

На правах рукописи

ФИДАРОВ Асланбек Феликсович

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКОГО СТОМАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА «БАК-
1000» В СОЧЕТАНИИ С АУТОЛОГИЧНЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ
СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ (ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.1.7. Стоматология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Москва – 2026

Работа выполнена на кафедре челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии медицинского института федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации.

Научный руководитель

Орлов Андрей Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор.

Официальные оппоненты:

Долгалев Александр Александрович, доктор медицинских наук, профессор; федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Ставропольский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, профессор кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии.

Сипкин Александр Михайлович, доктор медицинских наук, профессор; государственное бюджетное учреждение здравоохранения Московской области «Московский областной научно-исследовательский клинический институт им. М. Ф. Владимирского», заведующий кафедрой челюстно-лицевой хирургии и госпитальной хирургической стоматологии.

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Приволжский исследовательский медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится 25 марта 2026 г. в 9:00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.028 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

С диссертацией можно ознакомиться в Учебно-научном информационном библиотечном центре (Научной библиотеке) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайтах <http://vak.ed.gov.ru/> и <https://www.rudn.ru/science/dissovet/dissertacionnye-sovety/pds-0300028>.

Автореферат разослан «__» _____ 2026 г.

И.о. ученого секретаря
ПДС 0300.028
доктор медицинских наук, профессор

Мураев Александр Александрович

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования.

Актуальной проблемой современной имплантологии остается разработка средств и методов восстановления целостности костной ткани при возникновении ее дефектов вследствие травмы, патологических процессов воспалительно-деструктивной или опухолевой природы. Таким образом, представляется чрезвычайно важным изучение условий костной регенерации, которая осуществляется на основе физиологических процессов, присущих этой ткани в норме и при патологии.

Одним из таких механизмов является индукция восстановления костной ткани после ее повреждения при сохранении структурной и функциональной состоятельности благодаря пролиферации клеток-предшественниц и их последующей дифференцировке (Диденко Н.Н., 2024) в остеобластическом направлении (Albrektsson T. и Johansson C., 2001).

В ряде работ предлагались различные методики с использованием комплексных материалов, которые обладают способностью индуцировать образование кости. Например, Notz и Herr (1994) описали использование кальций-фосфатной керамики в сочетании с костным морфогенетическим белком в качестве одного из перспективных направлений разработки материалов с остеоиндуктивным эффектом. (Гнатюк Н.Д. 2024).

Однако, по мере накопления информации о том, как происходит остеогистогенез на различных этапах онтогенеза, начиная с антенатального периода, представления о базовых механизмах, лежащих в основе этого комплексного процесса, включающего в себя ангиогенез и остеогенетическую дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (МСК), подверглись значительным изменениям (Brandi M.L. и Collin-Osdoby P. 2006; Долгалев А.А. 2022). В последние годы эта идея получила современное дефинитивное оформление и адекватную доказательную базу (Kishor K. с соавт., 2016).

На основании вышесказанного можно судить об актуальности поставленных задач как с точки зрения проблем теоретической медицины, так и практики применения комплексных имплантационных материалов, используемых для восполнения обширных, длительно незаживающих костных дефектов челюстно-лицевой области (Гарунов М.М., 2022; Мураев А.А. 2023).

Степень разработанности темы исследования:

Важным аспектом проблемы остается обоснованность выбора остеопластического материала, который претерпевает комплекс превращений в тканевой среде в результате активного биогенного взаимодействия с компонентами местных защитно-приспособительных реакций организма. По информации в немногочисленных литературных источниках известно, что мезенхимальные стволовые клетки могут быть индуцированы в нескольких направлениях, в том числе – ангиогенном. Известно, что ангиогенез является ключевым фактором остеорегенерации, обеспечивающим поступление необходимых для метаболизма костной ткани молекул. Однако, отсутствуют исследования и методики, объединяющие в себе применение остеопластического материала и МСК.

Существует большое количество исследований, посвященных подбору имплантационного материала в модели дефекта кости, однако для заживления критических дефектов до сих пор не было разработано оптимальной методики. Несмотря на достаточно успешное применение различных видов остеопластических материалов в клинической имплантологии при закрытии небольших костных дефектов,

использование апатит силикатного стоматологического композита «БАК-1000» для этой цели представляет большой практический интерес в плане повышения вариативности и эффективности остеорегенерации. Не менее интересным остается раскрытие механизмов взаимодействия между апатитосиликатным материалом и МСК.

С означенных позиций представляется актуальной тема исследования нового малоизученного остеопластического материала «БАК-1000» в комбинации с МСК в составе разработанной 3D-биоинженерной конструкции с целью решения конкретных клинических задач. Отечественных работ по анализу остеогистогенеза при имплантации 3D-конструкций подобного состава явно недостаточно

Цель исследования.

Отработка техники устранения критического дефекта кости для восстановления ее целостности при помощи 3D-биоинженерной конструкции на основе ангиостимулированных аутологичных мезенхимальных стволовых клеток подкожно-жировой ткани и биосовместимого остеокондуктивного апатитосиликатного стоматологического композита «БАК-1000».

Задачи исследования:

1. Разработать технику устранения дефекта кости при помощи 3D-биоинженерной конструкции на основе индуцированных в ангиогенном направлении МСК на апатитосиликатной матрице биосовместимого стоматологического композита «БАК-1000».

2. Провести морфологическую оценку остеогистогенеза и ангиогенеза в месте имплантации комплексного апатитосиликатного стоматологического композита «БАК-1000».

3. Провести морфологическую оценку остеогистогенеза и ангиогенеза в периимплантационных тканях после имплантации комплексного апатитосиликатного стоматологического композита «БАК-1000» в комбинации с аутологичными МСК со специфическим ангиостимулирующим действием.

4. Провести морфометрическую оценку степени биорезорбции апатитосиликатного матрикса имплантата «БАК-1000» и «БАК-1000» в комбинации с ангиоиндуцированными МСК.

Научная новизна исследования.

1. Впервые при замещении дефекта кости критического размера была разработана и применена 3D-биоинженерная конструкция на основе индуцированных в ангиогенном направлении мезосфероидов и остеопластического материала – прототип васкуляризованного биотрансплантата.

2. Впервые проведено сравнительное исследование эффективности применения биоинженерной конструкции, заселенной индуцированными в ангиогенном направлении мезосфероидами и не заселенной. Показана их высокая эффективность в отношении стимуляции ангиогенеза с образованием большого количества кровеносных сосудов, преимущественно капиллярного типа, а также умеренное увеличение активности остеогистогенеза.

3. Впервые были исследованы тканевые ответы на внедренную 3D-биоинженерную конструкцию: обнаружили разрушение материала имплантата с формированием вокруг него костного ободка и признаки активного ангиогенеза.

4. Впервые в качестве имплантационного материала в модели критического диастаза кости апробирован биосовместимый апатитосиликатный стоматологический композит «БАК-1000».

