

Асфаров Теймур Фаик оглы

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

3.1.7. Стоматология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

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»

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, профессор,
член корреспондент РАН

Иванов Сергей Юрьевич

Научный консультант:

доктор медицинских наук, доцент

Волков Алексей Вадимович

Официальные оппоненты:

Панин Андрей Михайлович, доктор медицинских наук, профессор, ФГАОУ ВО Российский университет медицины Минздрава России, заведующий кафедрой пропедевтики хирургической стоматологии

Долгалев Александр Александрович, доктор медицинских наук, доцент, ФГБОУ ВО СтГМУ Минздрава России, профессор кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится 30 октября 2024 г. в 10:00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.028 при Федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы» по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (научная библиотека) по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6 и на сайте организации ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов им. Патриса Лумумбы» <https://www.rudn.ru/science/dissovet/dissertacionnye-sovety/pds-0300028>

Автореферат разослан « » _____ 2024 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета ПДС 0300.028
кандидат медицинских наук,
доцент

Макеева Мария Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

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 (С. В. Ильин и соавт., 2022; M. Kang et al., 2020; H. Xiao et al., 2020).

Тем не менее разработка новых биомедицинских методик для реституции костной ткани является актуальной проблемой хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, в травматологии и нейрохирургии. Каждый год около 12% населения России получают травмы, из них 80% - люди молодого и трудоспособного возраста (С. Ю. Иванов и соавт., 2020; А.А. Мураев и соавт., 2016; А. П. Бонарцев и соавт., 2018). Кроме того, в последнее время наблюдается рост числа больных заболеваниями, сопровождающимися обширными разрушениями костной ткани (опухоли, туберкулез 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.

Степень разработанности темы исследования

Согласно статистическим данным средняя распространенность адентии среди населения колеблется от 11% до 37% (R Borg-Bartolo et al., 2022). Так, принимая в расчет нижний край вариативного диапазона каждый десятый человек является пациентом хирургического профиля, который нуждается в лечении с применением костезамещающих материалов. Чаще всего стоматологические пациенты обращаются в клинику на этапе значительной атрофии костной ткани, что усложняет восстановление утраченных объемов.

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 (E. Prajatelista et al., 2021). При использовании костезамещающих материалов для замещения дефектов кости успех регенерации зависит от множества факторов: качества и свойств используемых материалов, хирургической техники, генетически обусловленных регенераторных способностей организма, инфекционных агентов и др.

В силу этого актуален поиск различных методов и средств для замещения значительных дефектов костной ткани в полости рта в наименьшие сроки, с минимальным риском отторжения костного регенерата.

Цель исследования

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

Задачи исследования

1. Разработать технологии получения комбинированных костных матриксов на основе поли-3-оксибутирата, его композитов с аморфным гидроксиапатитом 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 матриксов на модели костного дефекта *in vivo*.

Научная новизна исследования

1. Впервые разработана методика насыщения нового биокomпозиционного 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 замещения костных дефектов челюстей, усовершенствовать методы лечения пациентов с потерей зубов и улучшить качество их жизни.

Методология и методы исследования

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 флуоресцентной микроскопии; программные полуавтоматизированные методы гистоморфометрии.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Новые синтетические биокпозиционные 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 биокпозиционные 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 биокпозиционного материала на основе поли-3-оксибутирата с добавлением СИМ выражается в образовании на 34,9% большего относительного костного объёма 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 результатов исследования

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

Основные положения диссертационной работы были доложены на Международной научно-практической конференции (2020 г.) «Современные аспекты комплексной стоматологической реабилитации пациентов с дефектами челюстно-лицевой области» в докладе «Разработка остеопластических материалов на основе гибридной конструкции из поли-3-гидрооксибутирата 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 имени Патриса Лумумбы» Министерства образования и науки Российской Федерации.

Внедрение результатов исследования в практику

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

Публикации

По теме диссертации опубликованы 7 научных работ, в том числе 2 - в изданиях, рекомендуемых ВАК Минобрнауки Российской Федерации, 4 - индексируемые в международной базе данных SCOPUS.

Личный вклад автора в исследовании

Автором лично проведен набор и анализ данных литературы по изучаемой тематике, написан обзор литературы. Автор разработал структуру и план исследований. Непосредственно участвовал в лабораторной части работы, анализировал полученные результаты. Автор лично проводил экспериментальную часть исследования и оперировал животных, которым имплантировали изучаемые материалы. Полученные материалы направлял на рентгенологическое исследование: конусно-лучевую компьютерную томографию, далее сам описывал и интерпретировал полученные данные. Участвовал в описании гистологических материалов, провёл их анализ. Проводил статистический анализ полученных результатов.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 110 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.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

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

Объектом исследования явились мембраны и матрицы из поли-3-оксибутирата (ПОБ), полученные микробиологическим путем, и различные их комбинации с альгинатом натрия (АГ), симвастатином (СИМ) и аморфным гидроксиапатитом (ГА).

