

На правах рукописи

ШЕВЕЛА

Александр Андреевич

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКИЕ РЕАКЦИИ НА ВНЕДРЕНИЕ
МЕТАЛЛИЧЕСКИХ ИМПЛАНТАТОВ В КОСТНУЮ ТКАНЬ
В УСЛОВИЯХ ПРИМЕНЕНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ
(ЭКЗОСОМ МУЛЬТИПОТЕНТНЫХ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ
СТРОМАЛЬНЫХ КЛЕТОК) В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**

3.3.2 – патологическая анатомия

АВТОРЕФЕРАТ

**диссертации на соискание ученой степени
доктора медицинских наук**

Новосибирск – 2022

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте химической биологии и фундаментальной медицины Сибирского отделения Российской академии наук (Новосибирск) и Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Московский государственный медико-стоматологический университет имени А.И.Евдокимова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научные консультанты:

доктор медицинских наук, профессор,
академик РАН
доктор медицинских наук, профессор

Янушевич Олег Олегович
Майбородин Игорь Валентинович

Официальные оппоненты:

Гармаева Дарима Кышектовна, доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой «Нормальная и патологическая анатомия, оперативная хирургия с топографической анатомией и судебная медицина» медицинского института Северо-Восточного федерального университета им. М.К.Аммосова (Якутск).

Летягин Андрей Юрьевич, доктор медицинских наук, профессор, заместитель директора по научной работе – руководитель Научно-исследовательского института клинической и экспериментальной лимфологии – филиала ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН» (Новосибирск).

Овсянко Елена Владимировна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры анатомии человека имени академика Ю.И.Бородина ФГБОУ ВО «Новосибирский государственный медицинский университет» Минздрава России.

Ведущая организация: ФГБОУ ВО «Алтайский государственный медицинский университет» Минздрава России (Барнаул).

Защита диссертации состоится «_____» _____ 2022 г. в _____ час. на заседании совета 24.1.242.03 в ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» по адресу 630117, Новосибирск, ул. Тимакова, 2.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» <http://frcftm.ru>

Автореферат разослан «_____» _____ 2022 г.

Ученый секретарь
Диссертационного совета
доктор биологических наук

Клиникова Марина Геннадьевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Нарушения регенерации костей при переломах, в том числе на фоне остеопороза, при других патологических состояниях (метаболический синдром, ожирение, онкологические заболевания с метастазами в кости), часто приводят к несращению, сопровождаются повышенной хрупкостью, деформациями и хронической болью (Миронов С.П. и др., 2019; Снетков А.И. и др., 2019; Солод Э.И. и др., 2019; Черняев С.Н., Неверов В.А., 2020; Almubarak S. et al. 2016). В таких случаях часто требуется инвазивное хирургическое вмешательство в виде хирургической фиксации, костной пластики, удлинения кости и артропластики (Johnson A.J. et al., 2014; Birch J.G., 2017; Bhandari M., Swiontkowski M., 2017; Simpson A.H.R.W. et al., 2019). Помимо хирургических рисков, связанных с проводимыми процедурами, эти состояния создают, как правило, большие социально-экономические проблемы (Hernlund E. et al., 2013; Hak D.J. et al., 2014).

Для решения этих проблем в настоящее время предложены разные подходы, в том числе, применение костных трансплантатов (Azi M.L. et al., 2016), среди которых аутогенные костные трансплантаты обладают наилучшим остеогенным потенциалом и обычно считаются «золотым стандартом» (Mankin H.J. et al., 2005; Schmidt A.H., 2021). Однако ограниченное количество аутогенных трансплантатов и заболевания, ограничивающие забор аутогенных трансплантатов, не позволяют применять их достаточно широко, особенно у пациентов с обширными костными дефектами (Schwartz C.E. et al., 2009; Baldwin P. et al., 2019). Несмотря на это, возможный риск инфицирования и снижение остеогенных и остеоиндуктивных возможностей аллотрансплантатов в результате их стерилизации и процессов хранения требуют разработки альтернативных подходов (Finkemeier C.G., 2002; Sohn H.S., Oh J.K., 2019). Поэтому были изучены возможности использования других заменителей костной ткани, таких как гидроксиапатит (НАр) (Sun Y. et al., 2013; Xu Y. et al., 2018; Kaushik N. et al., 2020; Zhang M. et al., 2020), трикальцийфосфат (ТСР), сульфат кальция, деминерализованный костный матрикс и костные морфогенетические белки (ВМР) (Sohn H.S., Oh J.K., 2019). Однако большинство костных заменителей (имплантатов) имеют низкую механическую прочность, переменную скорость резорбции и ограниченные остеогенные и остеоиндуктивные свойства (Sohn H.S., Oh J.K., 2019), а также обладают иммуномодуляторными свойствами (Lee J. et al., 2019).

Тем не менее во всем мире увеличивается количество и объем операций, связанных с имплантацией изделий, созданных из искусственных материалов, в том числе из металлов (Sharma S. et al., 2016). Несмотря на известные общие реакции организма на имплантат, как инородное тело, следует выделить некоторые эффекты, часто связанные со свойствами того материала, из которого изготовлен имплантат (Siddiqi A. et al., 2017). Модификация поверхности имплантатов важна для улучшения их остеоинтеграции (Гринь А.А. и др., 2020; Sharma S. et al., 2016; Aivazi M. et al., 2016; Velasco E. et al., 2016; Trisi P. et al., 2016; Velasco-Ortega E. et al., 2016; Coelho P.G. et al., 2016; Su Y. et al., 2017; Tan N. et al., 2017). Шероховатости и другие топографические особенности наружных отделов имплантатов из металлов являются самыми релевантными для их остеоинтеграции (Velasco-Ortega E. et al., 2016).

Определенные перспективы для улучшения результатов внутрикостной имплантации имеют клеточные технологии. Мезенхимальные стромальные/стволовые клетки (МСК) с их простотой выделения из взрослых тканей и обширной способностью к пролиферации и дифференцировке в различные клеточные клоны в настоящее время являются наиболее протестированным типом регенеративных клеток (Tan S.H.S. et al., 2020). Существует более 1000 зарегистрированных клинических испытаний (<https://www.clinicaltrials.gov> по состоянию на 20 мая 2020 г.), в которых сообщается об их эффективности против широкого спектра травм и заболеваний, а также установленным показателям безопасности у людей (Galipeau J., Sensébé L., 2018). При изучении регенерации кости в ряде клинических исследований продемонстрирована безопасность и эффективность МСК для лечения дефектов костей и таких заболеваний, как остеонекроз (Liebergall M. et al., 2013; Chen C. et al., 2016;

Castillo-Cardiel G. et al., 2017; Hernigou P. et al., 2018; Hernigou P. et al., 2018). Несмотря на терапевтический эффект, клеточная терапия МСК сопряжена со значительными затратами и проблемами, строгим контролем производства, обращением и хранением для обеспечения оптимальной жизнеспособности и активности клеток, необходимых для трансплантации (Tan S.S.H. et al., 2020).

Использование МСК для восстановления тканей, например регенерации костей, было сначала основано на гипотезе о том, что эти клетки могут дифференцироваться в остеобласты для восстановления поврежденной ткани. В настоящее время установлено, что МСК секретируют факторы, участвующие в клеточных процессах, таких как хемотаксис, ангиогенез, остеогенез, способствующий общей регенерации кости (Meirelles L. da S. et al., 2009; Hofer H.R., Tuan R.S., 2016). В подтверждение этой гипотезы *in vitro* продемонстрировано, что МСК секретируют факторы, способствующие экспрессии ангиогенного фактора (Zaw S.Y.M. et al., 2020), а также остеогенной дифференцировке и минерализации самих МСК (Xu J. et al., 2016).

На этих результатах базируется другой подход к стимуляции репаративной регенерации костной ткани – использовании экзосом МСК (Takeda Y.S., Xu Q., 2015; Qin Y. et al., 2016). Экзосомы и микровезикулы секретируются различными типами клеток и участвуют в физиологических и патофизиологических процессах. Экзосомы опосредуют межклеточные связи и содержат сигнальные органоиды, которые передают определенную информацию от определенной клетки к клеткам-мишеням. В результате этих свойств экзосомы определенных типов клеточных элементов могут служить новыми инструментами для различных терапевтических подходов, включая иммуномодуляторную и регенеративную терапию (Lener T. et al., 2015). Действие экзосом в большей мере сходно с эффектами мультипотентных стромальных/стволовых клеток (МСК) (Doerpner T.R. et al., 2015).

Установлено, что продукты секреции МСК из пуповины человека, приводят к остеогенной дифференцировке МСК, выделенных из костного мозга и способствуют репарации костной ткани (Wang K.X. et al., 2015). Экзосомы, продуцируемые МСК жировой ткани, способствуют пролиферации и остеогенному дифференцированию первичной культуры остеобластов человека (Lu Z. et al., 2017). *In vivo* экзосомы МСК стимулируют регенерацию кости и ангиогенез в костях свода черепа овариоэктомированных крыс при критических размерах их дефектов. Эффект экзосом усиливается при увеличении их концентрации (Qi X. et al., 2016).

За счет МСК или их экзосом, обладающих иммуномодуляторным действием (Blazquez R. et al., 2014; Zhu Y.G. et al., 2014; Li L. et al., 2015; Simonson O.E. et al., 2015; Song Y. et al., 2017; Tang X.D. et al., 2017; Toh W.S. et al., 2017; Tan J.L. et al., 2018; Li Q.C. et al., 2019), можно уменьшить выраженность острого (при операции имплантации) и хронического (сопровождающего присутствие инородного тела в тканях) воспалительного процесса. Супрессия активности воспалительной реакции может ускорить интеграцию имплантатов в организм и уменьшить повреждение периимплантатных тканей лизосомальными ферментами лейкоцитов (Fredriksson M.I. et al., 2003; Gwalani L.A., Orange J.S., 2018; Shao Q. et al., 2019; Sun X. et al., 2020), и, следовательно, улучшить результаты самой процедуры имплантации.

Степень разработанности темы исследования. Анализ большого числа публикаций, посвященных проблемам внутрикостной имплантации и применения клеточных технологий для ускорения регенерации костной ткани, можно сделать заключение, что ни одна из основных задач окончательно не решена. Есть достаточно точная рекомендация оценивать эффективность интеграции изделий по относительной площади контакта с окружающей костью и оценке выраженности уровня резорбции кости вокруг имплантата. Вместе с этим, нет однозначного подхода к выбору материала для имплантации, способа обработки и модификации его поверхности. Недостаточно данных о влиянии экзосом МСК на процессы взаимодействия инородного тела с тканями организма-реципиента. Встречаются работы с сомнительными или недостаточно обоснованными выводами, что обуславливает необходимость дальнейших клинических и экспериментальных исследований по всем направлениям оссеоимплантологии.

Цель исследования – изучить особенности репаративной регенерации костной ткани при внедрении металлических имплантатов в условиях применения экзосом мультипотентных стромальных клеток в эксперименте.

Задачи исследования:

1. Провести комплексный патоморфологический и рентгенологический анализ характера и выраженности регенераторных реакций после внедрения титановых имплантатов с разным характером поверхности (шероховатой и полированной) в проксимальные мышечки большеберцовых костей кроликов.

2. Методами люминесцентной микроскопии установить время нахождения в тканях экзосом МСК, введенных в дефект кости, без и с последующей установкой титановых винтовых изделий.

3. Изучить эффективность использования экзосом МСК для регенерации дефекта костной ткани.

4. С применением рентгеновской денситометрии изучить изменения плотности костной ткани рядом с титановыми имплантатами после их внедрения в условиях использования экзосом МСК.

5. Проанализировать влияние экзосом МСК, введенных в места установки внутрикостных титановых имплантатов, на состояние тканей, прилегающих к внедренным изделиям.

6. Доказать возможность диссеминации введенных местно экзосом МСК в отдаленные от трансплантации органы.

7. Установить характер осложнений после применения экзосом МСК при внутрикостной имплантации.

Научная новизна исследования. Впервые показано, что спустя 6 мес после внедрения винтовых титановых имплантатов в проксимальные мышечки большеберцовых костей кроликов прочность фиксации инородных тел с гладким и шероховатым характером поверхности практически одинакова, о чем свидетельствует измерение усилия, прилагаемого для выкручивания изделий.

