

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2019

Копецкий И.С.¹, Логинов В.В.¹, Рыжова С.Д.¹, Виргильев П.С.¹, Лохонина А.В.², Костырев С.В.³ОЦЕНКА РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ПРИМЕНЕНИИ КОМБИНАЦИИ
АУТОЛОГИЧНОГО ФИБРИНОВОГО МАТРИКСА С ПРЕДИФФЕРЕНЦИРОВАННЫМИ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ НА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ МОДЕЛИ¹ФГБОУ ВО «РНИМУ имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 117997 г. Москва;²ФГБУ «НМИЦ АГП им. В.И. Кулакова», 117997, г. Москва;³НИИ урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина, 105425, г. Москва

♦ **Актуальность исследования.** По данным отечественных и зарубежных авторов, частота повреждения нижней челюсти составляет 36–84% от всех повреждений костей лицевого скелета. А.Я. Фриденштейн, внесший ключевой вклад в исследования мезенхимальных стволовых клеток (МСК), их анализ, виды, методики выделения и применения в различных комбинациях с материалами, позволил расширить границы регенеративной медицины. **Цель исследования** — оценка регенераторного потенциала кортикальной костной ткани в области угла нижней челюсти, при внесении экзогенных предифференцированных МСК (пМСК) на аутологичном фибриновом матриксе в эксперименте. **Материал и методы.** Нами было проведено экспериментальное исследование на 27 кроликах породы Советская шиншилла. Животные были разделены на 3 группы: А, Б и контрольная. Всем животным трепаном был сформирован дефект костной ткани, в области угла нижней челюсти, диаметром 6мм. Группам А и Б в сформированный дефект нижней челюсти вводили аутологичный фибриновый сгусток с предифференцированными жМСК в количестве 300 тыс. и 1 млн клеток соответственно. Размер дефекта оценивали через 8, 10 и 12 недель. **Результаты.** На 12 неделе после оперативного вмешательства, в экспериментальной группе Б размер дефекта костной ткани, значительно сократился и составил $0,006022 \pm 0,00135 \text{ мм}^3$, в то время как в контрольной группе объем дефекта $0,05597 \pm 0,00505 \text{ мм}^3$, а в группе А составил $0,02235 \pm 0,0056 \text{ мм}^3$. В экспериментальном исследовании было получено улучшение патофизиологических процессов регенерации костной ткани, в условиях бикортикального дефекта, с минимальным присутствием губчатого вещества в зоне повреждения.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки; повреждения; нижняя челюсть; регенерация; кролики.

Для цитирования: Копецкий И.С., Логинов В.В., Рыжова С.Д., Виргильев П.С., Лохонина А.В., Костырев С.В. Оценка регенерации костной ткани при применении комбинации аутологичного фибринового матрикса с предифференцированными мезенхимальными стволовыми клетками на экспериментальной модели. *Российский медицинский журнал*. 2019; 25(3): 172-175. DOI <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2106-2019-25-2-172-175>

Для корреспонденции: Копецкий Игорь Сергеевич, доктор мед. наук, зав. кафедрой терапевтической стоматологии ФГБОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова», 117997, г. Москва, E-mail: kopetski@rambler.ru

Kopetsky I.S.¹, Loginov V.V.¹, Ryzhova S.D.¹, Virgilyev P.S.¹, Lokhonina A.V.², Kostyrev S.V.³EVALUATION OF BONE TISSUE REGENERATION USING A COMBINATION OF AUTOLOGOUS FIBRIN MATRIX
WITH PRE-DIFFERENTIATED MESENCHYMAL STEM CELLS IN AN EXPERIMENTAL MODEL¹N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, 117997, Moscow, Russian Federation;²V.I. Kulakov National Medical Research Center of Obstetrics, Gynecology and Perinatology,
117997, Moscow, Russian Federation;³N.A. Lopatkin Scientific Research Institute of Urology and Interventional Radiology — branch of the National
Medical Research Radiological Center, 105425, Moscow, Russian Federation

