

ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ СОЗДАНИЯ ФИБРИНОВЫХ СКАФФОЛДОВ, ЗАСЕЛЕННЫХ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ПУЛЬПЫ ЗУБА, ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ ЧЕЛЮСТИ

Домбровская Ю. А.^{1*}, Енукашвили Н. И.^{1,2*}, Котова А. В.^{1,2},
Билык С. С.³, Коваленко А. Н.³, Силин А. В.¹

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Северо-Западный государственный медицинский университет имени И. И. Мечникова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

²Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии Российской академии наук, Санкт-Петербург, Россия

³Федеральное государственное бюджетное учреждение «Российский орден Трудового Красного Знамени научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии имени Р. Р. Вредена» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Санкт-Петербург, Россия

*авторы внесли равный вклад в работу

Контактная информация:

Енукашвили Натэлла Иосифовна,
ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова
Минздрава России,
ул. Кирочная, д. 41, Санкт-Петербург,
Россия, 191015.
E-mail: n.enukashvily@incras.ru

*Статья поступила в редакцию 26.11.2019
и принята к печати 30.01.2020.*

Резюме

Актуальность. Подбору трехмерных скаффолдов из биосовместимых материалов в стоматологии уделяется большое внимание. С их помощью можно создать оптимальные условия для дифференцировки клеток, васкуляризации и ремоделирования регенерирующей костной ткани. Тканевая инженерия и 3D-технологии позволяют генерировать трехмерные структурно-функциональные матрицы, которые полностью соответствуют тканям, нуждающимся в реконструкции. Заселение таких скаффолдов клетками, способными к остеогенной дифференцировке, в перспективе может привести к разработке конструкций, позволяющих восстанавливать дефекты костной ткани челюстно-лицевого отдела.

Цель исследования. Оценка возможности создания скаффолдов, разработанных на основе 3D-моделирования дефектов костной ткани челюсти и заселенных стволовыми клетками пульпы зуба.

Материалы и методы. Проведен анализ данных компьютерной томографии костной ткани челюстей. Анатомический прототип вестибулярного и небного фрагментов костной ткани с существующими дефектами был создан на основе трехмерной модели с применением 3D-печати. Для создания замещающего материала на основе полученных форм использовали фибриновый клей, который получали из концентрата аутологичной плазмы крови с использованием рекомбинантного тромбина неживотного происхождения. Фибриновый клей смешивали с клетками паспортизированной культуры ранних (2–3) пассажей стволовых клеток пульпы зуба (СКПЗ).

Результаты. Фибриновый клей, приготовленный на основе концентрата аутологичной плазмы (фибриноген 20 г/л), сохраняет форму в течение 4 дней. На 5 день сжатие сгустка становится хорошо заметным, на 7 день размеры сгустка уменьшаются более чем на 50 %. Проллиферативная активность клеток при выращивании как внутри скаффолда, так и в 2D-условиях на адгезивном культуральном пластике,

не различались. Иммунофенотип клеток обеих групп соответствовал иммунофенотипу мезенхимных клеток, что является одним из свойств СКПЗ. Окраска Ализариновым красным клеток как выращиваемых на адгезивном культуральном пластике, так и извлеченных из клея на 10 день после индукции остеогенной дифференцировки, не различалась.

Заключение. Показана возможность использования фибринового клея для получения материала с механическими характеристиками, достаточными для получения материала стабильной формы, определяемой 3D-матрицей. Доказана способность стволовых клеток пульпы зуба, заключенных в скаффолд на основе фибринового клея, сохранять жизнеспособность, иммунофенотип и способность к остеогенной дифференцировке. Таким образом, данная технология в перспективе может быть использована для восстановления костной ткани в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии.

Ключевые слова: клеточные технологии в стоматологии, костный дефект, скаффолд, стволовые клетки пульпы зуба, 3D-печать форм для скаффолдов, фибриновый клей.

Для цитирования: Домбровская Ю.А., Енукашвили Н.И., Котова А.В., Билык С.С., Коваленко А.Н., Силин А.В. Оценка возможности создания фибриновых скаффолдов, заселенных стволовыми клетками пульпы зуба, для замещения костных дефектов челюсти. *Трансляционная медицина.* 2020;7(1):59–69. doi:10.18705/2311-4495-2020-7-1-59-69

FIBRIN SCAFFOLDS CONTAINING DENTAL PULP STEM CELLS FOR THE REPAIR OF PERIODONTAL BONE DEFECTS

Dombrovskaya Yu. A.^{1*}, Eukashvily N. I.^{1,2*}, Kotova A. V.^{1,2}, Bilyk S. S.³, Kovalenko A. N.³, Silin A. V.¹

¹North-Western State Medical University named after I. I. Mechnikov, Saint Petersburg, Russia

²Institute of Cytology of the Russian Academy of Science, Saint Petersburg, Russia

³Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Saint Petersburg, Russia

*equal contribution

Corresponding author:

Eukashvily Natella I.,
North-Western State Medical University
named after I. I. Mechnikov,
Kirochnaya str. 41, Saint Petersburg, Russia,
191015.
E-mail: n.eukashvily@incras.ru

*Received 26 November 2019; accepted
30 January 2020.*

Abstract

Background. 3D scaffolds plays an important role in developing new approaches in modern dentistry. They are used to establish optimal conditions for cell differentiation, vascularization and remodeling of regenerating bone tissue.

Objective. Evaluation of the possibility of creating scaffolds developed on the basis of 3D modeling of periodontal bone defects and containing tooth pulp stem cells.

Materials and Methods. The computer tomography data of the maxillar bone tissue defect were analysed. Anatomical prototype — a mold representing defects of the vestibular and palatal fragments of bone tissue was created by 3D printing. This 3D form was filled with fibrin glue and dental pulp stem cells. The fibrin glue was prepared from autologous blood plasma and mixed with dental pulp stem cells.

Results. Fibrin glue prepared from an autologous plasma concentrate (fibrinogen 20 g/l) retains its shape for 4 days. On the day 5, the clot retraction became clearly visible and on the day 7, the clot diameter decreased to 50 % of the original size. The proliferation rate of cells, grown both inside the scaffold and in 2D conditions, did not differ. The immunophenotype of cells of both groups corresponded to the immunophenotype of mesenchy-

mal stromal cells. The mesenchymal immunophenotype is a feature of dental stem cells. Alizarin red staining of cells both grown on adhesive culture plastic and extracted from glue on day 10 after the induction of osteogenic differentiation did not differ.