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

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

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

Пористость полимерных матриц рассчитывали исходя из уравнений плотности и пористости:

$D = m/h \times l \times w$, (1), где D — плотность ($г/см^3$), m — масса матрикса (г), h — высота или толщина (см), l — длина (см), w — ширина (см).

$P=(1-D/d)\times 100\%$, (2), где P — пористость (%), D — плотность, рассчитанная из уравнения (1), d — теоретическая плотность матрикса при расчёте отсутствия пор (г/см^3).

Плотность ПОб составляет 1.243 г/см^3 . Массу измеряли на лабораторных весах AL-64 (Acculab). Для определения связности пор использовали тест на пропитку тушью.

***In vitro* исследования**

Изучение механических свойств: эксперименты по изучению механических свойств проводили на сухих образцах с использованием реометра Anton Paar MCR 302. Модуль Юнга измеряли с помощью сжатия образцов.

Высвобождение лекарственного вещества: матриксы с 5% включением по массе СИМ (3 матрикса на каждую точку) помещали в 10 мл водного раствора фосфатного буфера и инкубировали в термостате при 37°C в течение 14 суток для анализа пролонгированного высвобождения СИМ из пористых ПОб-матриков. Количество высвободившегося СИМ определяли спектрофотометрически при $\lambda=238 \text{ нм}$ (NanoDrop, Thermo Fisher Scientific). Расчёт финальной стадии высвобождения проверяли по математической модели Фика первого порядка.

Оценка роста клеток: оценивали цитотоксичность и рост ММСК на плёнках и матриксах. ММСК, полученные по описанной ранее методике, 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.

Оценка активности щелочной фосфатазы: перед проведением экспериментов клетки фенотипировали с помощью антител к поверхностным маркерам CD45 и CD90 методом проточной цитометрии. Культуральную среду для остеодифференцировки ММСК готовили на основе DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium, ПАНЭКО, Россия) с 10% ЭТС (Biological Industries), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, 10 мМ дексаметазона (KRKA), 10 мМ β -глицерофосфата (Merck) и 50 мМ аскорбиновой кислоты (Merck). Для определения щелочной фосфатазы использовали образцы полимерных матриков диаметром 1,5 см. Изначально ММСК засевали 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 (250 мМ NaCl, 0,1% Тритон X-100, 50 мМ Нерес pH 7,5) и подвергали трём циклам замораживания-оттаивания. Затем образцы центрифугировали 10 мин при 10 000 об/мин и измеряли показатели 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 2 ч и измеряли оптическую плотность при 405 нм.

***In vivo* исследования.** На данном этапе проводили имплантацию разработанных композиций остеопластического материала на основе полиоксибутирата в критические костные дефекты на своде черепа крыс и изучали особенности их репаративной регенерации. Исследование проводили на 70 самцах крыс линии Wistar массой тела 400 г. Все эксперименты соответствовали рекомендациям 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 «Правилами 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., «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г. и ГОСТ ISO 10993-2-2011. 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.

Срок наблюдения составил 2 и 4 недели. Далее образцы направляли на рентгенологическое и гистоморфометрическое исследование.

Рентгенологическое исследование регенерации костных дефектов проводили на конусно-лучевом компьютерном томографе Planmeca ProMax 3D (Финляндия). Визуализировали костный дефект и измеряли его размеры в сагиттальной и трансверсальной плоскостях, площадь дефекта определяли в аксиальной плоскости.

Гистологические и гистоморфометрические исследования были проведены на базе кафедры патологической анатомии РУДН (зав. каф. д.м.н., профессор Бабиченко И.И.). При морфометрическом исследовании определяли доленое соотношение тканей в составе костного регенерата. Определяли относительный объём костной ткани - BV/TV в %, относительный объём соединительной ткани FbV/TV в %. Относительную долю остеопластического материала не определяли в виду трудности цифровой обработки срезов,

полученных методом костных шлифов и внеочаговым расположением костнопластического материала.

Таблица 1 - Распределение групп исследуемых животных в зависимости от вида костного матрикса и его состава

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

Использование флуоресцентных меток для изучения скорости регенерации костных дефектов: с целью оценки динамики образования костной ткани при стимуляции репаративного остеогенеза проводили прижизненное мечение флуоресцентными метками костной ткани. Всем крысам 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 вводили ализариновый красный С.

Методы статистической обработки 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 $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Морфология пленок и матриксов на основе поли-3-оксибутирата с включенным симвастатином. В результате проведенного исследования были получены плёнки из чистого полимера ПОб и с включением 1% и 5% СИМ, которые применяли для выявления эффективной концентрации. По данным сканирующей электронной микроскопии поверхность плёнки была гладкой и без шероховатостей (рис.1). Оптимальный рост клеток (максимальная оптическая плотность клеток) происходил на плёнках с концентрацией СИМ 5%, ввиду чего данную концентрацию СИМ использовали для дальнейших экспериментов.

Далее были получены трёхмерные пористые матриксы, состоящие из ПОб и ПОб с включением ГА (10% по массе) и СИМ 5%. Полученные матриксы получили жёсткую структуру, нерегулярную трёхмерную пористую структуру, обладали связанной системой пор (рис. 2). 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).

