

А.И. Потапова¹,

аспирант, стоматолог-хирург отделения хирургической стоматологии

А.П. Ведяева¹,

д.м.н., доцент, зав. отделением хирургической стоматологии

Т.В. Брайловская¹,

д.м.н., профессор, стоматолог-хирург отделения хирургической и экспериментальной имплантологии

Н.В. Кошелева²,

к.б.н., доцент, зав. лабораторией клинических смарт-нанотехнологий

П.С. Тимашев²,

д.х.н., доцент, научный руководитель научно-технологического парка биомедицины

И.И. Власова²,

к.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник отдела современных биоматериалов

П.И. Котенева²,

м.н.с. дизайн-центра «Биофабрика»

А.М. Цициашвили³,

д.м.н., профессор кафедры пропедевтики хирургической стоматологии

¹ ЦНИИСиЧЛХ, 119021, Москва, Россия² Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, 127006, Москва, Россия³ Российский университет медицины, 127006, Москва, Россия

Исследование *in vitro* цитотоксичности и биосовместимости ген-активированного остеопластического материала

Аннотация. Проведено исследование биосовместимости и цитотоксичности двух остеопластических материалов: ксеногенного материала (КМ) «Bio-Oss» и ген-активированного материала (ГАМ) «Нуклеостим-VEGF». Эксперимент проводился с использованием крови, которую инкубировали с образцами материалов при 37°C. Исследовали хемилюминесцентные реакции нейтрофилов под воздействием активатора — форбол-12-миристат-13-акетата, а также адгезию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) к материалам. Результаты показали, что оба материала усиливают радикал-генерирующую активность нейтрофилов, однако с разной скоростью: ГАМ активирует клетки быстрее, достигая максимума через 40 минут, в то время как КМ требует более длительного времени для активации. ММСК успешно адгезировали к гранулам обоих материалов, но ГАМ обеспечивал лучшую жизнеспособность клеток. Полученные данные указывают на высокую биосовместимость ГАМ и его потенциал для применения в тканевой инженерии и регенеративной медицине.

Ключевые слова: плазмида, остеопластический материал, генно-активированный материал, макрофаги, мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки, адгезия

для цитирования:

Потапова А.И., Ведяева А.П., Брайловская Т.В., Кошелева Н.В., Тимашев П.С., Власова И.И., Котенева П.И., Цициашвили А.М. Исследование *in vitro* цитотоксичности и биосовместимости ген-активированного остеопластического материала. — Клиническая стоматология. — 2025; 28 (1): 144—151. DOI: 10.37988/1811-153X_2025_1_144

A.I. Potapova¹,

postgraduate, surgeon at the Dental surgery Division

A.P. Vedyaeva¹,

Doctor of Science in Medicine, associate professor and head of the Dental surgery Division

T.V. Brailovskaya¹,

Doctor of Science in Medicine, professor of the Surgical and experimental implantology Division

N.V. Kosheleva²,

PhD in Biology, head of the Clinical smart-nano-technologies Lab

P.S. Timashev²,

Doctor of Science in Chemistry, associate professor and head of the Biomedical Science & Technology Park

I.I. Vlasova²,

PhD in Physics and Mathematics, leading researcher of the division of Modern biomaterials

P.I. Koteneva²,

junior researcher at the “Biofactory” Design Centre

A.M. Tsitsiashvili³,

Doctor of Science in Medicine, professor of the Oral surgery propaedeutics Department

¹ Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, 119021, Москва, Россия² Сеченовский университет, 127006, Москва, Россия³ Российский университет медицины, 127006, Москва, Россия

In vitro study of cytotoxicity and biocompatibility properties of gene-activated osteoplastic material

Annotation. A study of the biocompatibility and cytotoxicity of two osteoplastic materials has been conducted: the xenogenic material (XM) “Bio-Oss” and the gene-activated material (GAM) “Nucleostim-VEGF”. The experiment was conducted using blood, which was incubated with samples of materials at 37°C. Chemiluminescent reactions

of neutrophils under the influence of the activator forbol-12-myristate-13-acetate, as well as the adhesion of multipotent mesenchymal stromal cells (MMSCs) to materials were studied. The results showed that both materials enhance the radical-generating activity of neutrophils, but at different rates: GAM activates cells faster, reaching a maximum after

40 minutes, while XM takes a longer time to activate. MMSCs successfully adhered to the granules of both materials, but GAM provided better cell viability. The data obtained indicate the high biocompatibility of GAM and its potential for use in tissue engineering and regenerative medicine.

Key words: plasmid, osteoplastic material, gene-activated material, macrophages, multipotent mesenchymal stromal cells, adhesion

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время квалифицированная стоматологическая помощь остается высоко востребованной среди населения. Одним из наиболее распространенных видов оказания помощи является дентальная имплантация как эффективный метод лечения пациентов с отсутствием зубов. При этом проведение дентальной имплантации, по данным различных авторов, требует увеличения объема альвеолярной кости — проведения костной пластики с целью создания условий для установки дентального имплантата [1–3]. Кроме того, костная пластика может быть показана в связи с проведением различного рода радикальных резекционных вмешательств на челюстях по поводу кистозных и иных образований, после удаления которых формируются дефекты костной ткани, что может затруднить любое дальнейшее восстановительное лечение [1, 2]. Проведение операций костной пластики сопряжено с использованием остеопластических материалов, мембран или стволовых клеток [3]. «Золотым стандартом» остается аутогенная кость — только она одновременно обладает остеоиндуктивными, остеокондуктивными и остеогенными свойствами, при этом не вызывая никаких патологических иммунных реакций у пациента. При этом забор костного аутотранспланта всегда сопряжен с дополнительной хирургической травмой, возможными интра- и послеоперационными осложнениями в донорской области, ограниченным объемом трансплантата [3, 4].