Впервые установлено, что характер поверхности (гладкий полированный или шероховатый) титановых имплантатов не влияет на репаративные процессы в тканях, о чем свидетельствует отсутствие статистически значимых различий в выраженности сосудистых реакций и интенсивности лейкоцитарной инфильтрации во все сроки наблюдения и на разном удалении от места имплантации.

Впервые с помощью люминесцентной микроскопии показано, что экзосомы МСК при внутрикостной имплантации в окружающие мягкие ткани в значительных количествах обнаруживаются через 3 сут после введения, в несколько меньшем количестве – через 7 сут; через 10 – 12 сут присутствуют единичные везикулы; к 21-м суткам свободные экзосомы МСК практически полностью элиминируются из тканей.

Впервые установлено, что введение экзосом МСК в стандартизированный хирургический дефект костной ткани способствует более эффективному очищению послеоперационной раны, ее быстрому заживлению, формированию менее грубой костной мозоли и увеличению в 2 раза частоты успешной регенерации поврежденной кости к 21-м суткам по сравнению с контролем.

Впервые отмечено, что применение экзосом МСК в процессе имплантации в эксперименте способствует увеличению плотности костной ткани рядом с внедренным титановым изделием через 3 сут после операции. Сжатие отщепленных костных фрагментов при закручивании винтового титанового изделия в условиях менее выраженной гиперемии и отека при введении экзосом МСК является основной причиной увеличения плотности костной ткани.

Впервые показано, что введение экзосом МСК способствует консолидации образовавшихся при имплантации костных фрагментов между собой и с регенерирующей костью. При использовании экзосом МСК у всех животных через 10 сут происходит почти полное сращение винтового изделия с костной тканью, тогда как после операции без введения

экзосом регистрируется либо практически полная остеоинтеграция имплантата, либо абсолютное отсутствие контакта между инородным телом и образующейся костью.

Впервые показано, что в мягких тканях кроликов в области титановых имплантатов, внедренных с предварительным введением экзосом МСК, уменьшается выраженность воспалительной реакции, что приводит к замедлению рассасывания геморрагий, элиминации фибриновых сгустков, тканевого детрита и мелких костных фрагментов. Длительное присутствие тканевого детрита способствует пролонгации воспалительного процесса, приобретению им гранулематозного характера и отсрочиванию репарации.

Впервые доказано, что после имплантации титанового винтового изделия в проксимальный мышцелок большеберцовой кости кроликов с использованием меченых люминесцентным красителем экзосом МСК, они оказываются в легких, миокарде, печени и селезенке, где их можно обнаружить вплоть до 10-х суток наблюдения. В указанных органах экзосомы МСК достигают капилляров, откуда адсорбируются периваскулярными фагоцитами. В легкие попадает максимальное количество введенных экзосом МСК, которые часто ассоциированы с детритом и находятся в просвете альвеол.

Теоретическая и практическая значимость. Получены новые знания об особенностях репаративной регенерации костной ткани при внедрении титановых имплантатов с разным характером поверхности в условиях применения экзосом МСК. Полученные данные о том, что титановые имплантаты инертны для живого организма и обладают хорошей биосовместимостью, доказывают целесообразность применения внутрикостных имплантатов на основе титана и его сплавов. Внутрикостные имплантаты с шероховатой и гладкой поверхностью в каждом случае имеет свои преимущества и недостатки, которые необходимо учитывать при индивидуальном выборе метода коррекции. В связи с возможностью поступления тканевого детрита в правые полости сердца и легкие при обширных хирургических вмешательствах необходимо принимать меры по профилактике диссеминации антигенов по всему организму и тромбоэмболии легочных артерий. Вследствие обнаружения экзосом МСК в отдаленных органах после местного применения в процессе имплантации в трубчатые кости задних конечностей нельзя исключить влияния экзосом на весь организм после локальной тканевой инъекции.

Введение экзосом МСК в процессе внутрикостной имплантации может быть использовано для быстрого увеличения плотности кости рядом с имплантатом и консолидации костных фрагментов. Однако этот способ лечения может быть применен только при условии предварительного очищения послеоперационной раны от тканевого детрита. Необходимо разработать меры, направленные на быстрое и эффективное удаление из тканей всех костных отломков. Целесообразно дальнейшее изучение побочных эффектов экзосом МСК с целью разработки мер профилактики нежелательного влияния и усиления положительных эффектов в каждом конкретном случае.

Разработана методика выявления экзосом МСК, меченных люминесцентными красителями PKH26 или Vybrant® CM-Dil, с помощью световой флуоресцентной микроскопии с использованием фильтра для родамина (Rhod – диапазон возбуждения 540–552 нм, диапазон регистрации 575–640 нм) при проведении экспериментальных исследований.

Методология и методы исследования. Методология исследования основана на применении принципов и методов комплексного патоморфологического анализа для оценки реорганизации тканей после повреждения и на фоне установки титановых винтовых внутрикостных имплантатов в условиях применения клеточных технологий (экзосом МСК) для воздействия на интеграционные и репаративные процессы, общих подходах к экспериментальному моделированию. Используются современные методы комплексного патоморфологического анализа (световая и люминесцентная микроскопия, морфометрический анализ), рентгенография, рентгеновская денситометрия, компьютерная рентгеновская томография, адекватный статистический анализ полученных данных. Объект исследований – образцы тканей кроликов после повреждения, внедрения в кость металлических имплантатов

с различным характером поверхности и использования экзосом МСК. Предмет исследования – репаративные процессы в условиях применения экзосом МСК, особенности интеграции инородных тел в костной ткани при использовании экзосом МСК.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Прочность фиксации и тканевый ответ на внедрение в костную ткань винтовых титановых имплантатов с гладким и шероховатым характером поверхности в эксперименте спустя 6 мес после операции статистически значимо не различаются.

2. Введение экзосом МСК в стандартизированный хирургический дефект костной ткани способствует увеличению частоты успешной регенерации поврежденной кости через 21 сут с 40 до 90%.

3. Применение экзосом МСК в процессе интраоссальной имплантации в эксперименте приводит к увеличению плотности костной ткани рядом с внедренным изделием через 3 сут после операции.

4. Использование экзосом МСК способствует консолидации образовавшихся при имплантации костных фрагментов между собой и с регенерирующей костью в результате снижения интенсивности воспаления.

5. Экзосомы МСК после введения в ткани задних конечностей частично попадают в легкие, миокард, печень и селезенку, где присутствуют вплоть до 10 сут наблюдения.

Степень достоверности результатов. Используемые методы комплексного патоморфологического анализа (световая и люминесцентная микроскопия, морфометрический анализ, рентгенография, рентгеновская денситометрия, компьютерная рентгеновская томография), способы моделирования имплантации в экспериментальных условиях, применение клеточных технологий (экзосомы МСК), статистическая обработка количественных данных соответствуют поставленным цели и задачам, позволяют получить достоверные результаты и сделать обоснованные выводы. Диссертация выполнена на достаточном экспериментальном материале: использовано 107 беспородных кроликов обоего пола, которым в проксимальном мышечном кармане большеберцовой кости моделировали дефект костной ткани без и с внедрением различных имплантатов, в том числе с предварительным введением экзосом МСК. Проведена оценка возможности миграции введенных экзосом МСК в отдаленные органы и ткани. Сформулированные научные положения, выводы и практические рекомендации основаны на результатах собственных исследований, не носят характера умозрительных заключений и вытекают из результатов работы.

Апробация. Результаты проведенного исследования доложены на межрегиональных конференциях «Актуальные вопросы хирургии» (Омск, 2010, 2013); научной конференции «Фундаментальные науки – медицине» (Новосибирск, 2010); 8-м, 12-м и 14-м Сибирских конгрессах с международным участием «Стоматология и челюстно-лицевая хирургия», Всероссийских симпозиумах «Новые технологии в стоматологии» (Новосибирск, 2013, 2017, 2019); 9-й Всероссийской научно-практической конференции «Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов» (Новосибирск, 2020); II Международной научно-практической конференции «Бородинские чтения» (Новосибирск, 2020), заседании научных сотрудников лабораторий технологий управления здоровьем, инвазивных медицинских технологий, персонализированной медицины и геномных медицинских технологий ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН (Новосибирск, 2021).

Исследование поддержано Программой фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2017 – 2020 гг. (VI.62.2.1, 0309-2016-0006) «Разработка технологий получения материалов для регенеративной медицины и развитие методов восстановления репродуктивного здоровья» и Программой фундаментальных исследований РАН по приоритетному направлению I.30П (ФИМТ-254, 0309-2015-0017) «Разработка новых клеточных технологий коррекции венозных тромботических процессов, основанных на введении мезенхимальных стромальных клеток в участок формирования тромба».

Публикации. По материалам диссертации опубликована 21 работа, из них 12 – в ведущих научных изданиях, рекомендованных ВАК для публикации результатов диссертационных исследований, в том числе входящих в базы Web of Science и Scopus.

Объем и структура работы. Диссертация изложена на 221 странице компьютерного текста и состоит из введения, 6 глав, заключения, выводов, практических рекомендаций, списка цитируемой литературы, включающего 379 источников (76 отечественных и 303 иностранных). Работа иллюстрирована 20 таблицами и 62 многокомпонентными комбинированными рисунками.

Личный вклад автора. Автором проведены планирование и разработка дизайна исследования, сформулированы его цель и задачи, выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы, отражающей современное состояние исследований по данной проблеме, определен методологический подход, позволяющий наиболее полно решить поставленные в исследовании задачи, самостоятельно выполнен весь комплекс запланированных методов, проведена статистическая обработка данных, интерпретированы и опубликованы основные результаты.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Общая характеристика экспериментального материала. Экспериментальная часть работы проведена на беспородных кроликах обоего пола возрастом 4 – 6 мес массой 3 – 4 кг. Все манипуляции не были связаны с причинением боли животным и проведены с соблюдением ГОСТ 33215-2014 (Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур) и ГОСТ 33216-2014 (Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами). Имплантацию проводили с соблюдением всех правил асептики и антисептики в условиях чистой операционной под общим наркозом на основе тотальной внутривенной анестезии пропофолом (Полатайко О.Р., 2009; Кэрролл Г.Л., 2009; Toder M.S. et al., 2016).

Получение, культивирование и характеристики МСК, выделение экзосом МСК. МСК получали из костного мозга крыс-самцов инбредной линии Wag массой 180 г в возрасте 6 мес, характеризовали и культивировали в соответствии с рекомендациями литературы (Martins A.A. et al., 2009; Berner A. et al., 2010; Майбородин И.В. и др., 2011, 2012). МСК имели следующие фенотипы: CD105+, CD90+, CD45-, CD34-. Кондиционную среду для выделения экзосом МСК (ЭМСК) собирали на стадии стационарного роста стабильной культуры 3-го пассажа преддифференцированных в костном направлении МСК (0,1 μ M раствор дезоксиметазона, 50 μ M раствор аскорбиновой кислоты и 10 mM раствор β -глицерофосфата) (все реактивы производства «Sigma», США) (Майбородин И.В. и др., 2011, 2012; Zhao J., Xu J.J., 2018) при достижении конфлюэнтности клеточного монослоя 80 – 90%, согласно указаниям литературы (Сухих Г.Т. и др., 2020; Blazquez R. et al., 2014; Oshchepkova A. et al., 2019).

Для удаления клеток, клеточного дебриса, апоптозных телец и крупных везикул кондиционную среду последовательно центрифугировали: 10 мин при 300 g, 10 мин – при 2 000 g, 30 мин – при 12 000 g. ЭМСК осаждали, центрифугируя супернатант 2 ч при 100 000 g, ресуспендировали в 200 мкл физиологического раствора на фосфатном буфере и повторно центрифугировали при 100 000 g в течение 2 ч. Выделенные ЭМСК ресуспендировали в 200 мкл забуференного физиологического раствора, пропускали через фильтр с порами 0,22 мкм. Количество ЭМСК определяли по содержанию белка в осадке, использовали коммерческий набор «Qubit protein assay kit» (Thermo Fisher Scientific, USA) и флюориметр «Qubit® 3.0». Окрашивание липидных компонентов мембран экзосом проводили флюоресцентным красителем Vybrant CM-DiI или PKH26, согласно инструкции производителя (Thermo Fisher Scientific, USA или Sigma-Aldrich, USA, соответственно).

