

DOI: 10.18481/2077-7566-2024-20-3-98-102

УДК 616.314-089.23

## ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ В ЗОНЕ ИМПЛАНТАЦИИ «БАК-1000» В КОМБИНАЦИИ С АНГИОСТИМУЛИРОВАННЫМИ МСК

Демяшкин Г. А.<sup>1</sup>, Фидаров А. Ф.<sup>2</sup>, Иванов С. Ю.<sup>1,2</sup>, Орлов А. А.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет), г. Москва, Россия

<sup>2</sup> Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия

<sup>3</sup> НИИ общей патологии и патофизиологии, г. Москва, Россия

### Аннотация

Актуальной проблемой современной челюстно-лицевой хирургии остается вопрос выбора оптимального остеопластического материала при устранении дефекта костной ткани, особенно при замещении обширных дефектов. Продолжается активный поиск и апробация новых биокомпозитов, стимулирующих остеогистогенез, с оценкой их эффективности и безопасности.

**Цель исследования:** оценка репаративной костной регенерации после имплантации «БАК-1000» в комбинации с МСК, стимулированными в ангиогенном направлении, в эксперименте.

**Материалы и методы.** Экспериментальные животные (крысы Sprague Dawley, возраст 13–15 недель, n = 30, ♂) в настоящем исследовании были случайным образом поделены на две группы — контрольную и опытную (по 15 животных в каждой). Первый этап эксперимента — культивирование мезенхимальных стволовых клеток, второй — создание и заполнение костных дефектов с использованием имплантационного материала и аутологических МСК.

**Результаты.** При гистохимическом исследовании через 2 месяца после имплантации биокомпозита в сочетании с МСК наблюдали умеренное развитие признаков остеогистогенеза, выраженный неоангиогенез и формирование кристалликов ярко-желтого цвета. Введение БАК-1000 животным контрольной группы демонстрировало формирование соединительнотканной капсулы вокруг имплантированного материала практически при отсутствии признаков репаративной костной регенерации и неоангиогенеза.

**Выводы.** В проведенном эксперименте было апробировано применение биокомпозита, состоящего из «БАК-1000» в комбинации с ангиостимулированными МСК. На основании гистохимического исследования отмечали его неэффективность при закрытии обширных дефектов костной ткани, однако дополнительное культивирование этих клеток на матрице из остеопластических материалов может усилить процессы остеогистогенеза и неоангиогенеза, индуцируя метаболизм костной ткани и стимулируя формирование соединительной ткани в зоне диастаза, что может послужить причиной дальнейших исследований подобных комбинаций.

**Ключевые слова:** остеогистогенез, соединительная ткань, апатитосиликатный материал, мезенхимальные стволовые клетки, гистохимия

Авторы заявили об отсутствии конфликта интересов.

Григорий Александрович ДЕМЯШКИН ORCID ID 0000-0001-8447-2600

д.м.н., заведующий лабораторией гистологии и иммуногистохимии, Институт трансляционной медицины и биотехнологии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова, г. Москва, Россия  
dr.dga@mail.ru

Асланбек Феликсович ФИДАРОВ ORCID ID 0000-0003-4857-7629

аспирант кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии, Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия  
08082012@bk.ru

Сергей Юрьевич ИВАНОВ ORCID ID 0000-0001-5458-0192

д.м.н., член-корреспондент РАН, заведующий кафедрой челюстно-лицевой хирургии Первого МГМУ им. И. М. Сеченова; заведующий кафедрой челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии, Российский университет дружбы народов, г. Москва, Россия  
ivanov-syu@rudn.ru

Андрей Алексеевич ОРЛОВ ORCID ID 0000-0001-2436-8278

д.м.н., профессор, главный научный сотрудник лаборатории клеточных технологий НИИ общей патологии и патофизиологии, г. Москва, Россия  
doctororlov@gmail.com

Адрес для переписки: Асланбек Феликсович ФИДАРОВ

121609, г. Москва, ул. Крылатская д.21

+7 (910) 4195522

08082012@bk.ru

### Образец цитирования:

Демяшкин Г. А., Фидаров А. Ф., Иванов С. Ю., Орлов А. А.