5. Разработанный метод получения VEGF-индуцированных мезосфероидов активно может применяться для 3D-печати поврежденных тканей и органов в трансплантологии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в том, что полученные результаты исследования взаимодействия 3D-биоинженерной конструкции на основе ангиоиндуцированных МСК с периимплантационными тканями имеют значение при выборе оптимального имплантационного материала при повреждении костной ткани в результате ее атрофии, травмы, патологических процессов воспалительно-деструктивной или опухолевой природы. В совокупности, полученные данные позволяют более глубоко изучить механизмы формирования костной ткани и компенсаторно-приспособительных реакций периимплантационной ткани.

Результаты исследования дополняют представления об ангиогенезе и зависимом от него остеогистогенезе, индуцированных имплантацией ангиоиндуцированных МСК на апатитосиликатной матрице, определен спектр структурных и функциональных изменений костной ткани и ее микроокружения.

Доказана эффективность индукции ангиогенеза мезенхимальными стволовыми клетками, стимулирующей остеогистогенез. На основании результатов проведенного морфологического исследования этих взаимосвязанных процессов после имплантации разработанной биоинженерной конструкции выявлено частичное восстановление костной ткани и активное образование новых кровеносных сосудов.

Практическая значимость работы состоит в том, что результаты проведенного исследования структурно-функциональных изменений костной ткани, имплантированного материала и периимплантационной ткани, а также разработанный метод 3D-культивирования ангиоиндуцированных МСК на матрице апатитосиликатного стоматологического композита могут быть использованы при выборе оптимальной методики замещения костного дефекта при лечении атрофии костной ткани, ее травмы или ложных суставов в хирургической стоматологии, имплантологии, челюстно-лицевой хирургии и травматологии. Созданная 3D-конструкция на матрице «БАК-1000» за счет ангиоиндуцированных МСК оказалась высокоэффективна в отношении стимуляции ангиогенеза и удобна при практическом применении.

Методология и методы исследования

Методология исследования базировалась на традиционных теоретических и практических методологических принципах. Был проведен анализ специализированной литературы с целью достижения качества полученных результатов и составления дизайна исследования.

Исследование проводилось на крысах породы Спрег-Дули (n=48) в модели критического дефекта бедренной кости. Фрагменты кости фиксировали в забуференном формалине, дальнейшее гистологическое исследование проводили по стандартной методике. Применение гистологического метода с окраской гематоксилином и эозином позволило оценить морфологические особенности процессов в кости в норме, в имплантационном ложе и периимплантационной ткани.

Основные положения, выносимые на защиту:

В опытах на лабораторных животных (крысах линии SD) подобрана экспериментальная модель критического дефекта бедренной кости. Для восстановления данного дефекта:

1. Разработан метод получения VEGF индуцированных сфероидов из 3D культуры мезенхимных стромальных клеток подкожной жировой ткани.
2. Создана 3D- биоинженерная экспериментальная конструкция, состоящей из биоактивного стоматологического материала «апатитосиликатный композит БАК-1000» и сфероидов, индуцированных в ангиогенном направлении.
3. Данная экспериментальная конструкция предложена для восстановления критических дефектов костной ткани, применение которой в свою очередь позволит увеличить эффективность методов лечения.

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов была обусловлена проведением исследования на достаточном количестве лабораторных животных – крыс породы Спрег-Доули (n=48) и анализом специализированной литературы, который позволяет обосновать и оценить актуальность выбранной темы и степень ее изученности. Использованный материал и выбранные методы соответствуют поставленным целям и задачам. Гистоморфологический анализ проводили на современном сертифицированном лабораторном оборудовании.

Полученные основные результаты научной работы были доложены и обсуждены на XXIV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2017); VIII Конференция молодых ученых РМАНПО с международным участием «Горизонты медицинской науки» (Москва, 2017).

Диссертация апробирована 29 мая 2025 года (№ 0300-УСП-9) на заседании кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

Личный вклад автора

Автор данной работы принимал непосредственное участие на всех ее этапах. Автором проведен анализ литературного обзора по данной проблематике, на основании чего разработана сама идея диссертации ее план и дизайн. Автор учувствовал во всех экспериментах, проводимых как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, автором проведена работа по сбору и интерпретации данных полученных результатов.

Внедрение результатов исследования

Результаты исследований используются в учебном процессе кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии Медицинского института Российского университета дружбы народов имени Патриса Лумумбы при преподавании дисциплины «Челюстно-лицевая и гнатическая хирургия» для студентов пятого курса, обучающихся по программе «Стоматология».

Публикации результатов работы

По теме диссертационного исследования опубликовано 4 научные работы. Все научные издания рекомендованы ВАК при Министерстве науки и образования РФ для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Объем и структура исследования

Материалы диссертации изложены на 117 страницах машинописного текста. Диссертация состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы, результаты собственных исследований и их обсуждение), выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 207 источника, из которых 40 отечественных, 167 зарубежных. Работа проиллюстрирована 4 таблицами, 53 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

В экспериментальном исследовании использовали животных – самцов крыс породы Спрег-Доули (*Rattus Sprog-Dowly*; вес 220 ± 20 грамм; возраст 9–10 недель; $n=48$). Они содержались при 12-часовом световом дне, кондиционировании при температуре 23°C и влажности 40 – 60%, на стандартном рационе питания с водой *ad libitum*. На время длительного эксперимента животные были размещены в клетках по две особи, чтобы исключить возможное влияние длительного одиночного содержания на поведение.

Этапы эксперимента.

Объект исследования – бедренная кость в области имплантации и периимплантационных тканей, которую изначально исследовали макроскопически на предмет наличия/отсутствия воспаления, отека.

Эксперимент состоял из двух этапов.

Первый хирургический этап.

Иссечение жировой ткани производили из паховой области. Выделенные фрагменты помещали в стерильные боксы со средой для культивирования МСК.

Второй хирургический этап.

На втором этапе создавали костные дефекты диафиза бедренной кости с их восполнением 3D-биоинженерной конструкцией.

Экспериментальные животные случайным образом были поделены на 2 группы:

I-ая группа ($n=24$; ♂) – контрольная, воспроизведение дефекта бедренной кости с последующим его закрытием апатитосиликатным стоматологическим композитом «БАК-1000»;

II-ая группа ($n=24$; ♂) – опытная, воспроизведение дефекта бедренной кости с последующим его закрытием при помощи 3D-биоинженерной конструкции на основе 3D-культивированных МСК, индуцированных в ангиогенном направлении, и апатитосиликатного стоматологического композита «БАК-1000».

По 8 животных каждой из групп выводили из эксперимента на 30, 60 и 120 сутки после окончания второго хирургического этапа.

Выведение из эксперимента.

Животных всех групп (I – II) выводили из эксперимента путем их помещения в атмосферу углекислого газа в соответствии с рекомендациями ВОЗ. После плановой эвтаназии, согласно дизайну эксперимента, у крыс были изъяты фрагменты костной ткани из области имплантации и периимплантационной ткани.