♦ **Introduction.** According to domestic and foreign authors, the frequency of damage to the mandible bone is 36–84% of all damage to the bones of the facial skeleton. Since A.Y. Friedenstein made a key contribution to the study of mesenchymal stem cells (MSC), their analysis, types, methods of isolation and use in various combinations with materials, allowed to expand the boundaries of regenerative medicine. **Aim of the study.** The purpose of the study is to evaluate the regenerative potential of cortical bone tissue in the region of the mandible angle, with the introduction of exogenous pre-differentiated MSC (MSCs) on the autologous fibrin matrix in the experiment. **Material and methods.** We carried out an experimental study on 27 rabbits of the Soviet Chinchilla breed. Animals were divided into 3 groups: A, B and control. The bone defect diameter of 6mm was formed in the angle of the mandible of all animals with a trepan. Groups A and B mandible defects were injected with autologous fibrin clot with pre-differentiated MSCs in the amount of 300 thousand and 1 million cells, respectively. Defect size was assessed after 8, 10 and 12 weeks. **Results.** At week 12 after surgery, in the experimental group B the size of the bone tissue defect was significantly reduced and amounted to $0.006022 \pm 0.00135 \text{ mm}^3$, while in the control group the defect volume was $0.05597 \pm 0.00505 \text{ mm}^3$, and in group A was $0.02235 \pm 0.0056 \text{ mm}^3$. In an experimental study, an improvement was obtained in the pathophysiological processes of bone tissue regeneration under conditions of a bicortical defect with minimal presence of spongy substance in the damage zone.

Keywords: mesenchymal stem cells; injuries; lower jaw; regeneration; rabbits.

For citation: Kopetsky I.S., Loginov V.V., Ryzhova S.D., Virgilyev P.S., Lokhonina A.V., Kostyrev S.V. Evaluation of bone tissue regeneration using a combination of autologous fibrin matrix with pre-differentiated mesenchymal stem cells in an experimental model. *Rossiiskii meditsinskii zhurnal (Medical Journal of the Russian Federation, Russian journal)*. 2019; 25(3): 172-175. (in Russ) DOI <http://dx.doi.org/10.18821/0869-2106-2019-25-2-172-175>

For correspondence: Igor S. Kopecky, doctor of medical sciences, head of the Department of therapeutic Stomatology “N.I. Pirogov Russian National Medical University”, 117997, Moscow, Russian Federation, E-mail: kopetski@rambler.ru

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments. The study had no sponsorship.

Введение

Первое место среди повреждений костей лицевого скелета занимают переломы нижней челюсти. Отечественными и зарубежными авторами показано, что частота повреждения нижней челюсти колеблется от 36–84% от общего числа повреждений костей лицевого скелета, в том числе с образованием дефекта костной ткани [1–3].

В последние десятилетия активно развивается направление тканевой инженерии для восстановления поврежденных зон организма в различных его локациях. С момента открытия А.Я. Фриденштейном мезенхимально стволовых клеток (МСК) их анализ, виды, методики выделения и применения в различных комбинациях с материалами позволили расширить границы регенеративной медицины.

Тенденции регенеративной медицины в восстановление костной ткани, сосредоточены на плюрипотентных мезенхимально стволовых клетках жирового происхождения (жМСК), так как произвести забор небольшого количества жировой ткани значительно легче, нежели такие же объемы костного мозга, а также стоит отметить, что общее количество МСК в костном мозге не превышает 0,01% и имеет тенденцию к уменьшению со временем старения организма [4].

Проводя анализ литературы, мы обратили внимание на то, что многие авторы проводили свои экспериментальные работы по внедрению жМСК на своде черепа, где имеется твердая мозговая оболочка с ярко выраженным кровоснабжением, что, по нашему мнению, нарушает интерпретацию результатов, поэтому при создании экспериментальной модели мы решили использовать область угла нижней челюсти, где толщина костного слоя имеет минимальный компактный слой, что затрудняет процессы регенерации [5].

Целью нашего исследования являлась оценка регенераторного потенциала кортикальной костной ткани в области угла нижней челюсти при внесении экзогенных прединдифференцированных МСК (пМСК) на аутологичном фибриновом матриксе в эксперименте [6].

Материал и методы

Экспериментальное исследование было проведено на 27 кроликах породы Советская шиншилла в возрасте 1 года (± 1 мес) массой от 5 до 7 кг. Все животные содержались в виварии в условиях, соответствующих международному стандарту. Работы с животными проводились в строгом соответствии с законодательством Российской Федерации, Положениями директивы 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 года по охране животных, используемых в научных целях (Статья 27), а также требованиями и рекомендациями «Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных» [7].

Животные были разделены на 3 группы.

Контрольную группу составили 9 животных. У данной группы животных в сформированный дефект костной ткани заполнялся кровяным сгустком.

Основную группу (А и Б) составили 18 животных, разделенных на 2 группы по 9 особей.

Животным группы А в сформированный дефект нижней челюсти вводили аутологичный фибриновый сгусток с прединдифференцированными МСК в количестве 300 тыс клеток.

Животным группы Б в сформированный дефект нижней челюсти вводили аутологичный фибриновый

сгусток с прединдифференцированными МСК в количестве 1 млн клеток.