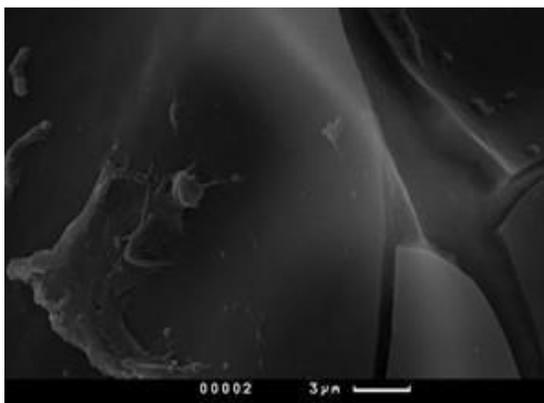


Рисунок 1 - Сканирующая электронная микроскопия плёнки ПОб с симвастатином ×2500

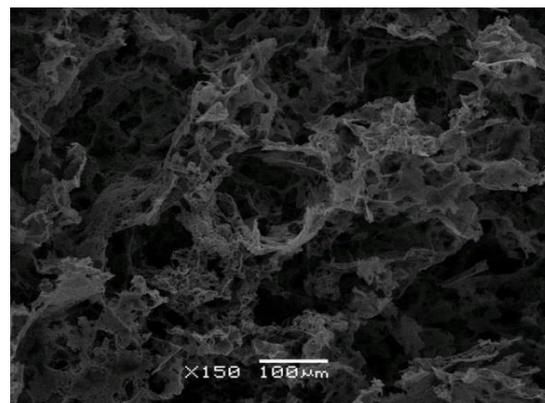


Рисунок 2 - Сканирующая электронная микроскопия пористого матрикса из ПОб с симвастатином ×150

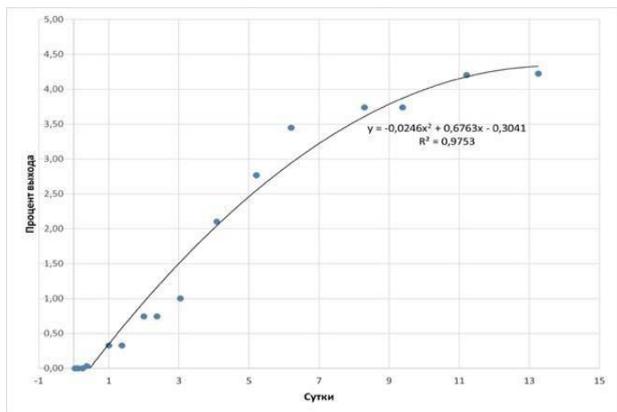
Таблица 2 – Пористость, размер пор и модуль Юнга полученных матриксов.

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*

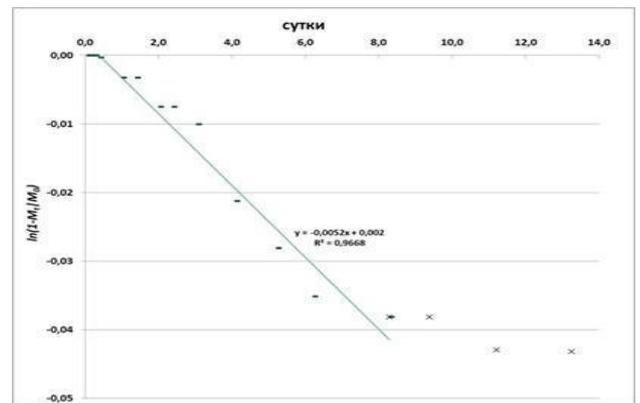
Примечание: * $p < 0.05$ (по сравнению с группой ПОб), # $p < 0.05$ (по сравнению с группой ПОб/ГА).

Высвобождение симвастатина из матриц на основе поли-3-оксибутирата с включенным симвастатином.

Выявлена высокая интенсивность высвобождения вещества в начальной фазе, начиная с 3-х суток, сменяющаяся выходом "на плато" при продолжительной инкубации (рис. 3а). Как видно по кинетической кривой (рис. 3б), "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. Таким образом, количество и доля активно высвобождающегося лекарственного вещества имеет тенденцию к уменьшению в зависимости от времени (рис. 3б).



а)



б)

Рисунок 3 - Высвобождение симвастатина из пористых матрицв ПОВ с включением симвастатина 5% по массе (а). Аппроксимация кинетики высвобождения симвастатина из пористых матрицв по модели первого порядка (б)

Исследование на цитотоксичность плёнок и матрицв.

Для оценки цитотоксичности 5% СИМ, который поддерживает дифференцировку ММСК, в состав матрицв также был добавлен ГА, который является неотъемлемым компонентом костной ткани. Цитотоксичность с АГ не определялась в связи с отсутствием эффекта цитотоксичности (А.А. Dudun et al., 2022). Однако в исследованиях *in vivo* АГ добавляли в состав материала, так как он сам по себе может влиять на костную регенерацию (А. V. Volkov et al., 2020). Для оценки цитотоксичности полимерных пористых матрицв ММСК культивировали в течение 1 недели. При добавлении ГА и СИМ в состав матрицв происходило не достигшее уровня значимости ингибирование роста, однако наблюдалась дальнейшая пролиферация клеток (рис. 4а). Это можно объяснить начинающейся дифференцировкой ММСК под действием СИМ и ГА, выделяющихся в среду, что замедляет рост клеток.