Моделирование дефекта костной ткани. В обеих проксимальных мышечках большеберцовой кости кроликов стоматологическим бором диаметром 2 мм с охлаждением стерильным физиологическим раствором создавали стандартизованные отверстия на глубину 4 мм (Toder M.S. et al., 2016).

При исследовании особенностей тканевых реакций на разные поверхности титановых изделий в созданное отверстие со стабильной первичной фиксацией до 30 Нсм вкручивали слева шероховатый имплантат с пескоструйной обработкой и протравленной кислотой поверхностью (3S, Israel), справа – с гладкой полированной поверхностью (3S, Israel).

С целью изучения эффекта ЭМСК на регенерацию костной ткани на левой конечности дефект кости инсулиновым шприцем заполняли теплым забуференным физиологическим раствором (контроль) (Zhang S. et al., 2016), на правой конечности в дефект вводили 50 мкг ЭМСК в теплом физиологическом растворе (опыт).

Для определения влияния ЭМСК на имплантацию металлических изделий дефект кости инсулиновым шприцем заполняли физиологическим раствором на фосфатном буфере (контроль) (Zhang S. et al., 2016) или вводили по 19,2 мкг ЭМСК в физиологическом растворе на каждую конечность (опыт) (Torreggiani E. et al., 2014; Wang K.X. et al., 2015; Zhang S. et al., 2016), через 10 – 20 сек. внедряли винтовые титановые имплантаты (3,5x8 мм с шероховатой поверхностью; 3S, Israel). Далее послойно без натяжения ушивали операционную рану (Toder M.S. et al., 2016).

Прооперированных животных выводили из эксперимента дислокацией шейных позвонков через 2 и 6 мес после хирургического вмешательства, в каждой группе было по 15 особей (всего 30). При определении влияния ЭМСК на регенерацию кости животных подвергали эвтаназии через 12 и 21 сут после операции, в каждой группе было по 10 особей (всего 20). Кролики после введения ЭМСК с последующей имплантацией винтового металлического изделия были выведены из эксперимента одновременно с контролем спустя 3, 7 и 10 сут после операции, в каждой группе было 9 – 12 животных (всего 57 особей).

Методы морфологического, морфометрического и рентгенологического исследования. Конечности выведенных из экспериментов кроликов, а также образцы легкого, печени, селезенки и сердца фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) не менее 7 сут.

Голені с имплантатами изучали на установке ORTHOPHOS XG (напряжение на рентгеновской трубке – 69 кВ; ток – 15 мА; длительность – 13962 мсек). Для получения изображений использовали программное обеспечение Sidexis 4 Viewer Version 4.3; для 3D моделирования и денситометрии – GALAXIS Basis/GALILEOS Implant Viewer. Проводили измерения плотности костной ткани, прилегающей к верхушке имплантата, к его шейке (2 измерения справа и слева) и на уровне 3 – 4-го витков резьбы от верхушки (также 2 измерения), результаты денситометрии выражали в оптических единицах, где за «0» принята плотность вакуума, а 100% или 4095 единиц – состояние плотного металла. Все оборудование и программное обеспечение фирмы ©Sirona Dental Systems GmbH, Germany.

Для морфологического исследования после удаления мягких тканей из кости выпиливали фрагмент с регенерирующим дефектом или отверстием от выкрученного изделия и подвергали декальцинации раствором «Biodec R» (Bio Optica Milano, Italy). Фиксированные образцы тканей обезвоживали и просветляли в реактиве «Изопреп» (БиоВитрум, Россия), после проводки заключали в гистопласт. Гистологические срезы толщиной 5 – 7 мкм окрашивали гематоксилином и эозином (Саркисов Д.С., Перов Ю.Л., 1996), исследовали при увеличении до 1200 раз в световом микроскопе Axioimager M1 (Carl Zeiss, Germany).

Кроме того, неокрашенные срезы мягких тканей, удаленных из зоны имплантации, а также срезы легкого, печени, селезенки и сердца изучали в режиме люминесценции указанного микроскопа с фильтрами Alexa Fluor 488 (диапазон возбуждения 450 – 490 нм, диапазон регистрации 515-∞ нм) или для родамина (Rhod – диапазон возбуждения 540 – 552 нм,

диапазон регистрации 575 – 640 нм). При получении микрофотографий использовали автоматическую экспозицию. В процессе совмещения изображений с применением фильтров Alexa 488 и для родамина можно получить зеленый и красный (или оранжевый и желтый) цвет в зависимости от преобладания интенсивности свечения при том или ином фильтре. Зеленый цвет дает более яркая флюоресценция при использовании фильтра Alexa 488, красный цвет – при применении родаминового фильтра, желтый и его оттенки получаются в результате смешения зеленого и красного цветов в той или иной пропорции (Майбородин И.В. и др., 2020; Сухих Г.Т. и др., 2020; Maiborodin I.V. et al., 2020).

Для получения необходимых морфометрических данных проводили измерения изображений, полученных при помощи цифровой видеокамеры микроскопа, на экране компьютера с использованием программного обеспечения морфологического модуля Axiovision (Zeiss, Германия).

Методы статистического анализа. Статистическую обработку полученных данных осуществляли с использованием программ STATISTICA 10 (StatSoft Inc., США) и MS Excel 7.0 (Microsoft, USA). При расчетах учитывали, что распределение исследуемых признаков было близким к нормальному. Описательные статистики представлены в виде среднего арифметического (M) и его стандартной ошибки (m) или стандартного отклонения (σ). Для сравнения двух независимых групп по количественному признаку использовали t-критерий Стьюдента. Сравнение средних в трех и более группах проводили методом дисперсионного анализа. Различия в сравниваемых группах считали достоверными при уровне статистической значимости $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты имплантации металлических изделий с различным характером поверхности в костную ткань в эксперименте. Через 2 мес после имплантации в проксимальный мышцелок большеберцовой кости изделий, изготовленных из титана с шероховатой или гладкой поверхностью, была выявлена тенденция к двукратному увеличению усилия, необходимого для выкручивания шероховатого имплантата: $46 \pm 8,94$ против $23 \pm 18,2$ Нсм для изделия с гладкой поверхностью. Спустя 6 мес после операции усилие выкручивания имплантатов составляло соответственно $67,5 \pm 9,57$ и $52 \pm 5,42$ Нсм для изделий с шероховатой и гладкой поверхностями. К этому сроку значения средних величин в целом по группам практически сравнялись.

Край проксимального мышцелка большеберцовой кости, непосредственно прилегающий к шероховатому имплантату, при микроскопическом исследовании не имел заметных изменений. Можно отметить только наличие структур костной мозоли на некоторых участках. В костном мозге, в местах его контакта с материалом имплантата, отмечено формирование тонкой полоски компактной костной ткани. Но в некоторых случаях инородное тело было отделено от структур костного мозга волокнистой соединительной тканью, ближе к металлу – плотной, далее – рыхлой. Сам костный мозг видимых патологических изменений не имел. В костной ткани и в костном мозге, непосредственно примыкающих к инородному телу, присутствовали различные по размерам фрагменты металла без воспалительной реакции вокруг.

В костном мозге, находящемся в месте внедрения гладкого инородного тела, патологических изменений также не было отмечено. По ходу имплантата костный мозг отграничивался волокнистой соединительной тканью: ближе к металлу – плотной, дальше – рыхлой или тонкой полоской компактной кости. В некоторых случаях было практически невозможно различить плотную волокнистую соединительную ткань от грубоволокнистой ткани кости. Необходимо также отметить наличие частиц металла в соединительной ткани, отграничивающей костный мозг от поверхности полированного имплантата, причем металл присутствовал как рядом с рыхлой соединительной тканью, так и с грубоволокнистой. Но

число таких металлических фрагментов и их размеры были значительно меньше, чем после внедрения изделия с шероховатой поверхностью.

Из-за шероховатой поверхности имплантатов к ним прочно присоединялись окружающие ткани, врастали в поры, и при выкручивании таких изделий происходила значительная травматизация тканей вокруг места имплантации. Гладкие полированные имплантаты имели меньшую площадь контакта с тканями организма, они фиксировались за счет биортикальной имплантации, при удалении легко выкручивались и не разрывали окружающие ткани. В связи с этим на удаленных шероховатых имплантатах присутствовали множественные обрывки тканей, а на изделиях с гладкой поверхностью тканевых фрагментов практически не было.

Любое медленно деградирующее инородное тело отграничивается от организма соединительнотканной капсулой и это является нормальной тканевой реакцией (Майбородин И.В. и др., 2013, 2014). Вследствие этого происходило обнаруженное отграничение имплантатов от структур костного мозга различными типами волокнистой соединительной ткани: ближе к металлу – плотной, дальше – рыхлой. Иногда там формировалась даже тонкая плоской компактной кости, которая также является одним из типов соединительной ткани.

Необходимо отметить, что даже прочные инородные тела разрушаются системами защиты организма, именно по границе имплантата происходят процессы его деградации. Большие и малые фрагменты любых инородных тел элиминируются фагоцитами (Майбородин И.В. и др., 2013, 2014), обволакиваются соединительной тканью и поглощаются макрофагами (гигантскими клетками инородных тел), содержащими среди прочих лизосомальных ферментов металлопротеиназы. С этим связано присутствие в тканях вокруг имплантатов их мелких частиц. Закономерно, что частицы с поверхности шероховатых изделий легче фрагментируются и отделяются от инородного тела (Майбородин И.В. и др., 2013; Greene W.B. et al., 1995). Отсутствие активной воспалительной реакции, гигантских клеток инородных тел, обширной грубой соединительнотканной капсулы в окружающих тканях во все сроки исследования свидетельствует об инертности материала шероховатых и гладких изделий для живого организма, об их совместимости с тканями.

Через 2 мес после операции объемная плотность лимфатических сосудов на участках дермы, непосредственно прилегающих к имплантатам, в случае внедрения шероховатых и гладких изделий возрастала соответственно на 59,7 и 53,4% по сравнению с таковой до хирургического вмешательства (табл. 1). Объемная плотность интерстициальных пространств после имплантации шероховатых и гладких инородных тел возрастала соответственно на 84,3% и в 2 раза по сравнению с состоянием до операции.

Таблица 1 – Объемная плотность (%) структурных компонентов дермы кроликов через 2 мес после операции (M±m)

Структуры	Группа животных		
	до операции	имплантат 3S с шероховатой поверхностью	имплантат 3S с гладкой поверхностью
<i>На участках, непосредственно прилегающих к имплантатам</i>			
Капилляры: кровеносные	2,73±0,78	4,45±0,82	2,91±1,04
лимфатические	4,27±0,78	6,82±0,98*	6,55±0,82*
Интерстициальное пространство	3,45±0,68	6,36±1,21*	6,91±1,14*
Клетки и межклеточное вещество	89,50±1,04	82,40±1,8*	83,6±1,43*
<i>На удаленных от имплантатов участках</i>			
Капилляры: кровеносные	2,73±0,78	2,64±0,81	3,01±0,89
лимфатические	4,27±0,78	4,91±0,94	5,00±1,61
Интерстициальное пространство	3,45±0,68	4,27±0,78	4,55±0,82
Клетки и межклеточное вещество	89,50±1,04	88,20±1,25	87,50±1,92

Примечание: * – $p \leq 0,05$ при сравнении с показателями до операции.

При сравнении состояния микроциркуляции крови и лимфотока непосредственно в области имплантатов и на удалении от них через 2 и 6 мес не были обнаружены статистически значимые отличия между результатами имплантации изделий с шероховатой и гладкой поверхностями (см. табл. 1, табл. 2).

Через 2 мес после операции численная плотность всех лейкоцитов в дерме в случае внедрения шероховатых и гладких имплантатов была больше в 4,4 и 4,6 раза, соответственно, чем до хирургического вмешательства (табл. 3).