Conclusion. The fibrin glue is a good material for creation a scaffold with suitable mechanical characteristics. The cells enclosed in the fibrin glue maintain their viability, immunophenotype and osteogenic potential. This technology can be used for bone tissue repair in dentistry and maxillofacial surgery.

Key words: bone defect, cell technologies in dentistry, dental pulp stem cells, fibrin glue, scaffold, 3D printed scaffold mold.

*For citation: Dombrovskaya Yu.A., Erukashvily N.I., Kotova A.V., Bilyk S.S., Kovalenko A.N., Silin A.V. Fibrin scaffolds containing dental pulp stem cells for the repair of periodontal bone defects. *Translyatsionnaya meditsina=Translational Medicine*. 2020;7(1):59–69. (In Russ.). doi:10.18705/2311-4495-2020-7-1-59-69*

Список сокращений:

СКПЗ — стволовые клетки пульпы зуба.

Введение

Современный мультидисциплинарный подход в решении проблемы создания скаффолд-технологий для регенерации костной ткани актуален и имеет огромный потенциал. Тканевая инженерия и 3D-технологии позволяют генерировать трехмерные структурно-функциональные матрицы — скаффолды, форма которых воспроизводит форму дефекта ткани, нуждающейся в реконструкции [1].

В настоящее время использование трехмерных скаффолдов в различных областях медицины позволяет добиться успешного результата не только за счет объемного замещения дефекта, но и стимуляции местных репаративных процессов, способствующих полному восстановлению функции [2].

Подбору трехмерных скаффолдов из биосовместимых материалов в стоматологии уделяется большое внимание. Основное их назначение — создание оптимальных условий для дифференцировки клеток, васкуляризации и ремоделирования регенерирующей костной ткани [3].

Такие скаффолды, благодаря точному повторению формы дефекта и биосовместимым материалам (в идеальной ситуации — тканеспецифичным), интегрируются в ткань пациента, являясь источником факторов роста и дополнительной областью клеточной адгезии для прикрепления, пролиферации и функционирования клеток, а внесенные в матрикс стволовые клетки пульпы зуба, будучи мультипотентными и плюрипотентными, способны дифференцироваться в клетки тканей зуба и периодонта [4, 5, 6, 7]. Кроме этого, за счет паракринных механизмов они воздействуют на собственные клетки реципиента, ускоряя процессы регенерации и подавляя воспалительные процессы [4, 8]. Осо-

бенностью стволовых клеток пульпы зуба (СКПЗ) и других популяций стволовых клеток ротовой полости является их эктодермальное происхождение при мезодермальном фенотипе [8]. Эти клетки обладают рядом уникальных особенностей, в частности способны дифференцироваться в одонтобласты, синтезировать межклеточный матрикс дентина и цемента, обеспечивать рост нерва и сосудов пульпы. В связи с этим их рассматривают как перспективный материал для лечения различных заболеваний ротовой полости, а также восстановления ткани пульпы, зубной эмали, периодонта методами регенеративной терапии [4, 8].

Для эффективного функционирования клетки должны быть скомбинированы со скаффолдом, который обеспечит прикрепление, пролиферацию, дифференцировку и миграцию клеток. Скаффолды на основе фибриногена затвердевают за счет расщепления фибриногена аутологичной плазмы крови пациента или донора [9, 10, 11]. Необходимую степень жесткости можно получить варьируя количество фибриногена и соотношение его с количеством тромбина, а также введением дополнительных компонентов, например коллагена [9, 10, 12].

Целью исследования являлась оценка возможности создания скаффолдов, разработанных на основе 3D-моделирования дефектов костной ткани челюсти и заселенных стволовыми клетками пульпы зуба.

Материалы и методы

Соблюдение этических стандартов

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам локального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

Создание 3D-модели анатомического прототипа

Проведен анализ данных спиральной компьютерной томографии костной ткани челюстей, выполненной на томографе Toshiba Aquilion Prime, оснащенный алгоритмом подавления металлических артефактов, шаг срезов — 1 мм.

С помощью специализированного программного обеспечения 3D Slicer 4.10.2 на основании срезов компьютерной томографии выполнена визуализация, сегментация и трехмерная реконструкция твердых тканей зубов, костной ткани и границ ее дефектов. Анатомический прототип вестибулярного и небного фрагментов костной ткани с существующими дефектами был создан на основе трехмерной модели с применением 3D-печати на основании технологии послойного сплавления (fused deposition modeling, FDM) филамента из полимолочной кислоты.

Клеточная культура

В работе использована паспортизированная культура ранних (2–3) пассажей стволовых клеток, выделенная из пульпы третьего моляра (№ 38) мужчины 25 лет. Показаниями к удалению являлись ретенция и дистопия. Паспортизация проводилась на основании внутренних стандартов учреждения (НИЛ клеточных технологий ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России), базирующихся на общей фармакопейной статье Минздрава России «Требования к клеточным культурам субстратам производства иммунобиологических лекарственных препаратов» [13] и базовых принципах паспортизации клеточных культур для регенеративной терапии [14]. Паспортизация включала в себя: проверку отсутствия инфекций (*Mycoplasma genitalium*, *M. hominis*, HIV1, 2, *Treponema pallidum*, HBV, HVC), кариотипирование (46XX, n = 25), иммунофенотипирование, оценку жизнеспособности до криоконсервации и после вывода из нее, тест на дифференцировку в трех направлениях (ади-по-, остео- и хондрогенном), а также генетическую идентификацию материала. Клетки получали из пульпы зуба, как описано ранее [15]. В дополнение к описанной методике, зуб инкубировали в растворе антибиотика и антимикотика, затем в 70 %-ом этаноле (для уничтожения клеток лигаментных связок с целью получения чистой культуры СКПЗ), затем через корневой канал (со стороны верхушки корня, апикальную часть которого удалили для удобства манипуляций) через иглу 31G вводили раствор коллагеназ и инкубировали 1 час при 37 °С. Диссоциированную ткань пульпы вымывали, промывали изотоничным раствором хлорида натрия

и культивировали далее на адгезивном культуральном пластике (TPP, Швейцария) в среде DMEM (1 г/л глюкозы), содержащей 10 % ASCM Supplement (HyClone, США), а также антибиотик пенициллин и антимикотик стрептомицин (далее — «стандартные условия»).

