфометрического исследования .....	69
3.4 Результаты флюоресцентной микроскопии.....	72
3.5. Результаты рентгенологического исследования регенерации критических костных дефектов.....	76
Глава 4. Обсуждение полученных результатов и заключение .....	80
Выводы .....	87
Практические рекомендации .....	87
Список сокращений .....	89
Список литературы .....	90

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность проблемы

Проблема восстановления костной ткани челюстей в хирургической стоматологии приобретает все большую актуальность. Необходимы решения вопросов возможности управления процессами репаративной регенерации с целью получения предсказуемого результата с формированием полноценного костного регенерата. На современном этапе развития реконструктивной хирургии полости рта накоплен значительный опыт применения различных остеопластических материалов, позволяющих выполнять операции с целью адекватного восстановления утраченных костных структур и полноценного функционирования челюстных костей, в том числе при больших по протяженности дефектах [21, 55, 134].

Тем не менее разработка новых биомедицинских методик для реституции костной ткани является актуальной проблемой хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, а также в травматологии и нейрохирургии. Каждый год около 12% населения России получают травмы, из них 80% - люди молодого и трудоспособного возраста. [4, 23, 24]. Кроме того, в последнее время наблюдается рост числа больных заболеваниями, сопровождающимися обширными разрушениями костной ткани (опухоли, туберкулез и др.).

Согласно статистическим данным в зависимости от исследуемой страны средняя распространенность адентии среди населения колеблется от 11% до 37%. [91]. Так, принимая в расчет нижний край вариативного диапазона каждый десятый человек является пациентом хирургического профиля, который нуждается в лечении с применением костезамещающих материалов.

Эти данные свидетельствуют о нарастающем количестве использования костезамещающих материалов во всех областях реконструктивной медицины и необходимости разработки объективных и

информативных методов контроля эффективности их применения [49]. При использовании костезамещающих материалов для восстановления дефектов кости успех регенерации зависит от множества факторов: качества и свойств костезамещающих материалов, хирургической техники, генетически обусловленных регенераторных способностей организма, инфекционных агентов и др.

Так как оценить индивидуальный регенераторный потенциал у каждого конкретного пациента и повлиять на него на сегодняшний день не представляется возможным, современные разработки направлены на оптимизацию остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств костезамещающих материалов с целью потенцирования костной регенерации.

#### **Цель исследования:**

Обоснование возможности применения нового биоконпозиционного костезамещающего материала, содержащего симвастатин, на основе синтетического матрикса из поли-3-оксибутирата для повышения эффективности восстановления костных дефектов.

#### **Задачи исследования:**

1. Разработать технологии получения комбинированных костных матриксов на основе поли-3-оксибутирата, его композитов с аморфным гидроксипатитом и/или альгинатом натрия, загруженных симвастатином в качестве остеоиндуктивного фактора.
2. Исследовать биосовместимость разработанных комбинированных матриксов *in vitro*.
3. Исследовать влияние разработанных матриксов на культивирование и дифференцировку мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток *in vitro*.

4. Оценить остеоиндуктивный потенциал разработанных комбинированных костных матриц на модели костного дефекта *in vivo*.

### **Научная новизна**

1. Впервые разработана методика насыщения нового биокомпозиционного материала на основе поли-3-оксибутирата (ПОБ) симвастатином (СИМ) для придания ему остеоиндуктивных свойств. Наиболее выраженным остеогенным потенциалом обладает 5% по массе полимера концентрация симвастатина.

2. Проведены инновационные экспериментальные *in vitro* исследования влияния физико-химических и биологических свойств разработанного комбинированного матрикса на основе ПОБ, загруженного симвастатином, на процессы роста и дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток (ММСК). Рост клеток в группе ПОБ с 1 по 7 сутки наблюдения составил 44%. При этом в группах ПОБ+аморфный гидроксиапатит (ГА) и ПОБ+ГА+СИМ было отмечено снижение роста клеток на 20% и 9,5% соответственно.

3. Впервые проведены экспериментальные *in vivo* исследования заживления критических костных дефектов свода черепа крысы при имплантации в них нового синтетического биокомпозиционного материала на основе ПОБ в комбинации с аморфным гидроксиапатитом и альгинатом натрия (АГ), содержащего симвастатин, доказывающего выраженные остеоиндуктивные свойства разработанного материала. Показатель относительного объема костной ткани в дефекте теменной кости был наибольшим среди всех исследуемых групп и составил в среднем 75,2%, а относительный объем соединительной ткани составил 24,8%.

4. На основании данных экспериментального исследования разработана методика использования остеопластического материала на основе ПОБ,

получаемого биотехнологическим путем, с различными наполнителями: ГА и/или АГ, и СИМ для оптимизации регенерации костных дефектов.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

1. Результаты проведённой работы продемонстрировали ранее не изученное местное действие СИМ в составе остеопластического биоматериала на регенерацию костной ткани, выражающееся в остеоиндуктивной активности, схожей с костными морфогенетическими белками.
2. Разработана технология производства полностью синтетического остеоиндуктивного остеопластического материала, позволяющего обеспечивать полноценную регенерацию критических костных дефектов плоских костей, к которым относятся черепные кости и челюсти.
3. Разработанная технология имеет патентную чистоту благодаря своей высокой наукоёмкости и при её промышленном внедрении позволит провести эффективное замещение имеющихся на рынке остеопластических медицинских изделий, применяемых в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.
4. Клиническое внедрение разработанного нового синтетического остеопластического биоматериала на основе ПОБ, содержащего СИМ, позволит повысить эффективность восстановления костных дефектов челюстей, усовершенствовать методы лечения пациентов с потерей зубов и улучшить качество их жизни.

### **Методология и методы исследования**

Диссертация выполнена в соответствии с принципами и правилами экспериментальной биологии и доказательной медицины.

Для изучения остеоиндуктивных свойств разработанного синтетического биокомпозиционного материала в качестве объекта исследования были

использованы культуры мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток и критические костные дефекты свода черепа крысы. Предметом исследования явилось дифференцировка и пролиферативная активность ММСК и состояние костной ткани свода черепа крысы в зоне регенерации критического костного дефекта.

В настоящей работе были использованы следующие методы: физико-химические, биохимические, клеточной биологии, гистологические специальные методы проводки и подготовки костных недеминерализованных шлифов, функциональные методы окрашивания костной ткани, позволяющие визуализировать старую и вновь образованную костную ткань; методы световой и флюоресцентной микроскопии; программные полуавтоматизированные методы гистоморфометрии.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

1. Новые синтетические биокомпозиционные материалы на основе поли-3-оксибутирата и его композитов с ГА и/или АГ, в том числе загруженных СИМ, обладают высокой биосовместимостью *in vitro*. Высвобождающийся из остеопластических материалов СИМ вызывает дифференцировку ММСК в остеогенном направлении.
2. Новые синтетические биокомпозиционные материалы на основе поли-3-оксибутирата и его композитов с ГА и/или АГ обладают остеокондуктивными свойствами *in vivo* и не оказывают токсического воздействия на мультипотентные стромальные клетки *in vitro*.
3. Активность остеогенеза в области критических костных дефектов пластинчатых костей при проведении направленной костной регенерации с использованием синтетического биокомпозиционного материала на основе поли-3-оксибутирата с добавлением СИМ выражается в образовании на 34,9% большего относительного костного объема по сравнению с применением материалов без СИМ (75,2% против 40,3%).



4. Пролонгированное местное высвобождение СИМ из остеопластических материалов в область костных дефектов оказывает выраженную стимуляцию образования костной ткани, схожую с действием костных морфогенетических белков.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Достоверность полученных результатов определяется достаточной репрезентативностью лабораторного и экспериментального материала. Автором проделана большая работа по клинико-лабораторному исследованию разработанного материала и хирургическому лечению экспериментальных животных (крыс) с критическими костными дефектами в области свода черепа. Полученные результаты являются обоснованным решением поставленных задач. Сформулированные в диссертационной работе положения и выводы достоверны, подтверждены полученными данными и результатами статистического анализа проведенных исследований.

### **Апробация результатов исследования**

Основные положения диссертационной работы были доложены на Международной научно-практической конференции (2020г): «Современные аспекты комплексной стоматологической реабилитации пациентов с дефектами челюстно-лицевой области» Доклад: «Разработка остеопластических материалов на основе гибридной конструкции из поли-3-гидроксибутирата и симвастатина для индукции репаративного остеогенеза».

Диссертация апробирована 21 сентября 2023 г. (протокол кафедрального заседания № 0300-34-04/04) на заседании кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии ФГАОУ ВО «Российский

Университет Дружбы Народов» Министерства образования и науки Российской Федерации.

### **Внедрение результатов исследования**

Полученные результаты диссертационной работы демонстрируют эффективность современных костезамещающих материалов для индукции репаративного остеогенеза, что позволяет успешно восстановить утраченные костные структуры. Результаты исследований используются в работе кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии медицинского института Российского университета дружбы народов.

### **Личный вклад автора**

Автор провел анализ литературных отечественных и зарубежных источников по тематике диссертационного исследования. Автором разработана структура проведенной диссертационной работы. Автор принимал участие в лабораторных работах и оценке их результатов. Автор лично провёл экспериментальное исследование *in vivo* костных матриц из поли-3-оксибутирата, насыщенных симвастатином. Было прооперировано 70 лабораторных животных (крыс), изготовлены и изучены полученные в экспериментах гистологические препараты. Автором были разработаны практические рекомендации.

### **Публикации**

По теме диссертации опубликованы 7 научных работ, в том числе 3 - в изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки Российской Федерации, 4 - индексируемые в международной базе данных SCOPUS.

### **Объем и структура работы**

Диссертация изложена на 111 страницах текста компьютерного набора, состоит из введения, обзора литературы, главы материалы и методы исследования, главы с результатами собственных исследований, обсуждения, выводов, практических рекомендаций, списка сокращений, списка литературы. Диссертация содержит 4 таблицы и иллюстрирована 26 рисунками. Библиографический список состоит из 189 научных публикаций, в том числе 36 отечественных и 153 зарубежных источников.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### **1.1. Мезенхимальные стволовые клетки и клеточно-генетический уровень репаративных процессов костной ткани**

Репаративная регенерация костной ткани является одним из основных физиологических процессов, которые лежат в основе костно-пластических операций в полости рта [36, 61, 115, 31, 96, 54, 92]. Понятие репаративная регенерация направлено на восполнение утраченной ткани, её дефицита, появившегося по причине альтеративных процессов разного генеза [26, 141, 63]. Данный процесс происходит под контролем генно-клеточных механизмов, которые запрограммированы для каждого живого организма по-своему.

Очевиден тот факт, что в настоящее время все чаще в медицинские учреждения поступают пациенты с диагнозом «K08.1 Потеря зубов вследствие несчастного случая, травмы, локальной периодонтальной болезни», «K08.2 Атрофия альвеолярного гребня». Основной жалобой данных пациентов является проблема с жеванием, артикуляцией и т.д. [21, 131, 18, 9]. Поэтому поиск методов и средств терапии таких пациентов на определенных этапах является одной из важных составляющих общественного здравоохранения.

Важно отметить, что все чаще путают понятия регенерации и репарации тканей. Регенерация ткани обозначает полное восстановление дефицитных тканей, которые в конечном итоге аналогичны утраченным тканям. Неполная регенерация (иногда называется репарацией) - представляет собой лишь замещение исходных тканей соединительно-тканым рубцом [36].

Одной из первых публикаций на тему костной регенерации появилась еще в 1820 г [108]. На сегодняшний день существует единое мнение о репаративной регенерации костной раны [4].

Репаративная регенерация костной ткани - последовательный, генетически-детерминированный процесс, который зависит от внешних и внутренних факторов организма человека [4]. Факторы роста, инициирующие рост и дифференцировку клеток, а также клетки костного дифферона и др. индуцируют регенерацию [153, 142, 137, 147]. В понятие костного дифферона входят клетки, которые отвечают за репаративную регенерацию костной ткани, которые представлены остеобластами, преостеобластами (преостеобласты 1-го поколения, преостеобласты 2-го поколения), остеоцитами, мезенхимальными стволовыми клетками (МСК) [166, 167, 118, 146].

Впервые участие стволовых клеток в регенераторных процессах было продемонстрировано 1 июля 1909 года на заседании гематологов [116]. Однако, экспериментальный фундамент был заложен еще в 1963 году Becker A.J. [47]. Стволовые клетки подразделяются на эмбриональные, фетальные, постнатальные. Эмбриональные и фетальные стволовые клетки не имеют обоснованной доказательной медицины для использования в клинической практике. Также, данные стволовые клетки этически запрещено применять при медицинских вмешательствах. Основной локализацией постнатальных стволовых клеток организма человека является костный мозг. Под постнатальными стволовыми клетками подразумеваются клетки взрослого человека. В силу их аутологичности, они не обладают антигенными свойствами, что благоприятно сказывается при их трансплантации [6, 150]. Следует отметить, что данные клетки в свою очередь включают: стромальные (мезенхимальные), гемопоэтические, а также тканеспецифические клетки (прогениторные) [6, 88, 5, 16, 25, 164].

Характеризуя типы стволовых клеток, следует отметить их потентность. Потентность – это способность клетки дифференцироваться и тем самым переходить в стадию дефинитивной клетки. Дефинитивная клетка не способна в дальнейшем дифференцироваться, и это конечная ступень

развития клетки, которая специфична исходной ткани [6, 88, 5]. По способности дифференцироваться стволовые клетки подразделяются на: унипотентные, плюрипотентные, мультипотентные, тотипотентные, олигопотентные [99].

МСК – это стволовые клетки мезенхимального происхождения. По способу дифференцировки данные клетки относятся к мультипотетным, так как могут дифференцироваться, а также пролиферироваться в большом количестве в линии одного зародышевого листка – мезенхимы. Следовательно, МСК могут дифференцироваться в остеогенном, хондрогенном, адипогенном и миогенном направлениях [119, 24, 34]. Они распространены в большинстве органов и тканей организма человека относящиеся в соединительной ткани. МСК тесно связаны с репарацией и регенерацией костной ткани за счет способности дифференцироваться в дефинитивные клетки костной ткани: остеобласты, остециты [92, 130]. Важно отметить, что остеокласты происходят из стволовых клеток гемопоэтического происхождения.

В силу сложностей изучения стволовых клеток непосредственно в тканях, в настоящее время принято выделять клетки из тканей и индуцировать дифференцировку.

Дифференцировка МСК в направлении определенного типа клеток происходит благодаря множеству индукторов и ингибиторов, которые играют важную роль как на начальной, так и на более поздних стадиях дифференциации [87, 179, 101, 188, 103]. Контроль дифференцировки МСК в определенные типы зрелых клеток происходит благодаря различным цитокинам, факторам роста, белкам внеклеточного матрикса, молекулам и факторы транскрипции [84, 172]. В недавнем обзоре литературы рассматривалось влияние факторов генетической транскрипции на дифференцировку МСК. В этом обзоре автор критически обсудил и оценил роль факторов транскрипции и связанных с ними сигнальных путей, которые

вливают на дифференцировку МСК в адипогенном, хондрогенном, остеогенном, миогенном направлениях [40].

На сегодняшний день существует много данных на тему генетических транскрипторов остеогенной дифференцировки. Однако, после сбора и анализа литературы были выявлены основные ключевые остеоиндукторы МСК [145, 132, 140, 72].

Инициация и непосредственно дифференцировка остеогенных МСК происходит также по сигнальным путям между транскрипторами [33]. По данным James A.W. и соавт. (2013) контроль дифференцировки МСК в остеогенном направлении происходит различными сигнальными путями, которые сходятся к транскрипционному фактору: Runt-related transcription factor 2 (Runx2) [102].

Runx2 является одним из ключевых факторов индукции дифференциации МСК в остеобласты. Runx2 принадлежит к семейству транскрипции Runx, которое содержит ДНК-связывающий домен runt, образует гетеродимер с Cbfb и связывается с последовательностью TGRyGGPyPy. Runx2 экспрессируется в остеобластической, а также хондробластической линиях клеток. У мышей с отсутствием Runx2 полностью отсутствует кость, а скелет образован хрящом. Следовательно, формирование внутримембранной и эндохондральной кости полностью прервано у мышей без Runx2 [106].

Runx2 индуцирует Sp7 - важный фактор транскрипции для дифференцировки остеобластов [106]. Также, в недавнем отечественном *in vitro* исследовании Покровской Л.А. (2020г) была продемонстрирована дифференцировка МСК в остеогенном и адипогенном направлениях при помощи остеоиндуктивной добавки [35].

Сигнальные пути дифференцировки клеток необходимы для каскадной, последовательной реакции различных транскрипционных факторов. По данным Li Y. И соавт. (2018) путь Wnt/ $\beta$ -catenin считается

главным индуктором остеогенеза. Автором было отмечено, что понимание связи между передачей сигналов PPAR Wnt в дифференцировке МСК имеет важное значение в различных областях медицины - от ожирения до остеопороза и регенеративной медицины [109, 176, 3, 14, 1].

Клеточно-сигнальный Wnt/ $\beta$ -catenin путь известен как один из важных молекулярных каскадов, регулирующих судьбу клетки на протяжении всей жизни [43, 89, 39]. Впервые связь костного метаболизма и Wnt/ $\beta$ -catenin сигнального пути было продемонстрировано в работе Gong, Y. [107].

Путь передачи сигналов Wnt можно разделить на два основных пути: канонический и неканонический. Из них канонический Wnt сигнальный путь способствует остеогенезу. Склеростин, продуцируемый остеоцитами, является ингибитором этого пути, тем самым подавляя остеогенез. В силу этого в последние годы было предложена антисклеростиновая терапия для лечения остеопороза. Склеростин первоначально был идентифицирован как ген, ответственный за склеростеоз [185], он подавляет образование костей, ингибируя канонический путь передачи сигналов Wnt [148].

Следует отметить, что белок  $\beta$ -катенин является мишенью и важным компонентом передачи Wnt/ $\beta$ -катенин сигналов. Этот путь участвует во многих аспектах роста и развития многих органов и тканей, начиная от определения роли клетки в организме и заканчивая дифференцировкой клетки. На ранних стадиях репарации перелома  $\beta$ -катенин необходим мезенхимальным клеткам для дифференцировки в остеобласты и на более поздних стадиях восстановления пула клеток костного дифферона [72].

В итоге, компоненты сигнального механизма Wnt имеют тесную связь с гомеостазом и метаболизмом костной ткани, а также ее репаративной регенерацией. Хотя решающая роль канонической передачи сигналов Wnt была строго установлена, многое еще предстоит открыть в отношении его перекрестных помех с другими путями в регенерации кости.



Обобщенные данные различных исследователей свидетельствуют о положительной модуляции сигнального Wnt- $\beta$ -катенин пути относительно костно-специфических внеклеточных модуляторов, таких как склеростин, которые имеют большие перспективы для восстановления костной ткани в условиях остеопороза и репаративной регенерации костных дефектов.

## **1.2. Современные биокомпозиционные материалы, барьерные мембраны, используемые при реконструктивных операциях в полости рта.**

Реконструктивные операции в полости рта нацелены на восстановление утраченного костного объема для дальнейшей дентальной имплантации. По данным Misawa М.И. и соавт. (2016) после утраты зуба до 34% случаев в течение последующего года развивается атрофия альвеолярного гребня [121]. Чаще всего стоматологические пациенты хирургического профиля обращаются в клинику на этапе значительной атрофии костной ткани, что усложняет восстановление утраченных объемов. В силу этого актуален поиск различных методов и средств для восстановления значительных дефектов костной ткани в полости рта в наименьшие сроки, с минимальным риском отторжения костного регенерата [124, 41].

Все чаще при реконструктивных операциях в полости рта врачи клиницисты прибегают к использованию так называемых биокомпозиционных (остеозамещающих) материалов [127, 15, 10, 2, 8], а также барьерных мембран [77, 79].

Применение барьерных мембран аргументировано изоляцией от эпителиальных клеток и фиксацией регенерата [144, 46, 32, 13]. По данным литературы, в полости рта содержится более 700 видов бактерий [70]. На сегодняшний день существует множество различных костно-пластических мембран, каждый из которых имеет преимущества и недостатки при

использовании в клинической работе [38, 42, 90, 139, 11, 20, 7]. Направленная костная регенерация (НКР) – хирургическая операция, направленная на стимуляцию процессов репаративной регенерации и восстановления костных дефектов [104]. Используются различные материалы и их модификации [169, 129, 173, 98]. По мнению ряда авторов, основными свойствами, которыми должны обладать костно-пластические мембраны являются: биосовместимость, клеточная окклюзия, интеграция с тканями хозяина, а также адекватные механические и физические свойства. Барьерные мембраны классифицируются на рассасывающиеся и нерассасывающиеся [60, 50, 97]. Нерассасывающиеся мембраны, в основном политетрафторэтилен (ПТФЭ), представляет первое поколение барьерных мембран. Как правило, такие типы мембран демонстрируют превосходную биосовместимость. Однако нерезорбируемые мембраны нуждаются во втором хирургическом вмешательстве, при котором его необходимо удалить. Впоследствии было создано второе поколение резорбируемых мембран. Недавно были предприняты усилия по разработке нового поколения мембран природного происхождения или использование принципов тканевой инженерии при изготовлении мембраны [110, 152, 126]. Кроме того, одновременное использование барьерной мембраны в дефекте вместе с костными трансплантатами и биокомпозиционными материалами в настоящее время обычно используются для обеспечения структурной поддержки в области дефекта и индукции внутреннего регенеративного потенциала тканей [56, 48, 71, 127, 49].

По данным систематического обзора Elgali I. И соавт. (2017), НКР с костным аутотрансплантатом/заменителем кости и без него является успешным методом лечения увеличения дефектов альвеолярной кости. Однако, существуют по-прежнему сложные ситуации и осложнения, которые требуют будущих разработок модифицированных мембран для НКР. По всей видимости, такие мембраны будут обладать хорошими остеоиндуктивными,

остеокондуктивными и антибактериальными свойствами, а также иметь совместимость с мягкими тканями [77].

Большая часть экспериментальных данных предполагает, что различные модификации физико-химических и механических свойств мембран могут способствовать регенерации кости.

К сожалению, большинство мембран были коммерциализированы для клинического использования, но до сих пор не имеют надлежащих научно-доказанных характеристик. Несмотря на большое количество исследований, посвященных роли проницаемости и пористости мембраны, на этот счет существуют противоречивые результаты. Нарушения клеточного хемотаксиса, инвазивности и стимуляции регенерации кости являются серьезной проблемой для предлагаемой барьерной концепции мембран.

В настоящее время применение аутогенной кости является «золотым стандартом» из-за более быстрой интеграции и биосовместимости [122, 19]. Вместе с тем, использование аутогенной кости сопряжено со сложностью заживления донорского участка и ограниченного количества трансплантата [186].

Ауто трансплантаты, могут иметь экстраоральное или внутриротовое происхождение. Источником интраорального ауто трансплантата являются: бугор верхней челюсти, скуло-альвеолярный гребень, ветвь нижней челюсти, ретромолярная область, симфиз нижней челюсти, а также костные экзостозы и кость, полученная из различных участков, при помощи костного скребка. Ауто трансплантаты, полученные из экстраоральных участков, таких как гребень подвздошной кости, обеспечивают остеоиндуктивный, остеокондуктивный и остеогенный потенциал [12]. Сводная часть черепа - еще один экстраоральный источник, который может быть использован для получения костной ткани для хирургических операций. Тем не менее, внутриротовые участки более предпочтительны в силу простоты взятия, а также малого риска осложнений.

Все чаще применяются материалы из других источников, а также проводятся модификации операций по увеличению гребня [73]. Биокomпозиционные материалы – это костные заменители, необходимые для восстановления утраченных костных тканей при различных костно-пластических операциях в полости рта. Существует условная классификация костных заменителей на остеоиндуктивные, остеокондуктивные и смешанные материалы. По происхождению биокomпозиционные материалы подразделяются на ксено- и аллогенные. Также выделяют отдельный тип остеозамещающих материалов – аллопластические. Вопрос в том, какой материал трансплантата наиболее надежен для образования кости. Parageorgiou S.N. и соавт. (2016) сообщили о тенденциях, которые, благоприятствуют аутогенной трансплантации [68]. Аутоотрансплантаты представляют самый высокий процент новой кости, за ними следуют синтетические трансплантаты, ксенотрансплантаты и аллотрансплантаты [68, 22, 29].

В систематическом обзоре M. Troeltzsch и соавт. (2016) была показана клиническая эффективность трансплантируемых материалов при увеличении альвеолярного гребня. Авторы показали, что горизонтальный прирост был значительно выше для смесей аутогенной кости с аллогенными/ксеногенными остеозамещающими материалами ( $4,5 \pm 1,0$  мм) по сравнению с использованием синтетических биокomпозиционных материалов ( $2,2 \pm 1,2$  мм). При устранении вертикальных дефектов, существенной разницы в комбинации смесей кости не наблюдалось [67].

При интеграции костного материала в область дефекта основным источником ростовых и дифференцировочных факторов является сосудистый компонент [114, 30, 66]. При заживлении любой костной раны иммобилизация и фиксация отломков является основным критерием состоятельной репаративной регенерации [55]. Однако существуют и другие критерии: ускорение интеграции костного регенерата, биосовместимость, а

также достижение максимально гомологичной утерянной костной ткани [165].

Аллогенный костнозамещающий материал - это костный материал от другого человека. Данные материалы обладают остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами по отношению к клеткам костного дифферона. Известно, что они образуют кость за счет резорбции матрикса и параллельного отложения новой кости на остаточном каркасе. Существуют следующие типы аллогенных материалов: замороженная, сублимированная (лиофилизированная) и деминерализованная лиофилизированная кость. Аллогенные материалы доступны в больших количествах и не имеют традиционных недостатков по сравнению с аутотрансплантатами.

Ксеногенный костнозамещающий материал - это костный материал, источником которого являются лошади, свиньи или крупный рогатый скот. Данные остеозамещающие материалы предварительно депротеинизируются и подвергаются дальнейшему удалению органических компонентов, тем самым снижая иммуногенность и вероятность резорбции, отторжения. Ксеногенный материал по большей части является остеокондуктором, с ограниченным резорбтивным потенциалом. Полученная в результате кристаллическая структура довольно похожа на губчатую кость человека. Чаще всего используют депротеинизированный минерал бычьей кости, коммерчески известная как Bio-Oss®, представляющая собой коммерчески доступную кость бычьего происхождения. После термической и химической обработки неорганическая фаза бычьей кости состоит в основном из гидроксиапатита, который сохраняет пористую архитектуру.

Аллопластические материалы являются полностью синтетическими и синтезируются из неорганических источников: фосфат кальция, биостекло, сульфат кальция. Керамические аллопластические материалы очень удобны в применении с факторами роста, ионами различных микро- и макроэлементов, которые в свою очередь влияют на регенераторный потенциал и

минеральную плотность кости. Данный вид материалов обладает остеокондуктивными, а также остеоиндуктивными свойствами при внесении различных ростовых компонентов. При создании аллопластических материалов возможно изменение архитектоники материалов: пористость, увеличение площади поверхности и т.д. [133, 82].

В систематическом обзоре литературы Miguita L. И соавт. (2017) было продемонстрировано, что за последние 10 лет в научной литературе преобладают научные работы на тему применения стволовых клеток при увеличении объема альвеолярного гребня для дальнейшей имплантации [59].

Аллопластические синтетические биоматериалы были разработаны для преодоления недостатков аутотрансплантатов и могут быть как разлагаемыми, так и неразлагаемыми. Аллопласты обычно остеокондуктивны без остеоиндукции или остеогенности.

Биоматериалы фосфата кальция представляют большой интерес для использования в качестве остеозаменителей, поскольку они имеют близкий по минеральному компоненту состав к нативной кости, они остеокондуктивны и образуют костный апатитоподобный материал.