Матрикс из ПОБ способен к поддержанию роста и пролиферации клеток (рис. 4б), однако при добавлении в состав матрикса ГА и СИМ увеличения роста клеток не происходило, как при росте на пленках (рис. 4а), 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. Тогда как хоть и небольшое, но увеличение роста на матриксах ПОБ происходило. При этом, матриксы, загруженные СИМ, поддерживали в целом рост клеток гораздо лучше (и статистически достоверно), по сравнению с матриксами ПОБ и ПОБ/ГА.

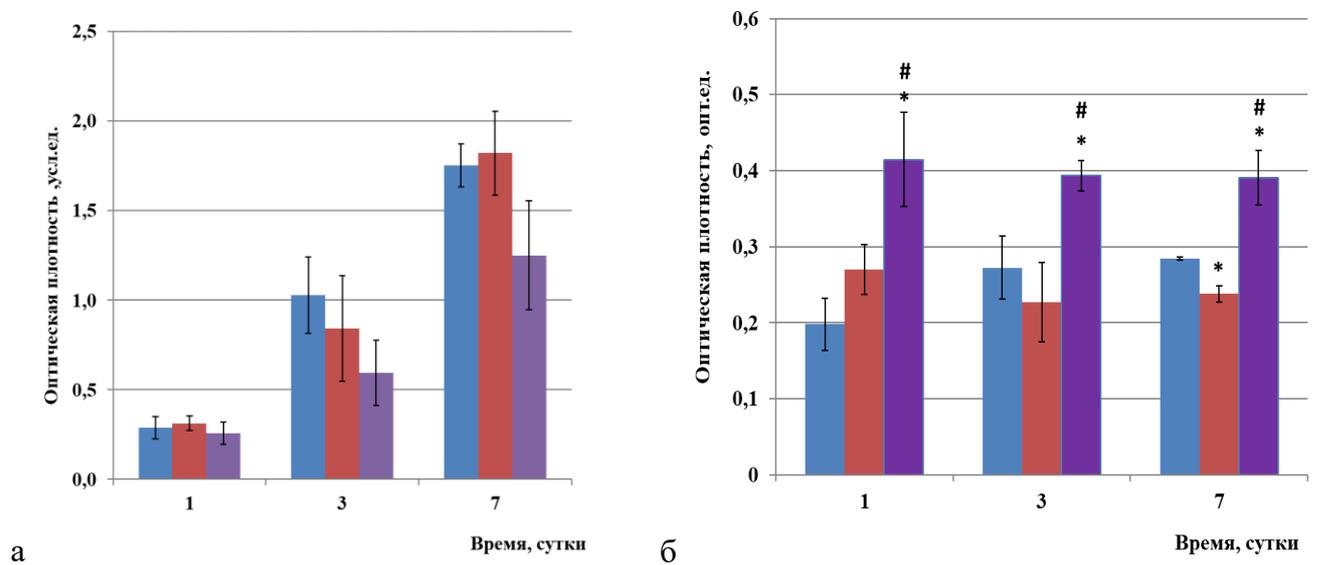


Рисунок 4 - Рост клеток на культуральном пластике в присутствии матриксов (а) и непосредственно на матриксах (б) из ПОБ, ПОБ/ГА и ПОБ/ГА/СИМ, в стандартной среде.

Нормальность распределения доказана тестом Шапиро-Уилка. Полученные данные анализировали с помощью теста Тьюки для множественного сравнения, достоверно

значимые различия указаны * $p < 0.05$

■ - ПОБ, ■ - ПОБ/ГА, ■ - ПОБ/ГА/СИМ

Активность щелочной фосфатазы при росте клеток на матриксах.

ММСК перед экспериментами были проверены на остеомаркеры CD45 и CD90 и по профилю соответствовали недифференцированным ММСК. На 14-е сутки эксперимента инкубация в остеогенной среде 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 меньшее повышение активности фермента. Тип подложки также

оказывал сильное 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.5).