В связи с вышеперечисленными недостатками использования аутогенных трансплантатов при костной пластике самой распространенной им альтернативой являются ксеногенные трансплантаты. Как правило, в той или иной степени они представляют собой деминерализованную и/или депротеинизированную форму, что должно говорить об отсутствии у них цитотоксичности, неорганической матрицы костей животных [5]. Их основные преимущества — это удовлетворительные остеокондуктивные свойства, отсутствие в необходимости формирования дополнительной донорской зоны и неограниченный объем [6, 7]. В зависимости от метода обработки ксеногенный остеопластический материал обладает достаточной резорбционной устойчивостью и может служить каркасом на протяжении нескольких лет [7, 8]. При этом для благоприятного исхода костной пластики: своевременного восстановления или увеличения объема костной ткани путем замещения костного трансплантата — недостаточно только остеокондуктивных свойств у остеопластических материалов. В связи с этим не прекращаются клинические испытания и исследования по разработке и совершенствованию неаутогенных остеопластических материалов, свойства

FOR CITATION:

Potapova A.I., Vedyeva A.P., Brailovskaya T.V., Kosheleva N.V., Timashov P.S., Vlasova I.I., Koteneva P.I., Tsitsiashvili A.M. In vitro study of cytotoxicity and biocompatibility properties of gene-activated osteoplastic material. *Clinical Dentistry (Russia)*. 2025; 28 (1): 144—151 (In Russian). DOI: 10.37988/1811-153X_2025_1_144

у которых будут аналогичными или приближаться к аутогенным [9, 10].

На сегодняшний день перспективной группой остеопластических материалов считаются синтетические материалы, целенаправленно создаваемые с учетом процессов необходимых для увеличения объема и полноценной регенерации кости. К таким материалам относятся Cerasorb (Германия), а также Alpha Bio (Израиль). В связи с этим ведутся разработки отечественных остеопластических материалов с выраженным остеоиндуктивным действием. Особенность одного из подобных отечественных материалов — наличие интегрированной в гранулы октакальций фосфата плазмидной ДНК с геном эндотелиального роста сосудов — VEGF [9]. Данный материал представляет собой комплекс «носитель — нуклеиновая кислота», компоненты которого объединены за счет использования гелевых полимеров на этапе синтеза матрикса. Эффективность материала определяется наличием и остеоиндуктивных, и остеокондуктивных свойств.

Остеоиндуктивные свойства разрабатываемого материала связаны с моментальным высвобождением нуклеиновых кислот в зону имплантации материала и специфическим действием молекулы белковой природы, направленной на активный синтез терапевтического белка (кольцевая ДНК или РНК) [10, 11]. Такой механизм позволяет клетке сохранять свое нормальное состояние и реакцию на клеточные сигналы и полностью прекратить синтез белка, что дает ген-активированным материалам преимущество перед материалами с факторами роста [11–13].

С учетом результатов и перспектив использования ген-активированных остеопластических материалов при костной пластике челюстей определенный интерес может представлять его *in vitro* оценка свойств цитотоксичности и, соответственно, биосовместимости по отношению к росту и дифференцировке мультипотентных мезенхимальных стromальных клеток (ММСК), что может быть изучено в сравнении с аналогичными характеристиками наиболее распространенной депротеинизированной формы ксеногенного остеопластического материала.

Цель исследования — оценка свойств цитотоксичности и биосовместимости по отношению к росту и дифференцировке мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток ген-активированного остеопластического материала

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе оценивали биосовместимость с ММСК, а также цитотоксичность в отношении нейтрофилов двух

остеопластическими материалами различного происхождения:

- 1) ксеногенный материал (КМ) — Bio-Oss (Geistlich Bio-Oss, Швейцария) — натуральный костнозамещающий материал, состоящий из минеральных, очищенных от белков-прионов компонентов бычьей кости и материал на основе октакальциевого фосфата;
- 2) ген-активированный остеопластический материал (ГАМ) — «Нуклеостим-VEGF» («Гистографт», Россия) — материал на основе октакальциевого фосфата и плазмидной ДНК с геном, кодирующим сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), который высвобождается с поверхности гранул, что приводит к усилению ангиогенеза и, как следствие, индуцирует репаративную регенерацию костной ткани.

Оценка цитотоксичности изучаемых материалов методом хемилюминесценции нейтрофилов крови

Важно учитывать общий ответ иммунной системы на имплантацию биоматериалов, который во многом зависит от повышенной концентрации нейтрофилов, они рекрутируются и активируются в месте локального повреждения ткани раньше, чем другие иммунные клетки. Нейтрофилы — клетки врожденного иммунитета, которые первыми реагируют на имплантацию материалов, и их сбалансированный ответ во многом определяет дальнейшую регенерацию тканей. Инфильтрация тканей нейтрофилами происходит через несколько часов после операции, в то время как первыми иммунными клетками, которые реагируют на имплантат, являются нейтрофилы крови. Нейтрофилы составляют 50–70% лейкоцитов крови человека в концентрации 2–7 млн/мл, и множество нейтрофилов успевает провзаимодействовать с материалом пока не остановится кровотечение. Активированные нейтрофилы секрецируют гранулярные белки (эластазу, миелопероксидазу и др.) и цитокины, фагоцитируют поврежденные клетки, а также генерируют активные формы кислорода (АФК).

Генерация АФК может быть количественно измерена с помощью метода люминол-зависимой хемилюминесценции. Это быстрый, простой и чувствительный метод оценки уровня активации нейтрофилов в цельной крови. Люминол окисляется АФК и после ряда внутримолекулярных перегруппировок переходит в 3-аминофталат, что сопровождается испусканием кванта света.