Приготовление фибринового клея

Фибриновый клей, содержащий стволовые клетки, получали как описано ранее [10, 11]. В данном исследовании использовали модифицированную методику. Вместо получения фибриногена из криопреципитата, концентрацию фибриногена повышали (до 20 г/л), центрифугируя плазму крови, полученную от того же донора, что и зуб, в концентраторах с диаметром пор 100 кДа (Sartorius, Германия). Концентрацию фибриногена определяли в сторонней организации (Северо-Западный центр доказательной медицины). Для активации образования сгустка добавляли тромбин (200U/мл, Baxter, США) и CaCl₂ (2 г/л, Marichem, Швейцария), в качестве ингибитора фибринолиза использовали ε-аминокапроновую кислоту (2 г/л, Мосфарм, Россия). Концентрация клеток в получаемом геле составляла 1.2 млн/мл. Для оценки ретракции фибринового сгустка клей заливали в лунки 24-луночного планшета, после окончания полимеризации сверху наслаивали физиологический раствор для предотвращения высыхания и измеряли диаметр сгустка через 1, 12, 24, 72, 120 и 168 часов.

Для формирования геля необходимой формы использовали полученный описанным выше способом на основе трехмерной модели анатомический прототип (рис. 1).

Морфофункциональная характеристика СКПЗ

После полимеризации геля, полученный скаффолд, содержащий клетки, переносили в культуральную среду и культивировали 7 дней. Для оценки жизнеспособности, иммунофенотипа и остеогенной дифференцировки собирали все клетки — покинувшие гель и оставшиеся в нем. Для извлечения клеток из скаффолда последний вначале измельчали скальпелем на фрагменты примерно 0,5 × 0,5 см, далее обрабатывали трипсином и инкубировали с плазмой, обедненной по тромбоцитам (platelet poor plasma) 3 часа при 37 °С, как описано Elnager et al., 2014 [16]. Затем образец пипетировали, смешивали с клетками, покинувшими гель, и для проточной цитометрии пропускали через фильтровальные сита 70 мкм. Для остеогенной дифференцировки высевали на адгезивный пластик в стандартные условия и далее обрабатывали, как

описано ниже. Оценивали жизнеспособность (методом проточной цитометрии, окрашивая клетки 7-AAD), пролиферативный потенциал [путем подсчета числа клеток в чашках Петри с нанесенной сеткой для подсчета (Nunc)] и остеогенный потенциал клеток. Для оценки остеогенного потенциала на 8 день культивирования клеток в геле их извлекали из геля, собирали клетки, мигрировавшие из геля, и переносили в другую чашку Петри с аналогичной культуральной средой. На следующий день среду заменяли на остеогенную MSCgo™ Rapid Osteogenic Differentiation Medium (Biological Industries, Израиль) и культивировали 10 дней — в данной среде за это время достигается максимальное окрашивание Ализарином, согласно рекомендациям производителя. После этого клетки фиксировали и окрашивали Ализарином [17].

Имунофенотипирование клеток проводили с использованием проточного цитометра Navios (Beckman Coulter), оборудованного полупроводниковыми диодными лазерами 488 нм и 638 нм и стандартным набором светофильтров от про-

изводителя (синий лазер: 525/40, 575/30, 614/20, 695/30, 755LP; красный лазер: 660/20, 725/20, 755 LP). Использовали следующие панели моноклональных антител (Beckman Coulter) для определения положительных и отрицательных маркеров иммунофенотипа мезенхимных стромальных клеток, характерного и для СКПЗ: CD44-FITC/CD73-PE/CD90PC5/CD105-PC7 и CD34-FITC/CD117-PE/CD14-PC5/CD45-PC7. Дополнительно использовали третью панель, включающую только антитела к HLA-DR-FITC для определения экспрессии человеческого лейкоцитарного антигена II типа (HLA II класса). Гейтирование графиков флуоресценции клеточных маркеров проводили по «живым» клеткам (выделены по параметрам прямого и бокового светорассеяния и окрашиванию 7-аминоактиномицином). Границы аутофлуоресценции определяли по неокрашенному контрольному образцу. Границы неспецифического связывания антител определяли с помощью изотипических контролей (иммуноглобулины мыши, конъюгированные с FITC, PE, PC5, PC7).

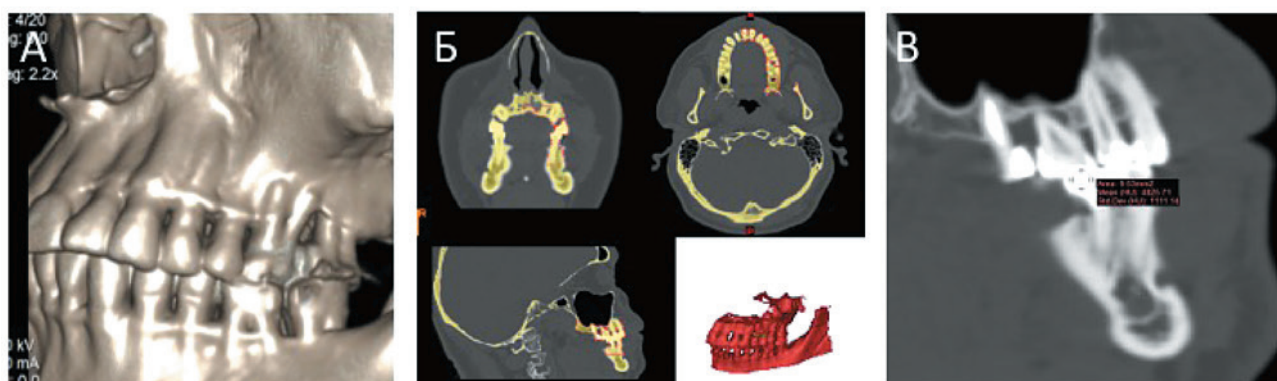


Рис. 1. Срезы, выполненные при анализе компьютерной томографии:

А — 3D-визуализация твердых тканей верхней и нижней челюстей, Б — аксиальная проекция костного дефекта на верхней челюсти слева, В — корональная проекция дефектов костной ткани и зубов верхней челюсти