Вывод животных из экспериментального исследования производился на 8, 10, 12 неделе по 3 животных из каждой группы.

Получение жировой ткани от лабораторных животных проводилось по разработанному нами хирургическому протоколу. Полученную в ходе первого хирургического этапа жировую ткань подвергали мелкой сепарации в чашки Петри и растворе PBS (Phosphate buffered saline – фосфатный буферный раствор) (Sigma Aldrich), обрабатывали 0,075% раствором коллагеназы (Sigma Aldrich) и трипсина, и оставляли в инкубаторе на 40 мин. Для инактивации комбинации трипсина и коллагеназы, полученный раствор разводили трехкратным раствором PBS (Sigma Aldrich), и центрифугировали при 500g 15 мин. Полученный супернатант аспирировали и добавляли в ростовую среду, содержащую DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Sigma Aldrich) 10% фетальную телячью сыворотку, и 1% пенициллин/стрептомицин. Замену ростовой среды производили каждые 3–4 дня. Через неделю инкубационного периода, производили количественную оценку колонии МСК путем окрашивания трипаново-синим, а также проводили автоматический расчет жизнеспособных клеток колонии. По достижению конфлюэнтного монослоя, рассаживали клетки в 4 флакона с стандартной ростовой средой и вносили в каждый флакон по 10×10^4 клеток.

Для остеогенной дифференцировки линейки МСК в полученную колонию МСК вводили остеогенную среду, содержащую 10 ммоль/л β -glycerophosphate, 0,1 ммоль/л dexamethasone, и 50 ммоль/л L-ascorbic acid (Sigma Aldrich). Инкубировали клетки на протяжении 28 дней со снятием контрольной группы клеток каждые 7, 14, 21 сут.

По достижению пМСК конфлюэнта, экспериментальные животные готовились ко второму хирургическому вмешательству. За сутки до оперативного вмешательства у каждого кролика производили забор крови из поверхностной ушной вены в объеме 30 мл в пробирки фирмы Vacuette (ISO 6710). Центрифугировали полученную кровь при значениях 2600 rpm на 12 мин для получения аутологичной фибриновой матрицы. В полученные фибриновые сгустки вводили пМСК и помещали в ростовую среду в инкубатор на сутки. Для подтверждения остеогенной дифференцировки клеток производилась полимеразно-цепная реакция, для определения уровня RUNX. Реакция проводилась до смены ростового раствора на остеогенную среду, далее на 7, 14 и 21-е сутки, после замены ростовой среды.

Перед вторым хирургическим этапом животным проводилась премедикация 2% раствором ксилазина гидрохлорида (ксила) в дозе 5 мг/кг. Для общей анестезии применяли внутримышечное введение 5% раствора тилетамина гидрохлорида и золазепам гидрохлорида (золетил) в дозе 15 мг/кг, в/м, но не более 0,25 мл в точку введения.

После введения исследуемого животного в состояние наркоза, удаляли шерсть в области угла, обрабатывали кожные покровы раствором антисептика (3% раствор перекиси водорода) и производили послойное рассечение мягких тканей до кости, отслаивая прикрепленную жевательную мышцу. Трепаном формировали дефект костной ткани в области угла нижней челюсти диаметром 6 мм.

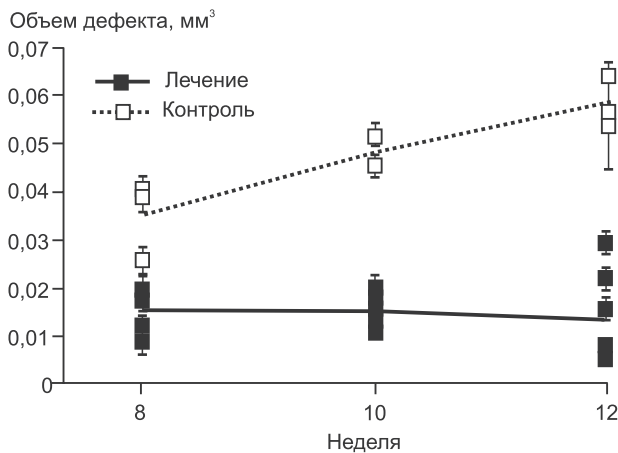


Рис. 1. Динамика изменений объема костного дефекта в экспериментальных и контрольных группах.
 $p \leq 0,02$ на 8, 10, 12-й неделе.

В постоперационном периоде экспериментальным животным проводилась анальгезирующая и антибактериальная терапия, аналогичная первому хирургическому этапу.