Клетки стромально-сосудистой фракции выделяли из подкожно-жировой клетчатки по стандартному протоколу (Hearnden R. с соавт., 2021). После окончания инкубации в раствор с тканью добавляли полную среду для культивирования и центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин. Полученный осадок ресуспендировали и пропускали через нейлоновый фильтр. Выделенные клетки вместе с

ферментированными кусочками тканей помещали на чистые чашки Петри в полную ростовую среду.

2D-культивирование. Полученные клетки культивировали в стандартных условиях (37°C; 5% CO₂) в полной ростовой среде, состоящей из смеси базовых сред ДМЕМ/F-12 (1:1, Биолот), дополненной 2 мМ L-глутамина, 100 ЕД/мл гентамицина (ПанЭко) и 10% эмбриональной телячьей сывороткой (HyClone). Когда клетки достигали монослоя, осуществляли пассирование 2D-культуры с помощью раствора Версена (Биолот) и 0,25% раствора трипсина (Биолот). На четвертом пассаже выращивания происходило формирование плотного монослоя культуры МСК (Рисунок 1). На четвертом пассаже культура стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ) представляла гомогенную популяцию активно пролиферирующих прогениторных клеток, способных дифференцироваться в трёх направлениях – адипогенном, хондрогенном и остеогенном. Клетки имели морфологию мезенхимоподобных клеток, формирующих плотный монослой с характерным поточным ростом. Затем, МСК переводили в условия 3D-культивирования.

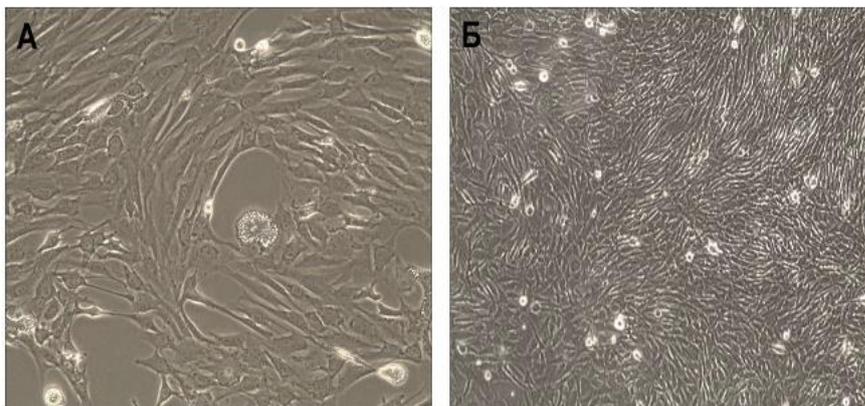


Рисунок 1 - Культура мезенхимных стромальных клеток жировой ткани крысы. А – пассаж 1, прикрепление клеток к субстрату и активная миграция из кусочка обработанной ферментами ткани;

Б – пассаж 4, клетки мезенхимного фенотипа формируют плотный монослой. Нефиксированные и неокрашенные клетки под инвертированным микроскопом. Световая микроскопия с фазовым контрастом, увеличение А – $\times 20$; Б – $\times 10$

Для получения микросфер клетки каждого образца из монослойной культуры помещали в 12 неадгезивных 256-луночных агарозных планшетов (3D Petri Dishes, Microtissue, США) в количестве 2000 клеток на 1 микролунку (1 мкл). Через 7 суток культивирования микросферы вымывали из агарозных планшетов и осаждали с помощью центрифугирования (5 мин, 600 об/мин, 60g). На данном этапе происходило добавление индуктора васкулогенеза VEGF фактора. Для получения тканеинженерной конструкции сфероиды в количестве 3000 шт. помещали на остеопластический материал «БАК-1000» и культивировали в полной ростовой среде в течение 7 суток (Рисунок 2). Иммунофенотипирование монослойной культуры СКЖТ проводили по следующим маркерным белкам: CD29, CD90, CD105, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19. Анализ экспрессии поверхностных маркеров подтвердил мезенхимную природу клеток.

Иммуноцитохимический анализ антигенов проводили на 2D и 3D культурах клеток, фиксированных с помощью 4% раствора параформальдегида в течение 20 минут. Сравнительное исследование экспрессии специфических маркеров клетками, выращенными в 2D и 3D культуре, показало их различие (Рисунок 3).

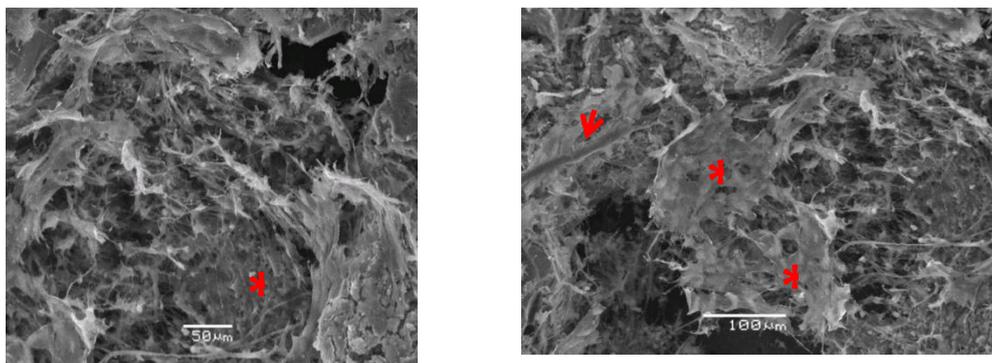


Рисунок 2 - Адгезия сфероидов (*) на матрице материала БАК-1000.
Формирование тубулоподобных структур (стрелка)

Клетки как в монослое, так и в сфероиде синтезировали маркеры мезенхимных клеток: виментин - белок цитоскелета, белок внеклеточного матрикса коллаген IV типа и белок межклеточных контактов -N- кадгерин. Однако локализация этих маркеров различалась. Коллаген IV типа в монослое выявлен в цитоплазме клеток, а в 3D культуре локализован в цитоплазме и межклеточном пространстве. N-кадгерин в отличие от монослойной культуры, где он локализован в цитоплазме, в сфероидах выявлен, кроме того, и на мембране поверхностных клеток. Белок адгезивных межклеточных контактов E-кадгерин в отличие от монослоя в 3D культуре наблюдали на мембране поверхностных клеток сфероида. Появление на мембране поверхностных клеток E-кадгерина эпителиальных контактов в сфероиде указывает на частичный мезенхимо-эпителиальный переход поверхностных клеток при 3D культивировании (Рисунок 3). После 7 суток 3D культивирования СКЖТ в питательной среде с добавлением индуктора васкулогенеза VEGF в сформированных сфероидах наблюдали экспрессию специфических маркеров эндотелиальных прогениторных клеток CD31, Flk-1, VEGF, von Willebrand.