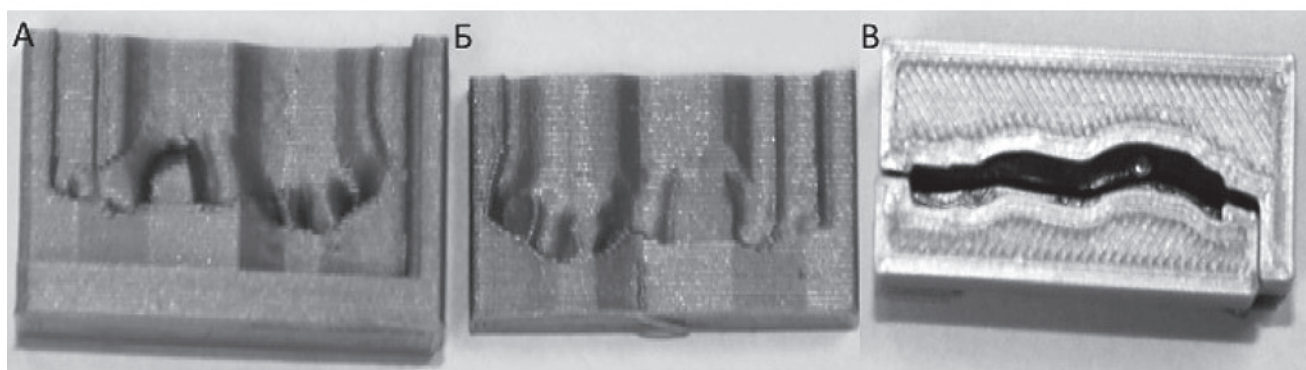


Рис. 2. 3D-форма для заливки скаффолда, соответствующего имеющемуся дефекту:

А, Б — стенки формы, В — собранная форма для заливки фибринового клея и клеток

*Статистическая обработка данных
и критерии статистической значимости*

Все эксперименты выполняли в трех повторностях. Для оценки значимости различий ($p < 0,05$) использовали множественный t-test. Анализ полученных данных и построение графиков проводили в программе GraphPad Prism 7. Данные представлены в виде среднего \pm ошибка среднего ($M \pm m$).

Результаты

Проведено построение трехмерной модели костей челюсти и зубов на основании сегментирования КТ-срезов (рис. 1).

С помощью полученных 3D-форм с толщиной стенок 1–1,5 мм, состоящих из вестибулярной и небной пластин и заполняемых фибриновым клеем и стволовыми клетками пульпы зуба, удалось получить структуры, соответствующие и анатомически полностью восстанавливающие костную ткань (рис. 2). По своей трехмерной структуре синтезированный скаффолд полностью конгруэнтен форме дефекта костной ткани на модели.

Пролиферативная активность клеток как при выращивании внутри скаффолда, так и при стандартных условиях, не различалась (рис. 3). Статистически значимых различий в каждой точке между контролем (выращивание в стандартных условиях) и экспериментом (выращивание в фибриновом геле) обнаружено не было.

Иммунофенотип клеток обеих групп соответствовал иммунофенотипу мезенхимных клеток

(табл. 1), что является одним из свойств СКПЗ [4]. Статистически значимых различий зарегистрировано не было. Как и мезенхимные стромальные клетки, СКПЗ не презентуют на клеточной поверхности антиген HLA-DR, относящийся к HLA II класса. Мы также не выявили статистически значимых различий в скорости формирования кальцификатов при остеогенной дифференцировке — при использовании выбранной нами среды как время появления первых кальцификатов, так и площадь, ими занимаемая при окончании культивирования в остеогенной среде, статистически значимо не различались (рис. 4).

Для фибриновых клеев характерно быстрое изменение формы за счет сжатия сгустка. Однако это явление наблюдается при низкой концентрации фибриногена (менее 10 г/л). При использовании нами плазмы, сконцентрированной до концентрации фибриногена 20 г/л, а также ингибитора фибринолиза ϵ -аминокапроновой кислоты подобное уменьшение не регистрировалось в течение первых 4 дней, через 5 дней объем сгустка уменьшался в среднем на $22,0 \pm 3,2$ %, через 7 — на $57,25 \pm 4,7$ % (рис. 5).

Показано при изучении структуры фибринового клея, что в зависимости от концентрации фибриногена меняются не только реологические, механические параметры сгустка, но и размер пор, образующихся при полимеризации между волокнами фибрина [18]. Наличие пор, размер которых позволяет клеткам мигрировать в/из скаффолда, является желательным параметром при подборе скаффолда.

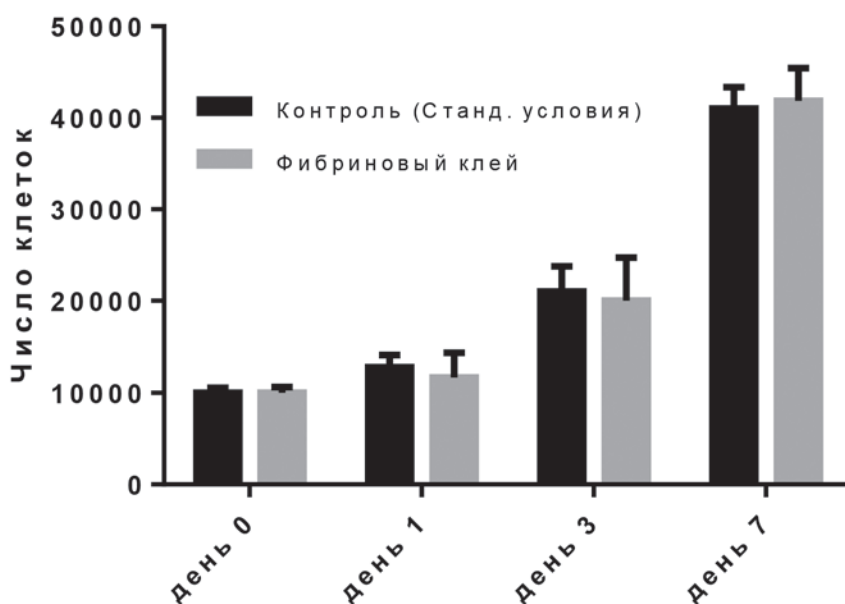


Рис. 3. Пролиферативная активность клеток, выращиваемых в фибриновом клее и в стандартных условиях (контроль):

по горизонтали — дни культивирования клеток после посева; по вертикали — число клеток на лунку. Данные представлены в виде $M \pm m$

В наших экспериментах при отсутствии изменения формы сгустка в условиях *in vitro* наблюдалась миграция клеток из фибринового клея (рис. 6), что говорит о том, что поры клея позволяют клеткам мигрировать из клея.