Таблица 2 – Объемная плотность (%) структурных компонентов дермы кроликов через 6 мес после операции (M±m)

Структуры	Группа животных		
	до операции	имплантат 3S с шероховатой поверхностью	имплантат 3S с гладкой поверхностью
<i>На участках, непосредственно прилегающих к имплантатам</i>			
Капилляры: кровеносные	2,73±0,78	3,27±1,19	3,45±1,21
лимфатические	4,27±0,78	5,18±1,66	4,64±1,03
Интерстициальное пространство	3,45±0,68	4,45±0,93	5,00±1,34
Клетки и межклеточное вещество	89,50±1,04	87,1±1,58	86,91±1,64
<i>На удаленных от имплантатов участках</i>			
Капилляры: кровеносные	2,73±0,78	2,82±1,08	2,36±0,81
лимфатические	4,27±0,78	4,45±0,93	4,82±1,08
Интерстициальное пространство	3,45±0,68	4,27±0,78	4,55±0,82
Клетки и межклеточное вещество	89,50±1,04	88,20±1,25	87,50±1,92

Таблица 3 – Количественный анализ клеток дермы кроликов на участках, непосредственно прилегающих к имплантатам, через 2 мес после операции (M±σ)

Клетки		Группа животных		
		до операции	имплантат 3S с шероховатой поверхностью	имплантат 3S с гладкой поверхностью
Численная плотность	N _A	49,70±9,98	218,00±75,10*	227,00±78,60*
Лимфоциты	%	75,41±4,13	55,30±50*	54,50±3,62*
	N _A	37,60±8,68	121,00±42,10	123,00±43,20
Нейтрофилы	%	16,50±4,11	28,10±3,21*	28,50±3,17*
	N _A	8,10±2,34	60,90±21,10*	65,20±24,40*
Эозинофилы	%	0,64±0,67	1,01±0,63	0,91±0,83
	N _A	0,31±0,34	2,36±1,75	2,00±2,32
Тканевые базофилы	%	1,01±1,10	1,18±0,87	1,27±1,10
	N _A	0,49±0,60	2,73±2,41	2,73±2,97
Эритроциты	%	0,18±0,41	1,91±0,70*	1,73±0,65*
	N _A	0,07±0,16	4,18±2,32	4,00±2,28
Моноциты	%	0,82±0,75	3,09±0,83*	3,18±0,87*
	N _A	0,41±0,39	6,73±3,17	7,64±4,01
Макрофаги	%	2,91±0,94	6,09±1,04*	6,27±1,19*
	N _A	1,45±0,58	13,40±5,71*	13,90±4,91*
Плазмоциты	%	1,45±0,52	2,01±0,63	2,18±0,87
	N _A	0,72±0,28	4,36±1,80	5,09±3,18
С признаками деструкции	%	1,18±0,98	1,36±0,51	1,45±0,52
	N _A	0,55±0,45	2,91±1,38	3,27±1,62

Примечание: N_A – численная плотность клеток на 10⁵ мкм² площади среза; * – p≤0,05 при сравнении с показателями до операции.

Относительное содержание лимфоцитов после имплантации шероховатых и гладких имплантатов достоверно уменьшалось соответственно на 36,3 и 38,3% по сравнению с состоянием до операции. Процентное содержание нейтрофилов после внедрения имплантатов с шероховатой и гладкой поверхностью возрастало соответственно на 70,3 и 72,7% относительно данных до имплантации. Абсолютное количество нейтрофильных лейкоцитов в случае внедрения шероховатых и гладких изделий было больше соответственно в 7,5 и 8 раз, чем до хирургического вмешательства.

Относительное количество макрофагов в случае внедрения шероховатых и гладких изделий повышалось в 2,1 и 2,2 раза, соответственно. Содержание макрофагов в единице площади среза дермы после имплантации шероховатых и гладких инородных тел было больше соответственно в 9,2 и 9,6 раза по сравнению с состоянием до операции. Следует особо отметить, что, несмотря на возрастание доли и численной плотности макрофагов в дерме непосредственно в области расположения имплантатов, у всех животных во всех наблюдениях отсутствовали многоядерные макрофаги со слившейся цитоплазмой.

Через 2 мес после хирургического вмешательства инородные тела были еще не плотно фиксированы в мышелках большеберцовых костей, но поверхности имплантатов уже были инкапсулированы соединительной тканью. За счет соединения между мышцами, связками, сухожилиями и инородными телам посредством этой соединительной ткани возможно какое-то смещение имплантатов во время движения животного. При смещении инородных тел возможны полные или частичные разрывы капсулы, соединяющей их с разными по плотности тканями организма. В таких случаях разрывы/повреждения тканей сопровождаются асептическим воспалением с выбросом различных биологически активных веществ, изменяющих микроциркуляцию и лимфоток, а также приводящих к возрастанию уровня лейкоцитарной инфильтрации.

Необходимо отметить, что в тканях в нормальных условиях жизнедеятельности функции иммунного контроля осуществляют в основном лимфоциты, численность других лейкоцитов увеличивается только при появлении антигенов. В данном случае в местах имплантации возрастало число нейтрофилов, а также макрофагов. За счет значительного возрастания количества этих клеток в дерме уменьшалась доля лимфоцитов. В проведенном эксперименте спустя 2 мес после внедрения инородных тел отмечено увеличение количества нейтрофилов и макрофагов, что свидетельствовало о том, что в дерме в участках имплантации постоянно идет повреждение и репарация тканей, одновременно присутствуют участки со свежими повреждениями и старыми регенерирующими разрывами.

Через 6 мес после имплантации в дерме непосредственно в области внедрения шероховатого инородного тела зарегистрировано увеличение в 4 раза численной плотности нейтрофилов (табл. 4). В случае внедрения гладкого имплантата отличие от исходных данных было также выраженным (в 4,3 раза больше), но статистически недостоверным. К этому сроку соединение имплантатов с костной тканью становилось более прочным. Соответственно, снижалась степень смещения инородных тел при движении и уровень повреждения тканей, выраженность лейкоцитарной инфильтрации уменьшалась, микроциркуляция нормализовывалась.

Регенерация костного дефекта в условиях экспериментального применения экзосом мультипотентных стромальных клеток. Спустя 12 сут в большинстве случаев (8 из 10; 80%) после введения ЭМСК репарация протекала быстрее, и часто дефект костной ткани визуально полностью регенерировал. Место операции можно было установить только по структурам кости с измененной плотностью и рубцовыми изменениями, а также по рубцам в близлежащих мягких тканях. Необходимо отметить, что рубец костной ткани в этих случаях был тонким, с упорядоченными структурами межклеточного матрикса.

Таблица 4 – Количественный анализ клеток в дерме кроликов на участках, непосредственно прилегающих к имплантатам, через 6 мес после операции (M±σ)

Клетки		Группа животных		
		до операции	имплантат 3S с шероховатой поверхностью	имплантат 3S с гладкой поверхностью
Численная плотность	N _A	49,70±9,98	173,00±64,70	164,01±67,4
Лимфоциты	%	75,41±4,13	67±3,87 ^s	65,21±5,91
	N _A	37,60±8,68	117±48,6	104,00±37,30
Нейтрофилы	%	16,50±4,11	18,9±3,33	20,40±4,03
	N _A	8,10±2,34	32,1±11,1*	34,80±20,20
Эозинофилы	%	0,64±0,67	1,09±0,83	1,18±0,98
	N _A	0,31±0,34	1,55±1,21	2,00±1,84
Тканевые базофилы	%	1,01±1,10	1,36±1,03	1,45±1,13
	N _A	0,49±0,60	2,09±1,92	2,45±2,16
Эритроциты	%	0,18±0,41	1,64±0,67	1,55±0,68
	N _A	0,07±0,16	2,73±1,42	2,45±1,44
Моноциты	%	0,82±0,75	1,82±0,75	1,73±0,78
	N _A	0,41±0,39	3,18±1,94	3,09±2,17
Макрофаги	%	2,91±0,94	5,27±0,91	5,45±1,29
	N _A	1,45±0,58	9,27±4,29	9,09±4,57
Плазмоциты	%	1,45±0,52	1,64±0,67	2,09±0,83
	N _A	0,72±0,28	2,73±1,62	3,45±2,07
С признаками деструкции	%	1,18±0,98	1,27±0,78	1,01±0,89
	N _A	0,55±0,45	2,18±1,47	1,91±1,87

Примечание: N_A – численная плотность клеток на 10⁵ мкм² площади среза; * – p≤0,05 при сравнении с показателями до операции; ^s – значения через 6 мес после операции, достоверно отличающиеся (p≤0,05) от таковых спустя 2 мес.

Микроскопически в этот срок у всех кроликов в контроле сохранялся дефект в костной ткани с формирующимися костными структурами и грубым толстым рубцом на границе с неповрежденными участками. Снаружи костный дефект был полностью закрыт грубоволокнистой соединительной тканью надкостницы с большим числом полнокровных тонкостенных кровеносных сосудов (грануляций). Далее кнаружи были расположены визуально интактные структуры сухожилий, прикрепленные к соответствующим участкам мышечка. То есть, регенерация надкостницы и мягких тканей вокруг моделированного дефекта шла быстрее, чем кости мышечка. Это приводило к срастанию надкостницы (процесс еще продолжался, о чем свидетельствовали грануляции) и окружающих мягких тканей над остающимся костным дефектом. Визуально это выглядело как полное заживление, но прочность кости в таких участках значительно снижена вследствие остающегося дефекта. Кость в области дефекта также регенерировала, на что указывали рубцово измененные фрагменты кости на периферии отверстия и отдельные костные структуры внутри дефекта, но репаративные процессы шли медленно.

Таким образом, введение ЭМСК крысы в дефект костной ткани кроликов приводило к ускорению ее регенерации и формированию более тонкой костной мозоли. Такое действие ЭМСК может быть связано с различными гипотетическими причинами. ЭМСК вследствие иммуномодуляторного влияния могут снижать интенсивность воспаления (Blazquez R. et al., 2014; Simonson O.E. et al., 2015; Li Q.C. et al., 2019). При этом, в случае асептического воспаления, инициированного только повреждением тканей, уменьшается объем деструкции, соответственно, раньше начинаются процессы репарации и быстрее формируется костная ткань в дефекте.

ЭМСК могут стимулировать функциональную активность отдельных иммунокомпетентных клеток (Tan J.L. et al., 2018), что может приводить к более быстрой репарации в

результате активного очищения дефекта от детрита. ЭМСК могут связываться также с матричными белками, такими как коллаген I типа и фибронектин, что способствует ускоренному и четко направленному дифференцированию собственных МСК костной ткани и надкостницы в направлении остеобластов, а также могут влиять на этот процесс, ускоряя или замедляя его (Takeda Y.S., Xu Q., 2015; Zhang S. et al., 2016; Qi X. et al., 2016). Это может быть причиной как увеличения численности остеобластов в дефекте, так и быстрого формирования последними полноценных костных балок.

ЭМСК могут стимулировать пролиферацию и некоторые функции уже имеющихся остеобластов (Furuta T. et al., 2016; Lu Z. et al., 2017), что также может приводить к более быстрому образованию ими структур кости в дефекте. ЭМСК содержат в большой концентрации различные проангиогенные факторы, в том числе ангиопоэтин-1 (Xv J. et al., 2017; Tang X.D. et al., 2017), и введение ЭМСК может активировать формирование *de novo* сосудов в местах инъекции (Gong M. et al., 2017; Yang Y. et al., 2018; Hu X. et al., 2019), в том числе грануляционной ткани. Значительное образование грануляций может быть одной из причин быстрой и эффективной элиминации детрита из поврежденных при моделировании дефекта тканей и, соответственно, заживления.

Спустя 12 сут после применения ЭМСК в надкостнице и рядом с ней, в костной ткани, в сосудах, проходящих в кости, а также в прилежащем к участку повреждения костном мозге были выявлены единичные очень мелкие пылевидные объекты, светящиеся красным цветом, что связано с преимущественной люминесценцией на фоне применения фильтра для родамина в результате окрашивания Vybrant® CM-Dil. Кроме того, иногда был отмечен четкий красный оттенок включений в крупных клетках, скорее всего, макрофагах. Обнаружение в области поврежденной кости даже минимального количества ЭМСК свидетельствует о том, что не все ЭМСК сразу оказываются в клетках-мишенях или разрушаются в месте введения, и не все ЭМСК мигрируют из регенерирующей костной ткани. ЭМСК, по крайней мере, частично, сохраняются у кроликов в месте применения не менее 12 сут. Захват ЭМСК клетками организма-реципиента происходит постепенно и, таким образом, влияние ЭМСК на регенерирующую кость пролонгировано.