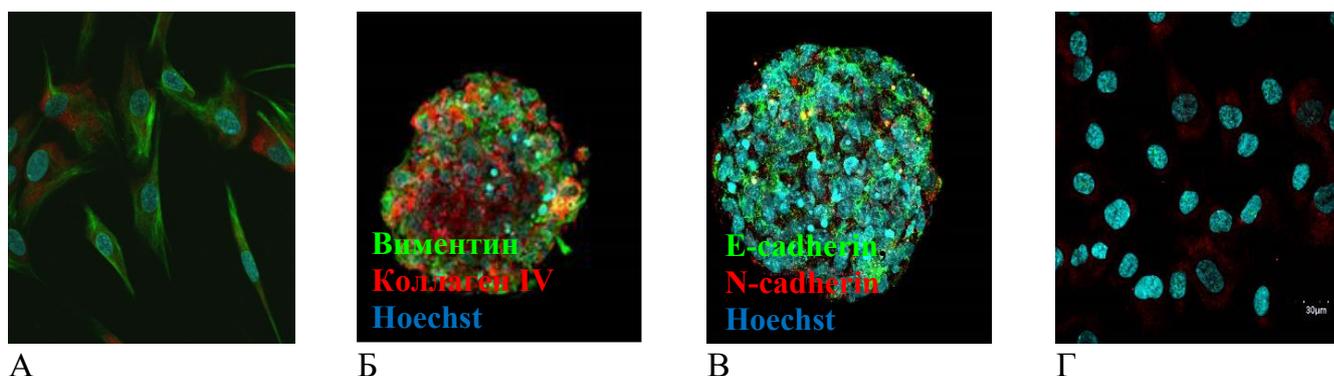


Рисунок 3 - Иммуноцитохимический анализ экспрессии мезенхимных и эпителиальных маркеров в клетках жировой ткани крыс в 2D и 3D культуре.

Синтез виментина (зеленый) и коллагена IV (красный) в 2D (А) и 3D (Б) культуре.

Синтез E-кадгерина (зеленый) и N-кадгерина (красный) в 2D (В) и 3D (Г) культуре.

Ядра окрашены Hoechst 33258 (синий). Лазерная конфокальная сканирующая микроскопия

Исследования показали остеогенную дифференцировку СКЖТ, культивированных в присутствии остеоиндуктивной матрицы БАК-100 как в монослое, так и в сфероидах (Рисунок 4). В 2D культуре клеток, синтез остеокальцина наблюдали преимущественно в околядерной области и диффузно по цитоплазме клеток, тогда как

в 3D культуре клетки образовывали длинные выросты, обогащенные остеокальцином. При этом остеопонтин локализовался вдоль мембран клеток. Все клетки синтезировали виментин.

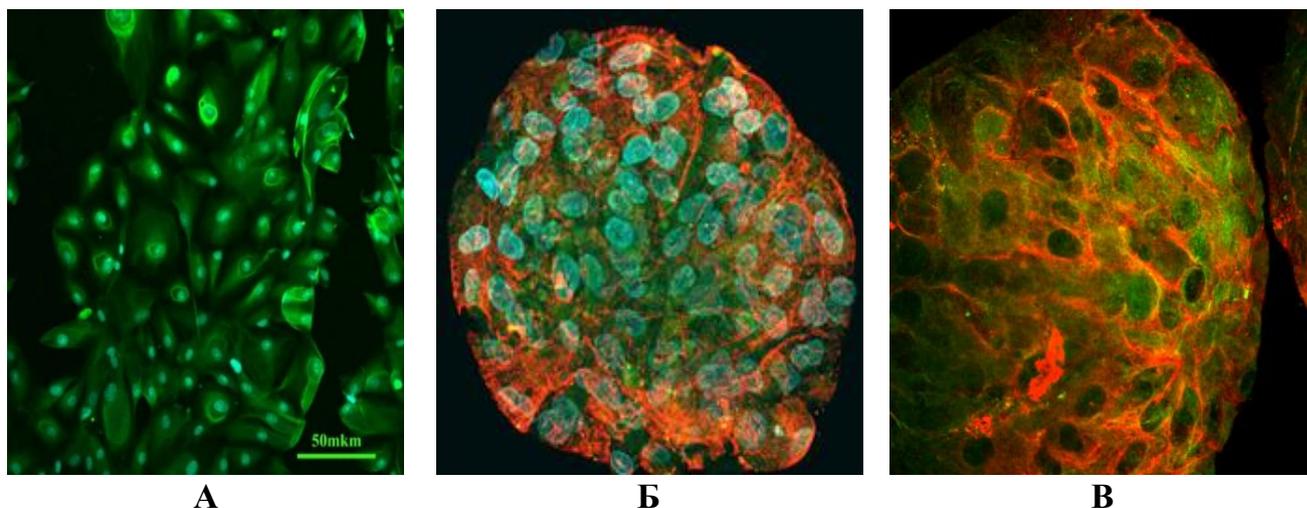


Рисунок 4 - Индукция остеогенной дифференцировки СКЖТ в монослойной культуре и в сфероидах в присутствии остеоиндуктивной матрицы БАК-100.

А – экспрессия остеокальцина в СКЖТ крыс, культивированных в монослое.

Б – экспрессия остеокальцина (красный) и виментина (зеленый) в СКЖТ крыс, выращенных в 3D культуре (сфероид);

В – экспрессия остеопонтина (красный) и виментина (зеленый) в СКЖТ крыс, в 3D культуре (сфероид).

Ядра клеток окрашены Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Протокол операции.

По наружной поверхности бедра производили разрез кожи длиной до 3,0 см. Далее острым и тупым путем осуществляли доступ к бедренной кости и бором производили две поперечные остеотомии с удалением фрагмента кости $0,3 \times 0,5$ см во всех экспериментальных группах. В первой группе дефект заполняли апатитосиликатным имплантационным материалом «БАК-1000» соответствующего размера. Во второй группе дефект кости заполняли биоинженерной 3D-конструкцией, состоящей из ангиоиндуцированных МСК на апатитосиликатной матрице («БАК-1000»). Затем костные отломки стягивали при помощи микропластин с фиксацией титановыми микровинтами ($L=5$ мм, $D=1,2$ мм) и компрессией 1 – 2 Н/см. Зону перелома покрывали коллагеновой мембраной «Bio-Gide Geistlich» размерами $1,5 \times 1,0$ см. Мышцы возвращали на место, послойно ушивали рану.

Послеоперационные мероприятия.

Операционную рану обрабатывали аэрозолем с антисептическими, противовоспалительными и ранозаживляющими свойствами («Алюминий спрей», Permix Pharma Kft). Результаты фиксировали на рентгеновских прицельных снимках. Наблюдение за животными осуществляли до их выхода из наркоза. В послеоперационном периоде проводили противовоспалительную терапию (кетопрофен + энрофлоксацин). Гистологическое исследование.