ОСОБЕННОСТИ РЕПАРАТИВНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ В ЗОНЕ ИМПЛАНТАЦИИ «БАК-1000» В КОМБИНАЦИИ С АНГИОСТИМУЛИРОВАННЫМИ МСК. Проблемы стоматологии. 2024; 3: 98-102.

© Демяшкин Г. А. и др., 2024

DOI: 10.18481/2077-7566-2024-20-3-98-102

Поступила 24.07.2024. Принята к печати 22.09.2024

DOI: 10.18481/2077-7566-2024-20-3-98-102

## **FEATURES OF REPARATIVE REGENERATION OF BONE TISSUE IN THE BAK-1000 IMPLANTATION ZONE IN COMBINATION WITH ANGIOSTIMULATED MSCS**

**Demyashkin G.A.<sup>1</sup>, Fidarov A.F.<sup>2</sup>, Ivanov S.Yu.<sup>1,2</sup>, Orlov A.A.<sup>3</sup>**

<sup>1</sup> *I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia*

<sup>2</sup> *Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russia*

<sup>3</sup> *Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*

### **Annotation**

An urgent problem in modern maxillofacial surgery remains the question of choosing the optimal osteoplastic material when eliminating diastasis of bone tissue, especially when replacing large defects. An active search and testing of new biocomposites that stimulate osteohistogenesis continues, assessing their effectiveness and safety.

**Aim of the study:** characteristics of osteoregeneration after implantation of “BAK-1000” in combination with MSCs stimulated in the angiogenic direction in an experiment.

**Materials and methods.** Experimental animals (Sprague Dawley rats, age 13–15 weeks, n = 30, ♂) in this study were randomly divided into two groups – control and experimental (15 animals in each). The first stage of the experiment is the cultivation of mesenchymal stem cells, the second is the creation and filling of bone defects using implantation material and autologous MSCs.

**Results.** A histochemical study two months after implantation of the biocomposite in combination with MSCs revealed moderate development of signs of osteohistogenesis, pronounced neoangiogenesis and the formation of bright yellow crystals. Administration of BAK-1000 to animals in the control group demonstrated the formation of a connective tissue capsule around the implanted material with virtually no signs of osteohistogenesis and neoangiogenesis.

**Conclusions.** In the experiment, the use of a biocomposite consisting of “BAK-1000” in combination with angiostimulated MSCs was tested. Based on a histochemical study, it was noted that it is ineffective in closing extensive bone tissue defects, however, additional cultivation of these cells on a matrix of osteoplastic materials can enhance the processes of osteohistogenesis and neoangiogenesis, inducing bone tissue metabolism and stimulating the formation of connective tissue in the diastasis zone, which may be the reason for further studies of such combinations.

**Keywords:** *osteohistogenesis, connective tissue, apatite silicate material, mesenchymal stem cells, histochemistry*

The authors declare no conflict of interest.

**Grigory A. DEMYASHKIN** ORCID ID 0000-0001-8447-2600

*Grand PhD in Medical sciences, Head of the Laboratory of Histology and Immunohistochemistry, Institute of Translational Medicine and Biotechnology, Sechenov University, Moscow, Russia*  
dr.dga@mail.ru

**Aslanbek F. FIDAROV** ORCID ID 0000-0003-4857-7629

*Postgraduate Student of the Department of Maxillofacial Surgery and Surgical Dentistry, Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russia*  
08082012@bk.ru

**Sergey Y. IVANOV** ORCID ID 0000-0001-5458-0192

*Grand PhD in Medical sciences, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Oral and Maxillofacial Surgery in Sechenov University; Head of the Department of Maxillofacial Surgery and Surgical Dentistry, Peoples' Friendship University of Russia named after Patrice Lumumba, Moscow, Russia*  
ivanov-syu@rudn.ru

**Andrey A. ORLOV** ORCID ID 0000-0001-2436-8278

*Grand PhD in Medical sciences, Professor, Chief Researcher in Laboratory of Cell Technologies in the Research Institute of General Pathology and Pathophysiology, Moscow, Russia*  
doctororlov@gmail.com