Трансплантаты на основе гидроксиапатита образуют химическую связь непосредственно в кости после имплантации. Синтетический гидроксиапатит используются в различных формах: пористые, не рассасывающиеся; твердые нерезорбирующиеся и резорбирующиеся (некерамический, пористый). Гидроксиапатит не является остеогенным и в основном функционирует как материал для остеокондукции. Данные материалы демонстрируют медленный и ограниченный резорбтивный потенциал и обычно зависят от пассивного растворения в тканевой жидкости и клеточных процессов, таких как фагоцитоз. Скорость деградации гидроксиапатита зависит от способа формирования керамики, соотношения кальция и фосфата, кристаллографической структуры и пористости. Способность гидроксиапатита к резорбции также в большей мере зависит от

температуры обработки. Минеральные трансплантаты, синтезированные при высоких температурах, очень плотные с очень ограниченной биоразлагаемостью. Гидроксиапатитный носитель обычно используется в качестве инертных биосовместимых наполнителей. При более низких температурах гидроксиапатит в виде частиц пористый и подвергается медленной резорбции.

Таким образом, аутогенный костный материал в сочетании с другими материалами для направленной костной регенерации, по-видимому, обладает некоторыми преимуществами по сравнению с одними только аллогенными, ксеногенными и синтетическими материалами.

За последние несколько десятилетий были проведены обширные исследования по разработке новых вариантов биоматериала. Различные трансплантаты твердых тканей и барьерные мембраны были исследованы для использования при реконструктивных операциях в полости рта. На сегодняшний день не существует идеального варианта биоматериала или хирургического вмешательства.

### **1.3. Симвастатин – основные направления применения.**

#### **Клеточно-генетическая связь с регенерацией и воспалением.**

Статины, известные как ингибиторы гидроксиметилглутарил-КоА (ГМГ-КоА) редуктазы, используются перорально для лечения гиперхолестеринемии и гиперлипидемии. Использование статинов в области регенерации костной ткани в настоящее время исследуется из-за существующей потребности в нетоксичных регенераторных средствах, способных усилить формирование костной ткани одновременно со снижением воспалительного ответа [94]. Впервые о таких эффектах было сообщено в 1999 году, когда авторы обнаружили, что статины увеличивают образование костей за счет стимуляции выработки костного морфогенного протеина-2 (BMP-2) в костных клетках грызунов [163].

Симвастатин - синтетический статин с несколькими второстепенными эффектами, включающими предотвращение костной резорбции, анаболическое действие на костную ткань. Эти эффекты симвастатина и других членов семейства статинов осуществляются в результате повышенного BMP-2,9. Статины подавляют апоптоз клеток за счет трансформирующего фактора роста b/Smad3 в остеобластах [158]. Они также обладают противовоспалительным действием, ингибируя поверхностные молекулы лейкоцитов. К тому же они подавляют миграцию и хемотаксис нейтрофилов, снижают межклеточную адгезию ICAM-1 (inter-Cellular Adhesion Molecule 1 – молекула клеточной адгезии) в моноцитах и макрофагах, уменьшают секрецию интерлейкина-6. Они способствуют дифференцировке остеобластов за счет увеличения экспрессии фактора роста эндотелия сосудов в остеобластах. Симвастатин также ингибирует дифференцировку остеокластов, индуцированную RANKL (активатор рецептора ядерного фактора каппа-B-лиганд, также известный как лиганд фактора некроза опухоли, член суперсемейства 11 (TNFSF11), связанный с активацией TNF-индуцированный цитокин (TRANCE), лиганд остеопротегерина (OPGL) и фактор дифференцировки остеокластов (ODF). Представляет собой белок, который у людей кодируется геном TNFSF11 и играет важную роль в метаболизме костной ткани, активируя остеокласты. В нескольких исследованиях были показаны многообещающие результаты использования симвастатина в качестве фактора, индуцирующего образование новой кости в регенеративных процессах [75].

Применение симвастатина в качестве остеоиндуктивного материала для регенеративных процессов в настоящее время является приоритетным направлением [44, 174, 58, 65, 75, 60, 160]. В исследовании J. Tu и соавт. (2017) была проведена оценка эффектов и сигнальных путей, через которые происходила дифференцировка хондроцитов под влиянием симвастатина. Авторами показано, что симвастатин индуцирует дифференцировку



хондроцитов, что подтверждается повышенной экспрессией коллагена типа II и индуцированным синтезом сульфатированного протеогликана. Результаты вестерн-блоттинга показали, что экспрессия коллагена типа II увеличивалась в 6 раз в зависимости от дозы. Симвастатин-индуцированная дифференцировка зависела от инактивации  $\beta$ -катенина, поскольку симвастатин подавлял накопление  $\beta$ -катенина, которое характеризовалось транслокацией  $\beta$ -катенина в ядро из цитоплазмы. Таким образом, исследователи продемонстрировали, что симвастатин увеличивает дифференцировку суставных хондроцитов кролика по пути Wnt/ $\beta$ -катенина [158].

В исследовании Sousa D.N. и соавт. (2020) была проведена оценка местного применения симвастатина в сочетании с депротеинизированной бычьей костью с двухфазной керамикой гидроксиапатит/ $\beta$ -трикальцийфосфат и с коллагеновой губкой. При гистометрическом анализе использование симвастатина показало увеличение образования кости в костных дефектах мышечной ткани в сочетании со всеми заменителями кости. Больше образование кости наблюдалось в группах с применением симвастатина, нежели без него. Следовательно, симвастатин в сочетании с депротеинизированной бычьей костью вызывал значительно большее образование новой кости [111].

В литературе описаны исследования, в которых оценивали местное применение статинов при терапии заболеваний пародонта [181, 100, 94]. Заболевание пародонта – воспалительный процесс, характеризующийся кровоточивостью десен, формирование пародонтальных карманов и разрушением ткани, поддерживающей пародонт, за счет высвобождения бактериальных липополисахаридов и протеаз из биопленки. Патогенетически воспаление тканей связано с синтезом активных форм кислорода, нейтрофилами, а также с активацией нескольких медиаторов воспаления, таких как интерлейкин-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-8 (IL-

8) и фактор некроза опухоли (TNF- $\alpha$ ), который способствует нарушению баланса костного гомеостаза, в результате чего при деструкции альвеолярной костной ткани увеличивается активность матриксных металлопротеиназ и соединительной дегенерации тканей вследствие повышения остеокластогенеза [28, 80]. В другом экспериментальном исследовании Swerts A.A. и соавт. (2017) было показано, что комплексное применение механического удаления зубного камня в сочетании с препаратами на основе симвастатина улучшает исходы заболевания у пациентов с пародонтитом по сравнению с группами с применением стандартных методик [181].

В работе Yaghobee S. и соавт. (2018) не было значимых различий между применением при открытом синус-лифтинге депротенизированной бычьей кости с симвастатином и без него [138]. Вместе с тем, в работе Gouda A. и соавт. (2018) гистоморфометрические результаты биопсий новообразованной кости показали, что количество новой костной ткани было выше в группе с использованием симвастатина по сравнению с группой, где применялся трикальций-фосфат ( $\beta$ -ТСР) через девять месяцев после оперативного вмешательства. С другой стороны, рентгенологическая оценка показала, что скорость резорбции в группе симвастатина была выше, чем в контрольной группе, однако разница была незначительной [115].

Для улучшения регенерации и остеоинтеграции дентальных имплантатов, особенно у пациентов с остеопорозом, необходимы новые стратегии лечения. В исследовании Liu X. и соавт. (2016) при нанесении симвастатина на поверхность имплантов диоксида титана при помощи полимерных мицелл была достигнута состоятельная остеоинтеграция. Биологические эффекты оценивали как *in vitro*, так и *in vivo*. Результаты показали, что поверхности имплантов с симвастатином могут способствовать ранней адгезии клеток, повышению активности щелочной фосфатазы и концентрации внеклеточного остеокальцина в остеобластах, а также экспрессии BMP2 (bone morphogenetic protein 2 - костный

морфогенетический белок второго типа). Воздействие на остеоинтеграцию симвастатином повышает контакт на границе имплантат-кость, а также демонстрирует регенераторный потенциал для широкого применения в улучшении местной регенерации кости и остеоинтеграции, особенно у пациентов с остеопорозом [168].

Тан J. и соавт. (2015) оценивали влияние одной локальной инъекции симвастатина на фиксацию импланта в модели крыс с остеопорозом с удаленными яичниками. Было показано, что 5 и 10 мг симвастатина значительно улучшали минеральную плотность кости, увеличивали долю объема кости, толщину и количество трабекул. Также прослеживалось увеличение скорости наложения минералов в кости. Кроме того, фиксация имплантата была значительно увеличена, а экспрессия BMP2 была заметно увеличена. Местное введение одной дозы симвастатина также способствует ангиогенезу. Количество сосудов, объем, толщина, площадь поверхности и сосудистый объем на объем ткани были значительно увеличены. Фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), экспрессия молекулы адгезии эндотелиальных клеток тромбоцитов-1 были повышены. В итоге, однократная местная инъекция симвастатина значительно увеличивала образование кости, способствовала остеоинтеграции и улучшала фиксацию имплантата у крыс после овариоэктомии. Основным механизмом, по-видимому, включает усиление экспрессии BMP2 и ангиогенез в кости-мишени [161].

#### **1.4. Основания применения симвастатина при реконструктивных операциях в полости рта.**

Исследования последних лет показали, что остеокондуктивные каркасы могут действовать как временная структура для облегчения или даже ускорения восстановления кости при критических дефектах.

Применение симвастатина *per os* для достижения остеогенных свойств не эффективно. Существуют данные о токсичности симвастатина

при системном использовании. Нарушение тромбопоэза и лейкопоэза костного мозга являются побочными действиями симвастатина [157, 162]. Однако основным побочным эффектом статинов является рабдомиолиз [120, 117]. Вместе с тем, вышеизложенные данные противоречивы, и некоторые авторы отрицают побочное действие симвастатина [74]. В силу вышеуказанных причин появилось множество работ на тему местной доставки симвастатина в целях анализа противовоспалительных и регенеративных процессов.

В последние годы появилась технология трехмерной (3D) печати, которая может использоваться для изготовления имплантатов с индивидуализированной внешней формой, внутренней пористой структурой и архитектурой, аналогичной натуральным костям.

Но несмотря на это такие имплантаты не обладают биологической активностью. Создание функционирующих каркасов костной ткани с использованием факторов остеогенной индукции является многообещающим методом для облегчения заживления кости. В работе Zhang W. и соавт. (2020) путем плавления электронным лучом была разработана пористая титановая клетка, которая была заполнена гидрогелем симвастатин/полоксамер 407. Проведена оценка прорастания кости. Было продемонстрировано, что гидрогель симвастатин/полоксамер 407 увеличивает кровоток в кости, активность остеобластов и вращение кости в каркас [170].

В другом исследовании Zhang Z.Z. и соавт. (2019) продемонстрировали 3D печать каркаса из поли-молочной и гликолевой кислоты (PLGA) с функцией высвобождения симвастатина путем быстрого прототипирования, в которую был включен коллаген для остеокондуктивности. Были проведены анализы *in vitro* с МСК костного мозга. Результаты продемонстрировали, что совмещение PLGA с коллагеном обеспечивает лучшую адгезию клеток, тогда как длительное высвобождение

симвастатином способствует большей пролиферации клеток без значительной цитотоксичности по сравнению с пустым каркасом [167].

При создании различных каркасов для доставки симвастатина должны учитываться критерии: механическая прочность и эффективные остеоиндукция и остеоиндукция, пористость. Применение каркасов из биокомпозитов полиэфирэфиркетона (PEEK), покрытые гидрогелем и гиалуроновой кислотой, симвастатином, также обладали регенеративным потенциалом. При заполнении симвастатином PEEK каркаса активность щелочной фосфатазы, оценка отложения кальциевых минералов и экспрессия генов остеогенного потенциала демонстрируют превосходную остеогенную дифференцировку преостеобластов [156]. Хотя высокопористые каркасы явно обладают огромным преимуществом для регенерации костной ткани, значительное увеличение пористости также приводит к сниженным механическим параметрам, что может привести к структурной нестабильности в исходном состоянии. Следовательно, механические свойства, особенно модуль сжатия, важны для создания каркаса для доставки лекарственных средств в костной ткани.

Высвобождение симвастатина из смешанных каркасов на основе поли-молочной и гликолевой кислоты (PLGA) с гидроксиапатитом (ГА) или  $\beta$ -трикальцийфосфатом ( $\beta$ ТСР) показало многообещающие результаты [143]. Соотношение PLGA и двухфазной керамики составляло 2:1. Чтобы оценить деградацию каркасов и высвобождение симвастатина, образцы взвешивали и затем инкубировали в 50 мл фосфатно-солевого буфера. Введение симвастатина в каркас и увеличение его пористости не оказало существенного влияния на механические свойства. Время высвобождения симвастатина связано с такими факторами, как степень гидратации каркасов. Чем выше пористость, тем быстрее гидратация. Так, данные Gentile P. и соавт. (2016) свидетельствуют о 3-х дневной задержке микрочастиц из PLGA вследствие гидрофобных свойств, однако затем показана быстрая диффузия

симвастатина в окружающие ткани [112]. Другими факторами, влияющими на период задержки, являются градиент концентрации симвастатина, пористость и взаимосвязь пор в каркасе. Этот период задержки подразумевает, что образцы должны быть гидратированы перед анализом, чтобы гарантировать, что биологические жидкости смогут сразу войти в каркас для обеспечения клеточного пула. Han X.Q. и соавт. (2014) изготовили каркасы с пористостью 90% из PLGA и двухфазной керамикой с включенным симвастатином. Данный каркас продемонстрировал пролонгированное высвобождение симвастатина и успешное распространение и дифференцировку стволовых клеток костного мозга, используя при этом дозу 0,5 мг симвастатина *in vitro* [83].

Не смотря на положительные результаты со стороны биополимерных носителей, были созданы каркасы на основе других биоинертных материалов. Кальций фосфатные цементы имеют аналогичную химическую формулу, как и минеральный компонент костной ткани, и могут также превосходно адаптироваться к форме дефекта. Группу кальций-фосфатных цементов можно разделить на две подгруппы: гидроксипатитовые цементы и кислые цементы. Новый костный каркас, содержащий биокерамические и биополимерные материалы, с остеоиндуктивной молекулой симвастатина показали состоятельные регенераторные результаты. Гидрогель из оксидированного нановолокна целлюлозы и желатина (гель) загружали в двухфазную керамику из фосфата кальция, в которую был заключен симвастатин, в результате чего получали каркас с остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами. Изготовленный каркас показал взаимосвязанную пористую архитектуру. После загрузки механическая стабильность керамического каркаса была увеличена, что подходит для применения регенерации костных тканей. Симвастатин успешно наносился на каркас с одновременным медленным высвобождением лекарства из каркаса вследствие остеокластической резорбции каркаса [37].

Все чаще в литературе демонстрируется дозозависимая индукция симвастатином дифференцировки МСК, а также токсических реакций [159, 154, 177, 83]. Fukui T. и соавт. (2012) использовали биоразлагаемый желатиновый гидрогель как систему доставки статинов для репаративной регенерации костной ткани *in vivo* крысах. Крысы получали местное введение либо конъюгированного с симвастатином желатинового гидрогеля, либо одного гидрогеля желатина. Функциональное заживление костей также было значительно лучше с увеличением экспрессии факторов роста, связанных с ангиогенезом и остеогенезом в периостальной грануляционной ткани в группе с применением симвастатина, чем в группе без использования последнего [177].

Таким образом, полученные разноречивые данные литературы касательно роли симвастатина в остеоиндукции демонстрируют необходимость дальнейшего изучения его репаративных свойств.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Данная диссертационная работа включала *лабораторный in vitro* и *экспериментальный in vivo* этапы.

### 2.1. Методы лабораторных исследований

Лабораторный этап работы проводили в составе научной группы на базе кафедры биоинженерии биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова (руководитель научной группы - старший научный сотрудник кафедры, к.б.н. А.П. Бонарцев; заведующий кафедрой академик РАН М.П. Кирпичников).

#### 2.1.1. Реактивы и оборудование

Для получения матриц использовали поли-3-оксибутират (ПОБ), полученный микробиологическим путем [128], альгинат натрия (АГ), симвастатин, аморфный гидроксиапатит (ГА), карбонат аммония, PBS (Merck, Германия).

Биосовместимость *in vitro* оценивали на культуре ММСК крыс Вистар, клетки выделяли из жировой ткани трёхдневных самцов [1]. Количество жизнеспособных клеток определяли методом ХТТ (Cell Proliferation Assay Kit, Biological Industries) [135].

#### 2.1.2. Получение полимерных матриц и изучение их свойств.

Полимерные матрицы получали методом выщелачивания с использованием карбоната аммония в качестве порообразователя. Раствор ПОБ смешивали с аморфным гидроксиапатитом (10%) и/или симвастатином (5%), помещали в чашку Петри, перемешивали с карбонатом аммония и после испарения растворителя промывали дистиллированной водой до полного вымывания карбоната аммония.



### *Исследование микроструктуры матриксов.*

Микрофотографии матриксов получали с помощью сканирующего электронного микроскопа (JSM-6510LV; JEOL) и на световом микроскопе Nikon SMZ1500 (Nikon) [135].

Пористость полимерных матриксов рассчитывали исходя из уравнений плотности и пористости:

$$D=m/h \times l \times w, \quad (1)$$

где  $D$  — плотность ( $\text{г/см}^3$ ),  $m$  — масса матрикса ( $\text{г}$ ),  $h$  — высота или толщина ( $\text{см}$ ),  $l$  — длина ( $\text{см}$ ),  $w$  — ширина ( $\text{см}$ ).

$$P=(1-D/d) \times 100\%, \quad (2)$$

где  $P$  — пористость (%),  $D$  — плотность, рассчитанная из уравнения (1),  $d$  — теоретическая плотность матрикса при расчёте отсутствия пор ( $\text{г/см}^3$ ).

Плотность ПОБ составляет  $1,243 \text{ г/см}^3$ . Массу измеряли на лабораторных весах AL-64 (Acculab).

Для определения связности пор использовали тест на пропитку тушью [135].

### **Изучение механических свойств.**

Эксперименты по изучению механических свойств проводили на сухих образцах с использованием реометра Anton Paar MCR 302. Реометр оборудован измерительной системой плита-плита. Типичная толщина исследуемых образцов составила 3-4 мм, диаметр — 2,5 см. Модуль Юнга измеряли с помощью сжатия образцов. Был построен график зависимости нормального давления от относительной деформации. Затем вычисляли модуль Юнга по наклону линейной части графика.

### **Высвобождение лекарственного вещества.**

Матрикссы с 5% включением по массе симвастатина (3 матрикса на каждую точку) помещали в 10 мл водного раствора PBS и инкубировали в термостате при  $37^\circ\text{C}$  в течение 14 суток для анализа пролонгированного

высвобождения симвастатина из пористых ПОБ-матрикс [51]. В качестве контроля использовали непористую плёнку без лекарственного вещества. После каждого измерения количества высвободившегося лекарственного вещества матриксы помещали в свежий раствор PBS. Количество высвободившегося симвастатина определяли спектрофотометрически при  $\lambda=238$  нм (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). Расчёт финальной стадии высвобождения проверяли по математической модели Фика первого порядка.

Модель первого порядка использовалась для описания высвобождения лекарственного вещества. Кинетика описывается уравнением:

$$dC/dt = -KC,$$

где  $C$  — концентрация лекарственного вещества,  $K$  — постоянная кинетики высвобождения лекарственного вещества первого порядка.

Учитывая первый закон Фика, можно получить связь для константы  $K$ :

$$D/Vh = K,$$

где  $D$  — коэффициент диффузии в разделительной среде,  $V$  — объём среды высвобождения,  $h$  — толщина диффузионного слоя.

Как следствие, модель первого порядка выражается в следующем виде:

$$\frac{M_t}{M_0} = 1 - k_3 \exp(-kt), \quad (3)$$

где  $k_3 = e^k$  — множитель перед экспонентой,  $k$  — обратная к времени затухания величина [57, 175].

### **Оценка роста клеток.**

Оценивали цитотоксичность и рост ММСК на плёнках и матриксах. ММСК, полученные по описанной ранее методике [135], культивировали в стандартной среде DMEM (Dubecco's modified Eagle medium) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) и 1% антибиотика (пенициллин+стрептомицин) до 3-го пассажа. Для оценки цитотоксичности

материала ММСК заседали в 96-луночный планшет из расчёта 2000 клеток на лунку. После инкубации в течение 24 ч удостоверялись, что клетки прикрепились, после чего вместе со сменой среды в лунку добавляли исследуемый образец, который предварительно стерилизовали 96% этанолом в течение 1 ч. Рост живых клеток в присутствии образца определяли стандартным методом ХТТ (Cell Proliferation Kit, Biological Industries) на 1, 3 и 7-е сутки инкубации.

Для оценки роста клеток предварительно стерилизованные 96% этанолом и обрезанные по размерам лунки плёнки и матриксы помещали в 96-луночный планшет. ММСК заседали на плёнки и матриксы из расчёта 2000 клеток на лунку. Рост живых клеток определяли стандартным методом ХТТ на 1, 3 и 7-е сутки инкубации клеток на плёнках и матриксах.

### **2.1.3. Оценка активности щелочной фосфатазы.**

Перед проведением экспериментов клетки фенотипировали с помощью антител к поверхностным маркерам CD45 и CD90 методом проточной цитометрии по ранее описанной методике [135]. Культуральную среду для остеодифференцировки ММСК готовили на основе DMEM с 10% ЭТС (Biological Industries), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, 10 мМ дексаметазона (KRKA), 10 мМ  $\beta$ -глицерофосфата (Merck) и 50 мМ аскорбиновой кислоты (Merck) [135]. Образцы полимерных матриксов диаметром 1,5 см. применяли для определения щелочной фосфатазы. ММСК заседали исходя из расчёта 7000 клеток на образец и анализировали на 7, 14 и 28-е сутки. Образцы, в которых присутствовали растущие клетки, промывали дважды в PBS, затем перемещали в лизирующий буфер (250 мМ NaCl, 0,1% Тритон X-100, 50 мМ Hepes pH 7,5) и подвергали трём циклам замораживания-оттаивания. Затем в течение 10 минут полученные образцы центрифугировали на скорости 10 000 об/мин и определяли уровень щелочной фосфатазы. В лунки 96-луночного планшета добавляли 100 мкл пробы и 50 мкл реагента (15 мМ н-нитрофенилфосфат

(Merck), 2 mM MgCl pH 10,0), инкубировали в термостате в течение 2 ч, после чего измеряли оптическую плотность при 405 нм.

## **2.2 Исследование регенерации критических костных дефектов *in vivo*.**

Моделирование критического костного дефекта на теменной кости крыс является хорошо отработанным и общепризнанным методом [95, 151], так как позволяет изучить остеоиндуктивные свойства остеопластических материалов и провести сравнительный анализ полученных данных с результатами других исследований [78, 151, 136].

Все эксперименты были проведены в соответствии с рекомендациями локального биоэтического комитета (протокол № 8а заседания биоэтической комиссии НижГМА от 10.11.2015) и протоколу №18 заседания Комитета по Этике Медицинского института РУДН им. Патриса Лумумбы от 18 мая 2023 года, при их постановке руководствовались документом «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и № 701 от 24.07.1978 г., «Правила лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г. и ГОСТ ISO 10993-2-2011.

Эксперименты были проведены на 70 самцах крыс линии Wistar массой тела 400г. В зависимости от используемого матрикса для имплантации в костный дефект самцы крыс были распределены на 7 групп: по 10 особей в каждой группе.

Так как основной целью данного этапа исследования была регенерация костной ткани в области её дефектов (свод черепа крысы), использовали только объёмные пористые матриксы с симвастатином со всеми вариантами насыщения: с применением АГ и ГА и без их использования. В качестве групп сравнения служили простые матриксы ПОБ без симвастатина: ПОБ/АГ, ПОБ/ГА/АГ. Распределение по исследуемым группам представлено в таблице 1.

Таблица 1

## Описание исследуемых групп

<i>Номер группы</i>	<i>Характеристика группы</i>
<i>Группа 1</i>	Имплантация материала в область костного дефекта на основе чистого поли-3-оксибутирата
<i>Группа 2</i>	Имплантация материала в область костного дефекта на основе поли-3-оксибутирата с альгинатом натрия
<i>Группа 3</i>	Имплантация материала в область костного дефекта на основе поли-3-оксибутирата с альгинатом натрия и аморфным гидроксиапатитом
<i>Группа 4</i>	Имплантация материала в область костного дефекта на основе поли-3-оксибутирата с аморфным гидроксиапатитом
<i>Группа 5</i>	Имплантация материала в область костного дефекта на основе поли-3-оксибутирата, аморфного гидроксиапатита и симвастатина
<i>Группа 6</i>	Имплантация материала в область костного дефекта на основе поли-3-оксибутирата с альгинатом натрия, аморфным гидроксиапатитом и симвастатином
<i>Группа 7</i>	Контрольная группа. Формирование критического костного дефекта без имплантации в его область остеопластических материалов

**2.2.1 Методика операции**

За 10 мин до вмешательства испытуемым животным в качестве премедикации внутримышечно вводили Рометар согласно инструкции. Операции проводили под внутрибрюшинным наркозом «Золетил 100» (Virbac, Франция) в дозе 125 мкг/кг. Перед проведением разреза лобную и теменную область головы крысы брили от шерсти и обрабатывали

спиртовым раствором хлоргексидина в качестве антисептика. Далее производили разрез кожи и надкостницы до кости, отслаивали кожно-надкостничный лоскут и скелетировали свод черепа. Осуществляли гемостаз. Затем в области сагиттального шва между теменными костями шаровидным алмазным бором проводили трепанацию с формированием круглого диаметром 8 мм. Алмазный бор устанавливали в прямой хирургический наконечник, использовали физиодиспенсер. Трепанацию осуществляли максимально атравматично, с сохранением целостности твёрдой мозговой оболочки и центрального венозного синуса. Охлаждение кости во время остеотомии осуществлялось 10°C физиологическим раствором. В исследуемых группах в костный дефект помещали соответствующий матрикс, в контрольной группе костный дефект оставляли незаполненным. Мягкотканый лоскут укладывали на место и рану послойно ушивали резорбируемыми швами Vicryl Rapid 4-0.

### **2.2.2 Использование флюоресцентных меток для изучения скорости регенерации костных дефектов**

С целью оценки динамики образования костной ткани при стимуляции репаративного остеогенеза проводили прижизненное мечение флуорисцентными метками костной ткани. Всем крысам в группах с имплантацией полиоксибутирата, полиоксибутирата и аморфного гидроксиапатита, а так же в группе с имплантацией композита, состоявшего из полиоксибутирата, аморфного гидроксиапатита, альгината натрия и симвастатина с целью выявления скорости образования костной ткани и распространения костного регенерата в трехмерном пространстве и разделения эффектов стимуляции репаративного остеогенеза полиоксибутиратом, гидроксиапатитом и симвастатином, внутрибрюшинно вводили Доксимаг (АО "Мосагроген") на 8-й, 9-й и 10-й день после операции. В последующие дни на 15-й, 16-й и 17-й день эксперимента вводили окситетрамаг (АО "Мосагроген"). В заключении на 22-й, 23-й и 24-й

день эксперимента проводили инъекции ализариновым красным С. Метки вводили в дозировке 25 мг/кг массы тела в соответствии с инструкцией производителя.

Методология применения тетрациклиноподобных флюорохромов для выявления вновь образованного молодого костного регенерата основывается на их связывании с ионами кальция, входящими в состав минерального костного матрикса (гидроксиапатита). При взаимодействии ионов кальция и флюорохромов образуются хелатные соединения, которые накапливаются в новообразованной костной ткани. Известно, что различные тетрациклиноподобные флюорохромы при освещении светом определенной длины волны поглощают его и начинают излучать свет измененной длины волны другого цвета (т.е. с более длинными длинами волн, чем поглощённый свет). Поэтому для оценки скорости образования костных регенератов в различные сроки после проведённых операций животным вводили различные флюорохромы. Указанная тактика была применена во всех экспериментальных группах. Так, на 8-й, 9-й и 10-й день после операции животным внутрибрюшинно вводили Доксимаг (при флюоресцентной микроскопии вызывает зеленое свечение). Данный срок соответствует началу минерализации молодого костного матрикса. Следующей меткой был окситетрамаг (при флюоресцентной микроскопии вызывает желтовато-зеленоватое свечение), его вводили на 15-й, 16-й и 17-й день. На указанном сроке образовывалась новая меченая область вследствие включения окситетрамага в новообразованную костную ткань. В последующем на 22-й, 23-й и 24-й день был введен ализариновый красный С (при проведении флюоресцентной микроскопии характеризуется красным свечением). Вследствие введения данного вещества происходило окрашивание краев минерализованного регенерата.