Элиминация ЭМСК, по-видимому, происходит как вследствие миграции по сосудистому руслу (ЭМСК иногда были расположены непосредственно в просвете сосудов), так и вследствие фагоцитоза макрофагами, каковыми являются крупные клетки с флюоресцирующими красным цветом включениями. Заключение о макрофагальном происхождении таких крупных клеток сделано на основании их размера (только очень немногие из них превышали 20 мкм), неправильной формы клеток, наличия множества разнокалиберных включений, которые, скорее всего, были лизосомами. В таком случае светящиеся включения в макрофагах были фагосомами, флюоресцирующими за счет поглощенных из тканей ЭМСК. При этом нельзя исключить и окрашивание мембран макрофагов, в том числе фагосом, Vybrant® CM-Dil, освободившимся после лизиса ЭМСК.

Необходимо отметить, что ЭМСК (или макрофаги с ЭМСК) были обнаружены не только в костной ткани рядом с поврежденным мышечком, но и в окружающих место хирургического вмешательства мягких тканях (надкостнице и прилежающих или берущих начало от мышечка сухожилиях мышц конечности).

Через 21 сут на большеберцовой кости справа (опыт) в 9 случаях из 10 не было заметно признаков операции, тогда как слева (контроль) – только в 4 из 10. То есть в контроле полное заживление наступило в 40% случаев, а после использования ЭМСК – в 90%. Гистологически в случаях полного заживления и в контроле, и после введения ЭМСК на месте дефекта костной ткани наблюдалось формирование рубца (костной мозоли).

В 6 случаях после введения физиологического раствора в моделированное отверстие кости и в 1 наблюдении после использования ЭМСК оставался дефект костной ткани, но целостность кожи и подкожной клетчатки была восстановлена. Следует обратить внимание на присутствие небольших бесцветных инородных тел, похожих на кристаллические

образования со слабой клеточной реакцией вокруг. Обнаружение таких кристаллоподобных структур в тканях в области моделированного отверстия может служить косвенным признаком расположения в этих местах несколько ранее нежизнеспособных костных отломков, образованных во время создания дефекта и не удаленных из раны в процессе омывания охлаждающим физиологическим раствором. По мере лизиса такой некротизированной кости в процессе обызвествления некоторые соединения кальция могут кристаллизоваться и стать недоступными для поглощения фагоцитами (остеокластами) и препятствовать репарации костного дефекта.

Так как хирургическое вмешательство с заполнением дефекта кости физиологическим раствором или ЭМСК выполнялось одновременно, однотипно, одним и тем же исследователем и с применением идентичного инструментария, можно предположить, что крупные нежизнеспособные фрагменты кости присутствуют в каждой операционной ране в опыте и контроле, в среднем, с одинаковой частотой и одинаковым количеством.

Однако полная регенерация тканей как через 12 сут, так и через 21 сут намного чаще (успешнее) происходила после введения в дефект кости ЭМСК. То есть ЭМСК ускоряли не только репарацию раны, но и элиминацию из нее частиц некротизированной кости. Причем ускорение репарационных процессов могло быть осуществлено именно за счет более быстрого и эффективного удаления детрита.

Влияние экзосом мультипотентных стромальных клеток на остеointеграцию металлических имплантатов в кости.

Изменения плотности костной ткани при имплантации с использованием ЭМСК. При денситометрии и объединении данных, полученных со всех 5 точек измерения вокруг внедренного изделия, установлено, что средняя плотность костной ткани после операции без ЭМСК через 7 и 10 сут статистически достоверно возрастала на 63,5 и 56,7%, соответственно, относительно 3-х суток (табл. 5) (рис. 1, а, б).

Таблица 5 – Состояние костной ткани проксимального мыщелка большеберцовой кости кроликов рядом с имплантатом в разное время после операции (M±σ)

Параметр	Время после имплантации		
	3 сут	7 сут	10 сут
Контроль (без ЭМСК)			
Общая плотность костной ткани рядом с имплантатом (оптические единицы)	1341±153	2193±356 [#]	2101±323 [#]
Длина контакта костной ткани с имплантатом (L _L)	-	15,00±12,50	43,30±35,40
Объемная плотность кровеносных сосудов (%)	11,30±2,24	12,10±2,09	12,20±1,79
Применение ЭМСК			
Общая плотность костной ткани рядом с имплантатом (оптические единицы)	1974±248*	1732±204	1948±283
Длина контакта костной ткани с имплантатом (L _L)	-	15,60±11,30	75,60±9,82 ^{#§}
Объемная плотность кровеносных сосудов (%)	6,08±1,08*	11,90±2,20 [#]	11,8±1,99 [#]

Примечание: L_L – относительная длина структуры на срезе (% длины на срезе); [#] – p≤0,05 при сравнении с показателями через 3 сут после операции; [§] – p≤0,05 при сравнении с показателями через 7 сут после операции; * – p≤0,05 при сравнении с показателями после имплантации без ЭМСК.

Через 3 сут после имплантации с применением ЭМСК отмечено достоверное увеличение плотности костной ткани (на 47,2%) по сравнению с такой же процедурой, но без использования ЭМСК (см. табл. 5) (рис. 2, а, б). Такие отличия являются основным доказательством того, что ЭМСК влияют на репарацию костной ткани вокруг имплантатов. Кроме того, при имплантации без использования ЭМСК отмечено быстрое и статистически достоверное увеличение плотности костной ткани начиная с 7-х суток. Поврежденная в процессе

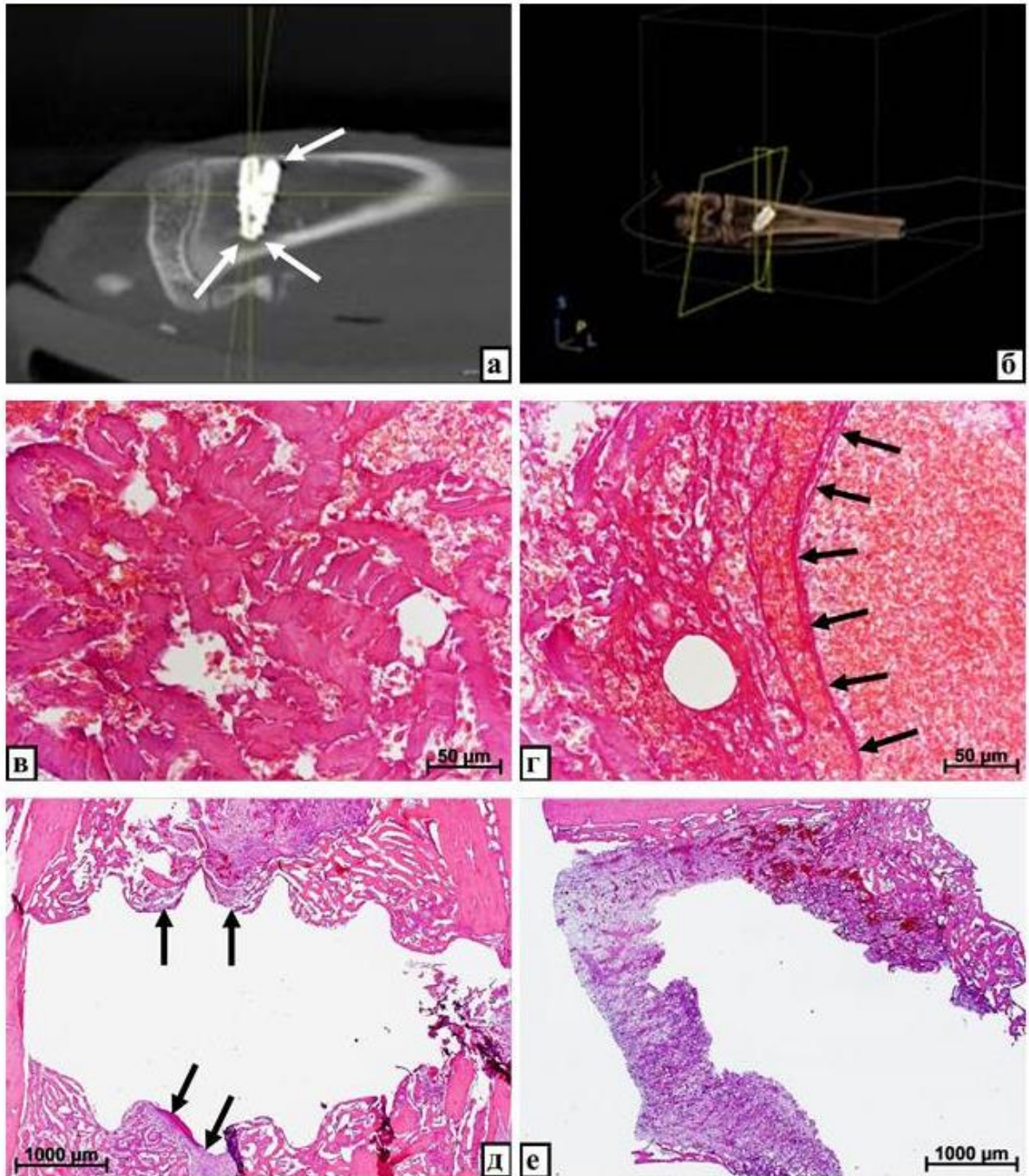


Рис. 1. Костная ткань проксимального мыщелка большеберцовой кости контрольных кроликов в разные сроки после внедрения металлических винтовых имплантатов.

а – имплантат в большеберцовой кости через 3 сут после операции, стрелками обозначены участки сниженной плотности костной ткани; б – 3D-моделирование положения имплантата в через 3 сут после операции; в – обширные геморрагии и большой объем костных фрагментов через 3 сут после имплантации; г – геморрагии и полнокровие сосудов (стрелки) спустя 3 сут после установки имплантата; д – через 10 сут имплантат в большей части граничит с костной тканью и только на небольших участках к нему примыкает рыхлая волокнистая соединительная ткань (стрелки); е – через 10 сут на всем протяжении имплантат отграничен от кости соединительной тканью. в, г, д, е – окраска гематоксилином и эозином.

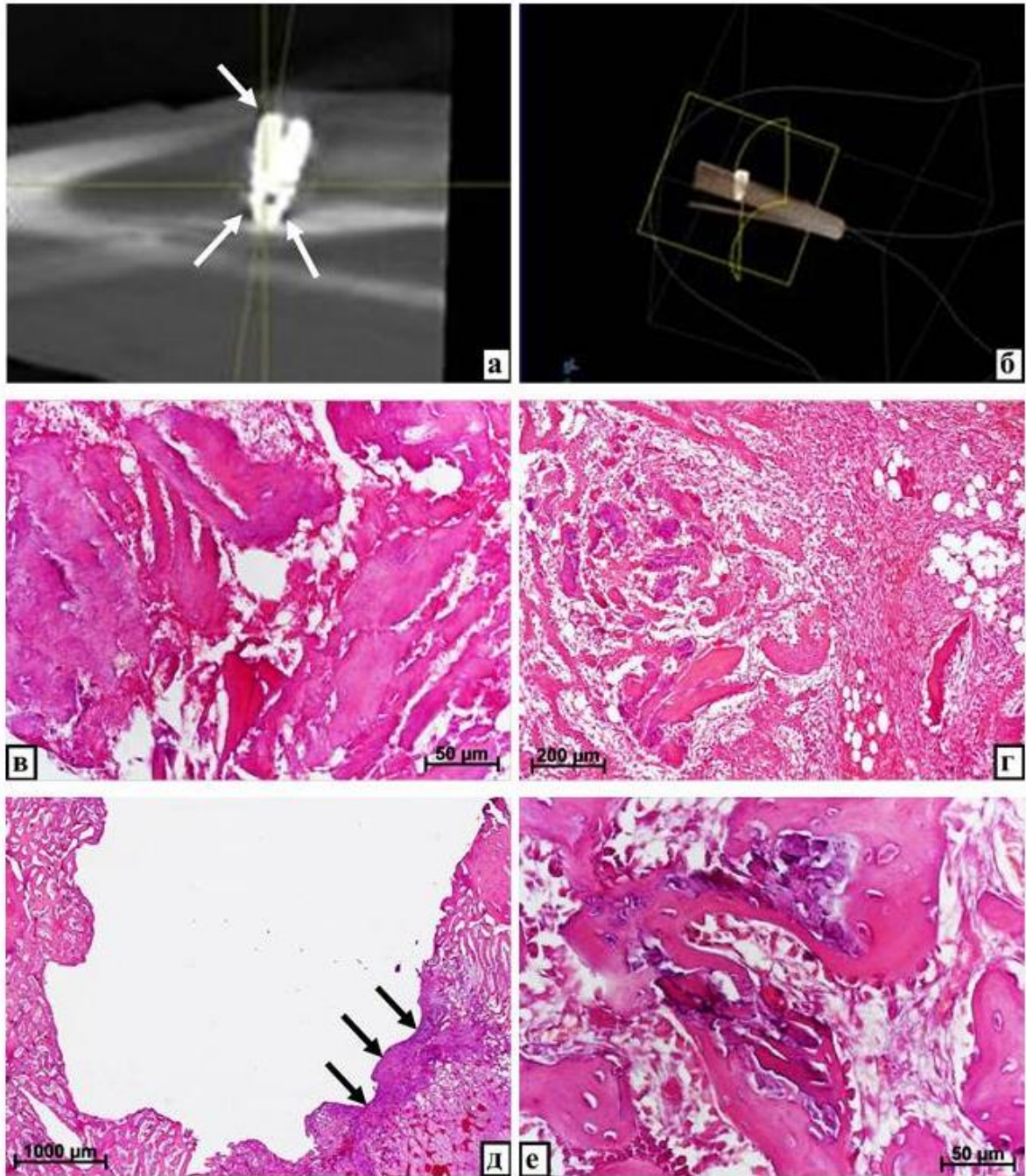


Рис. 2. Большеберцовая кость животных в разные сроки после внедрения в проксимальный мышеч-лок титановых винтовых изделий с предварительным введением ЭМСК.