Ген-активированный и ксеногенный материалы перед экспериментом с кровью взвешивали с соблюдением условий стерильности с точностью до 0,1 г. К образцам биоматериалов добавляли аликвоты крови в соотношении 1:100. В контрольной пробе к крови добавляли 20 мкл воды. После чего образцы крови инкубировали при 37°C, в условиях периодического аккуратного ресусспендирования каждые 15 минут. Хемилюминесценцию измеряли спустя 5, 40 и 70 минут инкубации. При измерении хемилюминесценции в кюветы хемилюминометра, с 485 мкл раствора Кребса—Рингера (с NaHCO_3

и CaCl_2) и 200 мкмоль люминола, добавляли 20 мкл крови, инкубированной с внеклеточными везикулами или 20 мкл крови, инкубированной без добавок, в качестве контроля. Измерение хемилюминесценции проводили в 3 повторах на приборе Lum-1200 (Россия). После 5 минут измерения к исследуемым образцам добавляли активатор нейтрофилов форбол-12-миристат-13-ацетат (ФМА) в концентрации 100 нг/мл. Измерения проводили при 37°C достижения максимума хемилюминесценции во всех пробах.

Оценка биосовместимости и адгезии ММСК на поверхности матриц остеопластических материалов

Оценку биосовместимости и адгезивных свойств обоих остеопластических материалов проводили путем двухцветного анализа Live/Dead жизнеспособности ММСК в популяции на основе целостности плазматической мембранны и активности эстеразы.

Стерильные образцы изучаемых остеопластических материалов засевали мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК), полученными у пациентов из биоптатов альвеолярной слизистой оболочки в ретромолярной области, в количестве 100 тыс. клеток на 0,5 см² материала. Образцы культивировали в течение 3 и 7 дней в стандартных условиях (37°C, 5% CO_2) и затем проводили анализ жизнеспособности с помощью анализа Live/Dead. Живые клетки окрашивали зеленым красителем кальцеином-АМ, мертвые — красным красителем пропидия йодидом. Для окрашивания ядер использовали синий краситель Hoechst 33258. После окраски в течение 20 минут (37°C, 5% CO_2) образцы трижды промывали смесью питательной среды Игла в модификации Дульбекко и среды Хама (DMEM/F12) в пропорции 1:1, а затем визуализировали с помощью флуоресцентной визуализирующей системы Evos M5000 (Thermo Scientific, США) при длине волны 405 нм (для Hoechst 33258), 488 нм (для кальцеина-АМ) и 594 нм (для пропидия йодида).

Обработка материала и выделение клеток

Для получения первичных культур ММСК производили забор биоптатов альвеолярной слизистой оболочки рта в ретромолярной области у 5 добровольцев, здоровых мужчин 18–25 лет, с соблюдением правил асептики и антисептики под местным обезболиванием (1,7 мл 4%-ного раствора артикаина с адреналином 1:200 000) получали биоптаты слизистой оболочки ретромолярной области в ходе плановой операции по удалению ретинированных третьих моляров нижней челюсти, покрытых невоспаленным слизистым «капюшоном», при помощи скальпеля, размером 0,5×0,5 см, после чего проводилось непосредственно удаление зуба и закрытие раны простыми узловыми швами.

После получения биоптаты помещали в пробирки объемом 15 мл в смесь питательных сред DMEM/F12 с добавкой глутамина (0,3 мг/мл) и гентамицина (40 мг/мл), и транспортировали для дальнейшей работы. В лаборатории биоптаты трижды промывали раствором DMEM/F12 с антибиотиками

(гентамицин и пенициллин/стрептомицин) и антимикотиком триазольного ряда, переносили в чашку Петри, механически проводили дезагрегацию и переносили в новые чашки Петри, где покрывали минимальным количеством ростовой среды 0,25%-ного раствора трипсина и раствором Версена (1:1) согласно стандартному протоколу получения мезенхимальных стромальных клеток [10]. Через сутки неприкрепившиеся фрагменты ткани переносили на новые чашки, а к прикрепившимся добавляли по 1,5 мл среды и культивировали до третьего пассажа.

Культивирование клеток

Клетки культивировали на адгезивных чашках Петри в стандартных условиях при 37°C и 5% CO₂ в ростовой среде DMEM/F12 с глутамином, с добавлением 10% эмбриональной телячей сыворотки, 1% антибиотика-антимикотика, 1% инсулин-трансферрин-сelenита, гепарина и 0,1% фактора роста фибробластов («ПанЭко», Россия). Смену среды и визуальный контроль состояния культур проводили при помощи инвертированного микроскопа с фазовым контрастом Axio Vert A1 (Carl Zeiss, ФРГ) раз в 2–3 суток. При достижении 70–80% конфлюентности культуры пассировали. Для этого чашки промывали в трех сменах раствора Версена, и в течение 3 минут обрабатывали 0,25% раствором трипсина при 37°C, переносили полученную супензию на новые чашки Петри с двукратным увеличением посевной площади и заливали полной ростовой средой. На следующие сутки после пассирования в чашках меняли полную ростовую среду.

Характеристика мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток

Фоторегистрацию фенотипа ММСК проводили рутинным способом в процессе культивирования и после пассирования с использованием светового микроскопа с фазовым контрастом.