Всем крысам линии Wistar вводили метки в дозировке 25 мг/кг массы тела. Таким образом, схема применения тетрациклиновых флюорохромов для

проведения маркировки сроков минерализации проводилась следующим образом: 8-9-10 дни, затем 15-16-17 дни и далее на 22-23-24 сутки.

К окончанию процессов первичного остеогенеза, что соответствовало 28 дню наблюдения, проводилась эвтаназия лабораторных животных. На своде черепа выделялась область регенерата с отступом не менее 5 мм от его границ. В течение 24 часов полученные образцы фиксировали в 70% этиловом спирте, после чего проводили гистологическое исследование. Данный метод фиксации используется, как правило, с целью изготовления не декальцинированных срезов (метод костных шлифов), сохранения флуоресцентных меток и эффективной пропитки костной ткани.

### **2.2.3 Гистологическое исследование**

Гистологические и гистоморфометрические исследования были проведены на базе кафедры патологической анатомии (зав. каф. д.м.н., профессор Бабиченко И.И.) медицинского института Российского университета дружбы народов.

После фиксации образцов в 70% этаноле в течение 24-72 часов их промывали дистиллированной водой, затем обезвоживали и заливали в пластифицирующуюся смолу (Technovit 9100, Германия). Таким образом формировались пластиковые блоки с не декальцинированной костной тканью внутри. Перед тем как проводить нарезку образцов для непосредственного микроскопического исследования, блоки сканировали на конусно-лучевом компьютерном томографе Point 3D Combi 500 C (Pointnix, Ю. Корея) на отработанном режиме 63kVp/7mA. Разрешение составляло 0,2 мм.

Далее блоки нарезали толщиной 100 мкм (Isomet 4000, США) и шлифовали до 20-40 мкм. После этого проводилась флуоресцентная микроскопия с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B. Микрофотографирование проводилось на стандартном наборе фильтров с последующим сложением RGB-каналов в единое изображение в



штатном программном обеспечении Leica для флуоресцентной микроскопии (мультиканальная гистопантограмма).

После флюоресцентной микроскопии шлифы окрашивали красителем небесный трихром. Заключали в бальзам и высушивали, затем осуществляли фотографирование на микроскопе Leica 2500 с цифровой фотокамерой CS5.

В контрольной группе микроскопическое исследование проводили гистологических препаратов, прошедших стандартную гистологическую парафиновую проводку, фиксированных в 10% нейтральным формалином по общепринятой методике. Парафиновые срезы толщиной 3-5 мкм. окрашивали по Маллори. Фотодокументирование осуществляли с использованием вышеописанного оборудования.

При морфометрическом исследовании определяли доленое соотношение тканей в составе костного регенерата. Определяли относительный объем костной ткани -  $BV/TV$ , относительный объем соединительной ткани  $FbV/TV$ . Относительную долю остеопластического материала не определяли в виду трудности цифровой обработки срезов, полученных методом костных шлифов и внеочаговым расположением костнопластического материала.

### **2.3. Рентгенологическое исследование регенерации костных дефектов.**

Рентгенологическое исследование регенерации костных дефектов проводили на конусно-лучевом компьютерном томографе Planmeca. Параметры данных сканирования следующие: DATE=20181002; TIME=213858; PIXELSIZE=150; BIT\_DEPTH=16; CALIBRATED\_SCALE=0.150000; ROTATION\_ANGLE=0; HORZ\_MIRROR=0; IMAGE\_TYPE=5; IMAGE\_SUB\_TYPE=1; IMAGE\_FORMAT=dcm; TOOTH\_MASK=0.

После сканирования блоков DICOM файлы импортировали в программу Horos v.3.2.1. ([www.horosproject.org](http://www.horosproject.org). GNU Lesser General Public

License, Version 3 (LGPL-3.0), визуализировали костный дефект и измеряли его размеры в сагиттальной и трансверсальной плоскостях, площадь дефекта определяли в аксиальной плоскости.



**Рисунок 1. Пример визуализации свода черепа крысы с костным дефектом на аксиальном срезе.**

#### **2.4. Статистическая обработка гистологических данных**

Для статистической обработки применяли программу SigmaPlot 11.0. Массив выборки был оценен по методу Шапиро-Уилка. Данные по каждой особи усредняли и вычисляли медиану (М) и при соответствии нормальному распределению (по результатам теста Шапиро–Уилка) среднее и среднеквадратичное отклонение  $M \pm SD$ . Для сравнения экспериментальных групп использовали непараметрический тест Краскела–Уоллиса и однофакторный анализ по методу Тукей. Уровнем достоверности считали  $p < 0,05$ .

При расчёте площади костных дефектов по данным конусно-лучевой компьютерной томографии (КЛКТ) пользовались описательной статистикой с определением максимальных и минимальных значений площади дефекта,

среднего значения и стандартной девиации. Также пользовались критериями Тьюки и Стьюдента с поправкой Бонферрони.

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Результаты лабораторных исследований

#### 3.1.1. Морфология пленок и матриц на основе поли-3-оксибутирата с включением симвастатина

В результате проведенного исследования были получены плёнки из чистого полимера ПОБ и с включением 1% и 5% симвастатина (рис. 2а). По данным сканирующей электронной микроскопии поверхность плёнки была гладкой и без шероховатостей (рис. 2б). Оптимальный рост клеток (максимальная оптическая плотность клеток) происходил на плёнках с концентрацией СИМ 5%, ввиду чего данную концентрацию СИМ использовали для дальнейших экспериментов.



Рисунок 2а

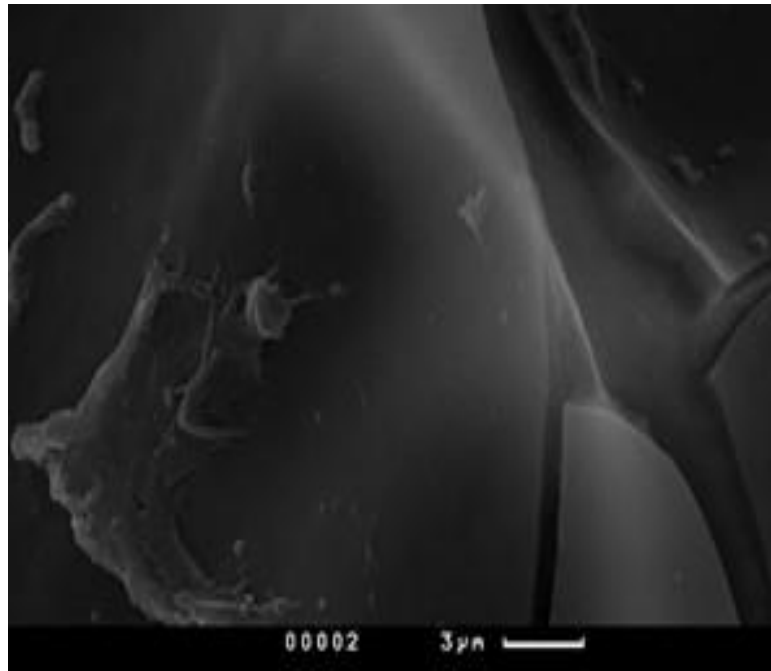


Рисунок 2б

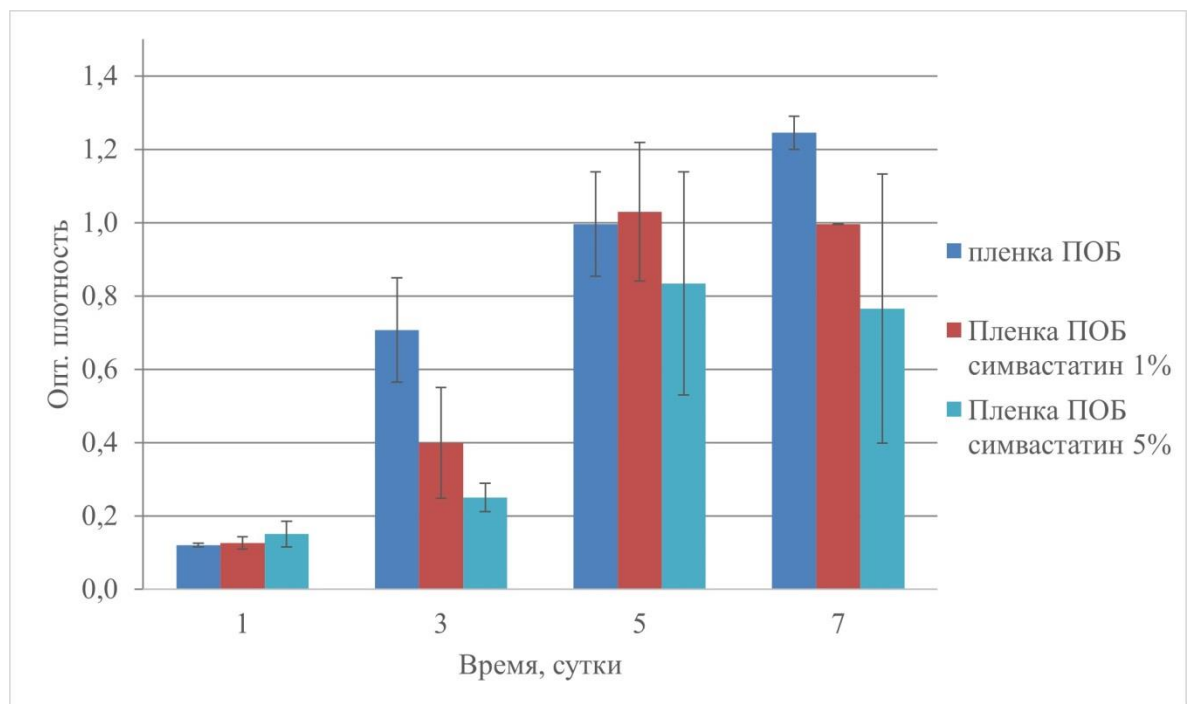


Рисунок 2в

**Рисунок 2.** Фотография (а) и микрофотография (б) плёнки (сканирующая электронная микроскопия  $\times 2500$ ), рост клеток на плёнках ПОБ, включением симвастатина (1% и 5% по массе) (в).

В результате проведенных исследований также были получены трёхмерные пористые матрицы, состоящие из ПОБ и ПОБ с включением

аморфного гидроксиапатита (ГА) (10% по массе) и симвастатина (СИМ) (5% по массе) (ПОБ/ГА/СИМ). Полученные матриксы получили жёсткую структуру, были не хрупкими и сохраняли форму (рис. 3а). Все типы матриксов обладали связанной системой пор, а закрытые поры, которые выглядят как белые области, отсутствовали (рис. 3б). Все пористые матриксы имели нерегулярную трёхмерную пористую структуру (рис. 3 в, г).



Рисунок 3а

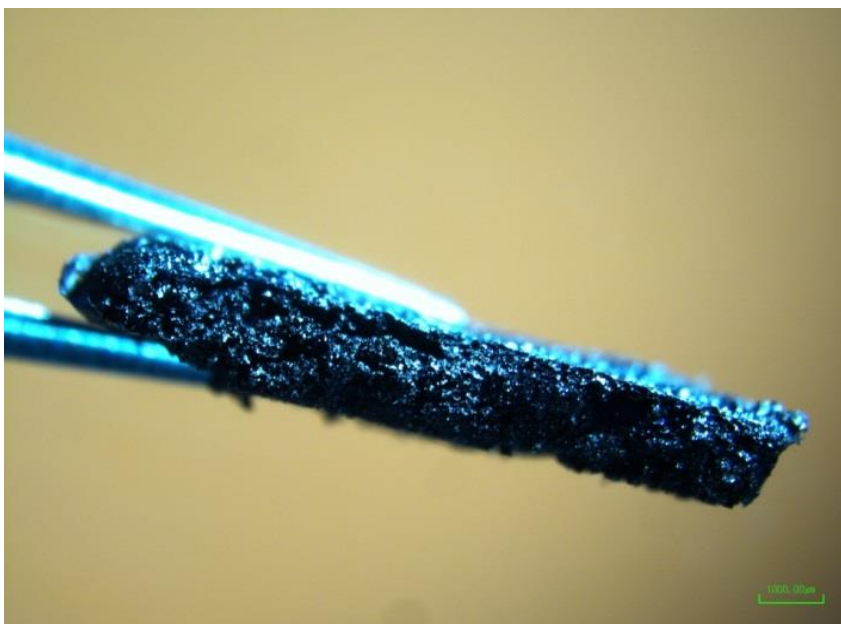


Рисунок 3б

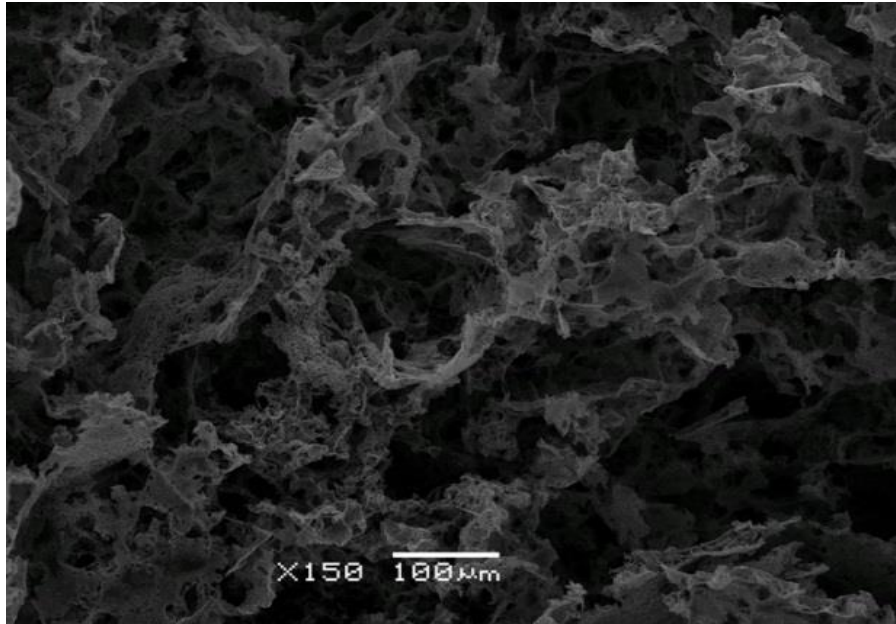


Рисунок 3в

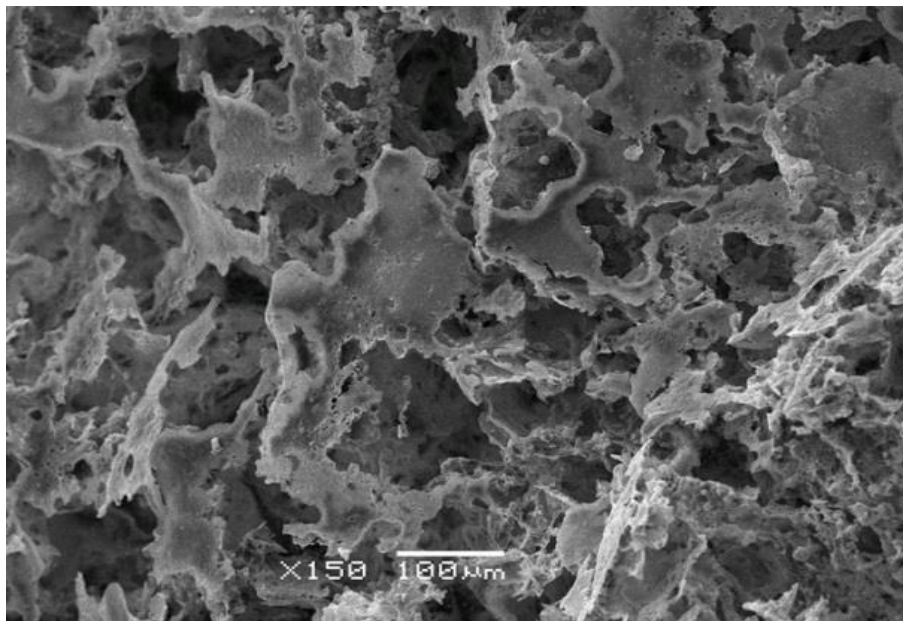


Рисунок 3г

**Рисунок 3.** Микроструктура полученных матриц из ПОб с включением аморфного гидроксиапатита и симвастатина (ПОб/ГА/СИМ).

Широкопольная световая микроскопия,  $\times 20$  (а, б); сканирующая электронная микроскопия,  $\times 150$  (в, г). а - матрикс из ПОб/ГА/СИМ; б - матрикс из ПОб/ГА/СИМ: чернильный тест; в - микроструктура матриц из ПОб; г - микроструктура матриц из ПОб/ГА/СИМ;

Как известно, пористость природной кости составляет 80% [11]. Как видно из таблицы 2, полученные нами значения пористости матриксов приближены к вышеописанному значению. Показано, что более высокая пористость позволяет клеткам лучше мигрировать в толщу образца [2, 34]. Следует отметить, что размер пор натуральной костной ткани составляет в среднем 50-100 мкм, что довольно близко к полученным значениям матриксов, причем для матриксов ПОБ/ГА/СИМ имеется тенденция (статистически недостоверная) к наименьшему размеру пор (таблица 2). Образцы с добавлением ГА демонстрировали более высокие значения модуля Юнга, а добавление лекарственного вещества еще более увеличивало жесткость матриксов (таблица 2).

Таблица 2

Пористость, размер пор и модуль Юнга полученных матриксов.

Состав матрикса	Пористость, %	Размер пор, мкм	Модуль Юнга, кПа
ПОБ	93±5	116±26	8,7±0,1
ПОБ/ГА	88 ±6	120±28	34,0±0.6*
ПОБ/ГА/СИМ	89±7	102±23	36,6±0.6*

**Примечание.** \*  $p < 0.05$  (по сравнению с группой ПОБ), #  $p < 0.05$  (по сравнению с группой ПОБ/ГА).

### 3.1.2. Высвобождение симвастатина из пленок на основе поли-3-оксибутирата с включением симвастатина

Выявлена высокая интенсивность высвобождения вещества в начальной фазе, начиная с 3-х суток, сменяющаяся выходом "на плато" при продолжительной инкубации (рис. 4а). Как видно по кинетической кривой, (рис. 4б) "взрывной эффект" выхода лекарственного вещества в 1-е сутки не наблюдался, высвобождение начиналось с 3-х суток и соответствовало кинетике, описываемой по математической модели высвобождения первого порядка.



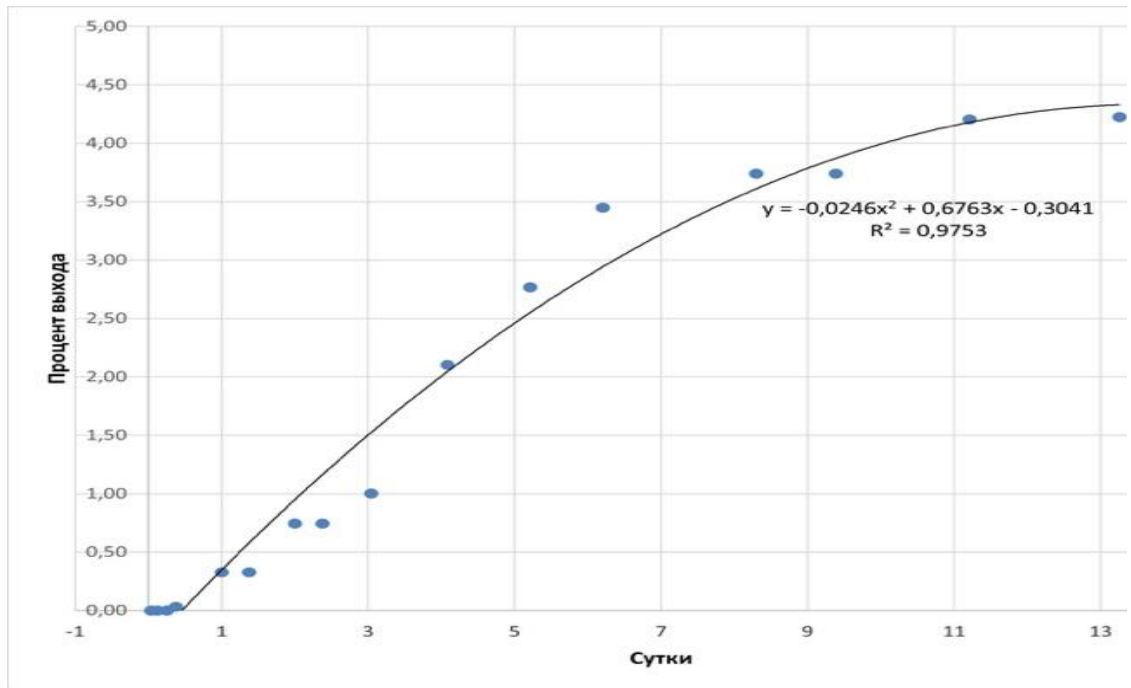


Рисунок 4а

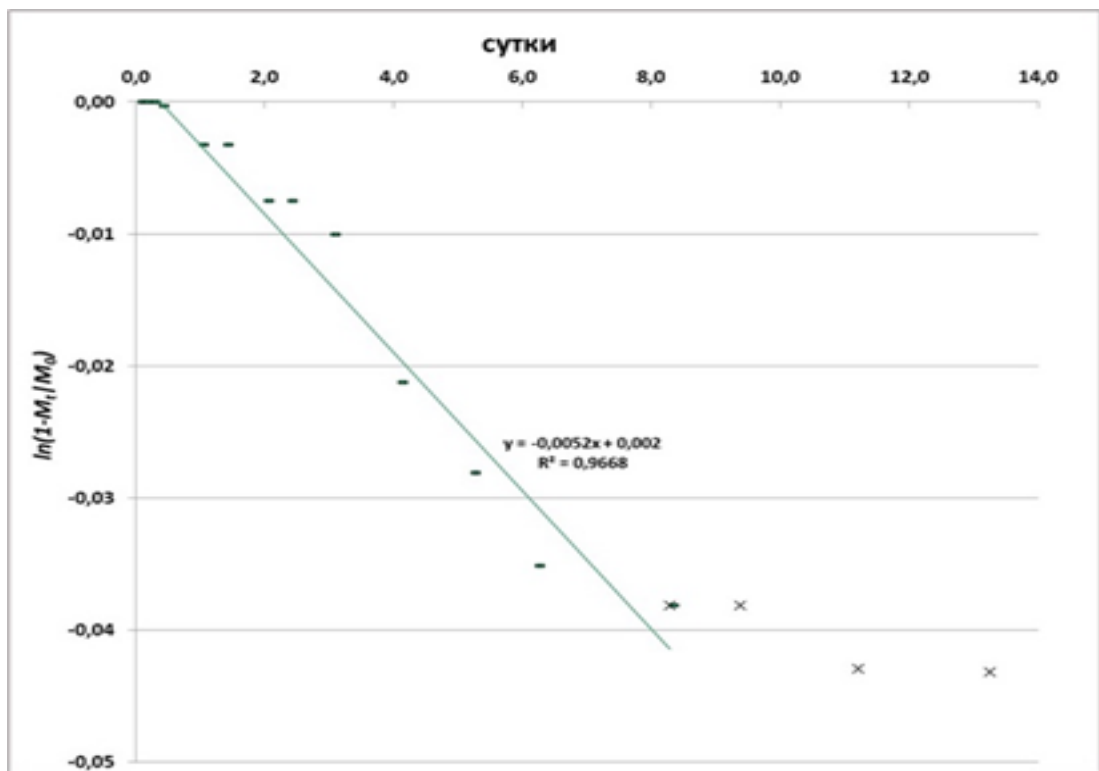


Рисунок 4б

**Рисунок 4.** Высвобождение симвастатина из пористых матриц ПОВ с включением симвастатина 5% по массе (а). Аппроксимация кинетики высвобождения симвастатина из пористых матриц по модели первого порядка (б).

Существует множество терапевтических систем, которые отображают этот тип высвобождения растворимых лекарственных веществ, включённых в пористые матриксы, когда количество высвобождаемого вещества пропорционально количеству оставшегося в матриксе. Таким образом, количество и доля активно высвобождающегося лекарственного вещества имеет тенденцию к уменьшению в зависимости от времени. Модель первого порядка больше подходит для описания конечной стадии высвобождения лекарственного вещества, поскольку выражение описывает позднюю стадию "фииковской" диффузии [7] (рис. 3б).

### **3.1.3. Исследование на цитотоксичность плёнок и матриксов.**

Исследовали рост ММСК на плёнках с включением симвастатина (1% и 5%). Несмотря на то, что увеличение содержания симвастатина в составе полимера приводило к уменьшению роста клеток, разница в количестве клеток не была значимой. В результате проведённых исследований для дальнейшей работы была выбрана концентрация симвастатина 5% по массе от количества полимера в изделии. Вместе с симвастатином, который поддерживает дифференцировку ММСК, в состав матрикса также был добавлен аморфный гидроксиапатит, который является неотъемлемым компонентом костной ткани и, как правило, используется для изготовления матриксов, предназначенных для инженерии этой ткани [12].

Для оценки цитотоксичности полимерных пористых матриксов ММСК культивировали в присутствии матриксов в течение 1 недели. Матрикс из ПОБ способен к поддержанию роста и пролиферации клеток (рис. 5б), однако при добавлении в состав матрикса ГА и СИМ увеличения роста клеток не происходило, как при росте на пленках (рис. 5а), но и количество живых клеток не снижалось, что также можно объяснить начинающейся дифференцировкой ММСК на матриксах под влиянием ГА и СИМ, который, как видно по кинетике высвобождения лекарственных

веществ, активно высвобождается из матриксов на 3-и сутки. Однако на матриксах ПОб происходило небольшое увеличение роста клеток. При этом матриксы, загруженные СИМ, поддерживали в целом рост клеток гораздо лучше по сравнению с матриксами ПОб и ПОб/ГА ( $p < 0,05$ ).

Рост клеток в группе ПОб с 1 по 7 сутки наблюдения составил 44%. При этом в группах ПОб+ГА и ПОб+ГА+СИМ было отмечено снижение роста клеток на 20% и 9,5% соответственно.