В экспериментальной области иссекали фрагменты, включающие имплантат с фиксаторами и окружающие ткани, и помещали их в нейтральный формалин на 24 часа, затем его обновляли и промывали материал в проточной воде при комнатной температуре в течение 24 часов. Производили декальцинацию в 25% растворе трилона

Б. Металлические элементы устройств (фиксаторы) удаляли по мере декальцинации костных участков тканевых фрагментов. Затем готовили серийные срезы (толщиной 2 – 3 мкм), окрашивали гематоксилином и эозином, а также гистохимическим методом по Ван-Гизону (фуксин-пикриновый метод окраски).

В процессе анализа подразделяли исследуемые структуры на две основные зоны:

1. «тело» имплантата, включавшее в себя, его матрикс;
2. периимплантационная зона, включавшая в себя тканевые структуры, окружающие имплантационный материал.

Микроскопический анализ выполняли с помощью системы видео-микроскопии и программы для обработки и анализа изображений Leica Application Suite (LAS) Version 4.9.0.

Для всех количественных данных проводили проверку на нормальность. При нормальном распределении вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD) с использованием пакета анализа данных программы Microsoft Excel (версия 14.0.4760.1000, 32-разрядная).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения SPSS Statistics 17.0 (версия 17.0.0.236), построение графиков выполняли в Statsoft Statistica 12 для Windows 10 (версия 12.5.192.0) с привлечением возможностей программы «STATGRAPH 5.1» («Microsoft», США).

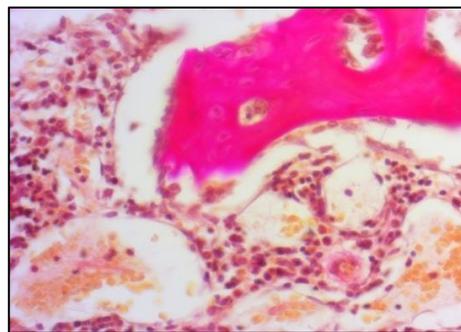
РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

I-ая группа – контрольная, имплантация «БАК-1000»

30-е сутки эксперимента. При гистологическом исследовании в области дефекта обнаружены единичные костные трабекулярные структуры, у краев которых наблюдали скопление гигантских многоядерных остеокластов, что говорит о начальных стадиях остеогистогенеза. Периимплантационное ложе образовано преимущественно рыхлой волокнистой соединительной тканью с участками интенсивного остеогистогенеза: формирование остеогенных трабекулярных структур. Особое внимание обращает на себя интенсивный ангиогенез в межтрабекулярных пространствах новообразованной костной ткани. Кроме того, обнаружили фокальную лимфоцитарно-макрофагальную инфильтрацию с единичными сегментоядерными лейкоцитами. Таким образом, на 30 сутки эксперимента отмечали достоверные признаки интенсивного ангиогенеза и слабо выраженного остеогистогенеза с формированием аркадно-трабекулярных структур, сопровождающиеся умеренной воспалительной реакцией в области инокуляции имплантационного материала (Рисунок 5).



А



Б

Рисунок 5 - Фрагмент кости на 30 сутки эксперимента во I группе.

А – Умеренный остеогистогенез в периимплантационной ткани.

Окраска по Ван-Гизону, увелич. $\times 50$.

Б – Интенсивный ангиогенез в области формирования костной ткани.

У костных краев, местами, обнаружены гигантские многоядерные остеокласты.

Окраска по Ван-Гизону, увелич. $\times 400$

60-е сутки эксперимента.

На этом сроке происходит резкое изменение тканевых структур. По периферии имплантационный материал представлен ячеисто-каналикулярной структурой с единичными гигантскими многоядерными остеокластами. Здесь преобладает грубоволокнистая соединительная ткань с очагами фиброза, бедная клеточными элементами. Также наблюдали резкое снижение интенсивности ангиогенеза: единичные кровеносные сосуды, преимущественно артерии и вены малого и среднего калибров (Рисунок 6). Таким образом, в этой группе на 60-е сутки эксперимента сохранялась ячеисто-каналикулярная структура имплантационного материала, однако резко снижалась интенсивность ангиогенеза и остеогистогенеза.

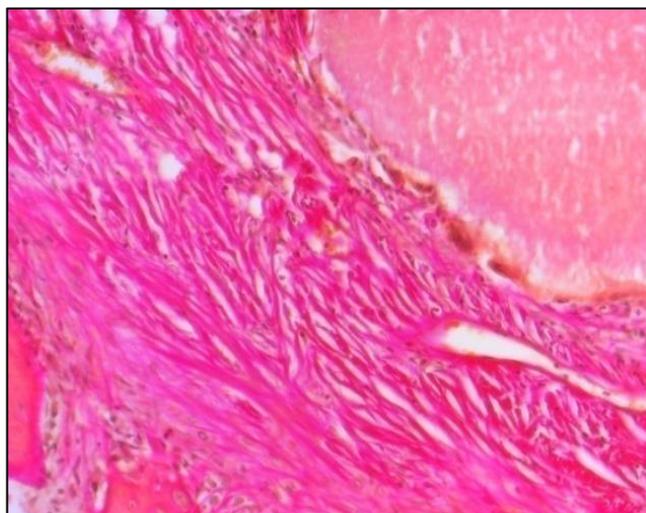


Рисунок 6 - Фрагмент кости на 60 сутки эксперимента во I группе.

Имплантационный материал окружен грубоволокнистой фиброзной соединительной тканью. По краю имплантационного материала располагаются единичные гигантские многоядерные остеокласты (стрелки углом).

Хорошо видна каналикулярно-ячеистая структура имплантационного материала.

Окраска по Ван-Гизону

120-е сутки эксперимента

На 120-е сутки эксперимента наблюдали картину умеренного остеогистогенеза с формированием костной ткани губчатого строения, с признаками ремоделирования, по краям костных структур умеренное количество гигантских многоядерных остеокластов (Рисунок 7). Снижение количества клеток в периимплантационной ткани. Встречаются участки с дефектами, заполненными разреженной полупрозрачной субстанцией. В прилежащей к имплантационному материалу ткани отмечали выраженный отек и, местами, выраженную макрофагальную инфильтрацию на фоне гомогенизирующегося межучточного матрикса. В некоторых микропрепаратах ячеисто-каналикулярный матрикс сохранен, однако в других – модифицирован в микрочастицы желтого цвета с разрушением его структуры. Таким образом, в I-ой группе на протяжении всего эксперимента отмечали снижение интенсивности ангиогенеза и остеогистогенеза. К концу эксперимента в микропрепаратах наблюдали разрушение имплантационного материала с его частичной трансформацией в микрочастицы ярко-желтого цвета. Обнаруженные в I-ой группе патоморфологические изменения суммированы в таблице 1.