Для подтверждения соответствия иммунофенотипа ММСК принятым критериям был исследован иммунофенотип первичных культур клеток на 3-м пассаже с помощью проточного цитофлуориметра на наличие специфических поверхностных маркеров МСК (CD90, CD73, CD105, CD44, CD29) и отсутствия гемопоэтических

и лимфоцитарно-лейкоцитарных маркеров (CD45, CD34, CD14, CD19). Суспензии живых клеток, полученные обработкой раствором Версена и трипсином, в количестве не менее 1 млн клеток на образец окрашивали антителами к CD90, CD73, CD105, CD29, CD44, CD19, CD34, CD45, CD14 конъюгированные с флуорочромом фикоэритрином в соотношении 1:100 в течение 15 минут в темноте. В качестве изотипического контроля использовали антитела к иммуноглобулинам мыши IgG1-PE (Mylenyi Biotec, ФРГ), также в качестве контроля использовали неокрашенную супензию клеток.

После окраски антителами образцы отмывали в фосфатно-солевом буферном растворе и загружали в проточный цитофлуориметр. Измерения проводили с использованием лазера с длиной волны 488 нм. Клеточные популяции признавали принадлежащими к популяции ММСК, если экспрессия положительных маркеров составляла ≥95%, а негативных ≤2%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Первичные культуры ММСК альвеолярной слизистой оболочки ретромолярной области имели стандартную морфологию (рис. 1A) — веретенообразную удлиненную форму. Клетки стабильно пролиферировали, формировали монослой, в процессе культивирования и при пассировании сохраняли свои морфологические особенности (рис. 1B).

Иммунофенотип клеток соответствовал принятым критериям ММСК, более 90% клеток популяции несли положительные маркеры (CD73, CD90, CD105, CD44, CD29), негативные маркеры присутствовали менее чем у 1% клеток (CD14, CD19, CD34, CD45).

Цитотоксичность в цельной крови

В каждом эксперименте сравнивали два образца цельной крови: контрольный образец (добавка фосфатно-солевого буфера) и образец, инкубированный с остеопластическим материалом — КМ или ГАМ. После инкубации отбирали аликовты крови для измерения ХЛ. В качестве индуктора активации нейтрофилов использовали ФМА. В экспериментах наблюдали усиление ответа нейтрофилов на ФМА по мере увеличения времени инкубации

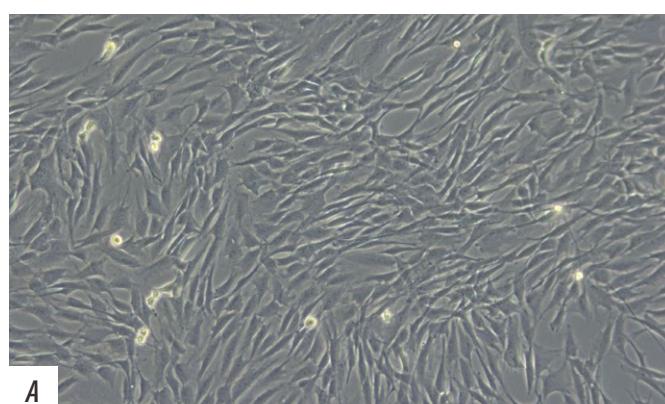


Рис. 1. Фенотип первичной культуры ММСК десны: А — 1-й пассаж; В — 3-й пассаж. Световая фазово-контрастная микроскопия, ув. 300

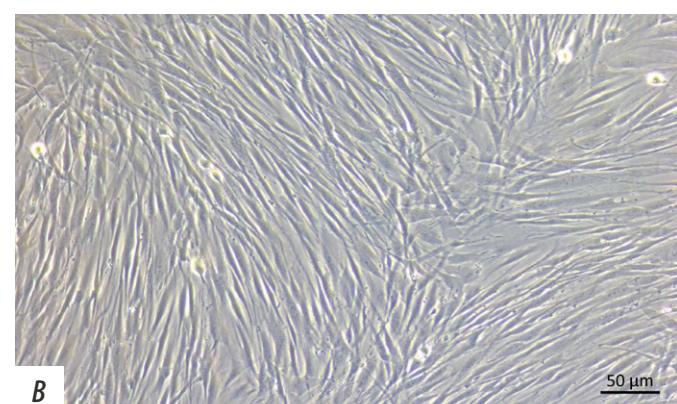


Fig. 1. The phenotype of the primary culture of MMSC gum: A — 1st passage; B — 3rd passage. Light phase contrast microscopy, mag. 300x

крови и материалов, однако временные зависимости для двух материалов были разные (рис. 2).

Индуцированное ГАМ увеличение ответа клеток на ФМА достигает максимума через 40 мин инкубации, что говорит о быстрой активации клеток. КМ, напротив,

не активирует нейтрофилы в крови по крайней мере до 40 минут инкубации, но дальнейший контакт материала с кровью усиливает ответ клеток на ФМА в полтора раза, аналогично тому, как это наблюдалось в случае ГАМ (см. таблицу).