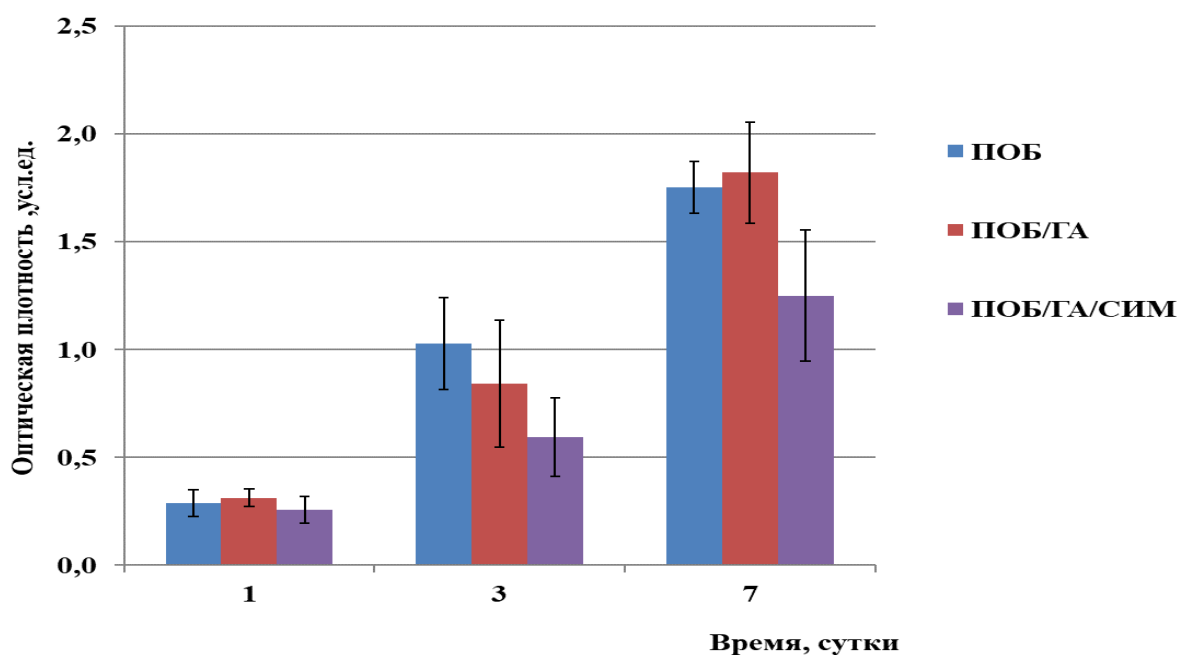
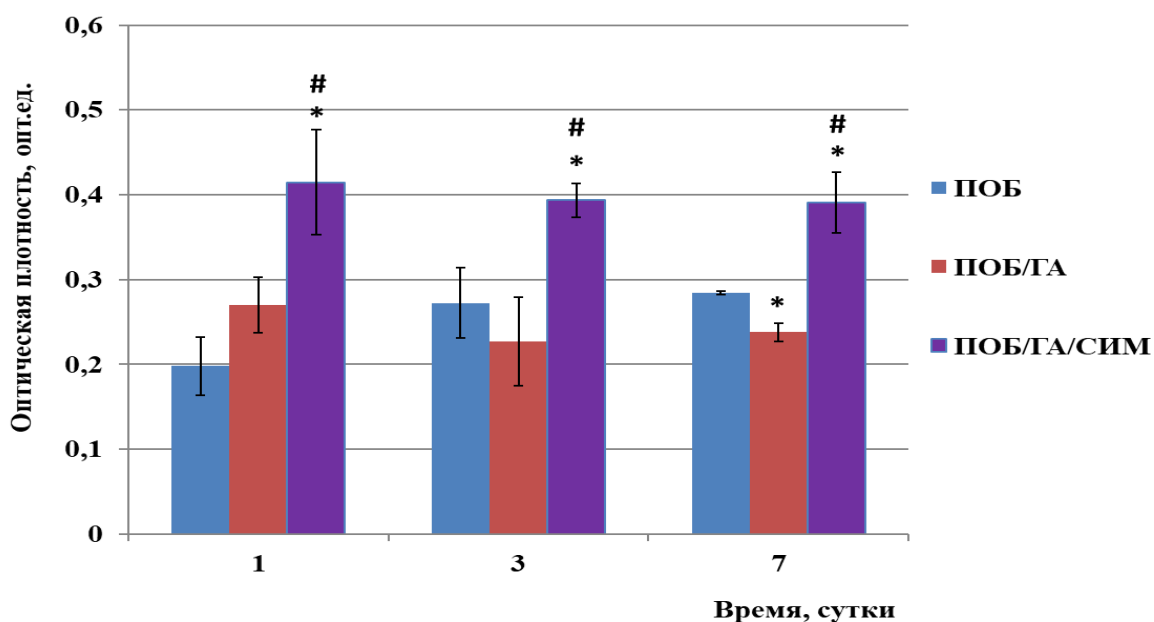


Рисунок 5а



+

## Рисунок 5б

**Рисунок 5.** Рост клеток на культуральном пластике в присутствии матриц (а) и непосредственно на матриксах (б) из ПОБ, ПОБ с включением аморфного ГА (ПОБ/ГА) и ПОБ с ГА и симвастатином (ПОБ/ГА/СИМ), в стандартной среде. Нормальность распределения доказана тестом Шапиро—Уилка. Полученные данные анализировали с помощью теста Тьюки для множественного сравнения, достоверно значимые различия указаны  $*p < 0.05$

### 3.1.4. Активность щелочной фосфатазы при росте клеток на матриксах.

ММСК перед экспериментами были проверены на остеомаркеры CD45 и CD90 и по профилю соответствовали недифференцированным ММСК [3]. На 14-е сутки эксперимента инкубация в остеогенной среде (рис. 6б) оказывала значимое влияние на ММСК, культивируемые на матриксах. При этом если в клетках на матриксе из ПОБ активность щелочной фосфатазы в остеогенной среде возрастала, то на матриксах с добавлением симвастатина наблюдалось статистически значимо меньше повышение активности фермента. Тип подложки также оказывал значимое влияние на активность фермента в клетках. В стандартной среде добавление в ПОБ аморфного гидроксиапатита и симвастатина практически в 3 раза повышало активность щелочной фосфатазы в клетках, в то время как в остеогенной среде процесс остеодифференцировки на этом матриксе снижался по сравнению с таковым на матриксе из ПОБ, что можно объяснить началом дифференцировки клеток (рис 6а).

Повышение экспрессии маркера фенотипа МСК CD45 в клетках, растущих на матриксах ПОБ/ГА и ПОБ/ГА/СИМ свидетельствует о спонтанном процессе дифференцировки, который происходит уже через 2 недели культивирования (рис. 7).

Таким образом, матриксы, загруженные симвастатином, вызывали снижение пролиферативной активности клеток и увеличение активности щелочной фосфатазы, что может указывать на начало их дифференцировки в остеоиндуктивном направлении.

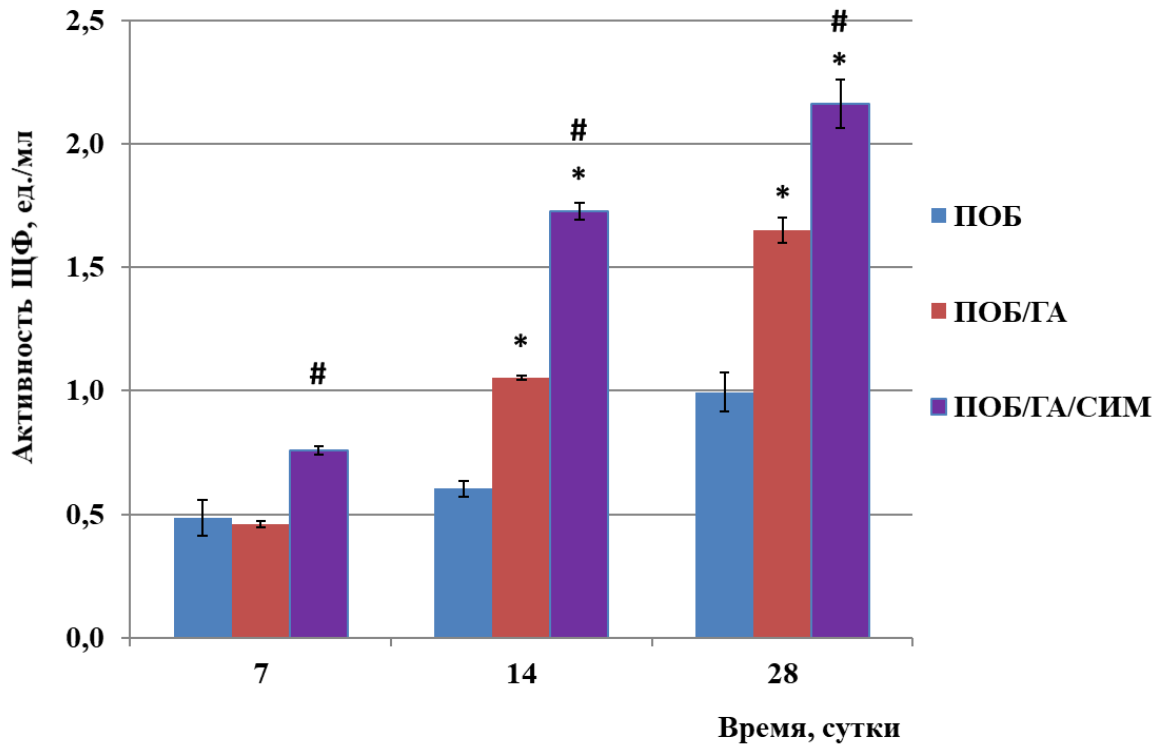


Рисунок ба

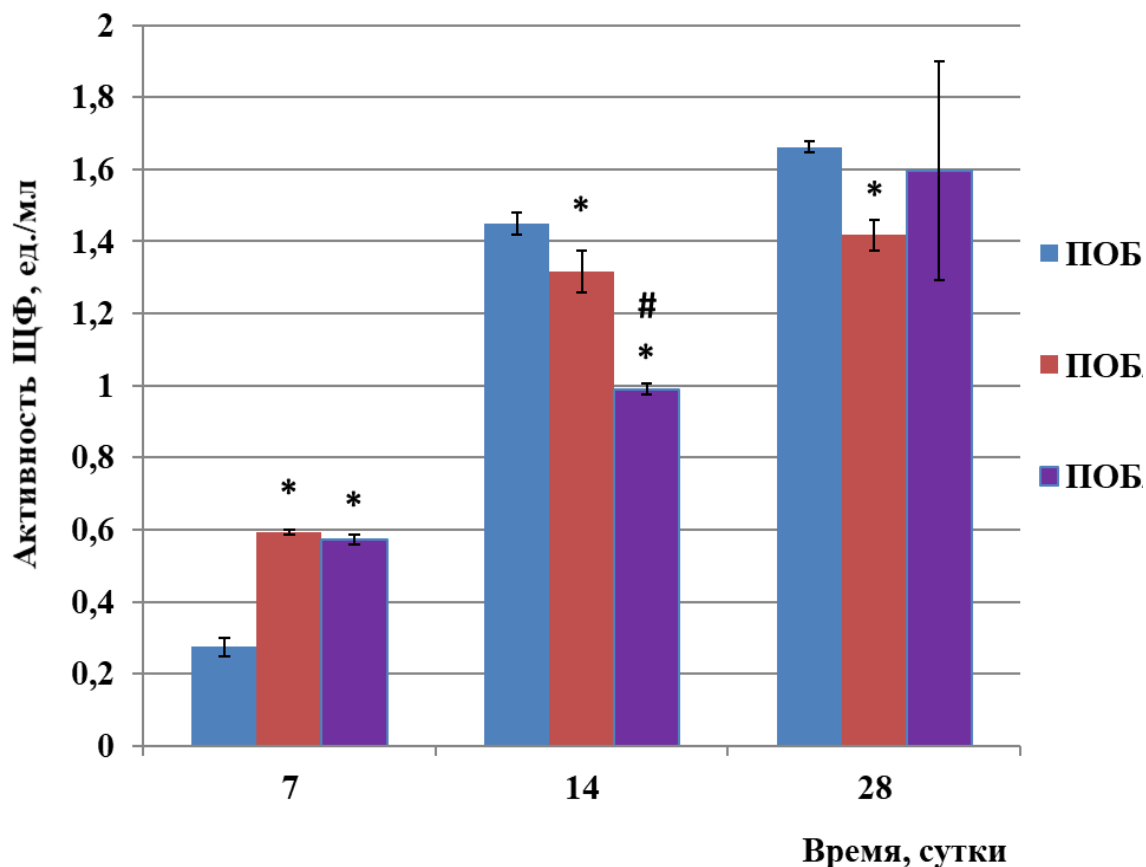
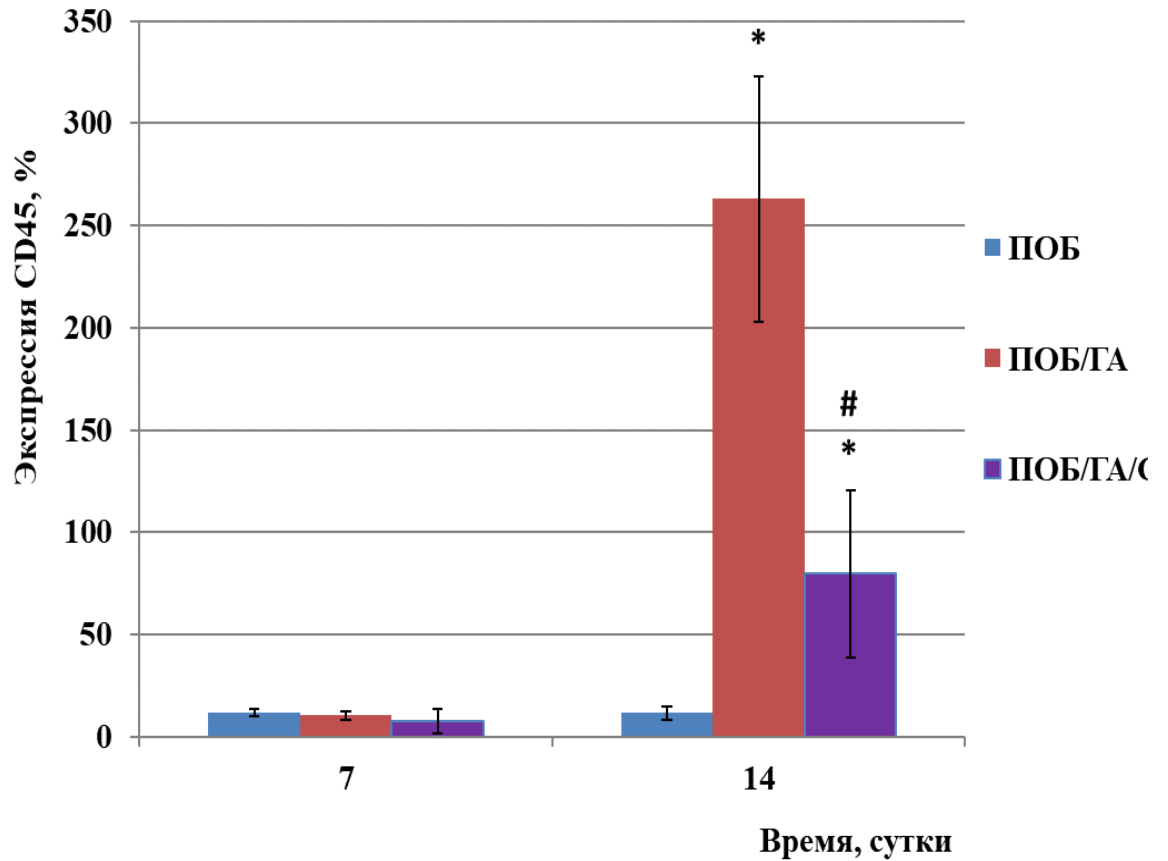


Рисунок 6б

**Рисунок 6.** Активность щелочной фосфатазы в клетках при росте на матриксах из ПОб, ПОб/ГА и ПОб/ГА/СИМ в стандартной (а) и остеогенной (б) среде. Нормальность распределения доказана тестом Шапиро—Уилка. Полученные данные анализировали с помощью теста Тьюки для множественного сравнения, достоверно значимые различия указаны  $*p < 0,05$ , #  $p < 0,05$ .

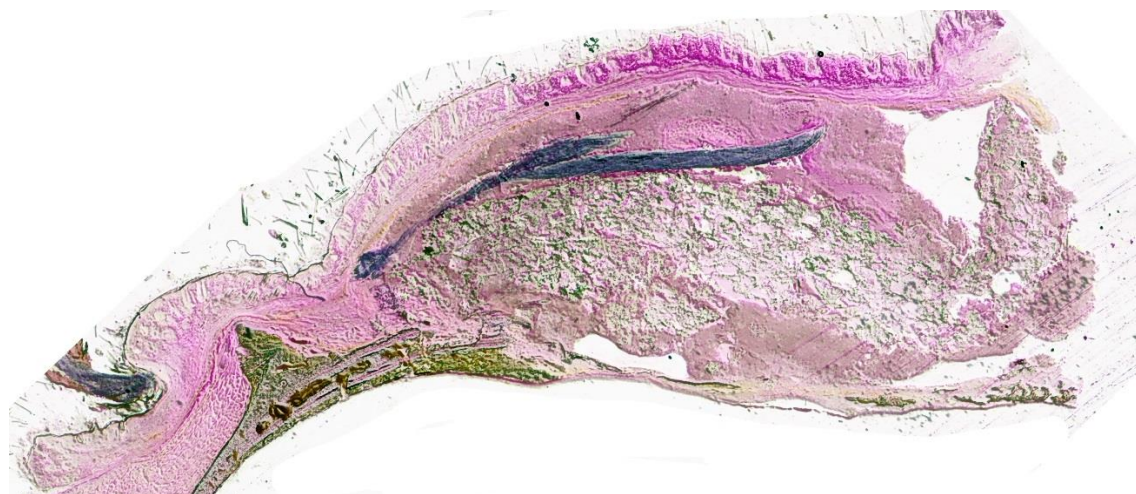


**Рисунок 7.** Уровень экспрессии CD45 в ММСК при росте на матриксах из ПОБ, ПОБ/ГА и ПОБ/ГА/СИМ в стандартной среде. Нормальность распределения доказана тестом Шапиро—Уилка. Полученные данные анализировали с помощью теста Тьюки для множественного сравнения, достоверно значимые различия указаны  $*p<0,05$ , #  $p<0,05$ .

### 3.2. Результаты световой микроскопии недеминерализованных костных шлифов

**Группа 1 (имплантация композитного материала в область костного дефекта на основе поли-3-оксибутирата).**

При гистологическом исследовании костных шлифов теменных костей крыс на данной точке наблюдения было выявлено, проекции полнослойного костного дефекта имеется костный регенерат, ограниченный по нижней поверхности твердой мозговой оболочкой, по верхней поверхности остеопластическим материалом губчатого строения. Напластование костного вещества происходило от краев костной раны - с материнской кости. Костный регенерат распространялся по твердой мозговой оболочке. Однако заполнения всего объема костного дефекта не происходило. Заполнение дефекта костной тканью было выявлено не более чем на 1/3 площади дефекта.



**Рисунок 8.** Гистопантомограмма поперечного спила теменной кости крысы после имплантации материала поли-3-оксибутират. Окраска небесный трихром. X10.



В свою очередь внутри остеопластического материала обнаруживали грануляционную ткань и соединительную ткань регенераторного типа с большим количеством гигантских многоядерных клеток.

При проведении морфометрического исследования проводилась оценка относительного объема новообразованной ткани (BV/TV) в регенерате дефекта кости и относительного объема соединительной ткани (Fb/TV) препаратов, окрашенных с применением небесного трихрома. Таким образом, относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости был равен в среднем 32,2% (медиана), а относительный объем соединительной ткани составил 67,8% (медиана) (рис. 8).

**Группа 2 (имплантация композитного материала в область костного дефекта на основе поли-3-оксибутирата с альгинатным гелем).**

Были проанализированы препараты теменных костей крыс с полнослойным дефектом костной ткани до твердой мозговой оболочки. Над дефектом в окружении соединительной ткани располагался диск материала с пористой структурой. Частично диск проникал в костный регенерат. Под ним с материнской кости определялся рост новообразованной костной. Костные балки образовывали островки кости балочного строения на твердой мозговой оболочке. Между островками рыхловолокнистая клеточная соединительная ткань богатая тонкостенными сосудами. Островки часто располагаются друг от друга на некотором расстоянии, иногда сливаясь между собой. На поверхности костных балок обнаруживались активные остеобласты и наслаения остеоида. В некоторых случаях с материнской кости фронт регенерации имел строение, напоминающее языки. Изучение серийных срезов не выявило перекрытие дефекта новообразованной костной тканью на этот срок наблюдения.

В свою очередь рыхловолокнистая соединительная ткань была незначительно инфильтрирована преимущественно лимфоцитами и плазмócитами. Полиморфноядерные лейкоциты не обнаруживались. В

некоторых местах на поверхности материала можно было обнаружить гигантские клетки инородных тел.



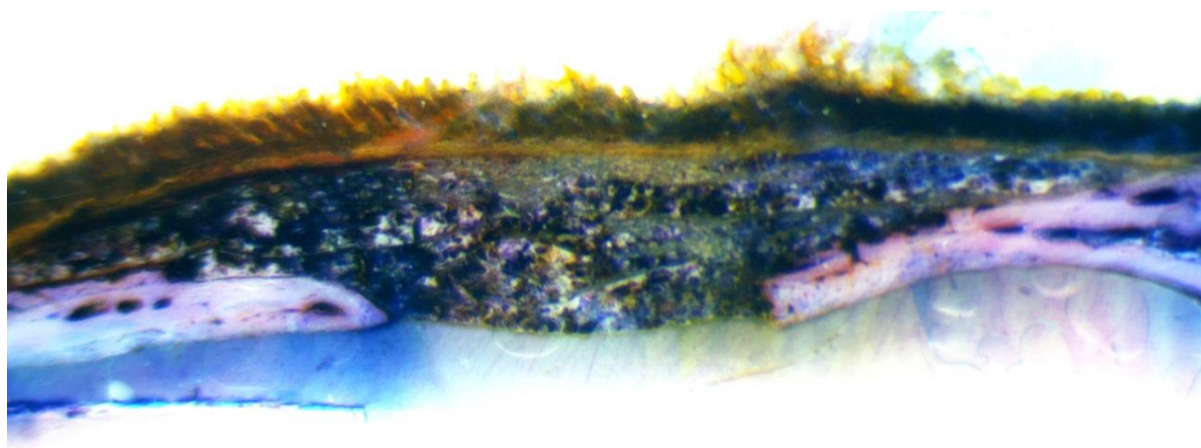
**Рисунок 9.** Гистопантомограмма поперечного спила теменной кости крысы после имплантации материала поли-3-оксибутират с альгинатным гелем. Окраска небесный трихром. X10.

При проведении морфометрического исследования проводилась оценка относительного объема новообразованной ткани (BV/TV) в регенерате дефекта кости и относительного объема соединительной ткани (Fb/TV) препаратов, окрашенных с применением небесного трихрома. Таким образом, относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости был равен в среднем 21% (медиана), а относительный объем соединительной ткани составил 79% (медиана) (рис 9).

**Группа 3 (имплантация композитного материала в область костного дефекта на основе поли-3-оксибутирата с альгинатным гелем и аморфным гидроксиапатитом).**

Были проанализированы препараты теменных костей крыс с полнослойным дефектом костной ткани до твердой мозговой оболочки. Диск материала с пористой структурой визуализировался над дефектом в окружении соединительной ткани и частично проникал в костный регенерат. Под ним с материнской кости определялся рост новообразованной костной ткани, которая преимущественно имела пластинчатое строение в виде узких

конусов с основанием, обращенным к материнской кости, и верхушкой, обращенной к центру регенерата. Изучение серийных срезов не выявило полного перекрытия дефекта новообразованной костной тканью в течение срока наблюдения. Следует отметить, что в большинстве случаев не наблюдалось сближения и слияния фронтов регенератов с краев дефектов. В центральной части оставался небольшой участок, свободный от костной ткани. При этом рыхловолокнистая соединительная ткань была незначительно инфильтрирована лимфоцитами и плазмócитами. Полиморфноядерные лейкоциты не обнаруживались. В некоторых местах на поверхности материала можно было обнаружить гигантские клетки инородных тел.



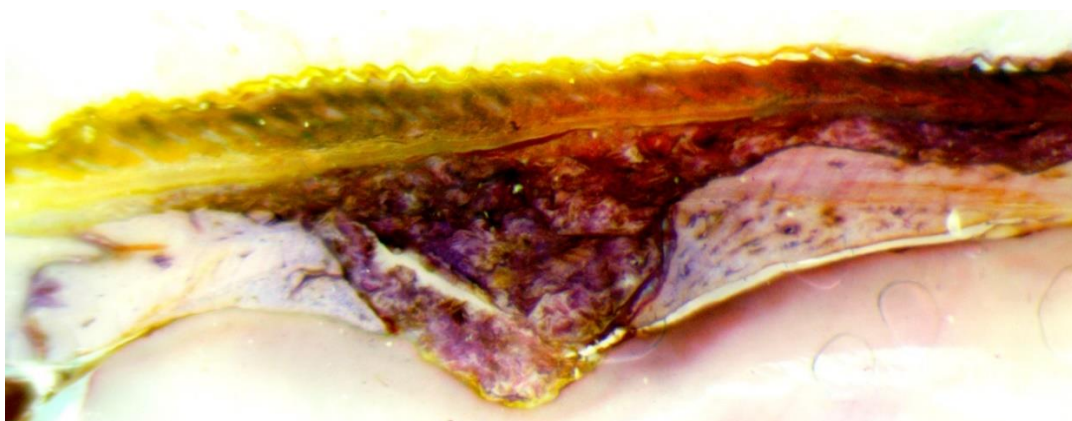
**Рисунок 10.** Критический костный дефект теменной кости крысы, определяющийся на гистопантомограмме через 28 дней после проведения оперативного вмешательства, в ходе которого проводилась имплантация поли-3-оксибутирата с альгинатом и аморфным гидроксипатитом. Окраска с применением небесного трихрома. X5.

При проведении морфометрического исследования проводилась оценка относительного объема новообразованной ткани (BV/TV) в регенерате дефекта кости и относительного объема соединительной ткани (Fb/TV) препаратов, окрашенных с применением небесного трихрома. Таким образом, относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости был

равен в среднем 34,2% (медиана), а относительный объем соединительной ткани составил 65,8% (медиана) (рис 10).

**Группа 4 (имплантация композитного материала в область костного дефекта на основе поли-3-оксибутирата с аморфным гидроксиапатитом).**

При гистологическом исследовании костных шлифов теменных костей крыс на данной точке наблюдения было выявлено, что полнослойный костный дефект, ограниченный по нижней поверхности твердой мозговой оболочкой, имеет признаки имевшего место репаративного остеогенеза, исходом которого явилось образование от краев дефекта пластинчатой костной ткани. В верхней части костной раны обнаруживали диск материала с несколько размытыми и неровными краями. Внутри диска обнаруживали грануляционную ткань с незрелой соединительной тканью регенеративного типа, а также местами многоядерные гигантские клетки инородных тел, а также диффузное распространение аморфного мелкокристаллического вещества (гидроксиапатита). Под диском располагался костный регенерат, содержащий фрагменты распадающегося диска. Костная ткань распространялась по твердой мозговой оболочке в виде умеренного по толщине массива. Костный дефект не был перекрыт полностью. Свободные области практически обнаруживались преимущественно в центральной части костной раны.



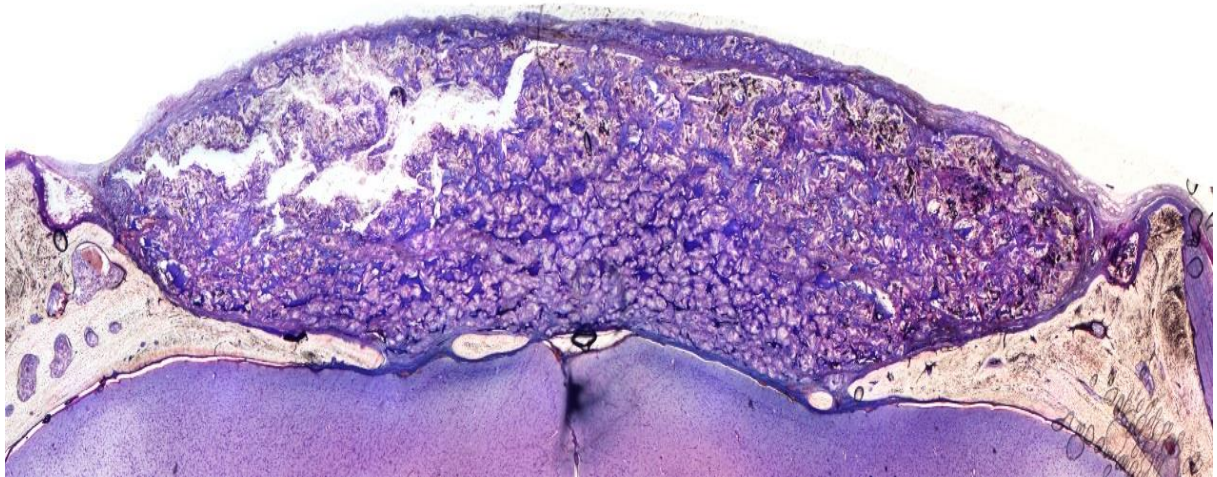
**Рисунок 11.** Критический костный дефект теменной кости крысы, определяющийся на гистопантомограмме через 28 дней после проведения оперативного вмешательства, в ходе которого проводилась имплантация поли-3-оксибутирата с аморфным гидроксипатитом. Окраска с применением небесного трихрома. X10.