Обсуждение

В данной работе мы показали техническую возможность создания заселенного клетками скаффолда, форма которого точно соответствует анатомическому дефекту кости челюсти. Технологии

Таблица 1. Иммунофенотип клеток СКПЗ, растущих в стандартных условиях и в фибриновом клее. Данные представлены в виде $M \pm m$

Поверхностный маркер	Клетки в фибриновом клее (% окрашенных клеток)	Клетки в стандартных условиях (% окрашенных клеток)
CD90	99,5 ± 0,82	99,4 ± 1,4
CD105	99,1 ± 1,1	99,8 ± 0,85
CD44	99,7 ± 0,82	98,9 ± 1,2
CD73	98,7 ± 0,91	98,8 ± 0,5
CD45	0,1 ± 0,07	0
CD34	0	0
CD14	0,5 ± 0,12	0,4 ± 0,2
CD117	0,4 ± 0,24	0
HLA-DR	0	0

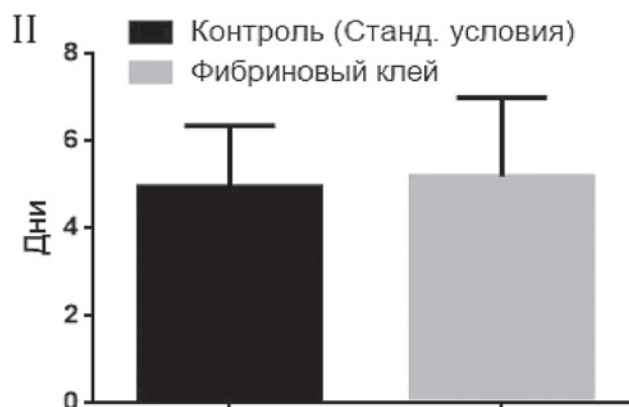
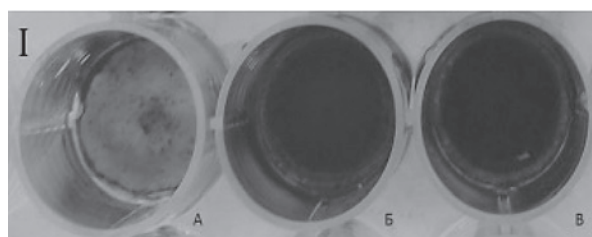


Рис. 4. Остеогенный потенциал СКПЗ, растущих в фибриновом клее:

I — вид культурального планшета после окрашивания Ализариновым красным кальцификатов клеток, растущих в стандартных условиях (Б) и после культивирования в фибриновом клее (В) на 10 день после добавления остеоиндуктивной среды; А — фоновое окрашивание недифференцированных клеток, растущих в стандартных условиях;

II — диаграмма появления первых кальцификатов после добавления остеоиндуктивной среды: по горизонтали — исследуемые группы; по вертикали — день появления первых кальцификатов. Данные представлены в виде $M \pm m$

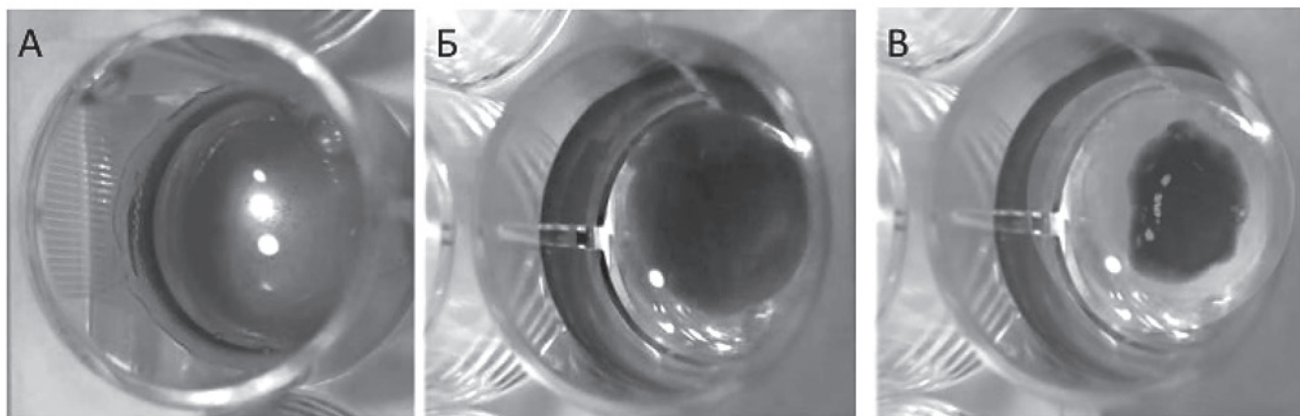


Рис. 5. Ретракция сгустка фибринового клея в условиях *in vitro* под слоем физиологического раствора:

А — через 1 час после приготовления, Б — через 5 дней, В — через 7 дней

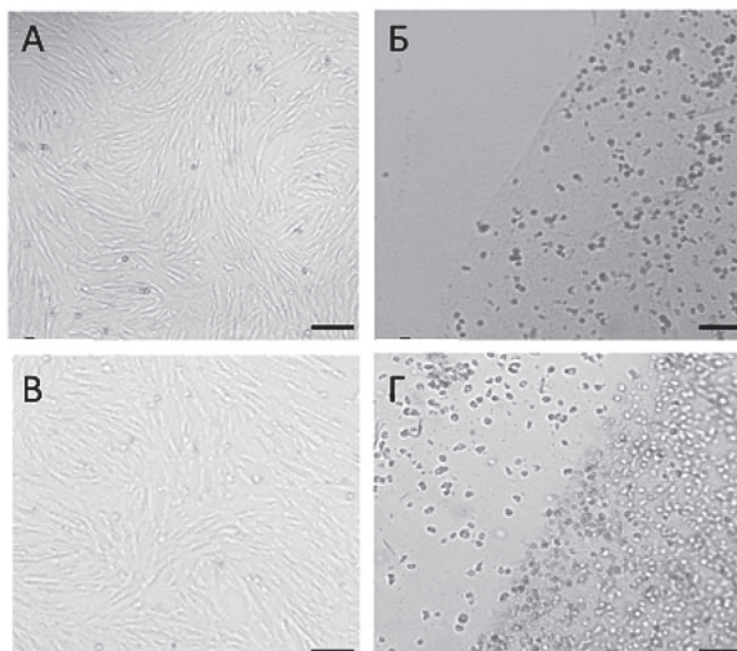


Рис. 6. СКПЗ в фибриновом клее на 2-й и 4-й день культивирования.