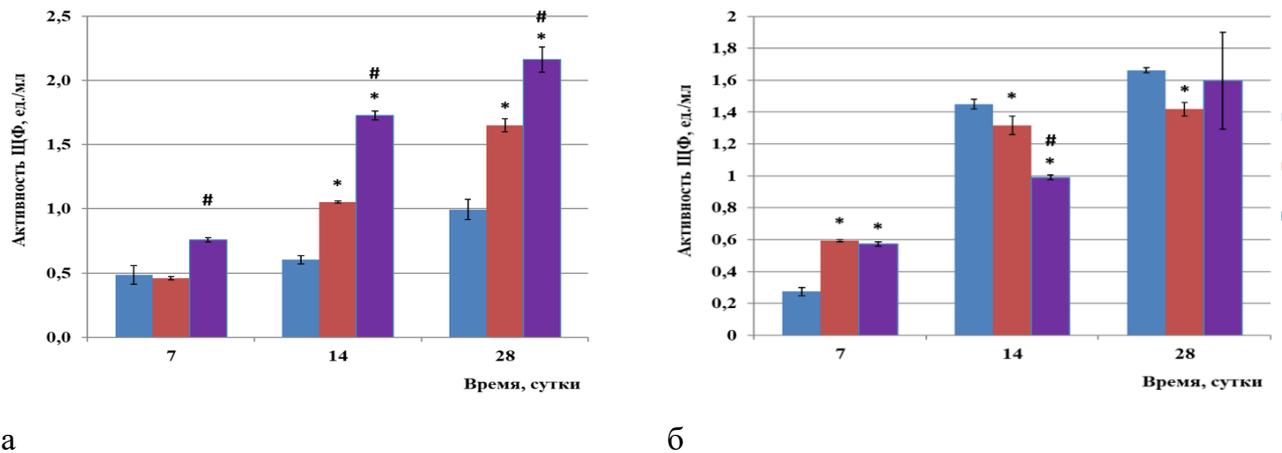


Рисунок 5 - Активность щелочной фосфатазы в клетках при росте на матриксах из ПОБ, ПОБ/ГА и ПОБ/ГА/СИМ в стандартной (а) и остеогенной (б) среде. Нормальность распределения доказана тестом Шапиро-Уилка. Полученные данные анализировали с помощью теста Тьюки для множественного сравнения, достоверно значимые различия указаны * $p < 0,05$, # $p < 0,05$.

■ - ПОБ, ■ - ПОБ/ГА, ■ - ПОБ/ГА/СИМ

Повышение экспрессии маркера фенотипа ММСК CD45 в клетках, растущих на матриксах ПОБ/ГА и ПОБ/ГА/СИМ, свидетельствует о спонтанном процессе дифференцировки, который происходит уже через 2 недели культивирования. Нормальность распределения доказана тестом Шапиро Уилка. Полученные данные анализировали с помощью теста Тьюки для множественного сравнения, достоверно значимые различия указаны * $p < 0,05$, # $p < 0,05$ (Рис.6).

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

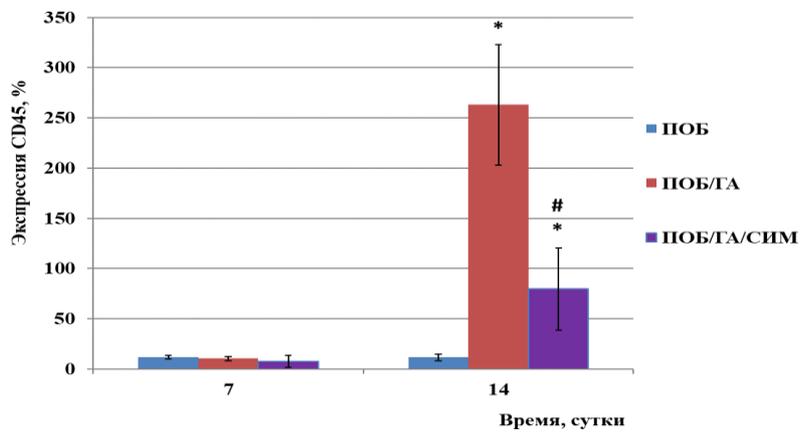


Рисунок 6 - Уровень экспрессии CD45 в ММСК при росте на матриксах из ПОБ, из ПОБ, ПОБ/ТА и ПОБ/ТА/СИМ в стандартной среде.

Результаты световой микроскопии недеминерализованных костных шлифов

Во всех исследуемых группах проводилось гистологическое исследование костных шлифов теменных костей крыс с определением относительного объема новообразованной костной ткани (BV/TV) и относительным объемом соединительной ткани (Fb/TV) в костном регенерате дефекта через 28 дней после операции.

В 1 группе (ПОБ) заполнение дефекта костной ткани было выявлено не более чем на 1/3 площади дефекта. Относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости - в среднем 32,2% (медиана), а соединительная ткань - 67,8% (медиана).

Во 2 группе (ПОБ+АГ) новообразованная костная ткань не заполняет полностью критический дефект. Относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости - в среднем 27% (медиана), а соединительная ткань - 73% (медиана).

В 3 группе (ПОБ+АГ+ГА) изучение серийных срезов не выявило полного перекрытия дефекта новообразованной костной тканью. Относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости - в среднем 34,2% (медиана), а соединительная ткань - 65,8 % (медиана).

В 4 (ПОБ+ГА) группе костный дефект не был перекрыт полностью, свободные области практически обнаруживались преимущественно в центральной части костной раны. Относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости - 40,3% (медиана), а соединительная ткань - 59,7% (медиана).