При проведении морфометрического исследования проводилась оценка относительного объема новообразованной ткани (BV/TV) в регенерате дефекта кости и относительного объема соединительной ткани (Fb/TV) препаратов, окрашенных с применением небесного трихрома. Таким образом, относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости был равен в среднем 40,3% (медиана), а относительный объем соединительной ткани составил 59,7% (медиана) (рис. 11).

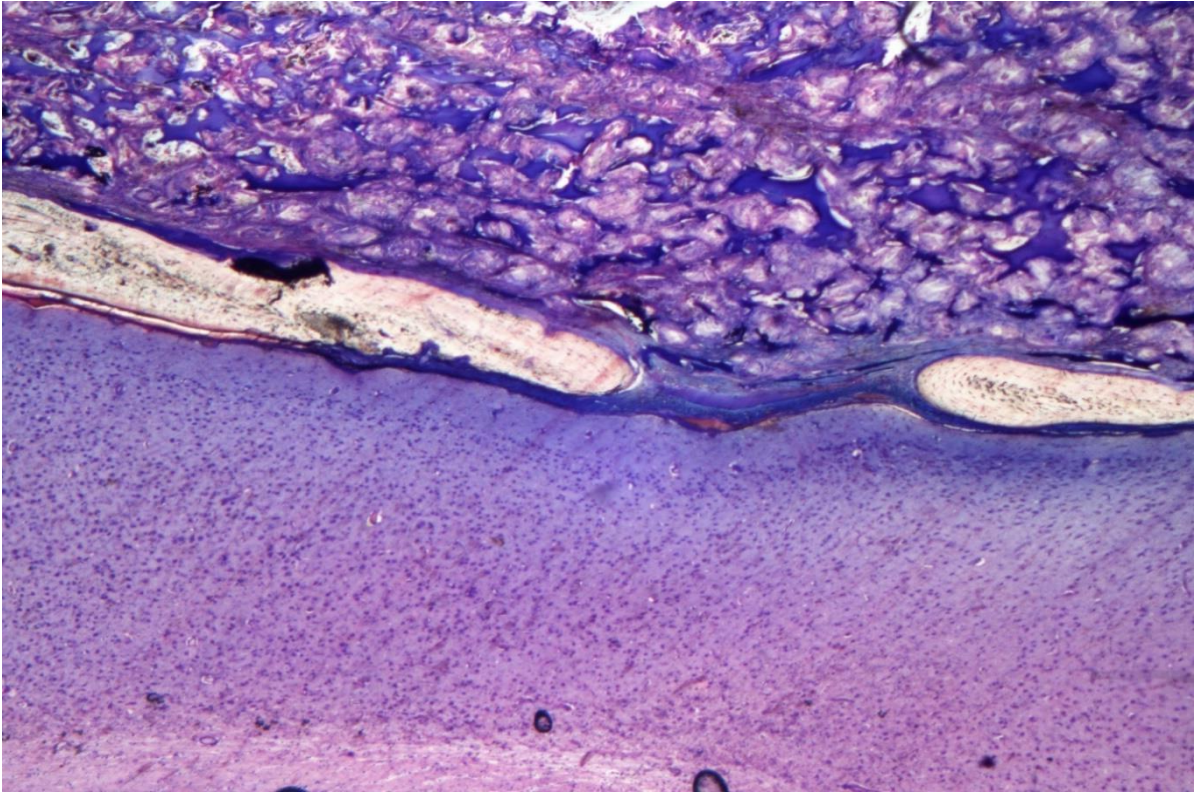
**Группа 5 (имплантация композитного материала в область костного дефекта на основе поли-3-оксибутирата, аморфного гидроксипатита и симвастатина).**

При гистологическом исследовании костных шлифов теменных костей крыс на данной точке наблюдения было выявлено, что полнослойный костный дефект, ограниченный по нижней поверхности твердой мозговой оболочкой, имеет признаки имевшего место репаративного остеогенеза,

исходом которого явилось образование по краям дефекта напластования пластинчатой костной ткани. В верхней части костной раны обнаруживали диск материала с несколько размытыми и неровными краями. Внутри диска обнаруживали грануляционную ткань с незрелой соединительной тканью регенеративного типа, а также местами многоядерные гигантские клетки инородных тел. Под диском располагался костный регенерат. Костная ткань распространялась по твердой мозговой оболочке неравномерными по толщине фронтами регенерата. Костный дефект не был перекрыт полностью. Свободные области составляли порядка 1/3. Островки костной ткани сливались между собой. Во всех случаях к контрольной точке исследования на поверхности новообразованной костной ткани местами обнаруживали остеобласты с фокусами незрелого остеоида.



**Рисунок 12.** Гистопантограмма теменной кости крыс с критическим костным дефектом спустя 28 дней после операции. Новообразованная костная ткань заполняет полностью критический дефект. Окраска небесный трихром. X10.



**Рисунок 13.** Гистопантомограмма теменной кости крыс с критическим костным дефектом спустя 28 дней после операции. Новообразованная костная ткань заполняет полностью критический дефект. Окраска небесный трихром. X50.

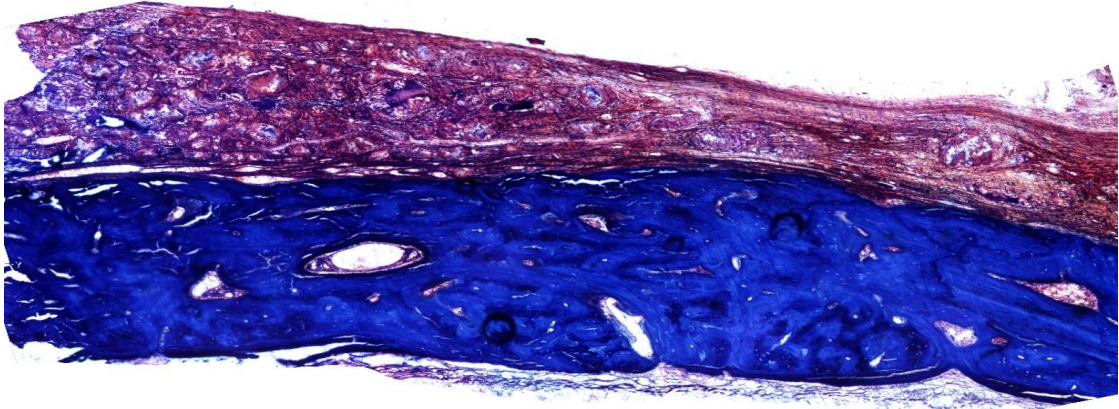
При проведении морфометрического исследования проводилась оценка относительного объема новообразованной ткани ( $BV/TV$ ) в регенерате дефекта кости и относительного объема соединительной ткани ( $Fb/TV$ ) препаратов, окрашенных с применением небесного трихрома. Таким образом, относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости был равен в среднем 52,9% (медиана), а относительный объем соединительной ткани составил 47,1% (медиана) (рис. 12, 13).

**Группа 6 (имплантация композитного материала в область костного дефекта на основе поли-3-оксибутирата с альгинатом, аморфным гидроксиапатитом и симвастатином).**

Препараты теменных костей крыс с полнослойным дефектом костной ткани до твердой мозговой оболочки. Над дефектом в окружении соединительной ткани располагается диск материала с пористой структурой. Частично диск проникает в костный регенерат. Под ним с материнской кости определяется рост новообразованной костной ткани. Новообразованная костная ткань преимущественно имеет пластинчатое строение в виде широких пластов, толщина которых сопоставима с толщиной материнской кости. Изучение серийных срезов выявило полное перекрытие дефекта новообразованной костной тканью на этот срок наблюдения. В большинстве случаев это произошло в результате сближения и слияния фронтов регенератов с краев дефектов. В центральной части свободных от костной ткани пространств практически не обнаруживается.

В свою очередь рыхловолокнистая соединительная ткань незначительно инфильтрирована преимущественно лимфоцитами и плазмócитами. Полиморфноядерные лейкоциты не обнаруживаются. В некоторых местах на поверхности материала можно обнаружить гигантские клетки инородных тел.





**Рисунок 14.** Гистопантомограмма теменной кости крыс с критическим костным дефектом спустя 28 дней после операции. Новообразованная костная ткань заполняет полностью критический дефект. Окраска небесный трихром. X10.

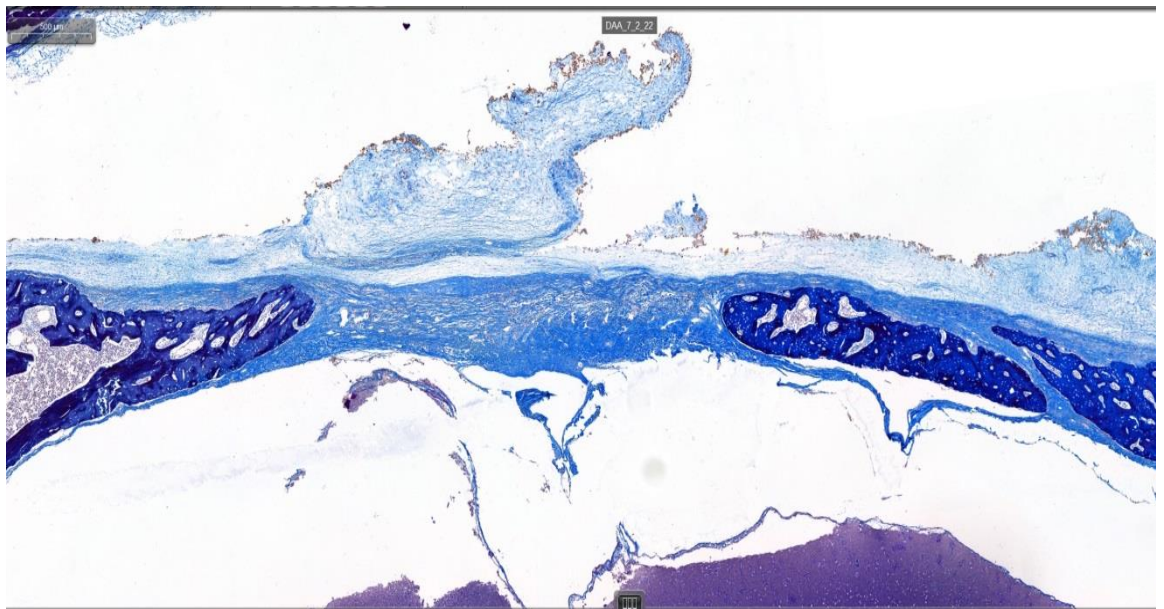
При проведении морфометрического исследования проводилась оценка относительного объема новообразованной ткани (BV/TV) в регенерате дефекта кости и относительного объема соединительной ткани (Fb/TV) препаратов, окрашенных с применением небесного трихрома. Таким образом, относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости был равен в среднем 75,2% (медиана), а относительный объем соединительной ткани составил 24,8% (медиана) (рис. 14).

#### **Группа 7 (контрольная).**

При гистологическом исследовании костных шлифов теменных костей крыс на данной точке наблюдения было выявлено, что полнослойный костный дефект, ограниченный по нижней поверхности твердой мозговой оболочкой, имеет признаки имевшего место репаративного остеогенеза, исходом которого явилось образование по краям дефекта напластования пластинчатой костной ткани. Костная ткань распространялась по твердой мозговой оболочке. При этом не перекрывала полностью дефект и не созревала до разделения на верхнюю и нижнюю пластинки. В некоторых случаях можно была обнаружить на твердой мозговой оболочке островки

костной ткани. Во всех случаях к контрольной точке исследования на поверхности новообразованной костной ткани не обнаруживали пролиферирующих остеобластов, незрелого и не минерализованного остеоида. Пространство между «языками» фронтов регенерации заполнено плотно-волокнистой соединительной тканью, которая сверху переходит в мягкие ткани свода черепа и эпителиальный покров.

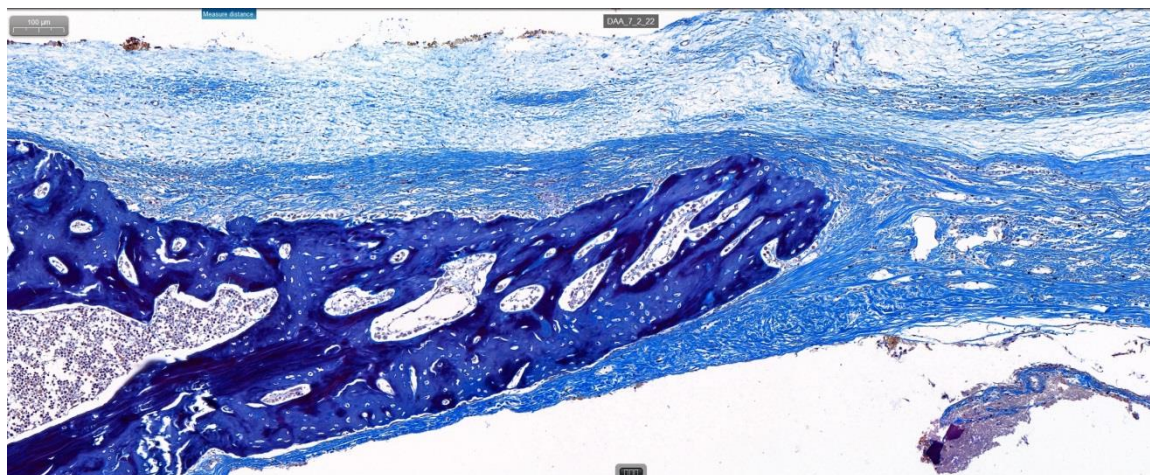
При гистологическом исследовании образцов теменных костей с критическим дефектом обращало на себя внимание, что на 28 сутки наблюдения не возникало полноценной спонтанной регенерации костей черепа. Морфологическая картина характеризовалась классической краевой регенерацией костной ткани с краев дефекта с центростремительным характером роста. Фронт регенерации распространялся с материнской кости по твердой мозговой оболочке среди плотноволокнистой соединительной ткани.



**Рисунок 15.** Регенерация костной ткани в критическом дефекте теменной кости. Окраска по Маллори.

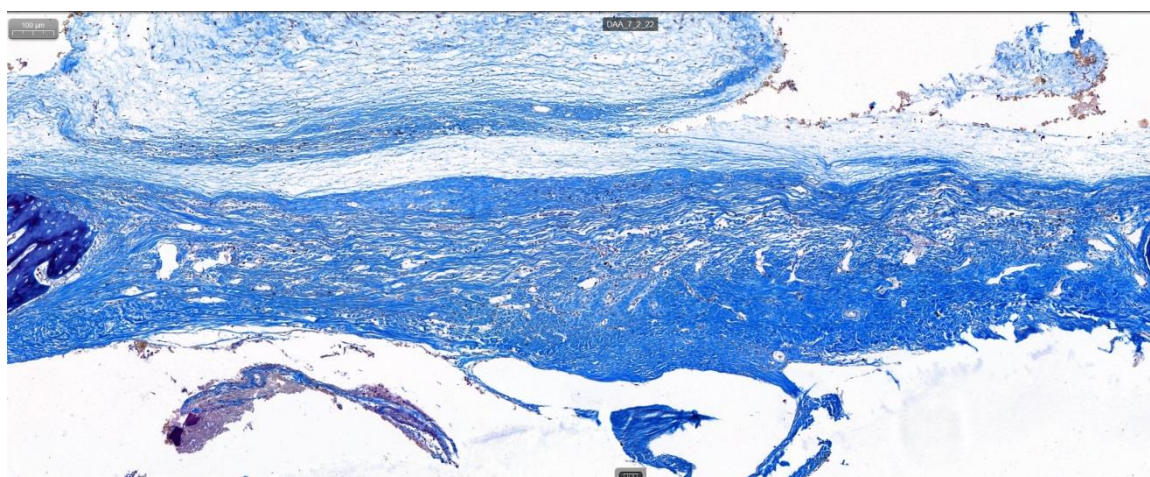
При этом, активность остеогенеза на поверхности новообразованной костной ткани сдерживалась плотноволокнистой соединительной тканью,

препятствуя заполнению центральной части регенерата остеогенными элементами. Увеличение объема костной ткани наблюдали преимущественно в вертикальном направлении.



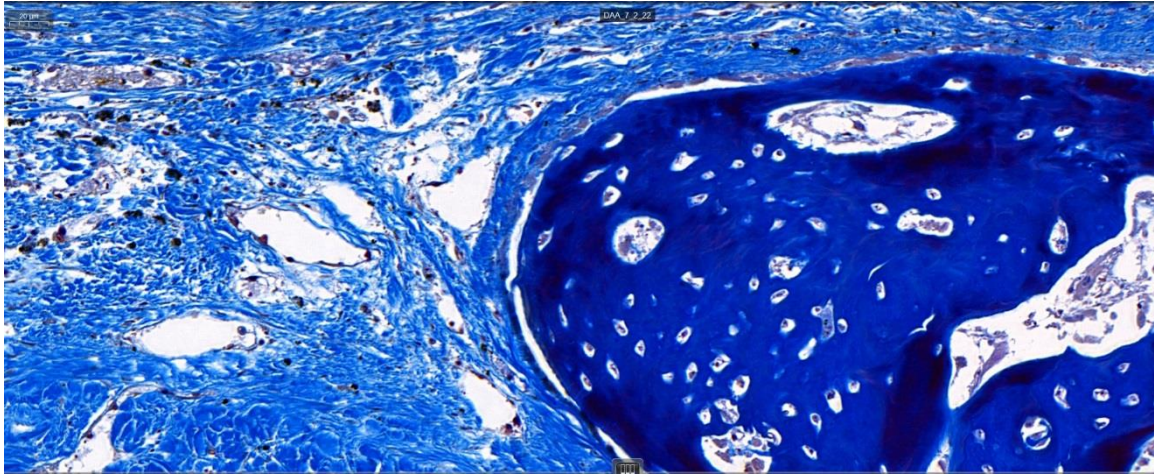
**Рисунок 16.** Регенерация костной ткани в критическом дефекте теменной кости. Сдерживание регенерации плотноволокнистой соединительной тканью. Окраска по Маллори.

В центральной части костной дефекта обнаруживалась плотноволокнистая неоформленная соединительная ткань, которая сливалась со шлемом черепа и твердой мозговой оболочкой в единый конгломерат.



**Рисунок 17.** Регенерация костной ткани в критическом дефекте теменной кости. Сдерживание регенерации плотноволокнистой соединительной тканью. Окраска по Маллори.

Несмотря на высокую васкуляризацию остеогенные элементы в ней отсутствовали, края новообразованной костной ткани, обращенные к центру регенерата сглажены. Активные остеобласты расположены поверхностно под регенерирующей надкостницей.



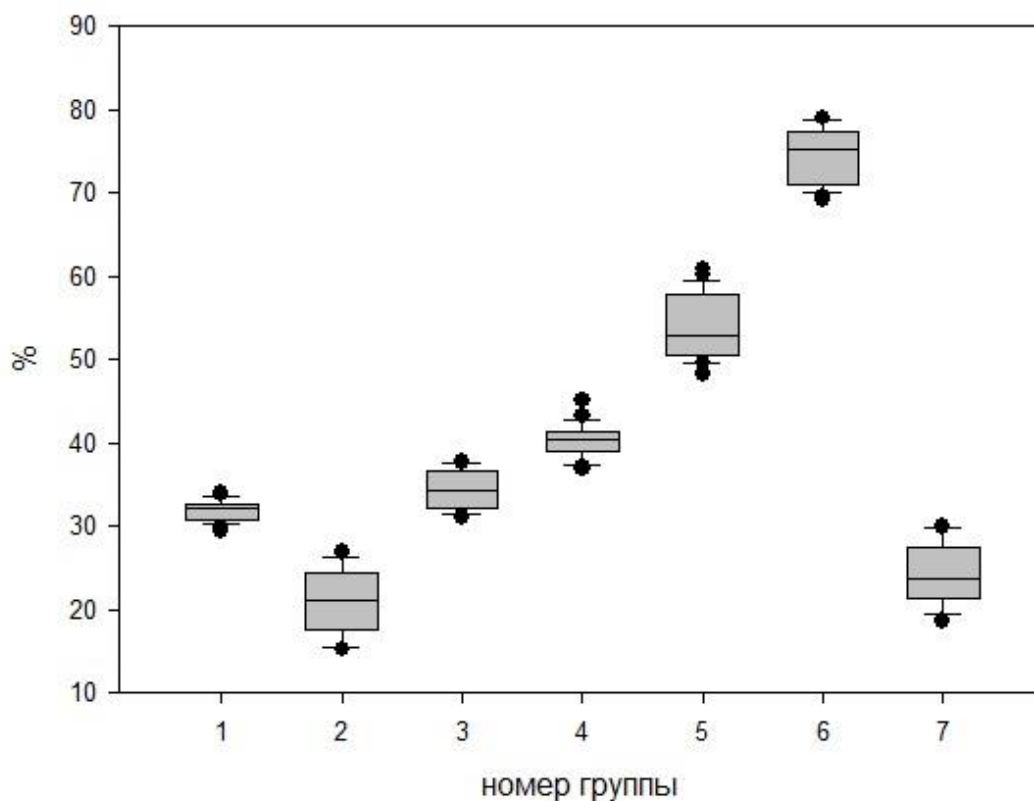
**Рисунок 18.** Регенерация костной ткани в критическом дефекте теменной кости. Сдерживание регенерации плотноволкнистой соединительной тканью. Остеобласты расположены поднадкостнично. Окраска по Маллори.

При проведении морфометрического исследования проводилась оценка относительного объема новообразованной ткани ( $BV/TV$ ) в регенерате дефекта кости и относительного объема соединительной ткани ( $Fb/TV$ ) препаратов, окрашенных с применением небесного трихрома. Таким образом, относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости был равен в среднем 23,7% (медиана), а относительный объем соединительной ткани составил 76,3% (медиана) (рис. 15-18).

### 3.3 Результаты морфометрического исследования

Изолированное использование поли-3-оксибутирата самостоятельно и в сочетании с альгинатом натрия (1 и 2 группы) не приводило к выраженному образованию костной ткани. Выявленная достоверная разница между этими группами ( $p=0,05$ ) может свидетельствовать в пользу негативного влияния альгината натрия на регенерацию костной ткани. Добавление в композицию гидроксиапатита так же достоверно ( $p=0,003$ ) снижает объем костной ткани в регенерате. При сравнении групп ПОБ+АГ и ПОБ+АГ+ГА объем костной ткани выше в группе без добавления альгината натрия. При сравнении групп с ПОБ и ПОБ+ГА выявлено достоверное ( $p=0,009$ ) стимулирующее действие на репаративный остеогенез гидроксиапатита. В свою очередь введение в композицию симвастатина значительно ускоряло регенерацию, что выразилось в достоверном увеличении объема костной ткани по сравнению как с чистым поли-3-оксибутиратом, так и в сочетании с аморфным гидроксиапатитом. Сравнительный анализ групп, в которых использовали сложные композиты из поли-3-оксибутирата, гидроксиапатита, альгината натрия и поли-3-оксибутирата, симвастатина, гидроксиапатита, альгината натрия выявил достоверную разницу в этих группах в пользу ПОБ+СИМ+ГА+АГ, что выразилось в достоверном ( $p= 0,006$ ) увеличении объема костной ткани в до максимальных значений среди исследуемых групп ( $BV/TV =75,2\%$ ) (рис. 19). Кроме того, только в этой группе произошло полное перекрытие критического дефекта теменной кости.

Относительный объем костной ткани (BV/TV)  
в группах по данным морфометрии



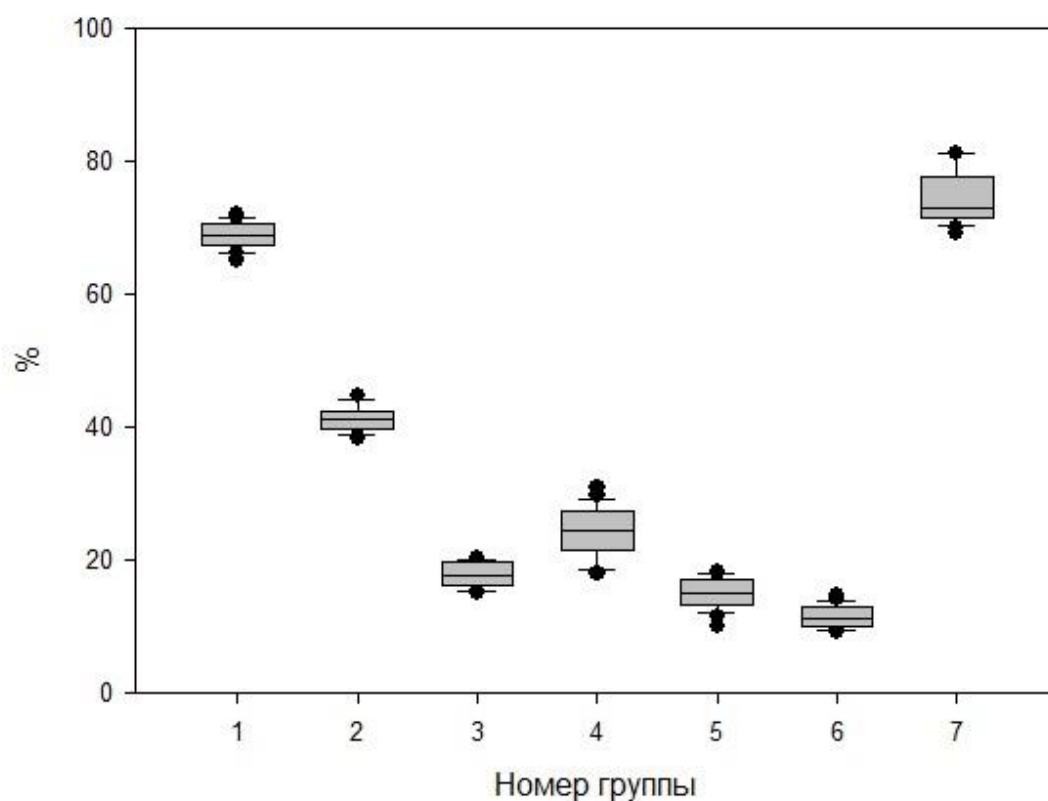
**Рисунок 19.** Диаграмма, отображающая относительный объем костной ткани (BV) в экспериментальных группах.

Таким образом, статистический анализ первичных данных, полученных при морфометрическом исследовании костной ткани выявил что, использование в составе композита альгината натрия не приводит к ускорению регенерации. Введение в композит аморфного гидроксиапатита незначительно оптимизирует регенерацию, но в присутствии альгината натрия, вероятно, происходит ее торможение. Введение в состав композита симвастатина приводит к выраженной стимуляции репаративного остеогенеза. В свою очередь применение альгината натрия при наличии симвастатина значимо не тормозит образование костной ткани.

При морфометрическом исследовании относительного объема плотноволкнистой соединительной ткани в костном регенерате теменных

костей крыс с критическим дефектом и использовании композитных остеопластических материалов было выявлено, что собственно введение отдельных компонентов композитных материалов достоверно не увеличивает объем плотноволокнистой соединительной ткани по сравнению с группой контроля и между группами, так как высокое содержание ее в регенерате соответствует низким показателям остеогенеза (рис. 20).

Относительный объем плотноволокнистой соединительной ткани в регенерате по данным морфометрии



**Рисунок 20.** Диаграмма, отображающая относительный объем плотноволокнистой неоформленной соединительной ткани в экспериментальных группах.

В свою очередь низкие объемные показатели плотноволокнистой соединительной ткани в присутствии симвастатина следует отнести в счет высоких показателей остеогенеза.

Таким образом, образование плотноволокнистой соединительной ткани в составе костных регенератов в присутствии синтетических композитных материалов не зависит от присутствия отдельных компонентов, а соотносится с выраженностью репаративного остеогенеза.