Контрольные клетки (А, В). Клетки в фибриновом геле (Б, Г). Начиная со 2-го дня видны колонии клеток в геле (Б). Часть клеток покидает фибриновый сгусток, затем клетки распластаются на субстрате и пролиферируют. Масштабный отрезок—100 мкм

3D-печати постепенно становятся неотъемлемой частью тканевой инженерии по многим причинам, в частности, благодаря тому, что они дают возможность быстрого получения анатомического прототипа, полностью повторяющего форму дефекта или заменяемого фрагмента ткани. То есть дают возможность получения персонализированных конструкций [19]. Подобный подход в настоящее время разрабатывается в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии [20, 21]. Однако наиболее

распространенным подходом, описываемым в данных работах, является печать самого скаффолда, а не формы для него [22]. В этом случае клетки либо накладываются на поверхность скаффолда в виде клеточных слоев, либо необходимо существенно сузить набор используемых материалов и техники печати [21]. Формы же для заливки дают возможность использовать более широкий набор материалов. Например, фибриновый клей, который для 3D-печати непригоден. Также при таком спо-

собе создания скаффолда, замещающего дефекты ткани, облегчается введение в него биологически активных веществ и клеток. Сочетание скаффолдов на основе фибринового клея и мезенхимных стромальных клеток (к которым СКПЗ близки по свойствам) позволяет улучшить свойства клеточного материала. Фибриновый клей защищает клетки от оксидативного стресса, позволяет удерживать на месте имплантации значительную часть клеток, не меняя их жизнеспособности и не препятствуя секреции паракринных факторов [18, 23].

Мы показали, что свойства данного скаффолда при концентрации фибриногена 20 мг/мл позволяют клеткам мигрировать, по крайней мере, из него (рис. 6). Ранее мы показали возможность клеточной миграции из клея при низких концентрациях фибриногена в клее [10]. Позднее Salem et al. показал, что способность клеток мигрировать из геля сохраняется при концентрации фибриногена до 20 г/л [18]. При этом основным фактором, препятствующим миграции, является изменение диаметра пор, но не толщины фибриновых волокон [18]. В нашей работе мы использовали фибриновый клей, содержащий ингибитор фибринолиза — *ε*-аминокапроновую кислоту. Такой фибриновый клей является крупнопористым [24].

Скаффолд на основе фибринового клея не обладает токсичностью, так как изготавливается из компонентов, одобренных для клинического применения (тромбина, аминокaproновой кислоты, хлористого кальция) и аутологичной плазмы пациента. Заключаемые в скаффолд СКПЗ, как и мезенхимные стромальные клетки, не несут на своей поверхности антигенов HLA II класса (табл. 1) и обладают очень низким уровнем экспрессии HLA I класса, вследствие чего обладают очень низким уровнем иммуногенности, не вызывают пролиферации аллореактивных Т-лимфоцитов как до, так и после дифференцировки [25, 26, 27]. В связи с этим мы предполагаем, что разрабатываемый скаффолд, заселенный СКПЗ, биосовместим, что будет проверено в дальнейших исследованиях *in vivo*.

В наших исследованиях СКПЗ после заключения в гель сохраняли свою жизнеспособность, иммунофенотип и способность к остеогенной дифференцировке. Можно предполагать, что метод 3D-моделирования для создания заливочной формы, в которую заливается исходный материал скаффолда с СКПЗ, применим для репаративного остеогенеза и устранения деформаций альвеолярной костной ткани челюстей в методиках направленной тканевой регенерации, исходом которых должен стать восстановленный объем костной ткани, необходимый для успешной осте-

оинтеграции и полноценного функционирования имплантатов. Стволовые клетки периодонта и СКПЗ обладают способностью восстанавливать периодонт и дефекты кости [28]. Фибриновый клей сам по себе ускоряет восстановление костной ткани, поскольку имитирует образование кровяного сгустка в поврежденном месте, что является естественным стимулятором репаративных процессов в костной ткани [29]. Показано, что использование мезенхимных стромальных клеток в сочетании с фибриновым гелем ускоряет восстановление альвеолярной кости [30].

Сроки биодеградации фибриновых матриц, по данным литературы, варьируют в зависимости от состава от 3 до 21 дня [24, 31, 32], что, безусловно, требует дополнительного изучения с целью оценки возможностей применения в различных областях стоматологии, так как, в зависимости от нозологической формы заболевания, предъявляются различные требования к срокам биодеградации. В ряде случаев необходимо продление сроков биодеградации скаффолда до 2 месяцев. Для продления сроков дегенерации скаффолда перспективным представляется добавление к фибриновому клею еще одного хорошо исследованного материала для скаффолдов — коллагена [33], добавляемого в различных концентрациях. Длительность биодеградации таких скаффолдов будет проверена нами в дальнейших исследованиях.

В наших исследованиях СКПЗ в фибриновом клею не утрачивали способности к остеогенной дифференцировке. При развитии костных дефектов челюсти происходит резорбция костной ткани, что связано с активацией остеокластов и изменением активности остеобластов вследствие повышенной выработки тканями пародонта провоспалительных цитокинов и медиаторов — интерлейкина-1, фактора некроза опухоли α , интерферон γ , костные морфогенетические белки, простагландина E2, матричной металлопротеазы и других [34]. Различными исследователями доказано, что стволовые клетки ротовой полости, в том числе находящиеся в строме пульпы зуба, участвуют в процессах восстановления поврежденной костной ткани. СКПЗ обладают высоким остеогенным потенциалом [4, 5], поэтому их использование для восстановления костной ткани является перспективным методом трансляционной медицины.

Иммуногенные свойства скаффолдов напрямую зависят от материалов, входящих в их состав, в данном скаффолде предполагается использовать в качестве источника фибриногена кровь пациента. Использование аутологичных материалов снижает риск иммунизации пациента.

Выводы

3D-моделирование и печать позволяют создать точную трехмерную копию дефекта костной ткани из биоинертных материалов с полностью конгруэнтными поверхностями, что в дальнейшем дает возможность заполнения скаффолдами и стволовыми клетками пульпы зуба. Нами предполагается, что данная технология может быть использована в различных методиках для восстановления челюстно-лицевой области.