а – разрезание тканей рядом с шейкой имплантата незначительно (стрелка) через 3 сут после операции, в области верхушки – только по ее сторонам (стрелки); б – 3D-моделирование через 3 сут после имплантации; в – через 3 сут фрагменты костного детрита плотно прилегают друг к другу; г – через 7 сут после внедрения имплантата рядом с отщепленными частями костной ткани расположены структуры молодой кости; д – через 10 сут только на небольшом протяжении имплантат граничит с соединительной тканью (стрелки); е – консолидация между собой и врастание фрагментов отщепленной кости в молодые формирующиеся костные структуры через 10 сут после операции. в, г, д, е – окраска гематоксилином и эозином.

имплантации костная ткань постепенно регенерирует и ее плотность в месте установки изделия нарастает. При введении ЭМСК статистически значимых изменений в течение 10 сут не выявлено. Это, по-видимому, обусловлено тем, что уже через 3 сут после операции плотность костной ткани опытных животных была достоверно выше, чем в контроле. Обнаруженный эффект ЭМСК можно объяснить рядом гипотетических причин, которые были рассмотрены ранее: это иммуномодуляторное и даже иммуносупрессивное действие ЭМСК на фоне активации отдельных иммунокомпетентных клеток, взаимодействие ЭМСК с некоторыми протеинами межклеточного матрикса, активация функциональной активности имеющихся остеобластов и стимуляция дифференцировки собственных МСК в остеобластном направлении, проангиогенные эффекты ЭМСК. Скорее всего, все эти механизмы действия ЭМСК на увеличение плотности костной ткани в области установки имплантата проявляются в совокупности.

Особенности воспалительной реакции в мягких тканях, прилегающих к имплантату, после его внедрения с применением ЭМСК. При изучении неокрашенных срезов тканей с применением люминесценции у контрольных животных никаких объектов, ярко флюоресцирующих при использовании фильтра для родамина, не выявлено. Через 3 сут после внедрения имплантатов с последующим введением ЭМСК в мягких тканях рядом с изделиями обнаружено множество мелких пылевидных объектов, интенсивно флюоресцирующих при установке родаминового фильтра. Такие объекты отнесены к введенным ЭМСК, поскольку их мембраны были окрашены РКН26, ярко светились при воздействии ультрафиолетовым светом через фильтр для родамина. В некоторых случаях эти мелкие флюоресцирующие красным цветом объекты были распределены по ткани и детриту относительно равномерно. На более удаленных от места имплантации участках, например в мышечной ткани, пылевидные частицы встречались крайне редко и, как правило, поодиночке, их можно было обнаружить только в результате тщательного поиска. То есть, ЭМСК из места введения (из высверленного отверстия под имплантат), возможно, под давлением закручиваемого изделия, распределялись по мягким тканям в области хирургического вмешательства, оказывая свое влияние на течение воспалительной реакции и репаративного процесса.

После имплантации с применением ЭМСК к 7-м суткам отдельные клетки содержали включения разного размера, овальной формы и с четкими краями, ярко светящиеся при использовании родаминового фильтра. Единичные внеклеточные мелкие пылевидные объекты встречались крайне редко и только после длительного тщательного поиска. Скорее всего, элиминация введенных ЭМСК, по крайней мере, части из них, происходила через проникновение в клетки, которые способны накапливать и концентрировать ЭМСК, не исключено, что в лизосомах. Подавляющее большинство клеток вообще не содержало люминесцентной метки РКН26. Через 10 сут после имплантации с введением ЭМСК в образцах мягких тканей у каждого животного только при тщательном поиске можно было обнаружить по одному-два мелких пылевидных объекта, интенсивно флюоресцирующих в условиях применения фильтра для родамина.

У контрольных кроликов через 3 сут после операции в мягких тканях на поверхности мышелка большеберцовой кости, прилегающих к имплантату, а значит и находящихся непосредственно в зоне повреждения, обнаружены выраженный отек, геморрагии и значительные воспалительные изменения. В этот срок детрит, фибриновые и эритроцитарные массы были обильно инфильтрованы лейкоцитами, среди которых было много нейтрофилов. В таких участках появлялись отчетливые признаки формирования рубца (присутствовали фибробласты, образовывался межклеточный матрикс). Лейкоцитарные инфильтраты проникали глубоко в мышечные ткани, а среди инфильтрованного лейкоцитами детрита были расположены нежизнеспособные фрагменты поперечнополосатых мышечных симпластов. Необходимо отметить, что достаточно редко встречались нежизнеспособные костные фрагменты, по-видимому, получившиеся при высверливании отверстия в кости для вкручивания винтового имплантата. Эти костные частицы были окружены и инфильтрованы по периферии макрофагами (крупные фрагменты) или полностью разделены на более мелкие частицы

фагоцитами, то есть даже применение водяного охлаждения в процессе имплантации не приводило к полному удалению мелких костных фрагментов.

Повреждение тканей во время имплантации сопровождается отеком и образованием детрита, который постепенно или удаляется наружу вместе с отечной жидкостью, или разжижается ферментами лейкоцитов (Gwalani L.A., Orange J.S., 2018; Shao Q. et al., 2019; Sun X. et al., 2020). Далее такой частично или полностью лизированный детрит также вместе с раневым отделяемым элиминируется из тканей или поступает в сосудистое русло, преимущественно, лимфатическое.

Постепенно (через 3 сут после имплантации) детрит в тканях практически исчезал, оставались только медленно лизируемые крупные отщепленные фрагменты кости и некротизированных симпластов скелетных мышц. Через 3 сут после имплантации с применением ЭМСК в тканях регистрировалась значительно менее выраженная лейкоцитарная инфильтрация и разные по величине костные фрагменты у всех животных. Мелкие фрагменты были уже полностью инфильтрированы и разрушены многоядерными макрофагами, а в более крупных фрагментах деструкция фагоцитами в этот срок происходила только на периферии, центральная часть представляла собой гомогенную эозинофильную бесклеточную массу.

Можно предположить, что в результате иммуномодуляторного эффекта ЭМСК (Blazquez R. et al., 2014; Simonson O.E. et al., 2015; Li Q.C. et al., 2019), связанного с подавлением пролиферации, миграции и функциональной активности иммунокомпетентных клеток (Tan J.L. et al., 2018; Li Q.C. et al., 2019; Harrell C.R. et al., 2020), лизис детрита идет медленнее, более крупные его фрагменты остаются в тканях. Это может способствовать замедлению очищения раны после хирургического вмешательства, что может сдерживать репарацию и ухудшать результаты имплантации.

Через 7 сут после имплантации у контрольных кроликов все мягкие ткани в области повреждения кости (вблизи имплантата) представляли собой молодую рыхлую волокнистую соединительную ткань с большим числом фибробластов и в разной степени инфильтрованную лимфоцитами и макрофагами. Иногда в этой формирующейся соединительной ткани встречались некротизированные костные фрагменты диаметром до 300 мкм на разной стадии деструкции.

После имплантации с последующим ведением ЭМСК через 7 сут, несмотря на формирование обширных массивов соединительной ткани, еще оставались признаки некроза и воспаления. Ткани были отечны, содержали детрит, который только начинал рассасываться и замещаться соединительной тканью. Частично была некротизирована и поперечнополосатая мышечная ткань, прилегающая к месту операции, нежизнеспособные симпласты еще не были полностью лизированы макрофагами. Во всех наблюдениях ткани содержали мелкие костные фрагменты, в основном со скоплениями многоядерных макрофагов вокруг. Кроме того, гигантские клетки инородных тел во множестве присутствовали и вне частиц кости – в формирующейся соединительной ткани и рядом с некротизированными мышцами.

Через 10 сут у контрольных животных продолжалось формирование соединительной ткани в области имплантата. Эта соединительная ткань становилась похожей на плотную волокнистую и по ее границе продолжался лизис нежизнеспособных мышечных симпластов, между которыми развивалась рыхлая неоформленная соединительная ткань. У 6 животных были найдены костные фрагменты, и по большей части они были практически полностью лизированы, иногда только по небольшим остаткам гранулам можно было определить местонахождение таких структур.

Спустя 10 сут после внедрения имплантатов в условиях предварительного введения ЭМСК мягкие ткани на месте хирургического вмешательства представляли собой плотную или рыхлую волокнистую соединительную ткань. У всех животных этой группы в данный срок эксперимента в соединительной ткани рядом с имплантатом были расположены остатки лизируемых костных фрагментов. В некоторых случаях рядом с многоядерными макрофагами со слившейся цитоплазмой содержались частицы обызвествленной костной

ткани, в других – фрагменты кости были полностью инфильтрированы такими макрофагами, а иногда только группы гигантских клеток инородных тел свидетельствовали, что ранее на таких участках присутствовали нежизнеспособные ткани.

Скорее всего, присутствие как детрита, так и большего количества некротизированных костных фрагментов после применения ЭМСК, обусловлено их иммуномодуляторным эффектом (Blazquez R. et al., 2014; Simonson O.E. et al., 2015; Li Q.C. et al., 2019). В результате супрессии воспаления (Simonson O.E. et al., 2015; Tan J.L. et al., 2018; Li Q.C. et al., 2019) в первые сроки после имплантации нарушается лизис детрита, в том числе и нежизнеспособных костных фрагментов. В нормальных условиях лизированный разжиженный детрит элиминируется, как раневое отделяемое, между швов, наложенных на операционный разрез. Однако задержка после применения ЭМСК лизиса детрита приводила к тому, что когда он становился разжиженным, края кожного разреза уже консолидировались. Детрит не мог быть удален наружу, начиналось его рассасывание, в том числе и костных фрагментов, непосредственно в тканях, с дальнейшим поступлением продуктов лизиса в сосудистое русло, главным образом, лимфатическое. То есть, через 10 сут после имплантации в тканях присутствовало еще много нелизированного детрита, в том числе, происходящего из мышечной ткани, а также большое количество костных частиц, и этот детрит рассасывался через инициацию гранулематозного воспалительного процесса.

Количественный анализ микроциркуляции и клеточной инфильтрации в мягких тканях, прилегающих к имплантату, после его внедрения в костную ткань в условиях применения ЭМСК. В качестве отличий состояния сосудистого русла, которые могли быть вызваны введением ЭМСК, относительно соответствующих данных в эти же сроки в контроле, необходимо отметить большую объемную плотность кровеносных сосудов через 10 сут (в 2,7 раза), меньший объем лимфатических сосудов и интерстициальных пространств через 3 сут (в 2,6 раза), возросшую площадь межклеточных щелей спустя 7 сут (на 69,3%) (табл. 6). Более высокий показатель относительной площади кровеносных сосудов через 10 сут после имплантации на фоне введения ЭМСК свидетельствует о более активной воспалительной реакции или более выраженном формировании грануляций к окончанию времени наблюдения по сравнению с имплантацией в группе контроля, т.е. без введения ЭМСК.