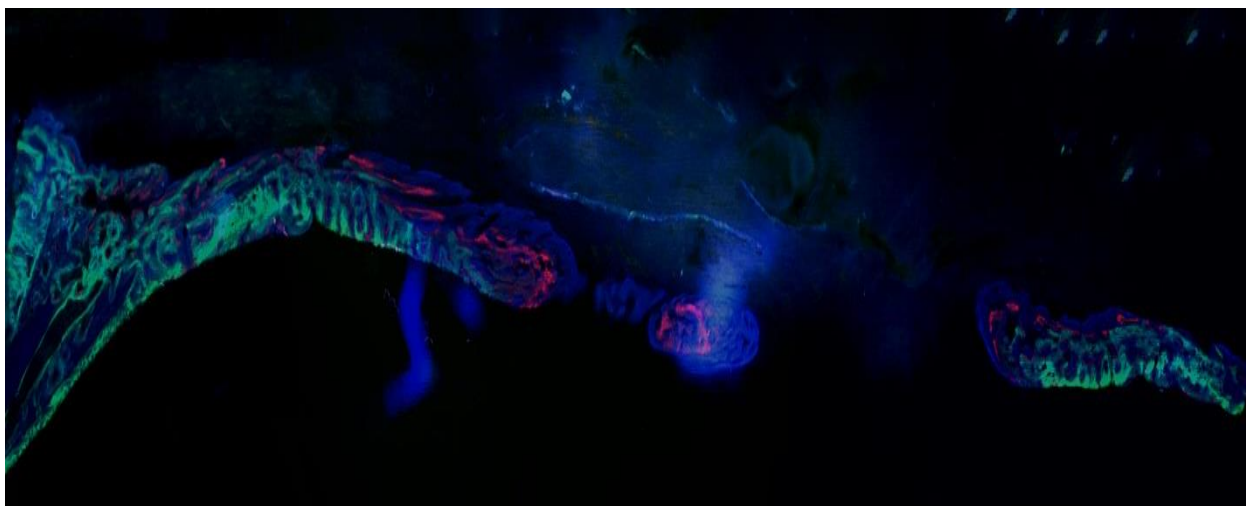
### **3.4 Результаты флюоресцентной микроскопии**

Изолированное изучение активности репаративного остеогенеза под воздействием ПОБ, аморфного гидроксиапатита и симвастатина в зависимости от использованного индуцирующего фактора проводили с применением флюоресцентной микроскопии.

#### **1 группа (ПОБ)**

При сравнительном анализе изображений, полученных световым и флюоресцентным методом микроскопии выявлено, что репаративный остеогенез, индуцированный повреждением, достаточно активен в первые три недели после нанесения критического дефекта. При флюоресцентной микроскопии выявляется накопление доксициклина и тетрациклина в большей части костного регенерата, причем распространение его начинается с материнской кости (рис. 21) исключительно вдоль твердой мозговой оболочки.





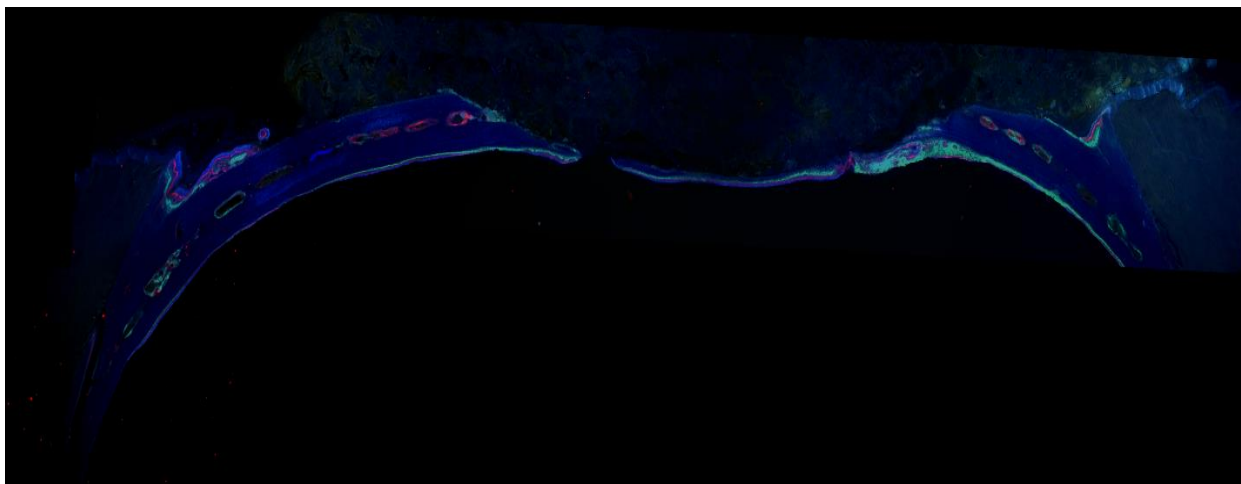
**Рисунок 21.** Комбинированное изображение. Гистопантомограмма шлифа теменной кости крысы (флюоресцентная микроскопия). Большая часть регенерата импрегнирована тетрациклином и доксициклином (зеленоватое и желтозеленоватое окрашивание) и меньшая часть ализариновым красным С (красное окрашивание).

Накопление ализаринового красного С составляет порядка 1/3 объема костного регенерата. Данное обстоятельство свидетельствует о том, что стимулированный повреждением репаративный остеогенез равномерно активный с распространением вдоль твердой мозговой оболочки.

#### **4 группа (ПОБ+ГА)**

При сравнительном анализе изображений, полученных световым и флюоресцентным методом микроскопии выявлено, что репаративный остеогенез, индуцированный повреждением, достаточно активен в первые три недели после нанесения критического дефекта. При флюоресцентной микроскопии выявляется накопление доксициклина и тетрациклина. Распространение его так же начинается с материнской кости (рис. 22), но не только вдоль твердой мозговой оболочки, но в центральной части дефекта. В этой части существуют отдельные области неоостеогенеза, соответствующие

ранним срокам после повреждения (до 20 дней), накапливающие тетрациклин и доксициклин.



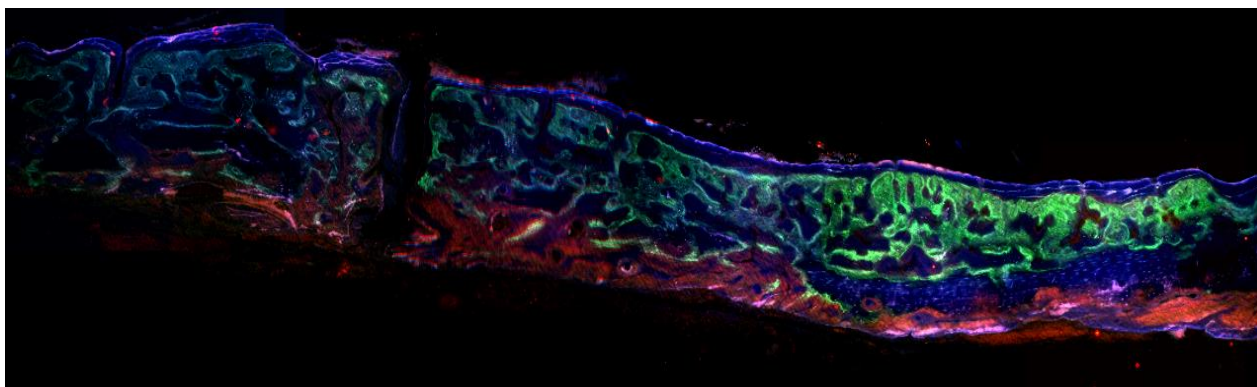
**Рисунок 22.** Комбинированное изображение. Гистопантограмма шлифа теменной кости крысы (флюоресцентная микроскопия). Часть регенерата импрегнирована тетрациклином и доксициклином (зеленоватое и желтозеленоватое окрашивание). Накопление ализаринового красного С (красное окрашивание) обнаруживается до половины объема костной ткани.

Накопление ализаринового красного С составляет порядка 1/2 объема костного регенерата. Данное обстоятельство свидетельствует о том, что стимулированный повреждением репаративный остеогенез не равномерен. Области накопления тетрациклина и доксициклина обнаруживаются как со стороны материнской кости, так и в центре костного регенерата. Вероятно, активация репаративного остеогенеза осуществляется за счет стимуляции его гидроксиапатитом.

### **6 группа (ПОБ + АГ+ ГА + СИМ)**

При сравнительном анализе и сопоставления изображений, полученных световым и флюоресцентным методом микроскопии выявлено, что репаративный остеогенез достаточно активен в течении всего периода наблюдения. При флюоресцентной микроскопии выявляется накопление

доксциклина и тетрациклина в большей части костного регенерата, причем распространение его начинается не только с материнской кости (рис. 23), но и повсеместно внутри костного регенерата. Определяется четкое распределение новообразованной костной ткани по слоям до 21 дня и после, что выражается в образовании пластов костного матрикса как со стороны твердой мозговой оболочки, так и со стороны надкостницы по типу «слоеного пирога».



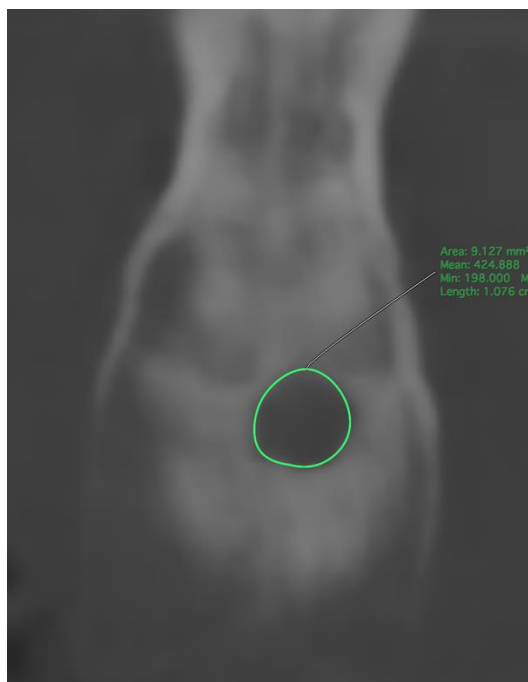
**Рисунок 23.** Комбинированное изображение. Гистопантограмма шлифа теменной кости крысы (флюоресцентная микроскопия). Большая часть регенерата импрегнирована тетрациклином и доксициклином (зеленоватое и желтозеленоватое окрашивание) и меньшая часть ализариновым красным С (красное окрашивание).

Накопление ализаринового красного С составляет порядка 1/2 объема костного регенерата. Данное обстоятельство свидетельствует о том, что стимулированный как повреждением, так и индукцией материалом репаративный остеогенез равномерен с выраженной активностью как в ранние сроки после нанесения повреждения, так и в последующем. Причем области накопления тетрациклина и доксициклина обнаруживающиеся со стороны материнской кости занимают центральную часть костного регенерата. Сливаясь между собой очаги остеогенеза замыкают костный

дефект. Накапливающийся ализариновый красный С после 21 суток обнаруживается в уже зажившей костной ране, увеличивая объем регенерата преимущественно как с внутренней, так и с наружной стороны (поднадкостнично). В данной группе наблюдений выраженная стимуляция репаративного остеогенеза на всех этапах репаративного остеогенеза может свидетельствовать в пользу активного влияния на репаративную регенерацию костной ткани молекул симвастатина.

### 3.5. Результаты рентгенологического исследования регенерации критических костных дефектов

Перед проведением гистологического исследования препараты черепов крыс сканировали на компьютерном томографе с разрешением 0,2 мм.



**Рисунок 24.**

Площадь оставшегося костного дефекта на 28-й день на аксиальном срезе КЛКТ в 6-й группе (ПОБ+АГ+ГА+СИМ)



**Рисунок 25.**

Площадь оставшегося костного дефекта на 28-й день на аксиальном срезе КЛКТ в 7-й контрольной группе

На рисунках представлены компьютерные томограммы свода черепа исследуемых животных 6-й исследуемой группы (ПОБ+АГ+ГА+СИМ) с наилучшим результатом заживления костного дефекта и 7-й контрольной (критический костный дефект без имплантации) с наименьшей площадью заживления (рис. 24, 25). В первой исследуемой группе (только ПОБ) площадь оставшегося костного дефекта составила 37,81 мм<sup>2</sup> (минимальная площадь 29,974 мм<sup>2</sup>, максимальная 47,54 мм<sup>2</sup>; стандартное отклонение составило ±5,01 мм<sup>2</sup>); во 2-й исследуемой группе (ПОБ+АГ) площадь оставшегося костного дефекта составила 35,72 мм<sup>2</sup> (минимальная площадь 29,67 мм<sup>2</sup>, максимальная 42,01 мм<sup>2</sup>; стандартное отклонение составило ±3,52 мм<sup>2</sup>); в 3-й группе (чистый ПОБ+АГ+ГА) площадь оставшегося костного дефекта составила 32,92 мм<sup>2</sup> (минимальная площадь 27,53 мм<sup>2</sup>, максимальная 39,97 мм<sup>2</sup>; стандартное отклонение составило ±3,88 мм<sup>2</sup>); в 4-й группе (чистый ПОБ+ГА) площадь оставшегося костного дефекта составила 22,55 мм<sup>2</sup> (минимальная площадь 18,75 мм<sup>2</sup> максимальная 26,38 мм<sup>2</sup>; стандартное отклонение составило ±2,05 мм<sup>2</sup>); в 5-й группе (ПОБ+ГА+СИМ) площадь оставшегося костного дефекта составила 14,62 мм<sup>2</sup> (минимальная площадь 12,68 мм<sup>2</sup>, максимальная 17,7 мм<sup>2</sup>; стандартное отклонение составило ±1,49 мм<sup>2</sup>); в 6-й группе (ПОБ+АГ+ГА+СИМ) площадь оставшегося костного дефекта составила 8,63 мм<sup>2</sup> (минимальная площадь 7,62 мм<sup>2</sup>, максимальная 9,71 мм<sup>2</sup>; стандартное отклонение составило ±0,59 мм<sup>2</sup>); в 7-й контрольной группе (критический костный дефект) площадь оставшегося костного дефекта составила 43,2 мм<sup>2</sup> (минимальная площадь 31,6 мм<sup>2</sup>, максимальная 48,95 мм<sup>2</sup>; стандартное отклонение составило ±4,49 мм<sup>2</sup>). Описанные данные представлены на рисунке 26 и в таблице 3.

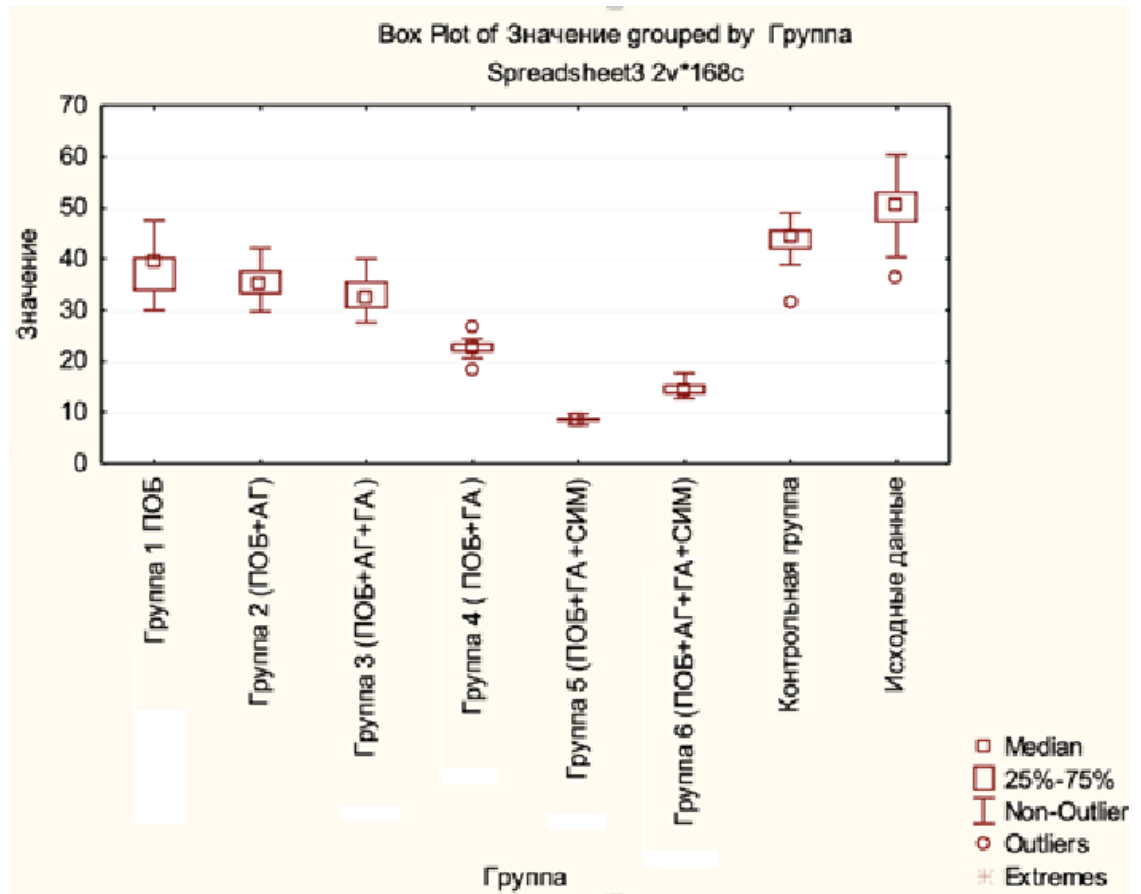


Рисунок 26. Площадь костного дефекта в исследуемых группах

Исследуемая группа	Площадь оставшегося костного дефекта	Минимальное и максимальное отклонение	Стандартное отклонение
Поли-3-оксибутират	37,81 мм <sup>2</sup>	29,974 мм <sup>2</sup> - 47,54 мм <sup>2</sup>	±5,01 мм <sup>2</sup>
Поли-3-оксибутирата + альгината натрия	35,72 мм <sup>2</sup>	29,67 мм <sup>2</sup> - 42,01 мм <sup>2</sup>	±3,52 мм <sup>2</sup>
Поли-3-оксибутирата + альгината натрия + аморфного гидроксиапатита	32,92 мм <sup>2</sup>	27,53 мм <sup>2</sup> - 39,97 мм <sup>2</sup>	±3,88 мм <sup>2</sup>
Поли-3-оксибутирата + аморфного гидроксиапатита	22,55 мм <sup>2</sup>	18,75 мм <sup>2</sup> - 26,38 мм <sup>2</sup>	±2,05 мм <sup>2</sup>
Поли-3-оксибутирата + аморфного гидроксиапатита и симвастатина	14,62 мм <sup>2</sup>	12,68 мм <sup>2</sup> - 17,7 мм <sup>2</sup> ;	±1,49 мм <sup>2</sup>
Поли-3-оксибутирата + альгината натрия, аморфного гидроксиапатита и симвастатина	8,63 мм <sup>2</sup>	7,62 мм <sup>2</sup> - 9,71 мм <sup>2</sup> ;	±0,59 мм <sup>2</sup>
Контрольная группа	43,2 мм <sup>2</sup>	31,6 мм <sup>2</sup> - 48,95 мм <sup>2</sup> ;	±4,49 мм <sup>2</sup>

**Таблица 3.** Площадь оставшегося костного дефекта во всех исследуемых группах.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наименьшей площади оставшегося костного дефекта в группе ПОБ+ГА+АГ+СИМ.

#### Глава 4. Обсуждение полученных результатов и заключение

Репаративная регенерация костной ткани - это сложный и многостадийный физиологический процесс [27]. Предполагается, что она достигается, когда мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки дифференцируются и заполняют участок костного дефекта [149]. По статистическим данным до 40% дентальных имплантатов требуют одномоментной направленной костной регенерации (НКР) [52]. Несколько источников продемонстрировали, что выживаемость имплантатов, установленных одномоментно с НКР, а также без костно-пластических мероприятий, различаются [184, 53]. Дентальные имплантаты, установленные в участки с одномоментной НКР, либо установка дентальных имплантатов в плановом порядке после НКР имели более предсказуемые результаты интеграции [86].

Во многих исследованиях сообщалось об остеогенном потенциале симвастатина, однако отсутствуют данные о его дозировке и профиле местной доставки [178, 175, 81]. Как сообщалось ранее, коллагеновые мембраны, осажденные мезенхимальными клетками, модифицированными жирными кислотами, способны доза-зависимо выделять СИМ [123, 125]. Поскольку гидрофобность мембран увеличивалась с увеличением длины цепи жирных кислот, скорость высвобождения лекарственного средства уменьшалась, а продолжительность высвобождения увеличивалась [123]. Murali VP и соавт. (2020) исследовали способность мультипотентных мезенхимальных стволовых клеток локально доставлять СИМ в область новообразовавшейся костной ткани при НКР. Поскольку соответствующая дозировка и степень высвобождения лекарственного средства, которое стимулировало бы достаточный остеогенез, неизвестна, мембраны, обработанные жирными кислотами, обеспечивали быстрое высвобождение низкой и высокой дозы или медленное и стабильное высвобождение [123, 125].



Исследования других авторов продемонстрировали, что мембраны, нагруженные СИМ, не показали более выраженного воспаления, чем мембраны без нагрузки, что подтверждает высвобождение нетоксичных уровней СИМ [155].

На сегодняшний день актуально биомедицинское применение бактериального ПОБ в производстве биоразлагаемых полимерных имплантатов и систем контролируемого высвобождения лекарственных средств [113]. В отличие от других биоразлагаемых полимеров, таких как, полидактид (ПЛА) и полигликолид (ПЛГА), поли-3-оксибутират (ПОБ) проявляет умеренную устойчивость к деградации *in vitro* и к биодegradации в биологических средах. Вероятность деградации зависит от ряда факторов: химического состава полимера, кристаллической структуры, морфологии и молекулярной массы [62]. Несмотря на то, что применение ПОБ *in vitro* и *in vivo* интенсивно исследуется, большинство имеющихся данных недостаточно, а иногда они даже противоречивы. В работе Iordanskii A.L. (2014) систематически оценено влияние физико-химических факторов гидролиза и биодegradации природного ПОБ как *in vitro*, так и *in vivo*. Биодegradация во многом зависит от физико-химических факторов, геометрии [45].

В данной диссертационной работе продемонстрирован рост ММСК клеток на различных матриксах (ПОБ, ПОБ+АГ, ПОБ+АГ+ГА, ПОБ+ГА, ПОБ+ГА+СИМ, ПОБ+АГ+ГА+СИМ). Данные матриксы, полученные при помощи метода выщелачивания с использованием карбоната аммония в качестве порообразователя, также смешанные с 5% и 1% СИМ, 10% ГА *in vitro* и *in vivo*, продемонстрировали биосовместимость и свойства деградации, подходящие для НКР [76]. Микроструктура матриксов была исследована с помощью сканирующего электронного микроскопа (JSM-6510LV; JEOL) и на световом микроскопе Nikon SMZ1500 (Nikon). Также были рассчитаны пористость при помощи формулы, плотность, а также

связанность матрицков. Механические свойства, такие как Модуль Юнга, морфометрические данные, реометрия проводились на сухих образцах ПОБ.

Модификация мембраны может улучшить её использование в целях контролируемого высвобождения СИМ [76, 155]. Однако этот эффект зависит от дозы и скорости выделения СИМ. Так, для анализа скорости высвобождения СИМ с носителя ПОБ с 5% СИМ помещали в 10% водный раствор PBS. Количество высвободившегося симвастатина определяли спектрофотометрически при  $\lambda=238$  нм (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). Расчёт финальной стадии высвобождения проверяли по математической модели Фика первого порядка.

Наличие пор в архитектонике ПОБ повысило остеокондуктивный потенциал матрикса, что продемонстрировано в результатах исследования. Размер пор природной кости составляет в среднем 50-100 мкм, что довольно близко к полученным значениям [105]. Kim, Но Yong (2018) разработал асимметрично пористую мембрану с листовой структурой путем иммерсионного осаждения с использованием смеси поликапролактона и тетрагликоля. Исследователями показано, что BMP2 (костные морфогенетические белки), осажденный в мембране, высвобождается непрерывно в течение 38 дней (без дополнительной модификации матрикса) и тем самым улучшает остеогенную дифференцировку клеток и образование/формирование новой костной ткани [105].

Анализ роста клеток и цитотоксичности проводился на матриксах и пленках. МСК культивировали в стандартной среде DMEM с добавлением 10% ЭТС и 1% антибиотика (пенициллин+стрептомицин) до 3-го пассажа. При исследовании цитотоксичности матрицков с СИМ наблюдались минимальные значения токсичности по отношению к МСК. Существуют научные данные, что цитотоксичность при комбинации с ПЛГА (поли (молочная-со-гликолевая кислота)) также не имеет токсичности. Так, в работе Toledano, Manuel (2021) СИМ комбинировали с ПЛГА мембранным

каркасом для контролируемой доставки СИМ. Наблюдались реологические и концентрационно-зависимые изменения морфологии мембран, что предполагает расщепление сложноэфирной связи и ковалентного связывания статина к ПЛГА, но не к растворенному симвастатину, при этом матрикс с осажденным СИМ имел минимальную токсичность [180].

Существуют противоречивые данные, в которых ставится под сомнение дифференцировка ММСК в остеогенном направлении. Для клеток, выращенных в среде ВМР2, дозозависимая реакция СИМ на рост клеток, активность ЩФ отсутствовали, хотя и наблюдалась тенденция к усилению стимулирующего действия ВМР2 на СИМ, а также активность ЩФ [155]. Однако, в данной диссертационной работе показана прямая корреляционная дозозависимая связь между остеогенной дифференцировкой ММСК и присутствием СИМ. В нашей работе продемонстрирован рост ММСК в размере 2000 клеток на лунку, который определяли методом ХТТ на 1, 3 и 7-е сутки инкубации.

Как правило, образование новой костной ткани в полости рта после костно-пластических операций происходит в течении от 3 до 9 месяцев в зависимости от масштаба костного дефекта и используемого материала трансплантата [182]. Таким образом, ожидается, что мембраны, используемые при данных операциях, сохранят свои качества для аналогичных временных рамок [93]. Результаты ранее опубликованных исследований согласуются с нашими данными, которые указывают на то, что мембраны на основе ПОБ+ГА могут быть альтернативой аналогичным коллагеновым, при этом осажденными СИМ, который индуцирует остеогенную дифференцировку. В работе Kim Ho Yong (2018) мембраны ГА медленно деградировали, образуя остеокондуктивный каркас, выделяя при этом СИМ с постоянной скоростью 0,2 мкг/день (данные *in vitro*) в течение всего 8-недельного периода исследования [105]. Была отмечена прямая корреляционная связь между выделением СИМ и скоростью заживления

дефектов. Основываясь на данных гистологического исследования и микро-КТ, на которых демонстрировалось большее образование костного объема, чем у ненагруженных мембран, можно сделать вывод, что для лучшей репаративной регенерации кости низкая скорость высвобождения СИМ предпочтительнее, чем ускоренное высвобождение.

Щелочная фосфатаза способствует формированию костной ткани путем деградации неорганического пирофосфата, ингибитора образования гидроксиапатита, и образования неорганического фосфата, который является ключевой молекулой в дифференцировке и минерализации остеобластов. В данной работе была оценена активность ЩФ, а также рост ММСК. Для этого ММСК заседали из расчёта 7000 клеток на образец и анализировали на 7, 14 и 28-е сутки. Образцы с растущими на них клетками промывали 2 раза в PBS, затем помещали в лизирующий буфер и подвергали трём циклам замораживания-оттаивания. Затем образцы центрифугировали 10 мин при 10 000 об/мин и измеряли показатели ЩФ. Наблюдалась прямая корреляционная связь между активностью ЩФ и ростом ММСК.