В 5 (ПОБ+АГ+СИМ) группе костный дефект не был перекрыт полностью. Свободные области составляли порядка 1/3 (рис.7). Островки костной ткани сливались между собой. Относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости - в среднем 52,9% (медиана), а соединительная ткань - 47,1% (медиана).

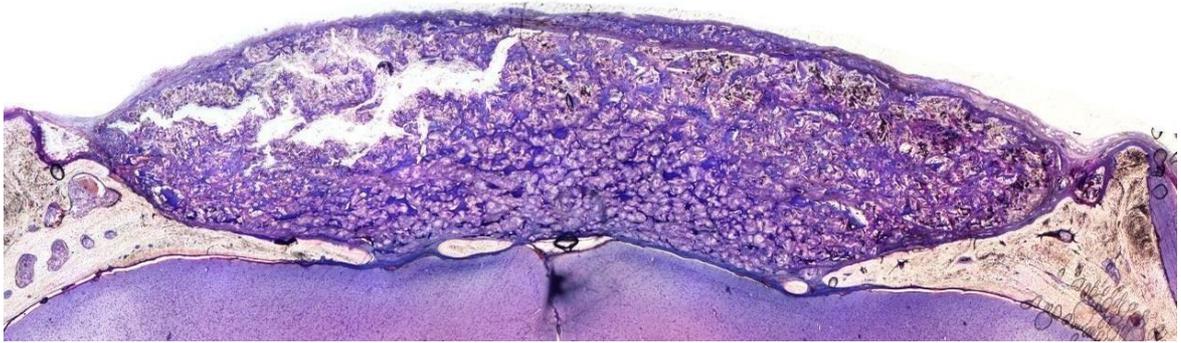


Рисунок 7 - Гистопантомограмма теменной кости крыс с критическим костным дефектом спустя 28 дней после операции. Новообразованная костная ткань заполняет полностью критический дефект. Окраска небесный трихром. X10

В 6 (ПОБ+АГ+ГА+СИМ) группе изучение серийных срезов выявило полное перекрытие дефекта новообразованной костной тканью. Относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости составил в среднем 75,2% (медиана), а соединительная ткань - 24,8% (медиана) (рис.8).

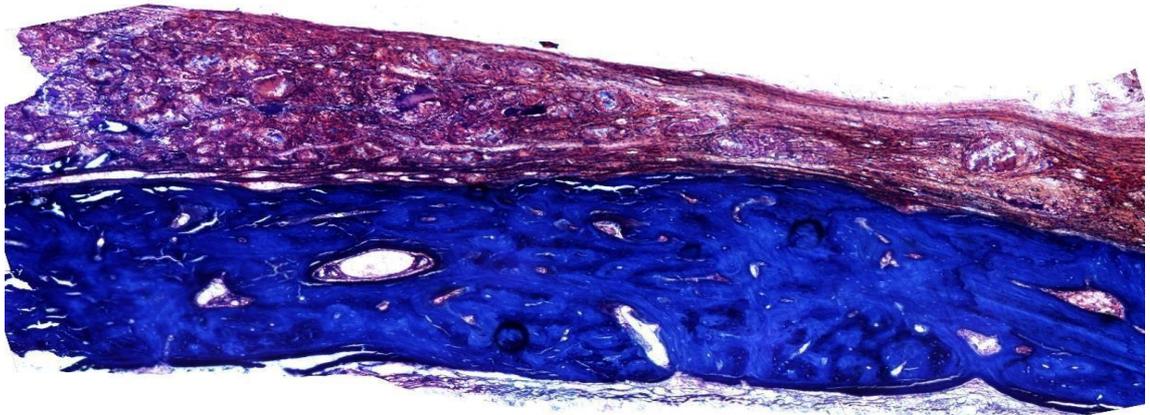


Рисунок 8 - Гистопантомограмма теменной кости крыс с критическим костным дефектом спустя 28 дней после операции. Новообразованная костная ткань заполняет полностью критический дефект. Окраска небесный трихром. X10

В 7 группе (контрольной) костная ткань распространялась по твердой мозговой оболочке, не перекрывая полностью дефект и не созревая до разделения на верхнюю и нижнюю пластинки. Относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости - в среднем 23,7% (медиана), а соединительная ткань - 76,3% (медиана).

Таким образом, сравнительный анализ исследуемых групп показал, что введение в композицию СИМ значительно ускоряло регенерацию, что выразилось в достоверном

увеличении объема костной ткани по сравнению как с ПОБ, так и в сочетании с ГА. Обнаружено, что при использовании сложных композитов из ПОБ+ГА+АГ и ПОБ+СИМ+ГА+АГ выявили достоверное ($p=0,006$) увеличение относительного объема костной ткани (BV/TV) в группе ПОБ+СИМ+ГА+АГ до максимальных значений среди исследуемых групп ($BV/TV = 75,2\%$). Кроме того, только в этой группе произошло полное перекрытие критического дефекта теменной кости. 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 АГ. При сравнении групп с ПОБ и ПОБ+ГА выявлено достоверное ($p=0,009$) стимулирующее действие на репаративный остеогенез ГА.