Радиографическое исследование: кроликам проводилась компьютерная томография на аппарате Versan на 8, 10 и 12-й неделе соответственно после выведения из эксперимента.

Животные выводились из эксперимента путем погружения в CO_2 камеру. Данные компьютерной томографии подвергались обработке в программе Osirix Lite.

Полученные данные подвергались обработке в программе Statistica for windows. График построен с применением Microsoft Excel. Для оценки различий между двумя независимыми выборками применялся статистический критерий Манна–Уитни с расчетами изменений объема дефекта на 8, 10, 12 неделе между контрольной группой и получавшим лечение (рис. 1).

Результаты

При проведении анализа данных КТ мы выяснили, что через 8 недель после начала экспериментального исследования в контрольной группе костный дефект в области угла нижней челюсти имеет овальную форму, отчетливо прослеживается тенденция к увеличению размеров дефекта, присутствуют явления резорбции по краям дефекта без признаков костеобразования со средним значением объема дефекта по группе $0,034467 \pm 0,0071685 \text{ мм}^3$.

В группе, где был использован аутологичный фибриновый матрикс с 300 тыс клеток пМСК, дефект имеет овальную форму, отмечается уменьшение размеров дефекта со средним значением по группе $0,014311 \pm 0,00426 \text{ мм}^3$.

В группе Б, где был использован аутологичный фибриновый матрикс с 1 млн клеток, на 8-й неделе нет сильно выраженного отличия при сравнении с группой А со средним значением $0,015889 \pm 0,00342 \text{ мм}^3$.

На 10 неделе лечения, отчетливо прослеживается изменения по заполнению дефекта костной тканью между контрольной группой и группой, получавшей лечение со средними значениями по группам:

- ♦ контрольная группа – $0,048444 \pm 0,00031426 \text{ мм}^3$;
- ♦ группа А — $0,01269 \pm 0,00228 \text{ мм}^3$;
- ♦ группа Б — $0,01526 \pm 0,00275 \text{ мм}^3$.

На 12-й неделе после оперативного вмешательства в экспериментальной группе Б размер дефекта костной ткани значительно сократился и составил $0,006022 \pm 0,00135 \text{ мм}^3$ (рис. 2), в то время как в контрольной группе объем дефекта составил $0,05597 \pm 0,00505 \text{ мм}^3$ (рис. 3), а в группе А — $0,02235 \pm 0,0056 \text{ мм}^3$ (рис. 4).

Заключение

В экспериментальном исследовании было получено улучшение патофизиологических процессов регенерации костной ткани, в условиях бикортикального дефекта, с минимальным присутствием губчатого вещества в зоне повреждения. Первые результаты исследования, свидетельствуют о том, что трансплантация аутогенного фибринового композита с предифференцированным МСК, позволяет позитивно влиять на регенеративный потенциал окружающих тканей, снижая недостаток нутриентов и кислорода в зоне повреждения, и обеспечивая ускоренное восстановление от периферии к центру.

Совместное применение высоких концентраций МСК с аутологичной фибриновой матрицей позволяет уменьшить краевую резорбцию в зоне повреждения. Так в основной группе животных, где использовались МСК, краевой резорбции не наблюдалось. Вероятно,

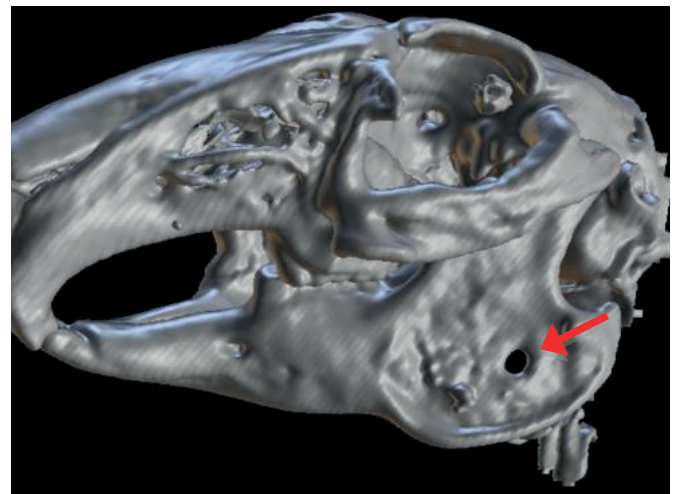


Рис.2. Дефект костной ткани у экспериментального животного из группы Б в области угла нижней челюсти.