Для оценки скорости репаративной регенерации костной ткани под влиянием синтезированных матриксов (ПОБ, ПОБ+АГ, ПОБ+АГ+ГА, ПОБ+ГА, ПОБ+ГА+СИМ, ПОБ+АГ+ГА+СИМ) были смоделированы критические костные дефекты на теменной кости 70 крыс линии Wistar массой тела 400 г, а также проведено дальнейшее прижизненное мечение флуоресцентными метками костной ткани. Было проведено распределение по группам, 10 крыс в каждой группе. Подразделение на группы проводилось в зависимости от используемого матрикса для имплантации в костный дефект (группа – 1 (ПОБ), группа – 2 (ПОБ+АГ), группа – 3 (ПОБ+АГ+ГА), группа – 4 (ПОБ+ГА), группа – 5 (ПОБ+ГА+СИМ), группа – 6 (ПОБ+АГ+ГА+СИМ), группа – 7 (контрольная группа)).

Далее проводили гистологическое исследование с использованием световой и флуоресцентной микроскопией, а также морфометрическую

оценку результатов. Для сравнения регенерации были выбраны 2 параметра: относительный объем костной ткани (медиана) и соединительная ткань (медиана). Межгрупповые различия между экспериментальными группами приведены в таблице 4.

Таблица 4

Сравнение показателей регенерации костной ткани между экспериментальными группами

<b>Изучаемые группы</b>	<b>Относительный объем костной ткани (медиана)</b>	<b>Соединительная ткань (медиана)</b>
<b>Группа 1 (ПОБ)</b>	32,2%	67,8%
<b>Группа 2 (ПОБ+АГ)</b>	21%	79 %
<b>Группа 3 (ПОБ+АГ+ГА)</b>	34,2%	65,8%
<b>Группа 4 ( ПОБ+ГА)</b>	40,3%	59,7%
<b>Группа 5 (ПОБ+ГА+СИМ)</b>	52,9%	47,1%
<b>Группа 6 (ПОБ+АГ+ГА+СИМ)</b>	75,2%	24,8%
<b>Группа 7 Контрольная группа</b>	23,7%	76,3%

Так, изолированное использование поли-3-оксибутирата самостоятельно и в сочетании с альгинатом натрия не приводило к выраженному образованию костной ткани. Выявленная достоверная разница между этими группами может свидетельствовать, скорее всего, в пользу негативного влияния альгината натрия на регенерацию костной ткани ( $p=0,05$ ). Добавление в композицию аморфного гидроксиапатита также достоверно снижает объем костной ткани в регенерате ( $p=0,003$ ). При

сравнении групп ПОБ+АГ и ПОБ+АГ+ГА объем костной ткани выше в группе без добавления альгината натрия. При сравнении групп с ПОБ и ПОБ+ГА выявлено достоверное стимулирующее действие на репаративный остеогенез аморфного гидроксиапатита ( $p=0,009$ ). В свою очередь, введение в композицию симвастатина значительно ускорило регенерацию, что выразилось в достоверном увеличении объема костной ткани по сравнению как с поли-3-оксибутиратом, так и в сочетании с аморфным гидроксиапатитом. Сравнительный анализ групп в которых использовали сложные композиты из поли-3-оксибутирата и симвастатина и композит из поли-3-оксибутирата, симвастатина, аморфного гидроксиапатита, альгината натрия выявил достоверную разницу в этих группах в пользу ПОБ+СИМ+ГА+АГ, что выразилось в достоверном увеличении объема костной ткани в последней группе ( $p= 0,006$ ).

Таким образом, анализ данных, полученных при морфометрическом исследовании регенерации костной ткани в области критических костных дефектов, выявил, что использование в составе композита альгината натрия не приводило к ускорению регенерации. Введение в композит аморфного гидроксиапатита несколько оптимизирует регенерацию, но в присутствии альгината натрия происходит ее торможение. При введении в композит симвастатина мы наблюдали выраженную стимуляцию репаративного остеогенеза. При введении в композит симвастатина у исследуемых крыс наблюдается выраженная стимуляция репаративного остеогенеза. Низкие объемные показатели плотноволокнистой соединительной ткани в присутствии симвастатина, следует отнести в счет высоких показателей остеогенеза.

Таким образом, полученные результаты *in vitro* и *in vivo* исследований демонстрируют, что введение в состав сложных полимерных остеопластических материалов симвастатина позволяет значительно

улучшить репаративный остеогенез в области критических костных дефектов.

### Выводы

1. Разработана технология, позволяющая загрузить симвастатин в полимерный матрикс на основе поли-3-оксибутирата, альгината натрия и аморфного гидроксиапатита для придания ему остеоиндуктивных свойств. Эффективной концентрацией симвастатина в качестве остеогенного фактора выбрана 5% по массе от количества полимера в изделии.

2. Разработанные варианты полимерных матриксов на основе поли-3-оксибутирата, аморфного гидроксиапатита, альгината натрия с симвастатином в различных комбинациях не вызывают токсического воздействия на мультипотентные стромальные клетки *in vitro*.

3. Полимерные матриксы на основе поли-3-оксибутирата, насыщенные симвастатином, вызывают снижение пролиферативной активности ММСК, которое сопровождается спонтанную остеогенную дифференцировку культивируемых в них мультипотентных стромальных клеток *in vitro*.

4. Имплантация в критический костный дефект свода черепа крыс матриксов из поли-3-оксибутирата в различных комбинациях с гидроксиапатитом и альгинатом натрия обеспечивают регенерацию не более 40,3% относительного объема костной ткани, что свидетельствует об отсутствии у данных вариантов матриксов остеоиндуктивных свойств

5. Добавление симвастатина в состав композита приводит к увеличению относительного объема костной ткани в костном регенерате критического дефекта теменных костей крыс. Наибольшую остеогенную активность *in vivo* продемонстрировала комбинация поли-3-оксибутирата, синтетического аморфного гидроксиапатита, альгината натрия и

симвастатина, что выразилось в образовании 75,2% относительного объема костной ткани в регенерате.

6. Флюоресцентная микроскопия выявила индукцию репаративного остеогенеза под влиянием симвастатина по всей площади костной раны, что выражалось наличием очагов остеогенеза в области контакта матрикса-носителя с твердой мозговой оболочкой, надкостницей и внутри самого матрикса.

### **Практические рекомендации**

1. При создании полимерных остеопластических материалов (матрикса, микросфер) на основе поли-3-оксибутирата нет необходимости включать в их состав альгинат натрия, так как он не имеет положительного влияния на остеогенез.

2. Наличие в составе матрикса поли-3-оксибутирата, аморфного гидроксиапатита и симвастатина в количестве 5% от общей массы является наиболее эффективной комбинацией с точки зрения потенцирования остеогенеза.

3. Для дальнейшего изучения влияния симвастатина и других статинов на остеогенез разработанная модификация поли-3-оксибутирата-симвастатина может служить основой для сравнения новых вариантов полимера и статинов.



### Список сокращений

**АГ** - альгинат натрия

**ГА** – аморфный гидроксиапатит

**КИ** – костный имплант

**КМП** – костные морфогенетические протеины

**КМБ-2** - костные морфогенетические белки

**МСК** – мезенхимальные стволовые клетки

**ММСК** – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

**НКР** – направленная костная регенерация

**ВV** - относительный объем костной ткани

**FbV** - относительный объем плотноволокнистой неоформленной соединительной ткани

**ПОА** – поли-3-оксиалканоат

**ПОБ** – поли-3-оксибутират

**ПОБВ** – поли-3-оксибутират-ко-3-оксивалерат

**ПГБ** – поли-3-гидроксибутират

**ПМК** – полимолочная кислота

**СЭМ** – Сканирующая электронная микроскопия

**ТИК** – Ткане-инженерной конструкции

**VEGF-A/ФРЭС** – Vascular endothelial growth factor/ фактор роста эндотелия сосудов

**ХТТ** – (2,3- бис- (2- метокси- 4- нитро- 5-сульфофенил)- 2Н-тетразолиум -5-карбоксамид)

## Список литературы

1. Антитела к склеростину как новая анаболическая терапия остеопороза / Е. О. Мамедова, Т. А. Гребенникова, Ж. Е. Белая [и др.] // Остеопороз и остеопатии. - 2018. - Т. 21, N 3. - С. 21 - 29.
2. Балин, В.Н. Устранение посттравматической деформации скулоорбитального комплекса имплантатом из пористого полиэтилена в комбинации с остеозамещающим материалом / В. Н. Балин, С. А. Епифанов, В. Д. Скуредин // Вестник Национального медико-хирургического Центра им. Н. И. Пирогова. – 2012. - Т. 7, N. 4. - С. 118 - 119.
3. Белая, Ж. Е. Wnt сигнальный путь в исследованиях костной ткани / Ж. Е. Белая // Остеопороз и остеопатии. - 2016. - N 1. - Р. 13 - 14.
4. Влияние витамина D на регенерацию костной ткани при реконструктивных операциях в полости рта и остеоинтеграцию дентальных имплантатов (обзор литературы) / С. Ю. Иванов, С. Ю. Калинин, Н. А. Гусейнов [и др.] // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2020. - Т. 75, N. 5. - С. 552 - 560.
5. Влияние экстрацеллюлярных везикул (экзосом) мезенхимальных стромальных клеток на регенерацию костной ткани / И. В. Майбородин, А. И. Шевела, В. В. Морозов [и др.] // Новости хирургии. - 2019. - Т. 27, N 2. - С. 196 - 203.
6. Ганина, А.М. Применение мезенхимальных стволовых клеток при лечении сахарного диабета 1 типа и его осложнений / А. М. Ганина, М. Б. Аскарлов // Universum: медицина и фармакология. - 2022. - № 4 (87). - С. 4 - 6.
7. Гударьян, А.А. Сравнительная эффективность использования резорбируемых мембран из полимолочной кислоты и коллагена при регенерации костных дефектов у больных перимплантитом / А. А. Гударьян, Н. Г. Идашкина, С. В. Ширинкин // Медичні перспективи. - 2014. - Т. XIX, №. 1. - С. 91 - 96.

8. Жизнеспособность мезенхимных мультипотентных стромальных клеток при росте на биокерамическом материале «Биосит-Ср Элкор» / Е. С. Касьянова, С. Ф. Александрова, М. С. Сердобинцев [и др.] // Бюллетень инновационных технологий. - 2017. -Т. 1, N. 4. - С. 44 - 51.
9. Загорский, В. А. Дентальная имплантация. Материалы и компоненты / В. А. Загорский // Символ науки. - 2016. - Т.9, N 2. - С. 132 - 136.
10. Измоденова, М. Ю. Сравнительный анализ влияния современных остеозамещающих материалов на регенераторный потенциал костной ткани / М. Ю. Измоденова, М. В. Гилев Д. В. Зайцев // Вестник Совета молодых учёных и специалистов Челябинской области. - 2018. -Т. 4, N. 3 (22). - С. 64 - 67.
11. Иммуногистохимическая и морфологическая характеристика тканевого ответа на полилактидные мембраны с коллоидным серебром / Г. А. Демяшкин, Е. А. Шаламова, Л. Л. Бороздкин [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2019. - Т.14, N. 4. - С. 664 - 667.
12. Исследование барьерной функции коллагеновой мембраны «Остеопласт» при заживлении костных дефектов в эксперименте / С. Ю. Иванов, А. Б. Зайцев, Н. Ф. Ямуркова [и др.] // Современные технологии в медицине. - 2011. - N. 3. - С. 35 - 38.
13. Калмин, О. В. Экспериментальное исследование применения мембраны «Кардиоплант» при направленной костной регенерации / О. В. Калмин, Д. В. Никишин // Астраханский медицинский журнал. - 2012. - Т. 7, N 4. - С. 132 - 134.
14. Канонический сигнальный путь WNT/ $\beta$ - катенин: от истории открытия до клинического применения / Т. А. Гребенникова, Ж. Е. Белая, Л. Я. Рожинская [и др.] // Терапевтический архив. - 2016. - Т. 88, №. 10. - С. 74 - 81.
15. Композиты на основе биоактивного стекла и полимерных гидрогелей / О. В. Усачева, Н. В. Свентская, С. П. Сивков [и др.] // Успехи в химии и химической технологии. - 2014. - Т. 28, N. 8 (157). - С. 94 -97.

16. Мезенхимальные стволовые клетки в процессах роста и репарации тканей / Н. И. Калинина, В. Ю. Сысоева, К. А. Рубина [и др.] // Acta Naturae (русскоязычная версия). - 2011. - Т. 3, N 4. - С. 32 - 39.
17. Опыт применения современного отечественного остеорепаративного материала в хирургической стоматологии / А. К. Иорданишвили, М. И. Музыкин, Е. В. Шенгелия [и др.] // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». - 2016. -N. 1. - С. 26 - 31.
18. Особенности трофики костной ткани после установки дентальных имплантатов / А. В. Иващенко, А. Е. Яблоков, И. И. Марков [и др.] // Вестник медицинского института «Реавиз»: реабилитация, врач и здоровье. - 2021. - №. 3 (51). - С. 79 - 84.
19. Оценка резорбции аутогенных костных блоков с ветви нижней челюсти при горизонтальной аугментации альвеолярного отростка / Д. Г. Корж, Д. Ю. Харитонов, И. В. Степанов [и др.] // Стоматология. - 2019. - Т. 98, N 6. - С. 30 - 32.
20. Направленная регенерация костных дефектов альвеолярного отростка с использованием стволовых клеток костного мозга на коллапановой подложке у экспериментальных животных / В. Ф. Куцевляк, В. И. Куцевляк, Е. А. Омельченко [и др.] // Вісник проблем біології і медицини. - 2015. - Т. 3, N 2. - С. 368 - 374.
21. Патофизиологические аспекты регенерации костной ткани при увеличении ширины тонкого альвеолярного гребня челюстей с применением пьезохирургической техники / С. В. Ильин, И. И. Бобынцев, Г. А. Гребнев [и др.] // Человек и его здоровье. - 2022. - Т. 25, N. 1. - С. 4 - 10.
22. Попов, Н. В. Роль аллогенных костно-замещающих материалов в репаративном остеогенезе атрофированной альвеолярной кости / Н. В. Попов // Вестник медицинского института «Реавиз»: реабилитация, врач и здоровье. - 2018. -Т. 2, N32. - С. 87 - 92.

23. Разработка и доклинические исследования ортотопических костных имплантатов на основе гибридной конструкции из поли-3-оксибутирата и альгината натрия / А. А. Мураев, А. П. Бонарцев, Ю. В. Гажва [и др.] // Современные технологии в медицине. - 2016. № 4 (8). - С. 42 - 50
24. Разработка тканеинженерной терапевтической системы на основе гибридной конструкции из поли-3-ок-сibuтирата с гидроксиапатитом, заполненной альгинатным гидрогелем, содержащим мезенхимальные стволовые клетки / А. П. Бонарцев, И. И. Жаркова, Е.А. Акулина и др. // Медико-фармацевтический журнал «Пuls». - 2018. - Т. 20, №. 9. - С. 70 - 78.
25. Роль мезенхимальных мультипотентных стромальных клеток в ремоделировании костной ткани / М. В. Киселевский, Н. Ю. Анисимова, Ю. И. Должикова [и др.] // Медицинская иммунология. - 2018. -Т. 20, N 4. - С. 515 - 522.
26. Садыков, Р. И. Современные методы медикаментозной и локальной терапии замедленной консолидации переломов (обзор литературы)/ Р. И. Садыков, И. Ф. Ахтямов // Гений ортопедии. - 2022. -Т. 28, N 1. - С. 116 - 122.
27. Смирнов, А.В. Строение и функции костной ткани в норме и при патологии. Сообщение 1 / А. В. Смирнов, А. Ш. Румянцев // Нефрология. - 2014. -Т. 8, N 6. - С. 9 - 25.
28. Содержание про- и противовоспалительных цитокинов в динамике экспериментального пародонтита у крыс с хроническим болевым синдромом» / А. Е. Брусенцова, Ю. Д. Ляшев, Н. В. Цыган [и др.] // Иммунология. - 2022. - Т. 43, №. 1. - С. 54 - 60.
29. Сохранение костного и мягкотканного компонентов альвеолярного гребня при немедленной имплантации в эстетической зоне челюстей в условиях дефицита костной ткани / М. В. Дьякова, Н. А. Беспалова, А. С. Клочков [и др.] // Современные технологии в медицине. - 2020. - Т.12, N. 1. - С. 57 - 64.

30. Сравнительным 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. - Т. 9, N 1. - С. 50 - 57.
31. Стимуляции регенерации тканей // ПАТЕНТ РОССИИ № 2480213. 2013. / И. Зон Леонард, Э. Норт триста, Гесслинг Вольфрам [и др.]
32. Толстоухов, В. С. Барьерная мембрана на основе кератиновых волокон / В. С. Толстоухов // Вестник Пензенского государственного университета. – 2017. - N. 1 (17). - С. 59 - 64.
33. Хирургическое лечение некроза головки бедренной кости с применением преддифференцированных мезенхимальных стволовых клеток / А. Э. Мурзич, О. А. Соколовский, О. Л. Эйсмонт [и др.] // Новости хирургии. - 2022. -Т. 30, N 1. - С. 54 - 60.
34. Экспериментальное обоснование применения мезенхимальных стволовых клеток для восстановления тканей периодонта / Ю. Л. Денисова, С. В. Сирак, С. П. Рубникович [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа. - 2020. - Т.15, N 3. - С. 337.
35. Экспрессия *runx2* и *osterix* в мезенхимных стволовых клетках крыс при культивировании в остеогенно кондиционированной среде / Л. А. Покровская, С. В. Надеждин, Е. В. Зубарева [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. - 2020. - N 2. - С. 112 – 117.
36. Эффективность методов реконструкции передней стенки верхнечелюстной пазухи (экспериментальное исследование) / Е. М. Трубушкина, Е. М. Бойко, Д. В. Стоматов [и др.] // Современные технологии в медицине. - 2022. - Т. 14, N. 1. - С. 44 - 55.
37. A biphasic calcium phosphate ceramic scaffold loaded with oxidized cellulose nanofiber-gelatin hydrogel with immobilized simvastatin drug for osteogenic differentiation / O. Faruq, S. Sayed, B. Kim [ et al.] // J Biomed Mater Res B Appl Biomaterials. - 2020. - Vol.108, N 4. - P. 1229 - 1238.

38. A Randomized Split-Mouth Clinical Trial on Effectiveness of Amnion-Chorion Membranes in Alveolar Ridge Preservation: A Clinical, Radiologic, and Morphometric Study / M. Hassan, S. Prakasam, C. Bain [ et al.] // International J Oral Maxillofac Implants. - 2017. - Vol. 32, N 6. - P. 1389 - 1398.
39. A small-molecule inhibitor of the Wnt pathway (SM04690) as a potential disease modifying agent for the treatment of osteoarthritis of the knee / V. Deshmukh, H. Hu, C. Barroga [et al.] // Osteoarthritis Cartilage. - 2018. - Vol. 26, N 1. - P. 18 - 27.
40. Almalki, SG. Key transcription factors in the differentiation of mesenchymal stem cells / SG. Almalki, DK. Agrawal // Differentiation. - 2016. - Vol.92, N1-2. - P. 41 - 51.
41. Alveolar Ridge Splitting Versus Autogenous Onlay Bone Grafting: Complications and Implant Survival Rates / N. Altiparmak, SS. Akdeniz, B. Bayram B [ et al.] // Implant Dent. - 2017. - Vol. 26, N 2. - P. 284 - 287.
42. Agarwal, A. Platelet rich fibrin combined with decalcified freeze-dried bone allograft for the treatment of human intrabony periodontal defects: a randomized split mouth clinical trial / A. Agarwal, ND. Gupta, A. Jain // Acta Odontology Scand. - 2016. - Vol. 74, N 1. - P. 36 - 43.
43. Activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway for disease therapy: Challenges and opportunities / P. Huang, R. Yan, X. Zhang [ et al.] // Pharmacology Ther. - 2019. - Vol.196. - P. 79 - 90.
44. Autogenous Tooth Bone Graft and Simvastatin Combination Effect on Bone Healing / U. Taşdemir, M. Kirtay, A. Keleş [ et al.] // Craniofac Surg. -2020. - Vol. -31, N 8. - P. 2350 - 2354.
45. Bacterial poly(3-hydroxybutyrate) as a biodegradable polymer for biomedicine. Part 2 / A. L. Iordanskii, G. A. Bonartseva, T. A. Makhina [et al.] // Вестник Казанского технологического университета. - 2014. - Vol. 17, N. 5. - P. 152 - 163.

46. Barrier membranes: More than the barrier effect? / O. Omar, I. Elgali, C. Dahlin [ et al.] //Clinical Periodontology. - 2019. - Vol. 46 Suppl 21(Suppl Suppl 21). - P. 103 - 123.
47. Becker A.J., Mc C.E., Till J.E. // Nature. - 1963. -Vol. 197. - P. 452 - 454.
48. Bi-layered electrospun nanofibrous membrane with osteogenic and antibacterial properties for guided bone regeneration / M. Lian, B. Sun, Z. Qiao [et al.] // Colloids Surf B Biointerfaces. - 2019. -Vol. 176. - P. 219 - 229.
49. Biomimetic Janus chitin nanofiber membrane for potential guided bone regeneration application / E. Prajateljia, ND. Sanandiya, A. Nurrochman [ et al.] // Carbohydr Polym. - 2021. - Vol. 251. - P.117032.
50. Biocompatibility and Immune Response of a Newly Developed Volume-Stable Magnesium-Based Barrier Membrane in Combination with a PVD Coating for Guided Bone Regeneration (GBR) / L. Steigmann, O. Jung, W. Kieferle [et al.] // Biomedicines. - 2020. - Vol. 8, N 12. - P. 636.
51. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) copolymers by Azotobacter chroococcum 7B: a precursor feeding strategy / A. P. Bonartsev, I.I. Zharkova, S. G. Yakovlev [ et al.] // Preparative Biochemistry and Biotechnology. - 2017. - Vol. 47, N 2. - P. 173 - 184.
52. BORNSTEIN MM, HALBRITTER S, HARNISCH H, WEBER HP, BUSER D. A retrospective analysis of patients referred for implant placement to a specialty clinic: indications, surgical procedures, and early failures // International J Oral Maxillofac Implants. - 2008. - N 23. - P. 1109 - 1116.
53. Bone Graft and Intraosseous Anchorage of Dental Implants for Reconstruction of the Residual Alveolar Ridge / Bali, Yashika [et al.] // Journal of pharmacy & bioallied sciences. - 2021. - Vol. 13, Suppl. 1. - S. 465 - S.468.
54. Bone engineering in dog mandible: Coculturing mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells in a composite scaffold containing vascular endothelial growth factor / A. Khojasteh, F. Fahimipour, M. Jafarian [et al.] // J Biomed Mater Res B Apple Biomaterial. - 2017. - Vol.105, N 7. - P. 1767 - 1777.



55. Bone regeneration is mediated by macrophage extracellular vesicles / M. Kang, CC. Huang, Y. Lu [et al.] // *Bone*. - 2020. - Vol.141. - P.115627.
56. Bottino, MC. Membranes for Periodontal Regeneration--A Materials Perspective / MC. Bottino, V. Thomas // *Front Oral Biology* -. 2015. - N17. - P. 90 - 100.
57. Bruschi, M.L. Mathematical models of drug release // *Strategies to modify the drug release from pharmaceutical systems* / Ed. M.L. Bruschi. Woodhead Publishing. - 2015. - P. 63 - 86.
58. Calcium Phosphate Carrying Simvastatin Enhances Bone Regeneration: A Systematic Review / R. Cruz, G. Pesce, J. Calasans - Maia [ et al.] // *Dent J*. - 2020. - Vol. 31, N 2. - P. 93 - 102.
59. Can stem cells enhance bone formation in the human edentulous alveolar ridge? A systematic review and meta-analysis / L. Miguita, A. Mantesso, CM. Pannuti [ et al] // *Cell Tissue Bank*. - 2017. - Vol.18, N 2. - P. 217 - 228.
60. Chalisserry, EP. Simvastatin Loaded Nano Hydroxyapatite in Bone Regeneration: A Study in the Rabbit Femoral Condyle / EP. Chalisserry, SY. Nam, S. Anil // *Curr Drug Deliv*. - 2019. - Vol.16, N 6. - P. 530 - 537.
61. Chavda, S. Human Studies of Vertical and Horizontal Alveolar Ridge Augmentation Comparing Different Types of Bone Graft Materials: A Systematic Review / S. Chavda, L. Levin // *J Oral Implantology*. - 2018. - Vol. 44, N 1. - P. 74 - 84.
62. Chitosan grafted/cross-linked with biodegradable polymers: A review / Sanchez-Salvador, Jose Luis [et al.] // *International journal of biological macromolecules*. - 2021. - Vol. 178. - P. 325 - 343.
63. Clinical Study of Bone Regeneration by Conditioned Medium From Mesenchymal Stem Cells After Maxillary Sinus Floor Elevation / W. Katagiri, J. Watanabe, N. Toyama [ et al.] // *Implant Dent*. - 2017. - Vol. 26, N 4. - P. 607.

64. Collagen based barrier membranes for periodontal guided bone regeneration applications / Z. Sheikh, J. Qureshi, AM. Alshahrani [et al.] // *Odontology*. - 2017. - Vol. 105, N 1. - P. 1 - 12.
65. Combination of a Bioceramic Scaffold and Simvastatin Nanoparticles as a Synthetic Alternative to Autologous Bone / CZ. Grafting. Wang, YH. Wang, CW. Lin [et al.] // *International J Mol. Sci.* - 2018. - Vol. 19, N12. - P.4099.
66. Comparing the Osteogenic Potentials and Bone Regeneration Capacities of Bone Marrow and Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Calvarial Bone Defect Model / YC. Lee, YH. Chan, SC. Hsieh [ et al.] // *International J Mol Sci.* -2019. - Vol. 20, N 20. - P. 5015.
67. Clinical efficacy of grafting materials in alveolar ridge augmentation: A systematic review / M. Duan Troeltzsch, M. Troeltzsch, P. Kauffmann [et al.] // *J Craniomaxillofac Surg.* - 2016. - Vol. 44, N 10. - P.1618 - 1629.
68. Comparative effectiveness of natural and synthetic bone grafts in oral and maxillofacial surgery prior to insertion of dental implants: Systematic review and network meta-analysis of parallel and cluster randomized controlled trials. / SN. Papageorgiou, PN. Papageorgiou, J. Deschner [ et al.] // *J Dent.* - 2016. - Vol. 48. - P. 1 - 8.
69. Current barrier membranes: titanium mesh and other membranes for guided bone regeneration in dental applications / YD. Rakhmatia, Y. Ayukawa, A. Furuhashi [ et al.] // *J Prosthodont Res.* - 2013. -Vol. 57, N 1. - P. 3 - 14.
70. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity / JA. Aas, BJ. Paster, L.N. Stokes [et al.] // *J Clinical Microbiology.* - 2005. - Vol. 43, N 11. - P. 5721 - 5732.
71. Development of fish collagen/bioactive glass/chitosan composite nanofibers as a GTR/GBR membrane for inducing periodontal tissue regeneration / T. Zhou, X. Liu, B. Sui, C. Liu [ et al.] // *J. Biomed Mater.* - 2017. - Vol. 12, N 5. - P.055004.

72. Duan, P. The role of the wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in formation and maintenance of bone and teeth / P. Duan, LF. Bonewald // *International J Biochemie Cell Biology*. - 2016. - Vol. 77(Pt A). - P. 23 - 29.
73. Effects of leukocyte-platelet-rich fibrin (L-PRF) in different intraoral bone grafting procedures: a systematic review / P. Dragonas, T. Katsaros, G. Avila-Ortiz // *International J Oral Maxillofac Surg*. - 2019. - Vol. 48, N 2. - P. 250 - 262.
74. Effects of simvastatin associated with exercise on the mechanical resistance of muscle and bone in rats / JS. Yamanaka, KEC. Ribeiro, GR. Yanagihara [ et al.] // *Rev Bras Ortopedia*. - 2018. - Vol.53, N 3. - P.287 - 292.
75. Effect of Simvastatin on Bone Regeneration: A Histologic and Histomorphometric Analysis / S. Yaghobee, M. Panjnoush, S. Chokami Rafiei [et al.] // *J Oral Maxillofac Surg*. - 2020. - Vol. 78, N 6.- P. 927 - 934.
76. El-Say, Khalid M [et al.] Matrix-type transdermal films to enhance simvastatin ex vivo skin permeability // *Pharmaceutical development and technology*. - 2017. - Vol. 22, N 4. - P. 492 - 499.
77. Elgali, I. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited / I. Elgali, O. Omar, C. Dahlin, P. Thomsen // *European J Oral Sci*. - 2017. - Vol. 125, N 5. - P. 315 - 337.
78. Emerging bone tissue engineering via polyhydroxyalkanoate (PHA)-based scaffolds / J. Lim, M. You, J. Li [ et al.] // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* - 2017. - Vol. 79. - P. 917 - 929.
79. Effect of membrane exposure on guided bone regeneration: A systematic review and meta-analysis / J. Garcia, A. Dodge, P. Luepke [ et al.] // *Clinical Oral Implants Res*. - 2018. - Vol. 29, N 3. - P. 328 - 338.
80. Enhancement of periodontal tissue regeneration by transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells / H. Kawaguchi, A. Hirachi, N. Hasegawa [et al.] // *J Periodontology*. - 2004. - Vol.75, N 9. - P. 1281 -1287.