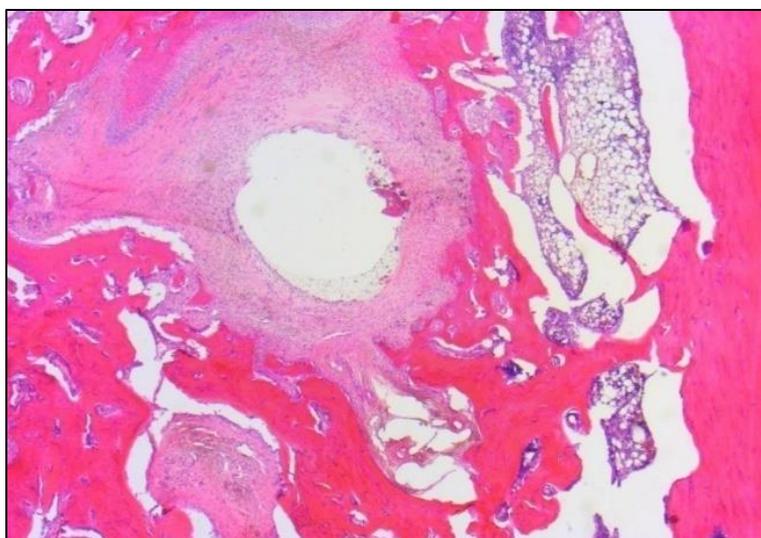


Рисунок 7 – Фрагмент кости на 120-е сутки эксперимента в I-ой группе. Вокруг полости на месте инокуляции обнаружены остатки имплантационного материала, клеточно-волоконистая соединительная ткань и единичные зрелые костные структуры.

Окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 50$

Таблица 1 – Патоморфологические изменения в I-ой группе в области инокуляции остеокондуктивного материала «БАК-1000»

Группа	I-ая группа (контрольная)		
n	24		
Сутки	30	60	120
Наблюдаемые морфологические изменения			
Клеточный состав	Костная ткань трабекулярной структуры, рыхлая волокнистая соединительная ткань,	Преобладает фиброзная грубоволокнистая ткань, единичные многоядерные остеокласты	Формирование костной ткани губчатого строения с фиброзной соединительной тканью и многоядерными остеокластами

	многоядерные остекласты		
Ангиогенез	Рост ангиогенеза	Снижение ангиогенеза	Снижение ангиогенеза
Остеогенез	Не выражен	Слабо выражен	Слабо выражен
Клеточная воспалительная инфильтрация, отек	Отсутствует	Незначительное проявление	Незначительное проявление
Кристаллы апатит силиката	Отсутствуют	Отсутствуют	Отсутствуют
Панваскулит	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

II-ая группа – опытная, имплантация «БАК-1000» в комбинации с ангиоиндуцированными МСК

30-е сутки эксперимента. Через 30 суток после завершения второго этапа операции в II группе в области имплантации на малых увеличениях отмечали обширный дефект костной стенки, через который была произведена инокуляция имплантационного материала в костномозговую полость, где отмечали скопления полиморфноядерных лейкоцитов (признаки гнойного воспаления) и деструкции. В некоторых микропрепаратах были обнаружены фрагменты имплантата, окруженные рыхлой волокнистой соединительной тканью и единичными гигантскими многоядерными остеокластами. Причем, отчетливо определялась ячеисто-каналюлярная структура имплантационного материала. Наблюдали большое количество зон интенсивного ангиогенеза, выраженность которого зависела от их локализации. Следует отметить, что уже на 30 сутки эксперимента в этой группе, местами, наблюдали начальные признаки восстановления костной ткани, по периферии которых преобладали гигантские многоядерные остеокласты. Таким образом, в результате проведенного гистологического исследования в II группе были обнаружены следующие патоморфологические признаки в области имплантации и периимплантационной ткани: умеренная воспалительная реакция, явления интенсивного ангиогенеза, умеренно выраженный остеогистогенез (Рисунок 8А).

60-е сутки эксперимента. На этом сроке эксперимента на малых увеличениях в гистологических препаратах сохранялась инциссура костномозговой полости. В периимплантационной области – диффузная лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация. Следует отметить, что в большинстве образцов наблюдается редукция ячеисто-каналюлярной структуры импланта, который замещается мелкозернистыми частицами желтого цвета. Вокруг материала – тонкая соединительнотканная капсула. Периимплантационная ткань во всех микропрепаратах интенсивно инфильтрирована

микрочастицами ярко-желтого цвета, проникающими в просвет кровеносных сосудов. При увеличении $\times 200$ обнаружили микрокристаллическую структуру этих частиц или их конгломераты. Нередко они располагались в просветах кровеносных сосудов (Рисунок 8Б). Тем не менее, процесс остеогистогенеза в этой группе продолжался, а формирующаяся костная ткань была представлена в виде плотного компактного ободка, отделенного от скоплений частиц желтого цвета тонким слоем фиброзной капсулы. В некоторых микропрепаратах отмечали умеренную макрофагальную инвазию в структуру имплантата. В «теле» преформированного имплантационного материала наблюдали интенсивную макрофагальную инфильтрацию. Отмечали превалирование неангиогенетического процесса.

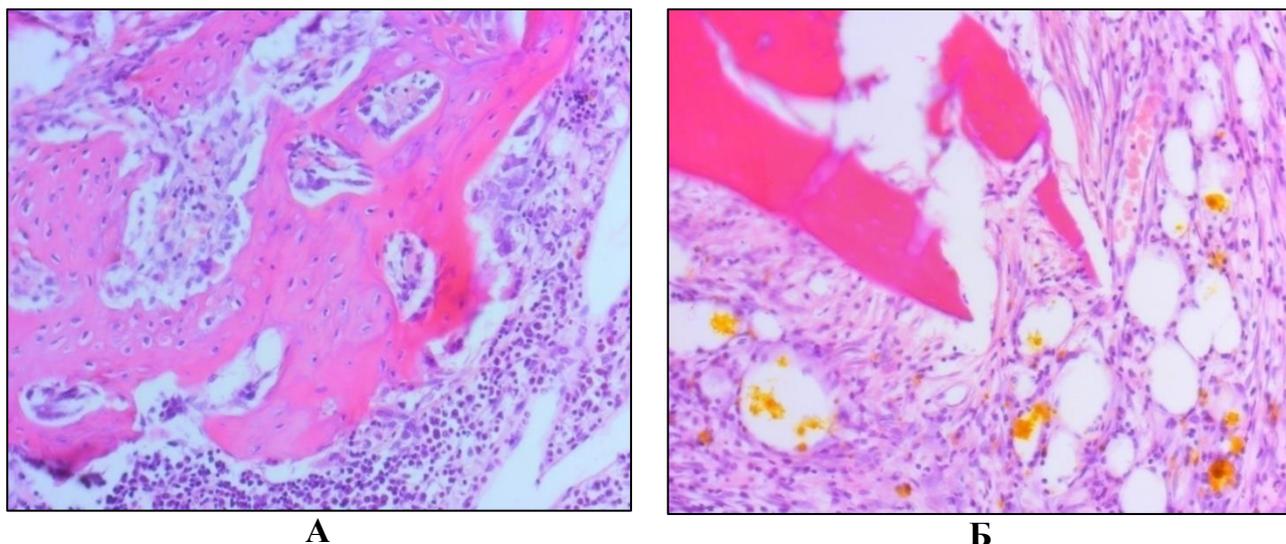


Рисунок 8 - Фрагмент кости II-ой группы на 30-е (А) и 60-е (Б) сутки эксперимента.