Использованный нами скаффолд на основе фибринового клея не влияет на ключевые свойства стволовых клеток пульпы зуба — жизнеспособность, пролиферационную активность, иммунофенотип, способность к остеогенной дифференцировке. Таким образом, он является перспективным материалом для создания заселенных клетками имплантов, предназначенных для восстановления костных дефектов челюсти.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Благодарности / Acknowledgments

Работа выполнена в рамках НИР (№ ААА-А-А18-118052990081-0) государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации № 056-00056-19-00. Авторы благодарят Покровский Банк стволовых клеток за помощь в освоении методики культивирования стволовых клеток пульпы зуба.

Список литературы / References

1. Nyberg EL, Farris AL, Hung BP et al. 3D-Printing Technologies for Craniofacial Rehabilitation, Reconstruction, and Regeneration. *Ann Biomed Eng.* 2017;45(1):45–57.
2. Ivanov AN, Norkin IA, Puchin'ian DM. The possibilities and perspectives of using scaffold technology for bone regeneration. *Tsitologiya.* 2014;56(8):543–548. In Russian [Иванов А.Н., А.Н., Норкин И.А., Пучиньян Д.М. Возможности и перспективы использования скаффолд-технологий для регенерации костной ткани. *Цитология.* 2014. 56(8): 543–548].
3. Jaremenko AI, Galeckij DV, Korolov VO. Sovremennye osteoplasticheskie i osteoinduktivnye materialy. Sostojanie problemy. Perspektivy primeneniya v stomatologii i cheljustno-licevoj hirurgii. Institut stomatologii=Institute of stomatology. 2011. 2(51):70–71. In Russian [Яременко А.И., Галецкий Д.В., Королов В.О. Современные остеопластические и остеоиндуктивные материалы. Состояние проблемы. Перспективы применения в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. *Институт стоматологии.* 2011. 2(51):70–71].
4. Sharpe PT. Dental mesenchymal stem cells. *Development.* 2016;143(13):2273–2280.

5. Liu L, Wei X, Ling J, Wu L, Xiao L. Expression pattern of Oct-4, Sox2, and c-Myc in the primary culture of human dental pulp derived cells. *J Endod.* 2011;37(4):466–472.
6. Atari M, Gil-Recio C, Fabregat M et al. Dental pulp of the third molar: a new source of pluripotent-like stem cells. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 14):3343–3356.
7. Martínez-Sarrà E, Montori S, Gil-Recio C et al. Human dental pulp pluripotent-like stem cells promote wound healing and muscle regeneration. *Stem Cell Res Ther.* 2017; 8(1):175–195.
8. Grimm WD, Dannan A, Giesenhagen B et al. Translational Research: Palatal-derived Ecto-mesenchymal Stem Cells from Human Palate: A New Hope for Alveolar Bone and Cranio-Facial Bone Reconstruction. *Int J Stem Cells.* 2014;7(1):23–29.
9. Uehara K, Zhao C, Gingery A et al. Effect of Fibrin Formulation on Initial Strength of Tendon Repair and Migration of Bone Marrow Stromal Cells in Vitro. *J Bone Joint Surg Am.* 2015; 97(21):1792–1798.
10. Erukashvily NI, Aizenshtadt AA, Bagaeva VV et al. Assessing the possibility to apply the fibrin glue made of cord blood plasma as a scaffold for mesenchymal stem cells transplantation. *HERALD of North-Western State Medical University named after II Mechnikov.* 2017; 9(2); 35–44. In Russian [Енукашвили Н.И., Айзенштадт А.А., Багаева В.В., и соавт. Оценка возможности применения фибринового клея на основе пуповинной крови в качестве скаффолда для мезенхимальных стволовых клеток. *Вестник Санкт-Петербургской государственной медицинской академии им. И.И. Мечникова.* 2017; 9(2); 35–44.]
11. Bagaeva VV, Ajzenshtadt AA, Savintsev AM et al. Method for obtaining of two-component preparation for treatment of joints damage by low-invasive introduction into joint bag and preparation obtained by this method. Patent of Russian Federation RU 2 638 796 C1. *Bulletin FIPS=FIPS Bulletin.* 2017. Issue35. In Russian [Багаева ВВ, Айзенштадт АА, Савинцев АМ. и др. Способ получения двухкомпонентного препарата для лечения повреждения суставов путем малоинвазивного введения в суставную сумку и препарат, полученный этим способом Патент РФ. RU 2 638 796 C1. *Бюлл ФИПС.* 2017; Вып.35.]
12. Egorikhina MN, Aleynik DY, Rubtsova YP et al. Hydrogel scaffolds based on blood plasma cryoprecipitate and collagen derived from various sources: Structural, mechanical and biological characteristics. *Bioact Mater.* 2019;4:334–345.
13. General pharmacopeia article «Requirements for cell cultures-substrates for the production of immunobiological drugs. OFS.1.7.2.0011.15» («State Pharmacopoeia of the Russian Federation. XIII edition. Volume II»). In Russian. [Общая фармакопейная статья «Требования к клеточным культурам-субстратам производства иммунобиологических лекарственных препаратов. ОФС.1.7.2.0011.15» («Государственная фармакопея Российской Федерации. XIII издание. Том II»)]
14. Supotnitskiy MV, Elapov AA, Merkulov VA, et al. Common technological processes used in manufacture of biomedical cell culture products. *Biopreparaty=Biopharmaceuticals.* 2015;(2):36–45. In Russian [Супотницкий МВ, Елапов АА, Меркулов ВА и соавт. Основные технологические процессы, используемые при производстве биомедицинских клеточных продуктов. *Биопрепараты.* 2015; (2): 36–45.]
15. Bagaeva VV, Erukashvily NI, Elsukova LV et al. Method for extracting a tooth pulp for receiving a culture