Определение относительного объема плотноволокнистой неоформленной соединительной ткани (FbV/TV) в составе костных регенератов в присутствии различных остеопластических материалов и их комбинаций выявило, что увеличение доли соединительной ткани в составе регенерата зачастую коррелирует с относительным объемом костной ткани (BV/TV) - 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.

Результаты флуоресцентной микроскопии

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

Полученные результаты показали, что при морфометрическом исследовании группы ПОБ+ГА+АГ+СИМ наблюдается накопление ализаринового красного С, которое составляет порядка 1/2 объема костного регенерата. Данное обстоятельство свидетельствует о том, что стимулированный как повреждением, так и индуцированный остеопластическим материалом репаративный остеогенез равномерен с выраженной активностью как в ранние сроки после нанесения повреждения, так и в последующем. При этом 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 (рис.9).

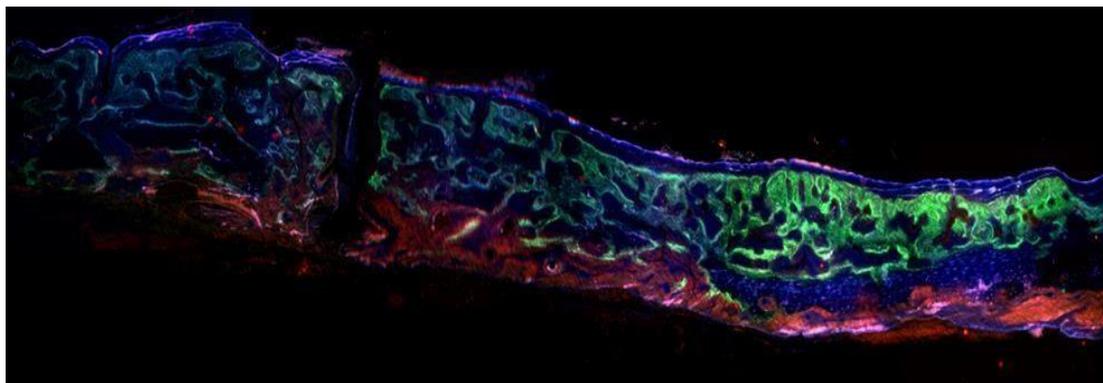


Рисунок 9 - Гистопантомограмма шлифа теменной кости крысы (флуоресцентная микроскопия) VI группы (объяснение в тексте)

При рентгенологическом исследовании костных дефектов в 1 группе площадь оставшегося костного дефекта составила 37,81 мм² (минимальная площадь 29,974 мм², максимальная 47,54 мм²; стандартное отклонение составило ±5,01 мм²); во 2 группе - 35,72 мм² (минимальная площадь 29,67 мм², максимальная 42,01 мм²; стандартное отклонение составило ±3,52 мм²); в 3 группе - 32,92 мм² (минимальная площадь 27,53 мм², максимальная 39,97 мм²; стандартное отклонение составило ±3,88 мм²); в 4 группе - 22,55 мм² (минимальная площадь 18,75 мм² максимальная 26,38 мм²; стандартное отклонение составило ±2,05 мм²); в 5 группе - 14,62 мм² (минимальная площадь 12,68 мм², максимальная 17,7 мм²; стандартное отклонение составило ±1,49 мм²); в 6 группе - 8,63 мм² (минимальная площадь 7,62 мм², максимальная 9,71 мм²; стандартное отклонение составило ±0,59 мм²); в 7 контрольной группе - 43,2 мм² (минимальная площадь 31,6 мм², максимальная 48,95 мм²; стандартное отклонение составило ±4,49 мм²). Таким образом, полученные данные свидетельствуют о наименьшей площади оставшегося костного дефекта в группе ПОБ+ГА+АГ+СИМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Перспективы дальнейшей разработки темы

Дальнейшие научные исследования, связанные с разработанным нами материалом могут быть посвящены решению следующих вопросов: *In vitro* оценка взаимодействия матриц на основе ПОБ и СИМ к костными клетками и другими клетками: остеобластами, остеокластами, макрофагами, а также *in vivo* изучение иммунного ответа к материалу. Кроме того, определение возможности изготовления костных матриц из ПОБ методом 3D

прототипирования и исследование регенерации критических костных дефектов челюстей у крупных животных при имплантации в эти дефекты них разработанного матрикса на основе ПОБ, содержащего СИМ. Так как регенерация костной ткани крупных животных, таких как свиньи и овцы приближена к таковой у человека, такие исследования необходимы для дальнейшей разработки протоколов клинических исследований. Интерес представляют *in vitro* и *in vivo* исследования, направленные на оценку способности матрикса ПОБ с СИМ к стимуляции ангиогенеза в области дефектов костной ткани. Эти исследования позволят не только углубить понимание биологических процессов, связанных с исследованным материалом, но и помогут в будущем усовершенствовать его состав и повысить его клиническую полезность.