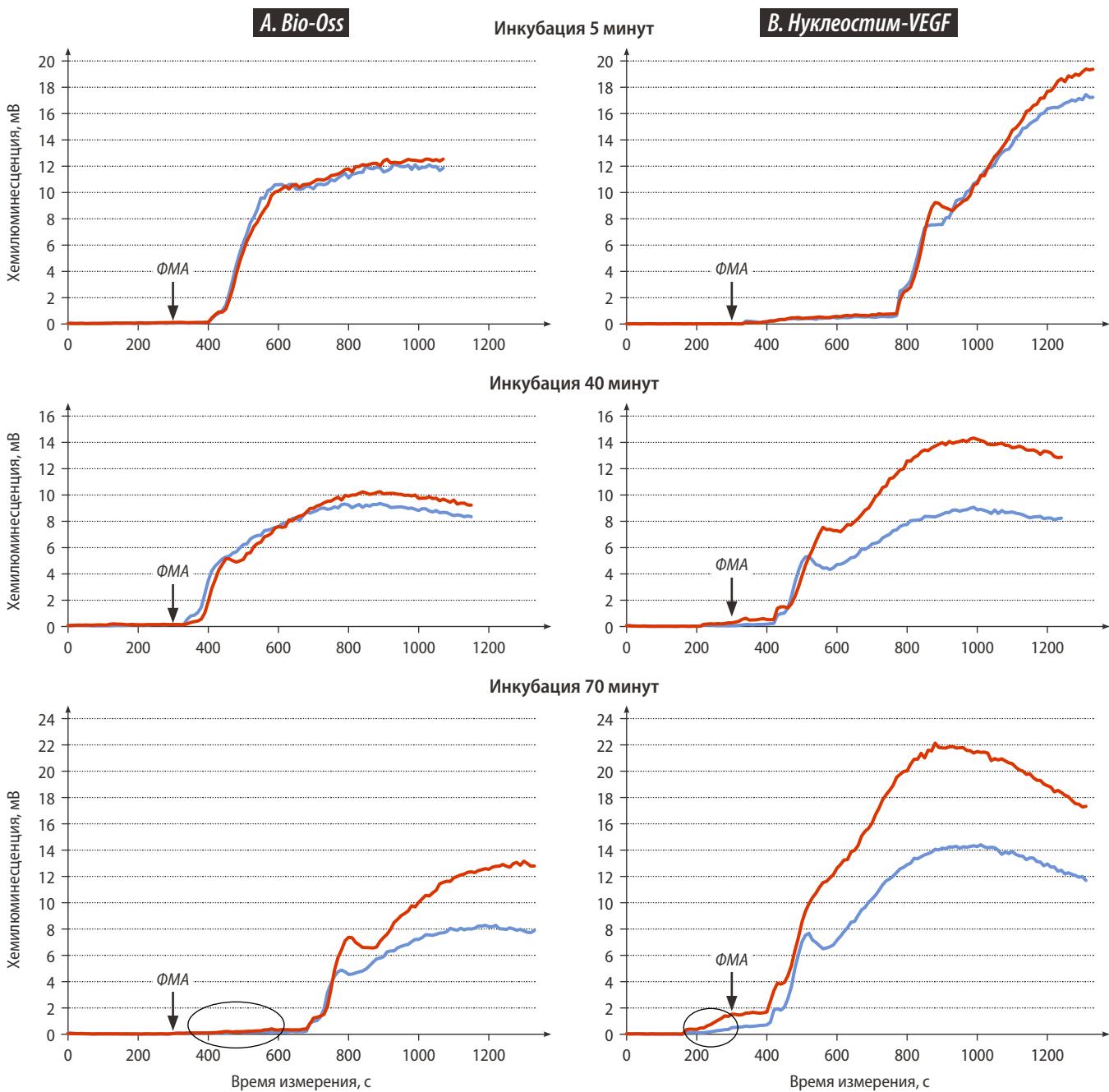


Рис. 2. Кинетика люминол-зависимой хемилюминесценции нейтрофилов крови, среднее значение при измерении трех независимых проб, взятых из одного образца (погрешность менее 15%): А — ксеногенный материал (Bio-Oss); В — ген-активированный остеопластический материал «Нуклеостим-VEGF». Инкубация с фосфатно-солевым буферным раствором (контроль, синяя кривая) или с остеопластическим материалом (красная кривая) при 36,7°C. Время инкубации 5, 40 и 70 минут. Кровь добавляли в момент времени 0 в кювету хемилюминометра с 485 мкл среды Кребса—Рингера (с NaHCO_3 и CaCl_2) и 200 мкмоль люминола. Стрелки указывают на добавление 100 нмоль форбол-12-миристат-13-ацетата (ФМА). Измерения проводили при 37°C до достижения максимума хемилюминесценции для всех образцов. Для времени инкубации 70 минут обведена собственная хемолюминесценция крови (до добавления ФМА)

Fig. 3. Kinetics of luminol-dependent chemiluminescence of blood neutrophils, the average value when measuring three independent samples taken from one sample (error less than 15%): A — xenogenic material (Bio-Oss); B — gene-activated osteoplastic material “Nucleostim-VEGF”. Incubation with phosphate-salt buffer solution (control, blue curve) or with osteoplastic material (red curve) at 36.7°C. Incubation time is 5, 40 and 70 minutes. Blood was added at time 0 to a chemiluminometer cell with 485 μl of Krebs—Ringer medium (with NaHCO_3 and CaCl_2) and 200 μmol of luminol. The arrows indicate the addition of 100 nmol of formbol-12-myristate-13-acetate (PMA). The measurements were carried out at 37°C until the maximum chemiluminescence was reached for all samples. For an incubation time of 70 minutes, the blood's own chemoluminescence is circled (before the addition of PMA)

Амплитуда кривой хемилюминесценции образцов остеопластических материалов, доля амплитуды хемилюминесценции контрольной пробы, к которой добавили натрий-фосфатный буфер (в %)

The amplitude of the chemiluminescence curve of samples of osteoplastic materials, the proportion of the amplitude of the chemiluminescence of the control sample, to which a sodium-phosphate buffer was added (in per-cent)

| Материал | Время инкубации, минуты | | |
|---|-------------------------|---------|---------|
| | 5 | 40 | 70 |
| Ксеногенный (Bio-Oss) | 104±8 | 115±22 | 132±38 |
| Ген-активированный «Нуклеостим-VEGF» | 108±7 | 149±35* | 152±47* |

Примечание. * — статистически достоверно значимое отличие от Bio-Oss ($p<0,05$, $n=3$, критерий Вилкоксона).