Сравнительно низкие показатели объемной плотности лимфатических сосудов и интерстициальных пространств через 3 сут после операции с применением ЭМСК могут указывать на уменьшение выраженности воспаления. ЭМСК супрессируют воспалительную реакцию (Simonson O.E. et al., 2015; Tan J.L. et al., 2018; Li Q.C. et al., 2019), и детрит в меньшей степени подвергается воздействию лизосомальных ферментов иммунокомпетентных клеток (Gwalani L.A., Orange J.S., 2018; Shao Q. et al., 2019; Sun X. et al., 2020), функциональная и пролиферативная активность которых также подавлена ЭМСК (Tan J.L. et al., 2018; Li Q.C. et al., 2019; Harrell C.R. et al., 2020). В результате в поврежденных тканях оставались крупные нелизированные фрагменты детрита. Такие фрагменты не элиминировались наружу между швами и не всасывались в лимфатическое русло, а оставались в месте хирургического вмешательства вплоть до окончания эксперимента, поддерживая вяло текущую воспалительную реакцию.

При сравнении численности и соотношения клеток в мягких тканях рядом с внедренным в большеберцовую кость имплантатом у животных без и с введением ЭМСК было обнаружено, что после их применения через 3 сут уменьшалась численная плотность всех клеток (на 40,3%). Относительное и абсолютное количество лимфоцитов снижалось соответственно на 48,8% и в 2,1 раза, а содержание нейтрофилов в единице площади среза – на 57%. К 7-м суткам в результате использования ЭМСК уменьшалось абсолютное количество всех клеток (на 59,3%) и нейтрофильных лейкоцитов (на 88%), но возрастало процентное содержание клеток с признаками деструктивных изменений (в 2,3 раза). Введение ЭМСК приводило к тому, что через 10 сут возрастало относительное содержание макрофагов (на 86,1%) и клеток с явлениями деструкции (на 63,6%) (см. табл. 6).

Таблица 6 – Структурная организация мягких тканей с поверхности проксимального мыщелка большеберцовой кости рядом с внутрикостным имплантатом у кроликов (M±σ)

Структуры		Время после имплантации		
		3 сут	7 сут	10 сут
Контроль (без ЭМСК)				
Капилляры: кровеносные лимфатические	A _A	3,56±1,24	3,00±1,41	1,56±0,73
	A _A	7,33±0,87	2,33±1,12 [#]	3,78±1,39 [#]
Интерстициальные пространства	A _A	27,80±8,03	4,33±1,00 [#]	6,56±0,88 [#]
Клетки и межклеточное вещество	A _A	61,30±7,48	90,30±2,45 [#]	88,10±1,83 [#]
Численная плотность всех клеток	N _A	174,00±20,10	188±33,50	88±13,9 ^{#S}
Лимфоциты	%	19,20±2,77	18,4±3,28	12,6±1,33 [#]
	N _A	33,50±6,23	34,80±10,10	11±1,57 ^{#S}
Нейтрофилы	%	20,10±2,93	10,9±1,45 [#]	4,22±0,833 ^{#S}
	N _A	35,00±5,52	20,3±3,37 [#]	3,72±1,05 ^{#S}
Макрофаги	%	8,44±1,59	15±2,4 [#]	10,1±1,27
	N _A	14,90±4,04	28,4±7,81	8,9±1,95 ^S
С признаками деструкции	%	6,00±1,12	2,11±0,782 [#]	4,89±1,05 ^S
	N _A	10,50±2,57	3,9±1,4 [#]	4,33±1,28 [#]
Применение ЭМСК				
Капилляры: кровеносные лимфатические	A _A	1,33±0,492	3,11±1,45	4,22±0,83 ^{#*}
	A _A	2,83±0,94 [*]	2,56±1,51	4,56±1,01
Интерстициальное пространство	A _A	10,50±2,28 [*]	7,33±1,00 [*]	8,00±1,00
Клетки и межклеточное вещество	A _A	85,30±2,50 [*]	87,00±2,65	83,20±1,72
Численная плотность всех клеток	N _A	124,00±11,60 [*]	118,00±9,71 [*]	72,20±13,90 ^{#S}
Лимфоциты	%	12,90±1,24 [*]	14,20±1,48	13,60±1,42
	N _A	16,00±2,03 [*]	16,70±2,09	9,68±1,51 ^{#S}
Нейтрофилы	%	17,90±1,62	9,22±1,20 [#]	6,67±1,00 [#]
	N _A	22,30±2,98 [*]	10,80±1,35 ^{#*}	4,74±0,79 ^{#S}
Макрофаги	%	7,50±0,79	18,20±1,09 [#]	18,80±1,64 ^{#*}
	N _A	9,34±1,56	21,40±1,67 [#]	13,60±3,00 ^S
С признаками деструкции	%	6,50±1,31	4,78±0,83 [*]	8,00±0,87 ^{S*}
	N _A	8,03±1,60	5,62±1,02	5,79±1,27

Примечание: A_A – относительная площадь структур на срезе (%); N_A – численная плотность клеток на 10⁵ мкм² площади среза. [#] – p≤0,05 при сравнении с показателями через 3 сут после операции; ^S – p≤0,05 при сравнении с показателями через 7 сут после операции; * – p≤0,05 при сравнении с показателями после имплантации без ЭМСК.

При сравнении численности и соотношения клеток в мягких тканях рядом с внедренным в большеберцовую кость имплантатом у животных без и с введением ЭМСК было обнаружено, что после их применения через 3 сут уменьшалась численная плотность всех клеток (на 40,3%). Относительное и абсолютное количество лимфоцитов снижалось соответственно на 48,8% и в 2,1 раза, а содержание нейтрофилов в единице площади среза – на 57%. К 7-м суткам в результате использования ЭМСК уменьшалось абсолютное количество всех клеток (на 59,3%) и нейтрофильных лейкоцитов (на 88%), но возрастало процентное содержание клеток с признаками деструктивных изменений (в 2,3 раза). Введение ЭМСК приводило к тому, что через 10 сут возрастало относительное содержание макрофагов (на 86,1%) и клеток с явлениями деструкции (на 63,6%) (см. табл. 6).

Можно отметить, что применение ЭМСК сопровождалось уменьшением числа лейкоцитов уже через 3 сут после имплантации по сравнению с контрольной группой. Такие результаты лучшего всего объясняются с позиции иммуномодуляторного эффекта ЭМСК (Blazquez R. et al., 2014; Simonson O.E. et al., 2015; Li Q.C. et al., 2019), в результате которого происходит супрессия пролиферативной и функциональной активности лимфоцитов

(Blazquez R. et al., 2014; Simonson O.E. et al., 2015) и нейтрофилов (Simonson O.E. et al., 2015; Li Q.C. et al., 2019; Harrell C.R. et al., 2020), а также подавляется выраженность воспаления (Simonson O.E. et al., 2015; Tan J.L. et al., 2018; Li Q.C. et al., 2019).

Однако воспалительная реакция развивается при любом повреждении тканей, так как в них присутствует антигенный детрит. Воспаление необходимо для удаления этого детрита и успешного протекания репаративных процессов. Применение ЭМСК подавляет воспаление (Simonson O.E. et al., 2015; Tan J.L. et al., 2018; Li Q.C. et al., 2019), при этом замедляется лизис детрита и его элиминация наружу с раневым отделяемым или в регионарные лимфатические узлы.

Необходимо обратить внимание на более высокое число макрофагов и клеток с признаками деструкции через 10 сут после операции с применением ЭМСК (см. табл. 6). Это может свидетельствовать о продолжающемся гранулематозном воспалении, обусловленном необходимостью лизиса костных и других плотных фрагментов детрита.

Патоморфология костных тканей после внедрения имплантатов в условиях применения ЭМСК. Через 3 сут после имплантации без применения ЭМСК между имплантатами и структурами неповрежденной кости выявлялись геморрагии, выраженная гиперемия, костный детрит (нежизнеспособные костные отломки разных размеров и форм) (рис. 1, в, г). К 7-м суткам образование костной ткани рядом с имплантатом происходило только на небольших участках. В основном имплантат граничил со обширными разрастаниями рыхлой волокнистой соединительной ткани с воспалительной инфильтрацией и множеством отдельно расположенных нежизнеспособных костных фрагментов. На отдельных местах происходила консолидация жизнеспособных фрагментов кости в костные балки, на других – лизис некротизированных костных отломков.

Спустя 10 сут после хирургического вмешательства без использования ЭМСК в 3 случаях произошла полная остеоинтеграция внедренного изделия, которое со всех сторон контактировало с костной тканью. В других 3 наблюдениях имплантат был, в основном, окружен губчатым веществом кости, и только на небольших участках граничил со структурами рыхлой волокнистой соединительной ткани. Еще у 3 кроликов весь имплантат находился в рыхлой волокнистой соединительной ткани с большим количеством нежизнеспособных инкапсулированных костных отломков. В этот срок вариационный ряд показателей длины контакта металла с костной тканью, составленный по данным от всех животных, находился в интервале 0 – 90% от протяженности всей поверхности изделия на срезах, что обусловило высокое значение стандартного отклонения среднего значения и отсутствие статистически значимых отличий от результатов исследования в предыдущие сроки.

В качестве особенностей морфологической картины при имплантации с использованием ЭМСК можно отметить, что через 3 сут гиперемии практически не было, а костный детрит был сгруппирован, сжат и занимал несколько меньший объем (рис. 2, в). К 7-м суткам винтовое изделие было окружено различными типами волокнистой соединительной ткани, где содержалось множество молодых костных балок. Кроме того, везде рядом с инородным телом были расположены костные фрагменты, в основном небольшими группами, и было зарегистрировано интенсивное образование рядом с костными отломками молодой костной ткани (рис. 2, г). Это может быть связано как с консолидацией жизнеспособных отщепленных частиц кости между собой, так и с формированием молодой кости из материала лизируемых «старых» фрагментов.

После операции с предварительным введением ЭМСК у всех животных через 10 сут только на очень незначительных местах внедренное изделие было отграничено от кости рыхлой волокнистой соединительной тканью, где присутствовали крупные фрагменты еще нелизируемого костного детрита. На всем остальном протяжении инородное тело плотно контактировало со структурами кости, и весь детрит был интегрирован в растущие структуры молодой костной ткани (рис. 2, д, е). После использования ЭМСК вариационный ряд показателей длины контакта металла с костью через 10 сут был стабильными и находился в интервале 60

– 90%. В результате этого через 10 сут процент контакта инородного тела с костной тканью стал выше в 4,8 раза по сравнению с 7-ми сутками. Но при этом не было достоверных различий от данных, полученных при имплантации без применения ЭМСК, вследствие уже отмеченного высокого значения стандартного отклонения в последнем случае.

Объемная плотность кровеносных сосудов рядом с имплантатом после операции без применения ЭМСК была практически постоянной все время наблюдения и колебалась от 9 до 15%. Объемная плотность сосудов после имплантации с предварительным введением ЭМСК через 3 сут была ниже соответственно на 95,7 и 94,1%, чем через 7 и 10 сут. Данный показатель через 3 сут после использования ЭМСК был меньше на 85,9% относительно результатов имплантации в этот же срок в контрольной группе.

Повреждение тканей во время подготовки и самой процедуры имплантации сопровождается образованием детрита. Даже применение водяного охлаждения в процессе имплантации не приводит к полному удалению мелких костных фрагментов, которые при внедрении винтового изделия оттесняются в окружающие ткани и спрессовываются там. Длительное присутствие детрита в месте имплантации, соответственно пролонгация воспалительного процесса и отсрочка регенерации тканей, могут ухудшить приживление внедренных изделий.

Наиболее вероятно, что высокие показатели васкуляризации тканей через 3 сут после имплантации без применения ЭМСК обусловлены воспалительным процессом, вызванным операционной травмой кости. Также одной из причин воспаления является наличие в тканях рядом с имплантатом большого объема костного детрита. При воспалительной реакции в тканях оказывается множество биологически активных веществ, способствующих стазу, тромбозу и соответствующему расширению кровеносных сосудов, что является физиологической реакцией на повреждение, препятствующей распространению антигенов и токсинов из места травмы по всему организму.