81. Evaluation of bone regeneration of simvastatin loaded chitosan nanofiber membranes in rodent calvarial defects / N. Ghadri, KM. Anderson, P. Adatrow [et al.] // *J Biomater Nanobiotechnol.* - 2018. - N9. - P.210.
82. Evaluation of zinc-doped mesoporous hydroxyapatite microspheres for the construction of a novel biomimetic scaffold optimized for bone augmentation/ W. Yu, T-W. Sun, C. Qi, Z. Ding [et al.] // *International J Nanomedicine.* - 2017. -N 12. - P. 2293 - 2306.
83. Experimental study of tissue-engineered bone constructed with simvastatin carried by PLGA/CPC and bone marrow stromal cells / XQ Han, ZH. Dong, XR. Yu [et al.] // *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* - 2014. - N 23. - P.7 - 14.
84. Extracellular Vesicles of Stem Cells to Prevent BRONJ / J. Watanabe, K. Sakai, Y. Urata [et al.] // *J Dent Res.* - 2020. - Vol. 99, N 5. - P. 552 - 560.
85. Fabrication of novel poly (lactic acid/caprolactone) bilayer membrane for GBR application / GL. Abe, JI. Sasaki, C. Katata [et al.] // *Dent Mater.* - 2020. - Vol.36, N 5. - P. 626 - 634.
86. Fiorillo, Luca et al. Multicenter clinical trial on dental implants survival rate: a FDS76® study // *Minerva dental and oral science.* - 2021. - Vol. 70, N 5. - P. 190 - 195.
87. First-in-human study and clinical case reports of the alveolar bone regeneration with the secretome from human mesenchymal stem cells/ W. Katagiri, M. Osugi, T. Kawai [et al.] // *Head Face Med.* - 2016. - Vol.12, N 5.
88. Functionally engineered extracellular vesicles improve bone regeneration / CC. Huang, M. Kang, Y. Lu [et al.] // *Acta Biomater.* - 2020. - Vol.109. - P.182 - 194.
89. Functions of Wnt signaling pathway in hair cell differentiation and regeneration / QQ. Fan, FL. Meng, R. Fang [et al.] // *Yi Chuan.* - 2017. - Vol.39, N 10. - P. 897 - 907.

90. GBR membrane of novel poly (butylene succinate-co-glycolate) copolyester co-polymer for periodontal application. / S. Pajoumshariati, H. Shirali, SK. Yavari [ et al.] // *Sci Rep.* - 2018. - Vol. 8, N 1. - P. 7513.
91. Global prevalence of edentulism and dental caries in middle-aged and elderly persons: A systematic review and meta-analysis. / R Borg-Bartolo, A Rocuzzo, P Molinero-Mourelle [et al.] // *J Dent.* – 2022. – Vol. 127. doi: 10.1016/j.jdent.2022.104335. Epub 2022 Oct 17.
92. Guided Bone Regeneration for the Reconstruction of Alveolar Bone Defects / A. Khojasteh, L. Kheiri, SP. Motamedian [ et al.] // *Ann Maxillofac Surg.* - 2017. - Vol. 7, N 2. - P. 263 - 277.
93. Healing complications and their detrimental effects on bone gain in vertical-guided bone regeneration: A systematic review and meta-analysis / Tay, John Rong Hao [et al.] // *Clinical implant dentistry and related research.* - 2022. - 10.1111/cid.13057. 19 Jan, doi:10.1111/cid.13057
94. High-dose atorvastatin reduces periodontal inflammation: a novel pleiotropic effect of statins / S. Subramanian, H. Emami, E. Vucic [et al.] // *J Am Coll Cardiology.* - 2013. - Vol. 62. - P. 2382 - 2391.
95. Hollinger, J. O. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials / J. O. Hollinger, J. C. Kleinschmidt // *The Journal of craniofacial surgery.* - 1990. - Vol. 1, №. 1. - P. 60 - 68.
96. Horizontal ridge augmentation using GBR with a native collagen membrane and 1:1 ratio of particulate xenograft and autologous bone: A 3-year after final loading prospective clinical study / SM. Meloni, SA. Jovanovic, I. Urban [ et al.] // *Clinical Implant Dent Relat Res.* - 2019. - Vol. 21, N 4. - P. 669 - 677.
97. Horizontal ridge augmentation using native collagen membrane vs titanium mesh in atrophic maxillary ridges: Randomized clinical trial / M. Atef, A. Tarek, M. Shaheen [ et al.] // *Clinical Implant Dent Relat Res.* - 2020. - Vol. 22, N 2. - P.156 -166.

98. In situ bone regeneration enabled by a biodegradable hybrid double-network hydrogel / Y. Zhang, M. Chen, J. Tian [et al.] // *Biomater Sci.* - 2019. - Vol.7, N 8. - P. 3266 - 3276.
99. Influence of simvastatin on the biological behavior of nucleus pulposus-derived mesenchymal stem cells/ Z. Huang, X. Cheng, J. Zhao [et al.] // *Iran J Basic Med Sci.* - 2019. - Vol. 22, N 12. - P. 1468 - 1475.
100. Injectable simvastatin in periodontal defects and alveolar ridges: pilot studies / M. S. Morris, Y. Lee, MT. Lavin [et al.] // *J Periodontology.* - 2008. - Vo.79, N 8. - P. 1465 - 1473.
101. Investigation of allogeneic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: preliminary findings / IJ. De Kok, SJ. Peter, M. Archambault [et al.] // *Clinical Oral Implants Res.* - 2003. - Vol. 14, N 4. - P. 481 - 489.
102. James, AW. Review of Signaling Pathways Governing MSC Osteogenic and Adipogenic Differentiation/ AW. James // *Scientifica (Cairo).* - 2013. - P.684736.
103. Jaw bones regeneration using mesenchymal stem cells. A single-center experience / W. Colangeli, U. Riccelli, A. Giudice [et al.] // *Ann Ital Chir.* - 2018. - Vol. 89. - P. 20 - 23.
104. Kim HY, Park JH, Byun JH, Lee JH, Oh SH. BMP-2-Immobilized Porous Matrix with Leaf-Stacked Structure as a Bioactive GBR Membrane // *ACS Appl Mater Interfaces.* - 2018. - Vol.10, N36. - P.30115 - 30124.
105. Kim Ho Yong et al. BMP-2-Immobilized Porous Matrix with Leaf-Stacked Structure as a Bioactive GBR Membrane // *ACS applied materials & interfaces.* - 2018. - Vol. 10, N 36. - P. 30115 - 30124.
106. Komori, T. Runx2, an inducer of osteoblast and chondrocyte differentiation / T. Komori // *Histochem Cell Biol.* - 2018. - Vol. 149, N 4. - P. 313 - 323.
107. LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development / Y. Gong, R.B. Slee, N. Fukai [ et al.] // *Cell.* - 2001. - N 107. - P. 513 - 523.

108. Lebel, E. Reflections on the Regeneration of Bones; Accompanied with a Case of Necrosis of the Tibia, Comprising the Whole Circumference and Length of the Bone, with Integrity of the Medulla and of the Greater Part of the Periosteum / E. Lebel // Lond Med Phys J. - 1820. - Vol. 44, N 258. - P.119 - 124.

109. Li Y, Jin D, Xie W, et al. PPAR- $\gamma$  and Wnt Regulate the Differentiation of MSCs into Adipocytes and Osteoblasts Respectively // Curr Stem Cell Res Ther. - 2018. - Vol.13, N 3. - P.185 - 192.

110. Liu, J. Mechanisms of guided bone regeneration: a review/ J. Liu, DG Kerns DG. // Open Dent J. - 2014. - N 8. - P. 56 - 65.

111. Local effect of simvastatin combined with different osteoconductive biomaterials and collagen sponge on new bone formation in critical defects in rat calvaria / DN Sousa, VM. Roriz, GJPL Oliveira [ et al.] //Acta Cir Bras. - 2020. - Vol. 20, N 35(1). - e202000102.

112. Local ised controlled release of simvastatin from porous chitosan–gelatin scaffolds engrafted with simvastatin loaded PLGA-microparticles for bone tissue engineering application / P. Gentile, VK. Nandagiri, J. Daly [et al.] // Mater Sci Eng C. - 2016. - Vol. 59. - P. 249 - 257.

113. Luo, Dandan et al. Silk Fibroin/Collagen Blended Membrane Fabricated via a Green Papermaking Method for Potential Guided Bone Regeneration Application: *In Vitro* and *in Vivo* Evaluation // ACS biomaterials science & engineering. - 2020. - Vol. 7, N 12. - P. 5788 - 5797.

114. Martin, V. Bone regeneration: Biomaterials as local delivery systems with improved osteoinductive properties / V. Martin, A. Bettencourt // Mater Sci Eng C Mater Biol Appl. - 2018. - Vol. 82. - P.363 - 371.

115. Maxillary sinus lift using osteoinductive simvastatin combined with  $\beta$ -TCP versus  $\beta$ -TCP - a comparative pilot study to evaluate simvastatin enhanced and accelerated bone formation / A. Gouda, E. Helal, S. Ali [ et al.] //Acta Odontology Scand. - 2018. - Vol.76, N 1. - P. 39 - 47.

116. Maximov, A.A. // Folia Haematologica. - 1909. - Vol. 8. P. - 125 - 134.

117. Mechanisms of simvastatin myotoxicity: The role of autophagy flux inhibition / A. Emami, S. Shojaei, SC. da Silva Rosa [ et al.] // *European J Pharmacology*. - 2019. - Vol. 862:172616.
118. Mesenchymal stem cell-macrophage crosstalk and bone healing / J. Pajarinen, T. Lin, E. Gibon [et al.] // *Biomaterials*. - 2019. - Vol.196. - P. 80 - 89.
119. Michaeli-Geller G, Zigdon-Giladi H. Refuat Hapeh Vehashinayim - 1993. 2015. - Vol.32, N 1. - P. 13 - 59.
120. Mirza, Zubair B., et al. Bone Scintigraphy of Severe Hypercalcemia Following Simvastatin Induced Rhabdomyolysis. *Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism: the Official Journal of the Italian Society of Osteoporosis, Mineral Metabolism, and Skeletal Diseases*. - 2016. - Vol. 13, N. 3. - P. 257 - 261.
121. Misawa, M. The alveolar process following single-tooth extraction: a study of maxillary incisor and premolar sites in man / M. Misawa, J. Lindhe, MG. Araujo // *Clinical Oral Implant Res*. - 2016. - N 27. - P. 884 - 889.
122. Misch, CM. Autogenous bone: is it still the gold standard? / CM. Misch // *Implant Dent*. - 2010. - N 19. - P. 361.
123. Modified electrospun chitosan membranes for controlled release of simvastatin / VP. Murali, T. Fujiwara, C. Gallop [et al.] // *International J Pharm*. - 2020. - Vol. 584. - P. 119438.
124. Moy, PK. Risk factors in bone augmentation procedures / PK. Moy, T. Aghaloo // *Periodontology*. - 2000. - 2019. - Vol. 81, N1. - P. 76 - 90.
125. Murali, VP, Guerra FD, Fujiwara T, Bumgardner J. *Electrospun Chitosan Guided Bone Regeneration Membranes for Delivery of Simvastatin to Stimulate Osteogenesis*. Seattle, Washington, USA: Society for Biomaterials; 2019.
126. Nano fibrous asymmetric collagen/curcumin membrane containing aspirin-loaded PLGA nanoparticles for guided bone regeneration / MA. Ghavimi, A. Bani Shahabadi, S. Jarolmasjed [ et al.] // *Sci Rep*. - 2020. - Vol.10, N 1 - P.18200.



127. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review / Z. Sheikh, N. Hamdan, Y. Ikeda [ et al.] // *Biomaterial Res.* - 2017. - Vol. 21. P. 9.
128. New poly(3-hydroxybutyrate) microparticles with paclitaxel sustained release for intraperitoneal administration / A. P. Bonartsev, A. L. Zernov, S. G. Yakovlev [et al.] // *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry.* - 2017. - Vol. 17, N 3. - P. 434 - 441.
129. Novel application of stem cell-derived factors for periodontal regeneration / T. Inukai, W. Katagiri, R. Yoshimi [et al.] // *Biochem Biophys Res Commun.* - 2013. - Vol. 430, N 2. - P. 763 - 768.
130. Numerical investigations of bone remodelling around the mouse mandibular molar primordia / J. Chen, Y. He, L. Keilig [et al.] // *Ann Anat.* - 2019. - Vol. 222. - P. 146 - 152.
131. Oral implant osseointegration model in C57Bl/6 mice: microtomographic, histological, histomorphometric and molecular characterization / CC. Biguetti, F. Cavalla, EM. Silveira [et al.] // *J Apple Oral Sci.* - 2018. - N26: e20170601.
132. *Osf2/Cbfa1*: a transcriptional activator of osteoblast differentiation / P. Ducy, R. Zhang, V. Geoffroy [ et al.] // *G. Cell.* - 1997. - Vol. 89, N 5. - P.747 - 754.
133. Osteogenic effects of simvastatin-loaded mesoporous titania thin films/ N. López - Álvarez, V. López-Puente, C. Rodríguez-Valencia [et al.] // *Biomed Mater.* - 2018. - N13(2). - P.025017.
134. Periosteum progenitors could stimulate bone regeneration in aged murine bone defect model / H. Xiao, L. Wang, T. Zhang [et al.] // *J Cell Molecular Medicine.* - 2020. - Vol.24, N 20. - P.12199 - 12210.
135. Poly(3-hydroxybutyrate)/poly (ethylene glycol) scaffolds with different microstructure: the effect on growth of mesenchymal stem cells / A. P. Bonartsev, I. I. Zharkova, V. V. Voinova [ et al.] // *Biotech.* - 2018. - N 8. - P. 328.

136. Poly(3-hydroxybutyrate)/hydroxyapatite/alginate scaffolds seeded with mesenchymal stem cells enhance the regeneration of critical-sized bone defect / A. V. Volkov, A. A. Muraev, I. I. Zharkova [ et al.] // *Materials Science and Engineering: C, Materials for biological application.* - 2020. - Vol. 114. - P. 110991.

137. Prospective Review of Mesenchymal Stem Cells Differentiation into Osteoblasts / P. Garg, MM. Mazur, AC. Buck [ et al.] // *Orthop Surg.* - 2017. - Vol.9, N1. - P. 13 - 19.

138. Radiographic Comparison of Bovine Bone Substitute Alone Versus Bovine Bone Substitute and Simvastatin for Human Maxillary Sinus Augmentation / S. Yaghobee, AARR. Ghahroudi, A. Khorsand [ et al.] // *J Dent (Tehran).* - 2018. - Vol. 15, N 1. - P. 20 - 29.

139. Recent advances in the development of GTR/GBR membranes for periodontal regeneration--a materials perspective / MC Bottino, V. Thomas, G. Schmidt [et al.] *Dent Mater.* - 2012. - Vol. 28, N 7. - P.703 - 721.

140. Recent Advances of Osterix Transcription Factor in Osteoblast Differentiation and Bone Formation / Q. Liu, M. Li, S. Wang [et al.] // *Front Cell Dev Biol.* - 2020. - N 8. - P. 601224.

141. Regeneration of red bone marrow in rat lower jaw after transplantation of mesenchymal stem cells into the site of injury / IV. Maiborodin, VA. Matveeva, IS. Kolesnikov [ et al.] // *Bull Experimental Biology Medicine.* - 2012. - Vol.152, N 4. - P. 528 - 534.

142. Reconstructing jaw defects with MSCs and PLGA-encapsulated growth factors / BC. Tee, KG. Desai, KS. Kennedy [et al.] // *Am J Transl Res.* - 2016. - Vol. 8, N 6. - P. 2693 - 2704.

143. Release of simvastatin from scaffolds of poly(lactic-co-glycolic) acid and biphasic ceramic designed for bone tissue regeneration / I. C. Encarnação, M. B. Sordi, A. Aragonés [ et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials.* -2019. doi:10.1002/jbm.b.34311

144. Retzepe, M. Guided Bone Regeneration: biological principle and therapeutic applications / M. Retzepe, N. Donos // *Clinical Oral Implants Res.* - 2010. - Vol. 21, N 6. - P. 567 - 576.
145. Role and regulation of RUNX2 in osteogenesis / M. Bruderer, RG. Richards, M. Alini [ et al.] // *European Cell Mater.* - 2014. - N 28. - P. 269 -286.
146. Role of mesenchymal stem cells in bone regeneration and fracture repair: a review / X. Wang, Y. Wang, W. Gou [ et al.] // *International Orthopedie.* - 2013. - Vol. 37, N 12. - P. 2491 - 2498.
147. Role of Mesenchymal Stem Cells in Bone Regenerative Medicine: What Is the Evidence? / A. Oryan, A. Kamali, A. Moshiri [ et al/] // *Cells Tissues Organs.* 2017. - Vol. 204, N 2. P. 59 - 83.
148. Sapir-Koren, R. Osteocyte control of bone remodeling: Is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption-formation cycles? / R. Sapir-Koren, G. Livshits // *Osteoporosis. Int.* - 2014. -Vol. 25. - P. 2685 - 2700.
149. Sasaki, Jun-Ichi et al. Barrier membranes for tissue regeneration in dentistry // *Biomaterial investigations in dentistry.* - 2021. - Vol. 8, N 1. - 54 - 63.
150. S.E. Haynesworth, M.A. Caplan. Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies / S.E. Haynesworth, M.A. Barer, A.I. // *Bone.* - 1992. - Vol.13, Issue 1. - P. 69 - 80, ISSN 8756-3282.
151. Schemitsch E. H. Size matters: defining critical in bone defect size! / E. H. Schemitsch // *Journal of orthopaedic trauma.* - 2017. - N. 31. - P. S20-S22.
152. Selection of Collagen Membranes for Bone Regeneration: A Literature Review / L. Sbricoli, R. Guazzo, M. Annunziata [ et al.] // *Materials (Basel).* - 2020. - Vol. 13, N 3. - P. 786.
153. Simvastatin promotes osteoblast differentiation and mineralization in MC3T3-E1 cells / T. Maeda, A. Matsunuma, T. Kawane [ et al.] // *Biochemie Biophys Res Commun.* - 2001. - Vol. 280, N3. - P. 874 - 877.

154. Simvastatin-doped pre-mixed calcium phosphate cement inhibits osteoclast differentiation and resorption / M. Montazerolghaem, A. Rasmusson, H. Melhus [ et al.] // *J Mater Sci Mater Medicine*. - 2016. - Vol. 27, N 5. - P. 83.

155. Simvastatin loaded chitosan guided bone regeneration membranes stimulate bone healing / Murali, Vishnu Priya [et al.] // *Journal of periodontal research*. - 20231. - Vol. 56, N 5. - P. 877 - 884.

156. Simvastatin delivery on PEEK for bioactivity and osteogenesis enhancements / LJ. Deng, YL.Wu, XH. He [et al.] // *J Biomaterial Sci Polym Ed*. - 2018. - Vol. 29, N 18. - P. 2237 - 2251.

157. Simvastatin-induced Changes in the Leukocytic System of Porcine Bone Marrow / A. Snarska, D. Wysocka, L. Rytel [ et al.] // *J Vet Res*. - 2018. - Vol. 62, N 3. - P. 329 - 333.

158. Simvastatin inhibits IL-1 $\beta$ -Induced apoptosis and extracellular matrix degradation by suppressing the NF-kB and MAPK pathways in nucleus pulposus cells / J. Tu, W. Li, Y. Zhang [et al.] // *Inflammation*. - 2017. - Vol. 40. - P. 725 - 734.

159. Simvastatin inhibits osteoclast differentiation induced by bone morphogenetic protein-2 and RANKL through regulating MAPK, AKT and Src signaling / M. Yamashita, F. Otsuka, T. Mukai [et al.] // *Regular Peptides*. - 2010. - Vol. 162, N1-3. - P. 99 - 108.

160. Simvastatin alleviates bone resorption in apical periodontitis possibly by inhibition of mitophagy-related osteoblast apoptosis / CN. Yang, SH. Kok, HW. Wang [et al.] // *International Endod J*. - 2019. - Vol. 52, N 5. - P. 676 - 688.

161. Single-dose local simvastatin injection improves implant fixation via increased angiogenesis and bone formation in an ovariectomized rat model / J. Tan, N. Yang, X. Fu [ et al.] // *Med Sci Monit*. - 2015. - Vol. 18, N 21. - P. 1428 - 1439.

162. Snarska, A. Effect of Simvastatin on Thrombopoiesis in Porcine Bone Marrow / A. Snarska, D. Wysocka, L. Rytel // J Vet Res. - 2019. - Vol. 63, N 1. - P. 117 - 121.
163. Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins / G. Mundy, R. Garrett, S. Harris [et al.] // Science. -1999. - Vol. 286, N 5446. - P. 1946 -1949.
164. Stem and progenitor cell microenvironment for bone regeneration and repair / C C. Lee, N. Hirasawa, KG. Garcia [et al.] // Regen Med. – 2019. - Vol.14, N 7. - P. 693 - 702.
165. Stem cell-based bone regeneration in diseased microenvironments: Challenges and solutions / BD. Sui, CH. Hu, AQ. Liu [ et al.] // Biomaterials. - 2019. - Vol. 196. - P. 18 - 30.
166. Stem cell-based bone and dental regeneration: a view of microenvironmental modulation / C. Zheng, J. Chen, S. Liu, Y. Jin // International J Oral Sci. - 2019. - Vol.11, N 3. - P. 23.
167. Strategies for MSC expansion and MSC-based microtissue for bone regeneration / V. Bunpetch, ZY. Zhang, X. Zhang [et al.] // Biomaterials. - 2019. - Vol.196. - P. 67 - 79.
168. Study of a new bone-targeting titanium implant-bone interface / X. Liu, Y. Zhang, S. Li [ et al.] // International J Nanomedicine. 2016. - Vol 25, N11. - P. 6307 - 6324.
169. Systematic scoping review of mandibular bone tissue engineering / S. Basyuni A. Ferro, V. Santhanam [et al.] // Br J Oral Maxillofac Surg. - 2020. -Vol. 58, N 6. - P. 632 - 642.
170. 3D printed porous titanium cages filled with simvastatin hydrogel promotes bone ingrowth and spinal fusion in rhesus macaques / W. Zhang, C. Sun, J. Zhu [ et al.] // Biomaterial Sci. - 2020. - Vol. 8, N 15. - P. 4147 - 4156.
171. Tee, BC. Mandibular distraction osteogenesis assisted by cell-based tissue engineering: a systematic review/ BC. Tee, Z. Sun // Orthod Craniofac Res. - 2015. - Vol.18 Suppl. 1(0 1). - P. 39 - 49.

172. Tee, BC. Xenogeneic mesenchymal stem cell transplantation for mandibular defect regeneration / BC. Tee, Z. Sun // *Xenotransplantation*. - 2020. - Vol.27, N 5. - e12625.
173. The effect of decellularized tissue engineered constructs on periodontal regeneration / A. Farag, SM. Hashimi, C. Vaquette [ et al.] // *J Clinical Periodontology*. - 2018. - Vol.45, N 5. - P. 586 - 596.
174. The effect of graft application and simvastatin treatment on tibial bone defect in rats. A histological and immunohistochemical study / N. Laçın, BS. İzol, EG. Özkorkmaz [ et al.] // *Acta Cir Bras*. - 2019. - Vol.34, N 4. - e201900408.
175. The effectiveness of the controlled release of simvastatin from  $\beta$ -TCP macrosphere in the treatment of OVX mice / J. Chou, T. Ito, M. Otsuka [ et al.] // *J Tissue Eng Regen Med*. - 2016. - N 10. - E195 - E203.
176. The Regulation of Bone Metabolism and Disorders by Wnt Signaling / K. Maeda, Y. Kobayashi, M. Koide [ et al.] // *International J Molecular Sci*. - 2019. - Vol.20 (22). - P.5525.
177. Therapeutic effect of local administration of low-dose simvastatin-conjugated gelatin hydrogel for fracture healing / T. Fukui, M. Ii, T. Shoji [et al.] // *J Bone Miner Res*. - 2012. - Vol. 27, N5. - P.1118 - 1131.
178. Threedimensional porous gelatin-simvastatin scaffolds promoted bone defect healing in rabbits / A. Moshiri, M. Shahrezaee, B. Shekarchi [ et al.] // *Tissue Int*. - 2015. - Vol. 96. - P. 552 - 564.
179. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells versus conventional bone grafts in the regeneration of maxillary alveolar bone: A systematic review and meta-analysis / E.A. Al-Moraissi, F. O. Oginni, MA. Mahyoub Holkom [ et al.] // *Int J Oral Maxillofac Implants*. - 2020. - Vol.35, N 1. - P. 79 - 90.
180. Toledano, Manuel et al. "Zn-Containing Membranes for Guided Bone Regeneration in Dentistry // *Polymers*. - 2021. - Vol. 13, N 11. - P. 1797.

181. Treatment of experimental periodontal disease by laser therapy in simvastatin-modified rats / AA. Swerts, BFE. Santos, SR. Bruzadelli [ et al.] // *J Apple Oral Sci.* - 2017. - Vol. 25, N 4. - P. 387 - 395.
182. Triplett, RG. Autologous bone grafts and endosseous implants: complementary techniques / RG. Triplett, SR. Schow // *J Oral Maxillofac Surg.* - 1996. - Vol. 54. - P. 486 - 494.
183. Tsuji, K et al. Expression of the PEBP2alphaA/AML3/CBFA1 gene is regulated by BMP4/7 heterodimer and its overexpression suppresses type I collagen and osteocalcin gene expression in osteoblastic and nonosteoblastic mesenchymal cells // *Bone.* - 1998. - Vol. 22, N 2. - P. 87 - 92.
184. Vaibhav, Vikas Osseointegration of Dental Implants in Ridges with Insufficient Bones using Different Membranes for Guided Bone Regeneration // *Journal of pharmacy & bioallied sciences.* - 2021. - Vol. 13, Suppl 1. - S225-S228.
185. Van Lierop, A.H.; Appelman-Dijkstra, N.M.; Papapoulos, S.E. Sclerostin deficiency in humans // *Bone.* - 2017. - Vol. 96. - P. 51 - 62.
186. Younger, EM. Morbidity at bone graft donor sites / EM. Younger, MW. Chapman // *J Orthop Trauma.* - 1989. - N 3. - P. 192 - 195.
187. Zhang, ZZ. 3D printed poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffolds function with simvastatin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres to repair load-bearing segmental bone defects / ZZ. Zhang, HZ. Zhang, ZY. Zhang // *Experimental Ther Medicine.* - 2019. - Vol. 17, N 1. - P. 79 - 90.
188. Zigdon H, Levin L. Stem cell therapy for bone regeneration: present and future strategies / H. Zigdon, L. Levin // *Alpha Omegan.* - 2012. - Vol. 105, N 1-2. - P. 35 - 38.
189. Zigdon-Giladi, H. Adult stem cells in the use of jaw bone regeneration: current and prospective research / H. Zigdon - Giladi, N. Khoury, A. Evron // *Quintessence Int.* - 2015. - Vol.46, N 2. - P. 125 - 131.