- of stem cells. Patent of Russian Federation 2017 143 739. Oficialny Bulletin FIPS=Official FIPS Bulletin. 2019. №4. In Russian [Багаева ВВ, Енукашвили НИ, Елсукова ЛВ. Способ извлечения пульпы зуба для получения культуры стволовых клеток. Патент РФ № 2679082. Официальный бюллетень ФИПС. 2019. №4.]
16. Elnager A, Abdullah WZ, Hassan R et al. In vitro whole blood clot lysis for fibrinolytic activity study using d-dimer and confocal microscopy. *Adv Hematol*. 2014; 2014:814684.
17. Bogdanova M, Kostina A, Zihlavnikova Enayati K et al. Inflammation and Mechanical Stress Stimulate Osteogenic Differentiation of Human Aortic Valve Interstitial Cells. *Front Physiol*. 2018;9:1635.
18. Salam N, Toumpaniari S, Gentile P et al. Assessment of Migration of Human MSCs through Fibrin Hydrogels as a Tool for Formulation Optimisation. *Materials (Basel)*. 2018; 11(9): pii: E1781.
19. Khang G. *Handbook of Intelligent Scaffolds for Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Jenny Stanford Publishing. 2017. p 1440.
20. Park SA, Lee HJ, Kim KS et al. In Vivo Evaluation of 3D-Printed Polycaprolactone Scaffold Implantation Combined with β -TCP Powder for Alveolar Bone Augmentation in a Beagle Defect Model. *Materials (Basel)*. 2018; 11(2):E238.
21. Tao O, Kort-Mascort J, Lin Y et al. The Applications of 3D Printing for Craniofacial Tissue Engineering. *Micromachines (Basel)*. 2019; 10(7): pii: E480.
22. Maroulakos M, Kamperos G, Tayebi L. et al. Applications of 3D printing on craniofacial bone repair: A systematic review. *J Dent*. 2019;80:1–14.
23. Kim I, Lee SK, Yoon JI et al. Fibrin glue improves the therapeutic effect of MSCs by sustaining survival and paracrine function. *Tissue Eng Part A*. 2013; 19(21–22):2373–2381.
24. Hedrich HC, Simunek M, Reisinger S et al. Fibrin chain cross-linking, fibrinolysis, and in vivo sealing efficacy of differently structured fibrin sealants. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2012; 100(6):1507–1512.
25. Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K et al. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp. Hematol*. 2003;31(10):890–896.
26. Wang Y, Huang J, Gong L et al. The Plasticity of Mesenchymal Stem Cells in Regulating Surface HLA-I. *iScience*. 2019; 15:66–78.
27. Iohara K, Utsunomiya S, Iohara S et al. Allogeneic transplantation of mobilized dental pulp stem cells with the mismatched dog leukocyte antigen type is safe and efficacious for total pulp regeneration. *Stem Cell Research & Therapy*. 2018; 9(1):116–132.
28. Amghar-Maach S, Gay-Escoda C, Sánchez-Garcés M et al. Regeneration of periodontal bone defects with dental pulp stem cells grafting: Systematic Review. *J Clin Exp Dent*. 2019;11(4):e373–381.
29. Bujoli B, Scimeca JC, Verron E. Fibrin as a Multipurpose Physiological Platform for Bone Tissue Engineering and Targeted Delivery of Bioactive Compounds. *Pharmaceutics*. 2019;11(11): pii: E556.
30. Zhang L, Wang P, Mei S et al. In vivo alveolar bone regeneration by bone marrow stem cells/fibrin glue composition. *Arch Oral Biol*. 2012; 57(3):238–244.
31. Buchta C, Hedrich HC, Macher M et al. Biochemical characterization of autologous fibrin sealants produced by CryoSeal and Vivostat in comparison to the homologous fibrin sealant product Tissucol/Tisseel. *Biomaterials*. 2005; 26(31):6233–6241.
32. Harris DM, Siedentop KH, Ham KR, Sanchez B. Autologous fibrin tissue adhesive biodegradation and systemic effects. *Laryngoscope*. 1987;97(10):1141–1144.
33. Shekhter AB, Guller AE, Istranov LP et al. Morphology of collagen matrices for tissue engineering (biocompatibility, biodegradation, tissue response). *Arkh Patol*. 2015;77(6):29–38. In Russian [Шехтер А.Б., Гуллер А.Е., Истранов Л.П., и соавт. Морфология коллагеновых матриц для тканевой инженерии (биосовместимость, биодеградация, тканевая реакция). *Архив патологии*. 2015;77(6):29–38.]
34. Volf GF. *Parodontology: atlas*. 2nd ed. M.: Medpress-inform, 2014. p. 548 In Russian. [Вольф Г.Ф. Пародонтология: цветной атлас. Пособие. 2-е изд. Москва: МЕДпресс-информ, 2014. с. 548].

Информация об авторах:

Домбровская Юлия Андреевна, к.м.н., ассистент кафедры стоматологии общей практики ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России;

Енукашвили Натэлла Иосифовна, к.б.н., старший научный сотрудник НИЛ клеточных технологий ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России; заведующий лабораторией некодирующей ДНК ИНЦ РАН;

Котова Анастасия Викторовна, научный сотрудник НИЛ клеточных технологий ФГБОУ ВО СЗГМУ им. И. И. Мечникова Минздрава России; старший лаборант-исследователь лаборатории некодирующей ДНК ИНЦ РАН;

Бильк Станислав Сергеевич, научный сотрудник, врач-травматолог ФГБУ «РНИИТО им. Р. Р. Вредена» Минздрава России;

Коваленко Антон Николаевич, к.м.н., старший научный сотрудник ФГБУ «РНИИТО им. Р. Р. Вредена» Минздрава России;

Силин Алексей Викторович, д.м.н., профессор, заведующий кафедрой стоматологии общей практики ФГБОУ ВО «СЗГМУ им. И. И. Мечникова» Минздрава России.

Author information:

Dombrovskaya Yuliya A., MD, PhD, Assistant Professor, Department of General Dentistry North-Western State University named after I. I. Mechnikov;

Enukashvili Natella I., PhD, Senior Researcher, Cell Technologies Laboratory, North-Western State University named after I. I. Mechnikov; Head of Non-Coding DNA Laboratory, Institute of Cytology RAS;

Kotova Anastasiya V., Researcher, Cell Technologies Laboratory, North-Western State University named after I. I. Mechnikov; Assistant, Non-coding DNA Laboratory, Institute of Cytology RAS;

Bilyk Stanislav S., MD, Traumatologist, Researcher, Russian Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after R. R. Vreden;

Kovalenko Anastasiya N., MD, PhD, Senior Researcher, Russian Scientific Research Institute of Traumatology and Orthopedics named after R. R. Vreden;

Silin Aleksey V., Professor, Head of General Dentistry Department, North-Western State University named after I. I. Mechnikov.