**Correspondence address: Aslanbek F. FIDAROV**

121609, Moscow, str. Krylatskaya 21

+7 (910) 4195522

08082012@bk.ru

### **For citation:**

*Demyashkin G.A., Fidarov A.F., Ivanov S.Yu., Orlov A.A.*

*FEATURES OF REPARATIVE REGENERATION OF BONE TISSUE IN THE BAK-1000 IMPLANTATION ZONE IN COMBINATION WITH ANGIOSTIMULATED MSCS. Actual problems in dentistry. 2024; 3: 98-102. (In Russ.)*

© Demyashkin G.A. et al., 2024

DOI: 10.18481/2077-7566-2024-20-3-98-102

Received 24.07.2024. Accepted 22.09.2024

## Введение

Одной из самых актуальных на сегодняшний день проблем хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии является узкий выбор остеопластических материалов для замещения дефектов костной ткани [11]. Считается, что наиболее эффективны керамики, однако их применение дискуссионно при замещении обширных дефектов в тех областях кости, где ожидается воздействие высоких нагрузок, что связано с относительной хрупкостью данного материала [3, 5].

В последнее время были предложены к использованию различные биокomпозиты, состоящие из керамического каркаса в сочетании с субстратами, повышающими их прочность (например металлами) [7], а также индуцирующими ангио- и остеогистогенез (культуры мезенхимальных стволовых клеток, МСК) [10]. В этих процессах ключевую роль играют многочисленные биологически активные молекулы, такие как васкулярно-эндотелиальный фактор роста, фактор роста фибробластов, инсулиноподобный фактор роста, костный морфогенетический белок и др. [9]. Они высвобождаются из тромбоцитов, клеток эстрацеллюлярного матрикса и окружающих тканей в ответ на появление костного дефекта [6].

Известно, что добавление культуры МСК в матрицу из остеопластического материала может индуцировать ангиогенез и ускорить остеогистогенез и регенеративную костную репарацию [10]. Эти клетки считаются высокопластичными и способны к дифференцировке в нескольких направлениях: ангиогенном, остеогенном, хондрогенном, адипогенном [8].

Таким образом, интересным представляется экспериментальное исследование механизмов резорбции и биологической активности, а также остеоиндуктивной эффективности биокomпозита, состоящего из биосовместимой остеопластической апатитосиликатной матрицы в сочетании с культурой ангиостимулированных МСК. Данные исследования позволяют апробировать новые методы замещения костных дефектов с оценкой состояния окружающей соединительной ткани и представляются высокоактуальными, так как поиск эффективного и безопасного остеопластического материала продолжается по сей день.

**Цель исследования:** оценка репаративной костной регенерации после имплантации «БАК-1000» в комбинации с МСК, стимулированными в ангиогенном направлении, в эксперименте.

## Материалы и методы

Экспериментальные животные (крысы Sprague Dawley, возраст 13–15 недель,  $n = 30$ , ♂) в настоящем исследовании были случайным образом поделены на две группы — контрольную и опытную (по 15 животных в каждой). Уход за животными осуществлялся в стандартных условиях в виварии. Все болезненные манипуляции проводили с использованием обезболивающих средств в соответствии с правилами

Хельсинкской декларации и Руководства по проведению медико-биологических исследований по уходу и использованию лабораторных животных (ILAR, DELS). Проведение исследования одобрено заключением локального этического комитета.

**Дизайн эксперимента.** Эксперимент разделили на два этапа. На первом осуществляли забор жировой ткани в паховой области опытных животных с дальнейшей культивацией мезенхимальных стволовых клеток (МСК), на втором этапе проводили остеотомию диафиза бедренной кости и заполняли дефекты либо имплантационным материалом «БАК-1000» (контроль), либо его комбинацией с аутологичными ангиостимулированными МСК (опытная группа). Животных выводили из эксперимента через 2 месяца после второго этапа путем введения высоких доз анестетика (кетамин + ксилазин).