А – начальные признаки остеогистогенеза с умеренной лимфомакрофагальной реакцией.

На периферии костных трабекул многочисленные гигантские многоядерные остеокласты.

Б – многочисленные кровеносные сосуды, преимущественно капиллярного типа.

По всему периметру препарата обнаружены ярко-желтые частицы микрокристаллической структуры, частично локализованные в просвете кровеносных сосудов капиллярного типа.

Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 200$

Таким образом, на 60-е сутки эксперимента в II-ой группе наблюдали сложный комплекс разнонаправленных процессов, которые включали в себя следствие воздействия двух факторов:

- а. стимулирующее ангиогенез действие МСК;
- б. образование костных структур *de novo*;
- в. появление кристаллических частиц в просвете кровеносных сосудов.

120-е сутки эксперимента. На этом сроке в II группе сохранялись явления интенсивного ангиогенеза в периимплантационной зоне. По всей ее площади по-прежнему наблюдали иммунокомпетентные клетки, фагировавшие микрокристаллические желтые частицы и мигрирующие за пределы имплантационного материала. Микрокристаллы ярко-желтого цвета и их конгломераты обнаружили в

стенках и просветах гемокапилляров. Клеточные элементы их стенок и сосудистые мембраны, находящиеся в контакте с микрокристаллами, частично подвергались лизису.

Таким образом, в результате проведенного гистологического исследования материала области имплантации, в II группе к концу четвертого месяца эксперимента, как и прежде, обнаружили признаки интенсивного ангиогенеза, сопровождающиеся повреждением сосудистой стенки микрокристаллами и развитием в ней признаков панваскулита с гиперплазией и воспалительной инфильтрацией стенки гемокапилляров.

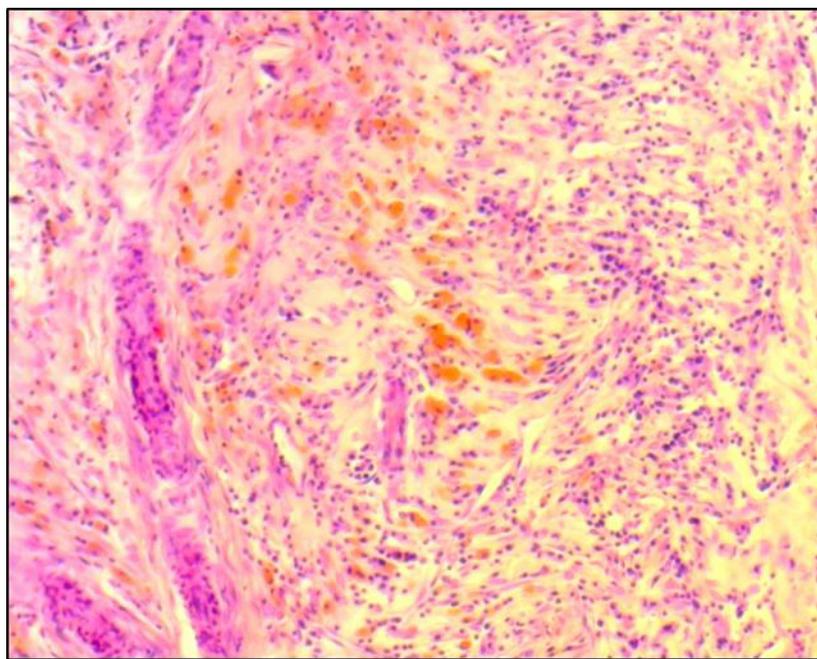


Рисунок 9 - Фрагмент кости II-ой группы на 120-е сутки эксперимента. Диффузная лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация, выраженный ангиогенез. Стенки некоторых кровеносных сосудов утолщены в результате панваскулита. Скопление большого количества макрофагов, которые содержат желтые микрокристаллы. Окраска гематоксилином и эозином, увелич. ×200

Перечисленные патоморфологические изменения в области инокуляции имплантата, состоящего из остеокондуктивного материала «БАК-1000» в комбинации с ангиостимулированными МСК, суммирована в таблице 2.

Таблица 2 – Патоморфологические изменения во II-ой группе в области инокуляции остеокондуктивного материала «БАК-1000» в комбинации с ангиостимулированными МСК

Группа	II-ая группа (опытная)		
n	24		
Сутки	30	60	120
Наблюдаемые морфологические изменения			
Клеточный состав	Рыхлая волокнистая соединительная ткань, многоядерные остеокласты.	Фиброзная соединительная ткань, коллагеновые фибриллы, плотная компактная	Плотное компактное костное вещество, наличие остеобластов

		костная ткань	
Ангиогенез	Выраженный ангиогенез	Выраженный ангиогенез, увеличение количества сосудов капиллярного типа	Выраженный ангиогенез, увеличение количества сосудов капиллярного типа
Остеогенез	Не выражен	Умеренный	Выраженный
Клеточная воспалительная инфильтрация, отек	Незначительное проявление	Отсутствует	Незначительное проявление
Кристаллы апатит силиката	Отсутствуют	Появление кристаллов	Появление кристаллов
Панваскулит	Отсутствует	Отсутствует	Выраженный

Проведенное нами гистоморфологическое исследование показало, что:

А. Стоматологический апатитсиликатный композит «БАК-1000», входивший в состав разработанной нами биоинженерной 3D-конструкции обладает высокой степенью биорезорбции. Применение ангиоиндуцированных МСК эффективно в отношении индукции остеогистогенеза, ангиогенеза и метаболизма клеток периимплантационных тканей.

Б. В результате проведенного исследования был выявлен механизм биогенного превращения одного материала в другой («феномен трансдукции»).

В нашей работе ячеисто-каналюлярная структура апатитосиликатного матрикса «БАК-1000» была частично окружена тонким слоем фиброзной соединительной ткани (капсула) и инвазирована макрофагами.

С другой стороны, использование разработанной нами методики по созданию 3D-биоинженерной конструкции с адгезированными на ней МСК может быть положено в основу разработки перспективной модели для изучения механизмов местных защитно-приспособительных реакций в ответ на чужеродные материалы в экспериментальных исследованиях *in vivo*.

Отдельно следует подчеркнуть, что МСК, индуцированные в ангиогенном направлении, способны опосредовать несколько биогенных эффектов: разрушение ячеисто-каналюлярной структуры имплантата с образованием силикатных микрокристаллов; аттракция и повышение двигательной и фагоцитарной активности макрофагов; активация образования остеобластической клеточной линии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, по результатам проведенного исследования следует, что разработанная методика имплантации биоинженерной 3D-конструкции, включающая в свой состав ангиоиндуцированные МСК и стоматологический материал «БАК-1000», позволяет эффективно замещать обширные дефекты костной ткани и стимулировать метаболизм периимплантационной ткани с интенсификацией остеогистогенеза и ангиогенеза. Что в свою очередь может послужить темой для дальнейших исследований в области подбора и апробации эффективного способа замещения обширных костных дефектов в клинической практике.