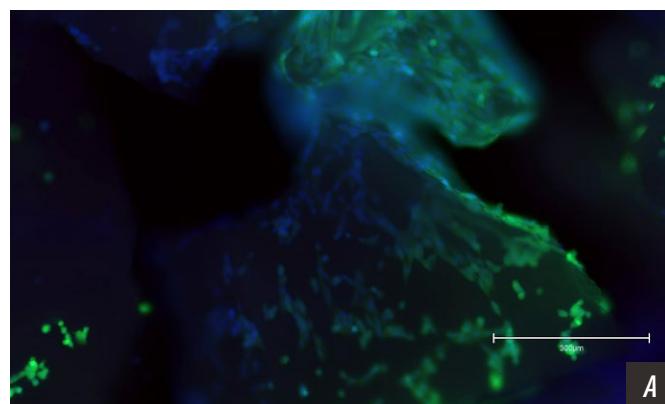
Биосовместимость и адгезия ММСК

При культивировании ММСК на поверхности гранул изучаемых остеопластических материалов клетки успешно адгезировали к поверхности частиц и оставались жизнеспособными как на 1-е, так и на 3-и сутки. При анализе образцов с помощью Live/Dead assay в эти сроки мертвых клеток обнаружено не было. ММСК

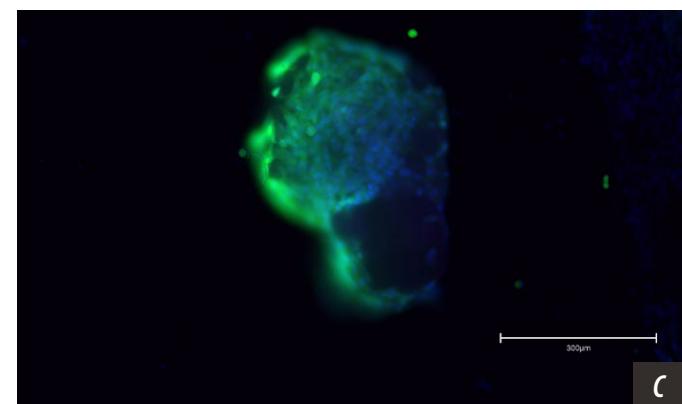
обнаруживали веретеновидной формы четко на поверхности гранул. Активная и равномерная адгезия ММСК происходила к гранулам ГАМ. На 1-е сутки площадь поверхности его гранул была покрыта монослоем ММСК (рис. 3А), тогда как на гранулах КМ клетки покрывали меньше $\frac{1}{2}$ площади поверхности гранул (рис. 3В). Спустя 3-е суток после посадки плотность ММСК на поверхности гранул КМ увеличилась до монослоя (рис. 3С). На поверхности ГАМ клетки по-прежнему покрывали более $\frac{3}{4}$ поверхности гранул и оставались жизнеспособными (рис. 3Д).

В 2016 г. В.В. Хоминец и соавт. изучали *in vivo* остеоиндуцицию, скорости reparативного остеогенеза и биодеградации ГАМ. На ранних сроках наблюдения гранулы материала были окружены новообразованной костью, а на 60-е сутки было зафиксировано полное заселение пространств между трабекулами костного репаратора и гранулами ГАМ [14].

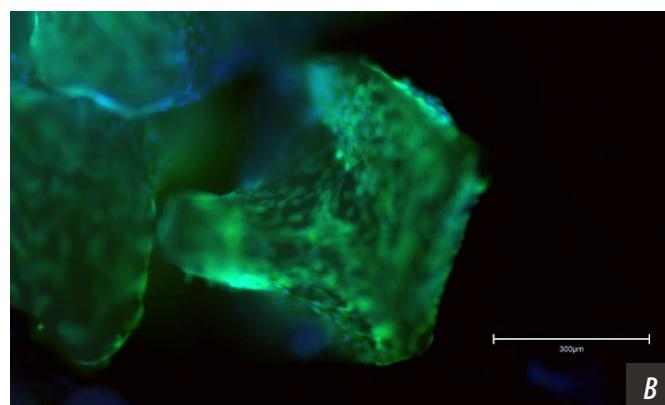
Исследование *in vivo* Г.А. Воложина и соавт. (2021) показало, что ГАМ обеспечивает ускорение и увеличивает эффективность reparативного остеогенеза. Однако, несмотря на удовлетворительные результаты в случае восполнения критических костных дефектов теменных костей кроликов, авторы указывают на необходимость



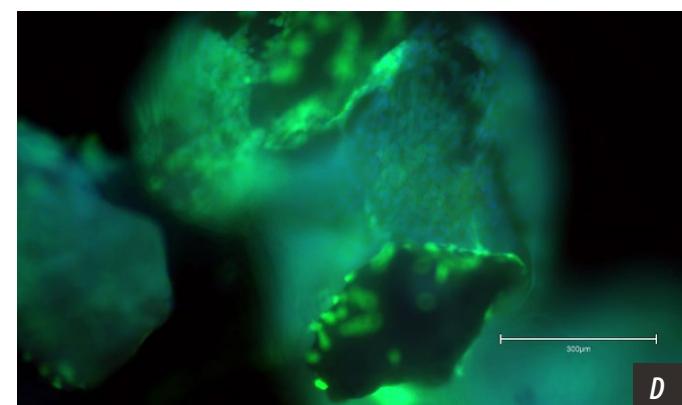
A



C



B



D

Рис. 3. Адгезия и жизнеспособность ММСК на поверхности гранул изучаемых остеопластических материалов: А — ксеногенный материал (Bio-Oss) на 1-е сутки культивирования; В — Bio-Oss на 3-и сутки; С — ген-активированный остеопластический материал «Нуклеостим-VEGF» на 1-е сутки; Д — «Нуклеостим-VEGF» на 3-и сутки. Веретеновидная форма клеток свидетельствует об их отличной адгезии к обоим материалам. Окраска на живые—мертвые клетки: зеленый — живые клетки (окраска кальцеином-АМ), красный — мертвые (окраска пропидия иодидом), синий — ядра (окраска бис-бензимидом)