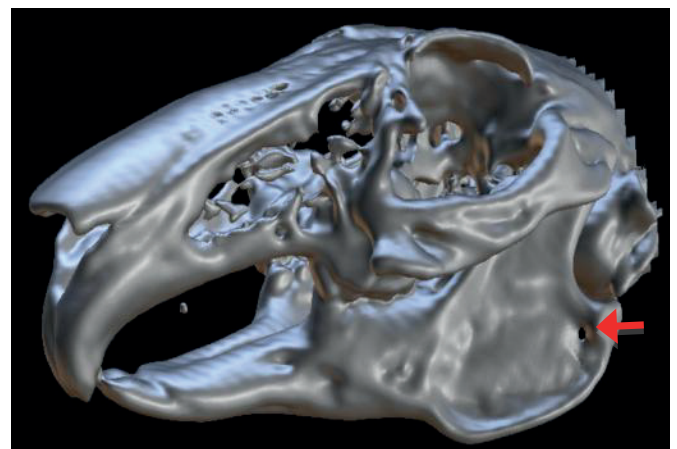


Рис.3. Дефект костной ткани у экспериментального животного из контрольной группы в области угла нижней челюсти.

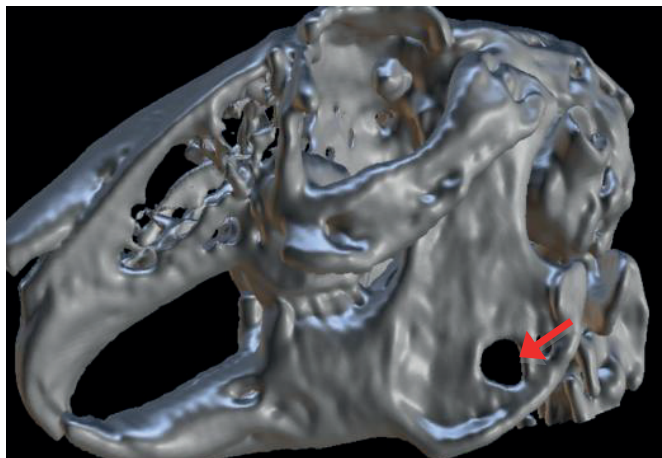


Рис. 4. Дефект костной ткани у экспериментального животного из группы А в области угла нижней челюсти.

это связано с более высокими концентрациями преостеобластов, ростовых факторов, сигнальных молекул и цитокинов, которые были привнесены из вне, а также отмечено уменьшение размеров объема костного дефекта в экспериментальной группе на 10-й неделе в 3,8 раз по сравнению с контрольной и 9,3 раза на 12-й неделе.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п. п. 3, 5–7 см. REFERENCES)

1. Дубровин М.С., Копецкий И.С., Полуниин В.С., Медико-социальная характеристика больных с повреждениями челюстно-лицевой области. *Вестник Роснадзора*. 2013; 2: 46-8.
2. Копецкий И.С., Притыко А.Г., Полунина Н.В., Насибуллин А.М. Травматизм челюстно-лицевой области (опыт 50-летнего наблюдения). *Вестник РГМУ*. 2010; 2: 31-4.
4. Киселева Е.В. Черняев С.Е., Васильев А.В., Воложин А.И. Перспективы использования стволовых клеток в реконструкции черепно-лицевого скелета. *Стоматология*. 2009; 4: 77-81.

REFERENCES

1. Dubrovin M.S., Kopetskiy I.S., Polunin V.S. Medical and social characteristics of patients with maxillofacial injuries. *Vestnik Roszdrazava*. 2013; 2: 46-8. (in Russian)
2. Kopetskiy I.S., Pritiko A.G., Polunina N.V., Nasibullin A.M. Traumatism of maxillofacial region (during 50 years). *Vestnik RGMU*. 2010; 2: 31-4. (in Russian)
3. Lee K. Global Trends in Maxillofacial Fractures. *Craniofacial Trauma and Reconstruction*. 2012; 05(04): 213–22. <http://dx.doi.org/10.1055/s-0032-1322535>
4. Kiseleva E.V., Cherniaev S.E., Vasil'ev A.V., Volozhin A.I. Stem cells use for craniofacial skeleton reconstruction — perspectives. *Stomatolodiya*. 2009; 4: 77-81. (in Russian)
5. Tobita M., Mizuno H. Oral and Maxillofacial Tissue Engineering with Adipose-Derived Stem Cells. *Regenerative Medicine and Tissue Engineering*. 2013; 05. <http://dx.doi.org/10.5772/55899>
6. Clark Raf. Fibrin and Wound Healing. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 25; 936(1): 355-67. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb03522.x>
7. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. National Academy Press, USA. 2011.

Поступила 24.04.19
Принята к печати 29.04.19