Перспективы дальнейшей разработки темы

Перспективы дальнейшего исследования темы биоинженерных конструкций дает возможность реконструировать мягкие и твердые ткани, а также возможно и внутренние органы уйдя при этом от забора собственных тканей. При выполнении реконструкций мы используем свободную пересадку или микрососудистые техники, но это сопряжено с созданием дефекта в каком-либо участке тела. Предложенная нами технология создания искусственного матрикса, заселенного МСК через 4-6 месяцев, позволяет решать проблемы регенерации мягких и твердых тканей (туннельная методика или методика шагающего лоскута, а также микрососудистые техники).

Выводы

1. Разработана техника устранения дефекта кости при помощи 3D-биоинженерной конструкции на основе индуцированных в ангиогенном направлении мезосфероидов МСК на апатитосиликатной матрице биосовместимого стоматологического композита «БАК-1000».

2. «БАК-1000» обладает высокой степенью биорезорбции, на 60,120 сутки после имплантации в 16 макропрепаратах, что составляет $\pm 67\%$ от общего количества животных контрольной группы, теряет свою ячеисто-каналюлярную структуру и замещается апатит силикатными микрокристаллами на фоне низкой степени остеогистогенеза и ангиогенеза.

3. Разработанная 3D-биоинженерная конструкция подвергается резорбции на 30 сутки с частичным сохранением ячеисто-каналюлярной структуры матрицы, в 8 макропрепаратах, что составляет $\pm 33\%$ определяются признаки воспалительной реакции сопровождающиеся умеренным остеогистогенезом, ангиогенезом.

4. После имплантации 3D-биоинженерной конструкции «БАК-1000» и ангиоиндуцированных МСК в экспериментальной группе в $\pm 67\%$ макропрепаратах образуется костная ткань de novo (от остеоидной субстанции до зрелой костной ткани с последующим ее ремоделированием) в сочетании с интенсивным ангиогенезом.

Практические рекомендации

Настоящая научная работа проведена на экспериментальных животных и относится к доклиническим исследованиям. Полученные результаты по воздействию разработанной 3D-биоинженерной конструкции на остеогистогенез и ангиогенез в модели обширного дефекта кости можно экстраполировать на человека, учитывая их тождественность в клинической практике. При условии выбора 3D-биоинженерной конструкции с включенными в ее состав ангио индуцированных МСК, данная модель может быть высокоэффективна и рекомендована в клинической практике при лечении дефекта костной ткани критического размера.

Публикации в изданиях, рекомендованных Перечнями ВАК.

1. Морфофункциональные особенности остеорегенерации через два месяца после имплантации "БАК-1000" в комбинации с ангиостимулированными мезенхимальными стволовыми клетками / Г. А. Демяшкин, С. Ю. Иванов, Г. К. Нуруев, **А. Ф. Фидаров**, В. В. Чуев, А. А. Чуева, М. А. Вадюхин, Ф. Н. Бондаренко // **Стоматология для всех**. – 2022. – № 4(101). – С. 34-38. – DOI 10.35556/idr-2022-4(101)34-38.

2. Морфофункциональные особенности остеорегенерации через четыре месяца после имплантации "БАК-1000" в комбинации с ангиостимулированными МСК / Г. А. Демяшкин, С. Ю. Иванов, А. А. Орлов, И. Н. Сабурин, Г. К. Нуруев, **А. Ф. Фидаров**, М. А. Вадюхин, Ф. Н. Бондаренко // **Проблемы стоматологии**. – 2022. – Т. 18, № 3. – С. 114-118. – DOI 10.18481/2077-7566-2022-18-3-114-118.

3. Современные материалы применяемые при репаративной регенерации костной ткани челюстно-лицевой области / Демяшкин Г. А., **Фидаров А. Ф.**, Иванов С. Ю., Орлов А. А. // **Проблемы стоматологии**. – 2024. – Т. 20, № 3. – С. 5-13. - DOI 10.18481/2077-7566-2024-3-5-13.

4. Особенности репаративной регенерации костной ткани в зоне имплантации «БАК-1000» в комбинации с ангиостимулированными МСК / Демяшкин Г. А., **Фидаров А. Ф.**, Иванов С. Ю., Орлов А. А. // **Проблемы стоматологии**. – 2024. – Т. 20, № 3. – С. 98-102. – DOI 10.18481/2077-7566-2024-20-3-98-102.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

БАК-1000 – апатитосиликатный композит;

МСК – мезенхимальные стволовые клетки;

СКЖТ – стромальные клетки жировой ткани;

VEGF – васкулярно-эндотелиальный фактор роста;

CD – кластер дифференцировки;

Flk-1, von Willebrand – специфические маркеры эндотелиальных клеток.

Фидаров Асланбек Феликсович**Экспериментальное обоснование применения остеопластического стоматологического материала «БАК-1000» в сочетании с аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками (экспериментальное исследование)**

Диссертационная работа Фидарова Асланбека Феликсовича «Экспериментальное обоснование применения остеопластического стоматологического материала «БАК-1000» в сочетании с аутологичными мезенхимальными стволовыми клетками (экспериментальное исследование)» является экспериментальной работой и посвящена разработке нового высоко технологичного метода устранения дефектов костной ткани челюстно-лицевой области. В данной работе представлено получение 3D биоинженерной конструкции, состоящей из ангиоиндуцированных мезосфероидов МСК и апатит-силикатной матрице стоматологического материала БАК – 1000. В ходе экспериментального исследования использовали животных – самцов крыс породы Спрег-Доули в количестве 48, разделив их на две группы основную и экспериментальную.

Полученные результаты по воздействию разработанной 3D-биоинженерной конструкции на остеогистогенез и ангиогенез в дефектах костной ткани можно экстраполировать на человека, учитывая их тождественность в клинической практике.

Aslanbek Felixovich Fidarov**"Experimental Validation of the Use of the Osteoplastic Dental Material BAK-1000 in Combination with Autologous Mesenchymal Stem Cells"**

Aslanbek Felixovich Fidarov's dissertation, "Experimental Validation of the Use of the Osteoplastic Dental Material BAK-1000 in Combination with Autologous Mesenchymal Stem Cells," is an experimental work devoted to the development of a new, high-tech method for eliminating bone defects in the maxillofacial region. This work presents the production of a 3D bioengineered construct consisting of angio-induced mesospherooids of MSCs and an apatite-silicate matrix of the dental material BAK-1000. Forty-eight male Sprague-Dawley rats were used in the experimental study, divided into two groups: the main group and the experimental group. The obtained results on the impact of the developed 3D bioengineered structure on osteogenesis and angiogenesis in bone tissue defects can be extrapolated to humans, given their identity in clinical practice.