**Остеопластическая матрица.** «БАК-1000» (регистрационное удостоверение 98/218/433, Россия) относится к группе нерезорбируемых остеопластических материалов, образован апатито-силикатной матрицей ячеисто-каналликулярной структуры, состоящей из гидроксипатита (ГА) в нескольких пропорциях Са/Р, силикатной матрицы, волостанина ( $\text{CaSiO}_3$ ); гидроксипатита ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ );  $\beta$ -трикальцийфосфата ( $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ) [1].

**Стромальные клетки жировой ткани (СКЖТ).** Клетки стромально-сосудистой фракции выделяли у крыс по стандартному протоколу из ткани подкожного жира брюшной области [1]. После этапов 2D- и 3D-культивирования получали частицы сферической формы в примерном количестве около 3000 шт., которые размещали на матрице «БАК-1000» с повторным культивированием еще в течение недели. Для оценки структуры МСК и полученных микросфер использовали микроскоп СКХ41 (Olympus, Япония) и камеру Invenio<sup>3</sup>S (Olympus, Япония), анализ изображений осуществляли в компьютерной программе DeltaPix (Olympus, Япония).

**Индукция ангиогенной дифференцировки СКЖТ.** Спустя 3 этапа 2D-культивирования в слой стромальных клеток жировой ткани (СКЖТ) добавляли индуктор васкулогенеза VEGF (васкулярный эндотелиальный фактор роста) в концентрации 10 нг/мл в полной ростовой среде.

**Гистохимическое исследование.** После извлечения фрагменты костной ткани с биокomпозитным материалом фиксировали в забуференном растворе формальдегида, декальцинировали и готовили для гистохимического исследования по стандартному протоколу [1]. Для гистохимического окрашивания срезов по Ван Гизону использовали комбинацию красителей «кислый фуксин + пикриновая кислота». Затем проводили анализ микропрепаратов в 5 случайных полях зрения светового микроскопа при увеличении  $\times 200$  с использованием системы видео-микроскопии (Leica DM2000, Германия) и программного обеспечения Leica Application Suite, Version 4.9.0.

## Результаты

Гистохимическое окрашивание микропрепаратов по Ван Гизону позволяет оценить структуру костной ткани: коллагеновые волокна окрашиваются в ярко-красный цвет, а другие тканевые элементы приобретают желтый или оранжевый цвет.

Через два месяца после формирования костного дефекта при гистохимическом исследовании в опытной группе обнаружили признаки умеренного остеогистогенеза: образование губчатой костной ткани и скопление по ее периметру гигантских многоядерных остеокластов, что сочеталось с ярко-красным окрашиванием коллагеновых волокон, расположенных пучками, которые составляют грубоволокнистый остеоид. Отмечали формирование единичных балок между пучками, которые в некоторых случаях соединялись между собой поперечными перемычками. По периметру «костной мозоли» некоторые пучки смыкались, формируя первичные гаверсовы каналы, заполненные многочисленными кровеносными сосудами (неоваскулогенез) и волокнистой соединительной тканью, окрашенной в ярко-красный цвет. Фрагменты резорбированного преформированного имплантационного комплекса были окружены грубой фиброзной соединительнотканной оболочкой. Тем не менее, отмечено значительное увеличение количества кровеносных сосудов в поле зрения. Интересно, что в области имплантации наблюдали многочисленные кристаллики ярко-желтого цвета (рис. 1А).

В то же время, в контрольной группе после имплантации БАК-1000 практически не отмечали признаков остеогистогенеза: местами формирование рыхлой волокнистой соединительной ткани, окрашенной в ярко-красный цвет, а также грубоволокнистой ткани с признаками фиброза, отделяющей костную пластину от тела имплантированного биокомпозита. Его частичная биорезорбция привела к формированию большого количества кристаллов ярко-желтого цвета. Практически отсутствовало структурированное расположение пучков коллагеновых волокон и формирование балочной структуры костной ткани (рис. 1Б).

## Обсуждение

Настоящее исследование посвящено изучению состояния костной ткани в области имплантации БАК-1000 в комбинации с ангиостимулированными МСК (опытная группа) и без них (контрольная группа).