Fig. 3. Adhesion and viability of MMSCs on the surface of granules of the studied osteoplastic materials: A — xenogenic material (Bio-Oss) on the 1st day of cultivation; B — Bio-Oss on the 3rd day; C — gene-activated osteoplastic material Nucleostim-VEGF on the 1st day; D — Nucleostim-VEGF on the 3rd day. The spindle-shaped shape of the cells indicates their excellent adhesion to both materials. Staining for living-dead cells: green — living cells (calcein-AM staining), red — dead (propidium iodide staining), blue — nuclei (bis-benzimide staining)

изучения механизма действия материала и длительности экспрессии терапевтического белка [2].

При культивировании ММСК на поверхности материалов и на 1-е и на 3-и сутки клетки имели веретено-видную морфологическую форму, что свидетельствовало об удовлетворительной адгезии к обоим материалам, а также об отсутствии цитотоксичности ГАМ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С помощью люминол-зависимой хемилюминесценции оба материала усиливают радикал-генерирующую активность нейтрофилов, однако эффекты отличаются во времени. Активация ген-активированным материалом быстрая и достигает максимума через 40 мин инкубации материала с кровью, тогда как ксеногенный

материал медленно активирует клетки, усиление ответа нейтрофилов на индуктор активации наблюдали не ранее, чем через 40 мин инкубации материала с кровью. Этого времени достаточно для имплантации материала, так что можно ожидать, что ксеногенный материал не будет влиять на нейтрофилы крови в процессе операции. Активная и равномерная адгезия ММСК происходила к гранулам ген-активированного материала, что может свидетельствовать о его безопасности биосовместимости и способности поддерживать жизнеспособность ММСК. Полученные данные могут быть полезными при разработке новых материалов для тканевой инженерии и регенеративной медицины.

Поступила/Received: 06.09.2024

Принята в печать/Accepted: 01.03.2025

ЛИТЕРАТУРА:

1. Ушаков А.И., Юрьев Е.М. Дентальная имплантация и выбор костно-пластических материалов в зависимости от типа костной ткани челюстей. — *Российская стоматология*. — 2016; 2: 12—17. [eLibrary ID: 26287578](#)
2. Воложин Г.А., Базикян Э.А., Деев Р.В., Бозо И.Я., Пресняков Е.В. Оценка регенерации костной ткани пациентов после имплантации биоинженерного остеозамещающего материала на основе синтетического октакальцийфосфата, активированного плазмидной ДНК с геном сосудистого эндотелиального фактора роста. — *Эндодонтия Today*. — 2021; 4: 343—349. [eLibrary ID: 47578346](#)
3. Амхадова М.А., Атабиев Р.М., Амхадов И.С., Цукаев К.А. Клиническо-экспериментальное обоснование применения отечественных резорбируемых мембран при направленной регенерации костной ткани. — *Медицинский алфавит*. — 2018; 34 (371): 41—45. [eLibrary ID: 37010235](#)
4. Тарба И.И. Замещение костных дефектов посредством персонализированной тканеинженерной конструкции *in vivo*. — *Пародонтология*. — 2023; 1: 49—54. [eLibrary ID: 50451534](#)
5. Рыжова И.П., Погосян Н.М., Чуев В.В., Плугатыр А.А., Новожилова М.С., Авдеев Е.Н., Иванов С.Ю. Результаты клинических исследований метода сохранения костной ткани перед имплантацией. — *Клиническая стоматология*. — 2021; 2: 37—42. [eLibrary ID: 46322599](#)
6. Олесова В.Н., Хафизов Р.Г., Шматов К.В., Иванов А.С., Мартынов Д.В. Динамика остеоинтеграции конструкционных материалов дентальных имплантатов, по данным электронномикроскопической оценки и элементного анализа состава костной ткани. — *Российский стоматологический журнал*. — 2018; 4: 172—175. [eLibrary ID: 36798317](#)
7. Ortiz-Puigpelat O., Simões A., Caballé-Serrano J., Hernández-Alfaro F. Blood absorption capacity of different xenograft bone substitutes. An *in-vitro* study. — *J Clin Exp Dent*. — 2019; 11 (11): e1018—e1024. [PMID: 31700576](#)
8. Бозо И.Я., Деев Р.В., Дробышев А.Ю., Комлев В.С., Рожков С.И., Еремин И.И., Далгатов И.Г., Воложин Г.А., Грачев В.И., Федотов А.Ю., Исаев А.А. Эффективность ген-активированного остеопластического материала на основе октакальциевого фосфата и плазмидной ДНК с геном VEGF в восполнении «критических» костных дефектов. — *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова*. — 2015; 1: 35—42. [eLibrary ID: 23272696](#)

REFERENCES:

1. Ushakov A.I., Yur'ev E.M. Dental implantation and the choice of the osteoplastic materials taking into consideration the type of the bone tissue of human jaws. *Russian Stomatology*. 2016; 2: 12—17 (In Russian). [eLibrary ID: 26287578](#)
2. Volozhin G.A., Bazikian E.A., Deev R.V., Bozo I.E., Presnyakov E.V. Assessment of regeneration of the bone tissue of patients after implantation of the bioengineering osteoreplacing material on the basis of the synthetic octacalcium phosphate activated with plasmid DNA with vascular endothelial growth factor gene. *Endodontics Today*. 2021; 4: 343—349 (In Russian). [eLibrary ID: 47578346](#)
3. Amkhadova M.A., Atabiev R.M., Amkhadov I.S., Tsukaev K.A. Clinical and experimental substantiation of the application of domestic resorbable membranes in guided bone tissue regeneration. *Medical alphabet*. 2018; 34 (371): 41—45 (In Russian). [eLibrary ID: 37010235](#)
4. Tarba I.I. Customized *in-vivo* tissue engineering for bone grafting. *Parodontologiya*. 2023; 1: 49—54 (In Russian). [eLibrary ID: 50451534](#)
5. Ryzhova I.P., Pogosyan N.M., Chuev V.V., Plugatyr A.A., Novozhilova M.S., Adveev E.N., Ivanov S.Yu. Clinical trial results method of preserving bone tissue before implantation. *Clinical Dentistry (Russia)*. 2021; 2: 37—42 (In Russian). [eLibrary ID: 46322599](#)
6. Olesova V.N., Khafizov R.G., Shmatov K.V., Ivanov A.S., Martynov D.V. Dynamics of osteointegration of construction materials of dental implants on electron-microscopic estimation data and elemental analysis of the composition of bone tissue. *Russian Journal of Dentistry*. 2018; 4: 172—175 (In Russian). [eLibrary ID: 36798317](#)
7. Ortiz-Puigpelat O., Simões A., Caballé-Serrano J., Hernández-Alfaro F. Blood absorption capacity of different xenograft bone substitutes. An *in-vitro* study. *J Clin Exp Dent*. 2019; 11 (11): e1018—e1024. [PMID: 31700576](#)
8. Bozo I.Ya., Deev R.V., Drobyshev A.Yu., Komlev V.S., Rozhkov S.I., Eryomin I.I., Dalgalatov I.G., Volozhin G.A., Grachyov V.I., Fedotov A.Yu., Isaev A.A. Efficacy of gen-activated osteoplastic material based on octacalcium phosphate and plasmid DNA containing VEGF gene for critical-sized bone defects substitution. *N.N. Priorov Journal of Traumatology and Orthopedics*. 2015; 1: 35—42 (In Russian). [eLibrary ID: 23272696](#)

9. Деев Р.В., Дробышев А.Ю., Бозо И.Я., Галецкий Д.В., Королев В.О., Еремин И.И., Филоненко Е.С., Киселев С.Л., Исаев А.А. Создание и оценка биологического действия ген-активированного остеопластического материала, несущего ген VEGF человека. — Клеточная трансплантомология и тканевая инженерия. — 2013; 3: 78—85. [eLibrary ID: 21033822](#)
10. Deev R.V., Drobyshev A.Y., Bozo I.Y., Isaev A.A. Ordinary and activated bone grafts: Applied classification and the main features. — *Biomed Res Int.* — 2015; 2015: 365050. [PMID: 26649300](#)
11. Деев Р.В., Дробышев А.Ю., Бозо И.Я. Ординарные и активированные остеопластические материалы. — *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова.* — 2015; 1: 51—69. [eLibrary ID: 23272699](#)
12. Volozhin G.A. Comparative study of geneactivated bone substitute and xenogenic bone matrix in alveolar ridge augmentation. — Clinical trial NCT04511689, 2020. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04511689>
13. Bozo I.Y., Deev R.V., Drobyshev A.Y., Isaev A.A., Eremin I.I. World's first clinical case of gene-activated bone substitute application. — *Case Rep Dent.* — 2016; 2016: 8648949. [PMID: 27891264](#)
14. Хоминец В.В., Деев Р.В., Кудяшев А.Л., Михайлов С.В., Шакун Д.А., Комаров А.В., Бозо И.Я., Щукин А.В., Фоос И.В. Применение ген-активированного остеопластического материала при лечении несращения бедренной кости: клинический случай. — *Травматология и ортопедия России.* — 2021; 1: 66—74. [eLibrary ID: 45594338](#)
9. Deev R.V., Drobyshev A.Y., Bozo I.Y., Galetsky D.V., Korolev O.V., Eremin I.I., Philonenko E.S., Kiselev S.L., Isaev A.A. Construction and biological effect evaluation of gene-activated osteoplastic material with human VEGF gene. *Cellular Transplantation and Tissue Engineering.* 2013; 3: 78—85 (In Russian). [eLibrary ID: 21033822](#)
10. Deev R.V., Drobyshev A.Y., Bozo I.Y., Isaev A.A. Ordinary and activated bone grafts: Applied classification and the main features. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 365050. [PMID: 26649300](#)
11. Deev R.V., Drobyshev A.Yu., Bozo I.Ya. Ordinary and activated osteoplastic materials. *N.N. Priorov Journal of Traumatology and Orthopedics.* 2015; 1: 51—69 (In Russian). [eLibrary ID: 23272699](#)
12. Volozhin G.A. Comparative study of geneactivated bone substitute and xenogenic bone matrix in alveolar ridge augmentation. Clinical trial NCT04511689, 2020. <https://clinicaltrials.gov/study/NCT04511689>
13. Bozo I.Y., Deev R.V., Drobyshev A.Y., Isaev A.A., Eremin I.I. World's first clinical case of gene-activated bone substitute application. *Case Rep Dent.* 2016; 2016: 8648949. [PMID: 27891264](#)
14. Khominets V.V., Deev R.V., Kudyashev A.L., Mikhailov S.V., Shakun D.A., Komarov A.V., Bozo I.Y., Schukin A.V., Foos I.V. Treatment of femoral non-union with the gene-activated osteoplastic material: A case report. *Traumatology and Orthopedics of Russia.* 2021; 1: 66—74 (In Russian). [eLibrary ID: 45594338](#)