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. Флуоресцентная 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 (матрикс, 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ АВТОРОМ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Публикации в изданиях, включенных в международные базы цитирования Scopus

1. Развитие методов акустической микроскопии для наблюдения процессов остеогенеза в регенеративной медицине / Ю. С. Петронюк, Е. А. Храмцова, В. М. Левин, Т.Ф. **Асфаров** (и др.) // Известия Российской академии наук. Серия физическая. – 2020. – Т. 84, № 6. – С. 799-802. – DOI 10.31857/S0367676520060204.

2. Poly(3-hydroxybutyrate)/hydroxyapatite/alginate scaffolds sealed with mesenchymal stem cells enhance the regeneration of critical-sized bone defect / I. I. Zharkova, V. V. Voinova, E. A. Akoulina, **T.F. Asfarov** (et al.) // Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.. – 2020. – Vol. 114. – P. 110991. – DOI 10.1016/j.msec.2020.110991.

3. Developing Techniques of Acoustic Microscopy for Monitoring Processes of Osteogenesis in Regenerative Medicine / Y. S. Petronyuk, E. A. Khramtsova, V. M. Levin, **T.F. Asfarov** (et al.) // Bulletin of the Russian Academy of Sciences: Physics. – 2020. – Vol. 84, No. 6. – P. 653-656. – DOI 10.3103/S1062873820060179.

4. Growth of Mesenchymal Stem Cells on Poly(3-Hydroxybutyrate) Scaffolds Loaded with Simvastatin / E. A. Akoulina, I. V. Demianova, I. I. Zharkova, **T.F. Asfarov** (et al.) // Bull Exp Biol Med. – 2021. – Vol. 171, No. 1. – P. 172-177. – DOI 10.1007/s10517-021-05190-8.

Публикации в изданиях, рекомендованных Перечнями РУДН/ВАК

5. Противовоспалительное и остеиндуктивное действие симвастатина, возможности его использования для лечения заболеваний пародонта / С. Г. Ивашкевич, **Т. Ф. Асфаров**, А. П. Бонарцев (и др.) // Клиническая стоматология. – 2021. – № 1(97). – С. 66-74. – DOI: 10.37988/1811-153X_2021_1_66. 2020.
6. Рост мезенхимных стволовых клеток на матриксах на основе поли-3-оксибутирата, загруженных симвастатином / Е. А. Акулина, И. В. Демьянова, И. И. Жаркова, **Т. Ф. Асфаров** (и др.) // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2021. – № 1. – С. 70-76. – DOI 10.47056/1814-3490-2021-1-70-76.

Публикации в других изданиях

7. Разработка остеопластических материалов на основе гибридной конструкции из поли-3-гидрооксибутирата и симвастатина для индукции репаративного остеогенеза / **Т. Ф. Асфаров**, А. В. Волков, А. П. Бонарцев // Современные аспекты комплексной стоматологической реабилитации пациентов с дефектами челюстно-лицевой области: сборник научных трудов Международной научно-практической конференции, Краснодар, 21–22 мая 2020 года. – Краснодар: Кубанский государственный медицинский университет, 2020. – С. 14-15.

Список сокращений

АГ – альгинат натрия

ГА – аморфный гидроксиапатит

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

ПОБ – поли-3-оксибутират

СИМ – симвастатин

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

Асфаров Т.Ф.

Разработка остеопластического биоматериала с остеиндуктивными свойствами для замещения костных дефектов челюстей (Экспериментальное исследование)

Проблема восстановления костной ткани челюстей в реконструктивной стоматологии приобретает все большую актуальность. 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. Тем не менее разработка новых биомедицинских методик для реституции костной ткани является актуальной проблемой в травматологии, нейрохирургии, челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии. Каждый год около 12% населения При использовании костезамещающих материалов для замещения дефектов кости успех регенерации зависит от множества факторов: качества и свойств остеопластических или костезамещающих материалов, хирургической техники, генетически обусловленными регенераторными способностями 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, для уменьшения влияния этого фактора требуется максимально оптимизировать остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства самого костезамещающего материала.

Asfarov T.F.

Development of osteoplastic biomaterial with osteoinductive properties for replacing bone defects of the jaws (Experimental study)

The problem of restoration of jaw bone tissue in reconstructive dentistry is becoming increasingly urgent. At the present stage of the development of reconstructive surgery of the oral cavity, considerable experience has been accumulated in the use of various osteoplastic materials that allow performing operations in order to adequately restore the lost bone structures and the full functioning of the jaw bones, including with long defects. Nevertheless, the development of new biomedical techniques for bone restitution is an urgent problem in traumatology, neurosurgery, maxillofacial surgery and surgical dentistry. Each year, about 12% of the population When using bone-substituting materials to replace bone defects, the success of regeneration depends on many factors: the quality and properties of osteoplastic or bone-substituting materials, surgical techniques, genetically determined regenerative abilities of the body, infectious agents, etc. Since it is not possible to evaluate the individual regenerative potential in each specific patient and influence it today, in order to reduce the influence of this factor, it is necessary to maximize the optimization of the osteoconductive and osteoinductive properties of the bone-substituting material itself.