По результатам гистохимической оценки при окрашивании по Ван Гизону, мы отмечали признаки умеренного остеогистогенеза в области имплантации биокомпозита в опытной группе. В данной группе отмечали выраженную пролиферацию кровеносных сосудов по сравнению с контролем, что может быть связано с индуцирующим влиянием СКЖТ на неангиогенез сосудов, преимущественно капиллярного типа, ввиду их стимуляции в ангиогенном направлении дифференцировки введением VEGF [2].

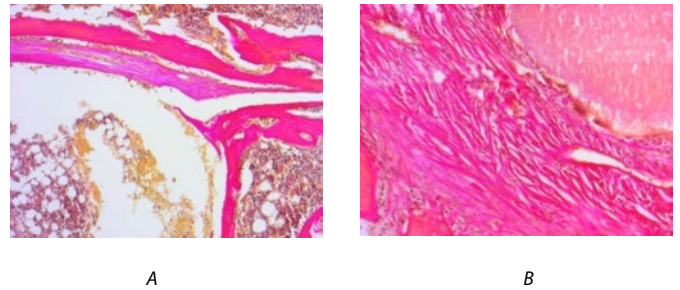


Рис. 1. Место имплантации через два месяца в опытной (А) и контрольной (Б) группах. Окраска по Ван Гизону, увелич.  $\times 100$   
Fig. 1. Place of implantation after two months in the experimental (A) and control (B) groups. Van Gieson staining, magn.  $\times 100$

Тем не менее, имплантация биокомпозита БАК-1000 в комбинации с МСК демонстрировала низкую степень остеогенеза по сравнению с результатами, полученными авторами при использовании других материалов [4, 12]. Кроме того, взаимодействие имплантата с окружающими тканями привело к частичной биорезорбции остеопластической матрицы с появлением кристаллических структур ярко-желтого цвета. Можно предполагать, что они являются продуктами биотрансформации БАК-1000, а именно кристаллами кварца, о чем можно судить на основании химического состава материала. Данное явление можно считать недостатком, который служит основанием для продолжения поиска более безопасного остеопластического материала.

Более показательны свойства БАК-1000 в контрольной группе, где образование кристаллов ярко-желтого цвета было менее выраженным ввиду формирования толстой соединительнотканной капсулы, окружающей имплантат. Вероятно, отсутствие выраженного метаболизма в области имплантации в сочетании с инкапсуляцией биокомпозита привело к низкой степени его биорезорбции, что послужило причиной формирования меньшего количества кристаллических структур и угнетению процесса остеогистогенеза.

Таким образом, на основании проведенного исследования можно отметить, что БАК-1000 не является остеопластическим материалом выбора при замещении обширных дефектов костной ткани, обладая низкой степенью остеоиндуктивной активности и безопасности. Однако ангиостимулированные МСК, культивируемые на матрице из более безопасного остеопластического материала, могут стимулировать метаболизм в области имплантации и усилить остеогистогенез при закрытии крупных диастазов кости. Это требует проведения дальнейших исследований с разработкой и апробацией новых остеоиндуктивных материалов.

## Заключение

В проведенном эксперименте было апробировано применение биокомпозита, состоящего из «БАК-1000» в комбинации с ангиостимулированными МСК. На основании гистохимического исследования отмечали его неэффективность при закрытии обширных дефектов костной ткани, однако дополнительное куль-

тивирование этих клеток на матрице из остеопластических материалов может усилить процессы остеогенеза и неоангиогенеза, индуцируя метаболизм костной ткани и стимулируя формирование соединительной

ткань в зоне дефекта, что может послужить причиной дальнейших исследований подобных комбинаций.

### Литература/References

1. Демьяшкин Г.А., Иванов С.Ю., Нуруев Г.К., Фидаров А.Ф., Чуев В.В., Чуева А.А., Вадюхин М.А., Бондаренко Ф.Н. Морфофункциональные особенности остеорегенерации через два месяца после имплантации «БАК-1000» в комбинации с ангиостимулированными мезенхимальными стволовыми клетками. Стоматология для всех. 2022;4(101):34-38. [G.A. Demyashkin, S.Yu. Ivanov, G.K. Nuruev, A.F. Fidarov, V.V. Chuev, A.A. Chueva, M.A. Vadyukhin, F.N. Bondarenko. Morphofunctional features of osteoregeneration two months after implantation of "BAK-1000" in combination with angiostimulated mesenchymal stem cells. Dentistry for everyone. 2022;4(101):34-38. (In Russ.)]. [https://doi.org/10.35556/idr-2022-4\(101\)34-38](https://doi.org/10.35556/idr-2022-4(101)34-38)
2. Dreyer C.H., Jørgensen N.R., Overgaard S., Qin L., Ding M. Vascular Endothelial Growth Factor and Mesenchymal Stem Cells Revealed Similar Bone Formation to Allograft in a Sheep Model // *Biomed Res Int.* – 2021;2021:6676609. <https://doi.org/10.1155/2021/6676609>
3. Frigério P.B., Quirino L.C., Gabrielli M.A.C., Carvalho P.H.A., Garcia Júnior I.R., Pereira-Filho V.A. Evaluation of Bone Repair Using a New Biphasic Synthetic Bioceramic (Plenum® Osshp) in Critical Calvaria Defect in Rats // *Biology (Basel).* – 2023;12(11):1417. <https://doi.org/10.3390/biology12111417>
4. Meesuk L., Suwanprateeb J., Thammarakharoen F. Osteogenic differentiation and proliferation potentials of human bone marrow and umbilical cord-derived mesenchymal stem cells on the 3D-printed hydroxyapatite scaffolds // *Sci Rep.* – 2022;12(1):19509. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-24160-2>
5. Nisar A., Iqbal S., Atiq Ur Rehman M., Mahmood A., Younas M., Hussain S.Z., Tayyaba Q., Shah A. Study of physico-mechanical and electrical properties of cerium doped hydroxyapatite for biomedical applications // *Mater. Chem. Phys.* – 2023;299:127511. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2023.127511>
6. Papachristou D.J., Georgopoulos S., Giannoudis P.V., Panagiotopoulos E. Insights into the Cellular and Molecular Mechanisms That Govern the Fracture-Healing Process: A Narrative Review // *J Clin Med.* – 2021;10(16):3554. <https://doi.org/10.3390/jcm10163554>
7. Papyrov E.K., Shichalin O.O., Belov A.A., Buravlev I.Y., Mayorov V.Y., Fedorets A.N., Buravleva A.A., Lembikov A.O., Gritsuk D.V., Kapustina O.V. CaSiO3-HAp Metal-Reinforced Biocomposite Ceramics for Bone Tissue Engineering // *J. Funct. Biomater.* – 2023;14:259. <https://doi.org/10.3390/jfb14050259>
8. Robert A.W., Marcon B.H., Dallagiovanna B., Shigunov P. Adipogenesis, Osteogenesis, and Chondrogenesis of Human Mesenchymal Stem/Stromal Cells: A Comparative Transcriptome Approach // *Front Cell Dev Biol.* – 2020;8:561. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00561>
9. Rodríguez-Merchán E.C. A Review of Recent Developments in the Molecular Mechanisms of Bone Healing // *International journal of molecular sciences.* – 2021;22(2):767. <https://doi.org/10.3390/ijms22020767>
10. Safarova Yantsen Y., Olzhayev F., Umbayev B. Mesenchymal Stem Cells Coated with Synthetic Bone-Targeting Polymers Enhance Osteoporotic Bone Fracture Regeneration // *Bioengineering (Basel).* – 2020;7(4):125. <https://doi.org/10.3390/bioengineering7040125>
11. Vasilyev A.V., Kuznetsova V.S., Bukharova T.B. Development prospects of curable osteoplastic materials in dentistry and maxillofacial surgery // *Heliyon.* – 2020;6(8):e04686. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e04686>
12. Wei S., Ma J.X., Xu L., Gu X.S., Ma X.L. Biodegradable materials for bone defect repair // *Military Medical Research.* – 2020;7(1):54. <https://doi.org/10.1186/s40779-020-00280-6>