После имплантации без ЭМСК нарастающая гиперемия способствует разобщению костных отломков, отдалению их друг от друга, тем самым уменьшая плотность тканей рядом с имплантатом через 3 сут. При этом повреждаются или пережимаются остающиеся функционирующими питающие сосуды. Это приводит к некротизированию большого числа костных фрагментов с необходимостью их лизиса, что, в свою очередь, пролонгирует воспаление и увеличивает сроки интеграции имплантата. Затем активность воспалительного процесса стихает и поддерживается только присутствием еще нелизированных отломков кости. В результате введения ЭМСК активность воспаления снижается (Simonson O.E. et al., 2015; Tan J.L. et al., 2018; Li Q.C. et al., 2019), соответственно, ниже степень расширения кровеносных сосудов. Далее начинается остеогенез по ангиогенному типу, и объемная плотность сосудов через 7 сут возрастает и остается на этом уровне до окончания эксперимента.

Как итог уменьшения интенсивности воспалительного процесса ЭМСК, сгруппированные костные фрагменты рядом с имплантатом, не подвергаются лизису и повреждению ферментами лейкоцитов (Gwalani L.A., Orange J.S., 2018; Shao Q. et al., 2019; Sun X. et al., 2020), а консолидируются, срастаются друг с другом и неповрежденными костными структурами. При этом отсутствуют нарушения кровоснабжения этих костных частиц, так как питающие их сосуды не пережаты ни гиперемизированными другими сосудами, ни отеком, причиной которого также являются блокада кровотока и гиперемия, ни воспалительным инфильтратом. Возможно, что эти костные частицы, кроме консолидации, даже могут служить точками начала регенерации кости, источником остеобластов, откуда начинается формирование новых остеонов и костных балок.

Не исключено, что сжатие отщепленных костных фрагментов при закручивании винтового изделия в условиях менее выраженной гиперемии и отека является главной причиной обнаруженного через 3 сут после имплантации с введением ЭМСК увеличения плотности костной ткани. Развивающийся к 7-м суткам ангиогенез приводит к уменьшению плотности структур, но в этот срок не происходит разделения уже плотно скрепленных фибрином и начавших срастаться костных отломков.

Относительная стабильность морфометрических показателей остеointеграции после имплантации с введением ЭМСК, скорее всего, также связана с их иммуномодуляторным действием (Blazquez R. et al., 2014; Simonson O.E. et al., 2015; Li Q.C. et al., 2019). Контроль ЭМСК активности воспаления (Simonson O.E. et al., 2015; Tan J.L. et al., 2018; Li Q.C. et al., 2019), меньшая выраженность расширения сосудов и отека, по-видимому, приводят к тому, что отщепленные костные фрагменты остаются в уплотненном состоянии сразу после вкручивания винтового имплантата. Процесс остеогенеза при использовании ЭМСК в меньшей мере зависит от количества образовавшихся при имплантации отщепленных фрагментов кости: если их много, то они консолидируются и составляют основу для роста молодой кости, если мало – быстро лизируются и не препятствуют формированию кости как из неповрежденных костных балок, так и из кровеносных сосудов (по типу ангиогенного остеогенеза). Лизису в любом случае подвергается значительно меньший объем некротизированной костной ткани и, соответственно, этот лизис быстрее заканчивается, особенно в условиях активации макрофагов ЭМСК (Tan J.L. et al., 2018).

Распределение экзосом мультитипентных стромальных клеток по организму после введения в дефект кости перед имплантацией. В *легких* всех 12 кроликов через 3 сут после введения ЭМСК были обнаружены многочисленные объекты очень мелких размеров, практически пылевидные, с яркой флюоресценцией при использовании фильтра для родамина. Примечательно, что все такие светящиеся красным цветом частицы были расположены в альвеолах (рис. 3, а). При внимательном изучении на большом увеличении было отмечено, что иногда таким образом флюоресцирующие объекты в просвете альвеол расположены свободно, тогда как в других случаях – в каких-то относительно гомогенных структурах, иногда очень больших, достигающих размеров по одному из диаметров 20 мкм. На уровне люминесцентной микроскопии в таких объемных образованиях не было заметно каких-либо клеток, но они содержали несколько или очень большое количество мелких объектов, менее 1 мкм размером, с интенсивным свечением при установке родаминового фильтра (рис. 3, б).

Наиболее вероятно, что такими флюоресцирующими красным цветом очень мелкими объектами в легких являются ЭМСК, мембранные структуры которых были окрашены люминесцентным красителем РКН26. При введении в искусственно созданный дефект проксимального мышцелка большеберцовой кости перед закручиванием винтового металлического имплантата часть ЭМСК попадает в мягкие ткани, еще часть поступает туда при введении в дефект изделия. Не исключено и вытеснение ЭМСК в окружающую костную ткань закручиваемым винтом.

В мягких тканях на поверхности мышцелка и в костной ткани, особенно в красном костном мозге, имеется множество кровеносных сосудов, которые повреждаются при подготовке и в процессе самой процедуры имплантации. Поэтому возможно попадание ЭМСК в кровь и их транспортирование с током крови через правые отделы сердца в малый круг кровообращения – в легкие, где ЭМСК, возможно, как инородные частицы в силу своих очень малых размеров выходят из сосудов и оказываются в просвете альвеол.

Посредством тока крови из места имплантации в легкие попадают не только ЭМСК, но и клеточно-тканевый детрит, в том числе и сгустки фибрина при рассасывании геморрагий в поврежденных тканях. При использовании ЭМСК в процессе хирургического вмешательства возможно их слипание за счет фибрина, адгезия к фрагментам тканевого детрита и фагоцитоз вместе с этим детритом и фибрином иммунокомпетентными клетками. Затем детрит с ЭМСК, фагоциты с ЭМСК и фибриновые сгустки с ЭМСК попадают в кровоток через поврежденные сосуды, затем – в правые полости сердца. Далее с током крови все это транспортируется в легкие, где, пройдя через оболочки сосудов, оказывается в просвете альвеол. Наиболее вероятно, что крупные гомогенные структуры с характерной точечной люминесценцией являются или фибриновыми сгустками, или фрагментами детрита, или погибшими макрофагами, попавшими в легкие вместе с адгезированными или адсорбированными ЭМСК из места имплантации и их применения.

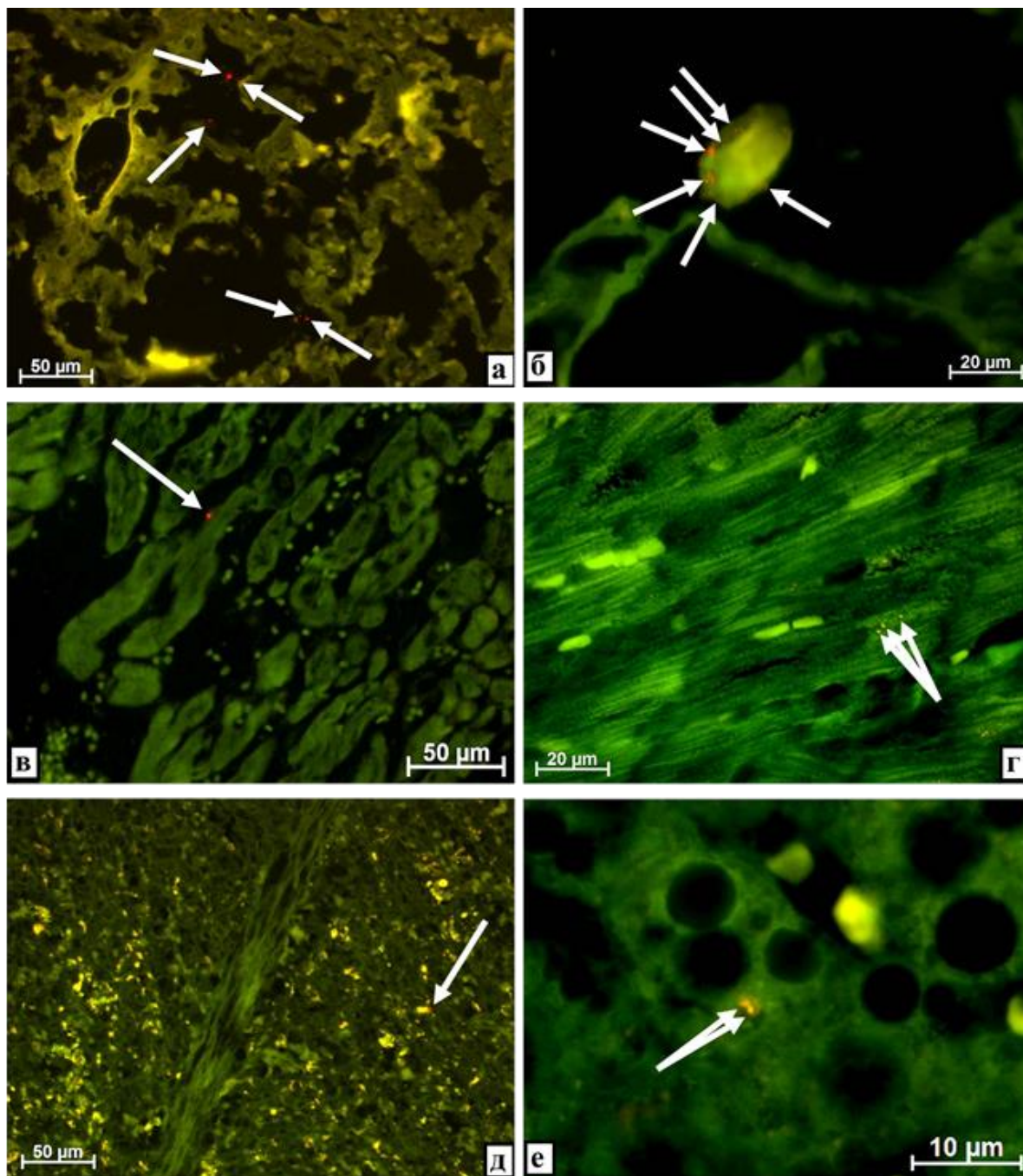


Рис. 3. Объекты с яркой флюоресценцией при использовании родаминового фильтра (ЭМСК) в разных органах после внедрения имплантата в большеберцовую кость кроликов. Совмещение изображений, полученных при использовании фильтров Alexa 488 и для родамина.

а – через 3 сут в легком присутствуют объекты с красной флюоресценцией (стрелки); б – через 3 сут в легком объекты с красной флюоресценцией (стрелки) заключены в гомогенную субстанцию; в – через 3 сут в миокарде расположен объект с красным свечением (стрелка); г – через 10 сут в миокарде расположено несколько объектов (стрелки) с преобладанием красного свечения; д – через 3 сут рядом с макрофагом красной пульпы селезенки присутствует объект с красной флюоресценцией (стрелка); е – флюоресценция с красным оттенком небольших объектов печеночной паренхимы спустя 3 сут (стрелки).

Через 7 сут единичные светящиеся на фоне фильтра для родамина объекты были найдены только у 3 из 9 животных. Эти объекты по-прежнему были расположены в альвеолах, но уже не были пылевидными, а имели размер около 5 – 7 мкм. Интенсивность флюоресценции несколько уменьшалась, в данном случае был отмечен уже не чистый красный цвет, а скорее оранжевый.

Не исключено, что все найденные в легких объекты с красным оттенком флюоресценции на 7-е сутки являются уже не собственно ЭМСК, а клетками с ЭМСК. То есть, в альвеолах присутствуют иммунокомпетентные клетки (нежизнеспособные, детрит) с ЭМСК. Но так как численность ЭМСК в месте операции значительно уменьшилась, то и количество светящихся красным цветом при использовании родаминового фильтра объектов в легких сократилось, также снизилась и яркость их флюоресценции. Практически такая же картина, как и через 7 сут, была выявлена через 10 сут. Также очень редкие светящиеся красным цветом объекты диаметром около 7 мкм присутствовали в просвете альвеол у 3 из 9 животных.

По мере развития репаративных процессов в поврежденном при имплантации мышце большеберцовой кости уменьшался объем тканевого детрита как в месте хирургической травмы, так и в кровеносном русле и легких. Также снижалась степень лейкоцитарной инфильтрации, меньшее количество иммунокомпетентных клеток из места внедрения инородного тела оказывалась в крови и легких. Все это, вместе с учетом элиминации ЭМСК из тканей, приводило к тому, что в легких уменьшалось количество объектов со специфической флюоресценцией (лейкоцитов с детритом и ЭМСК) при использовании фильтра для родамина.

В сердце через 3 сут после имплантации металлического винтового изделия в проксимальный мышцелок большеберцовой кости кроликов с предварительным введением ЭМСК были обнаружены единичные очень мелкие объекты с интенсивной флюоресценцией при использовании фильтра для родамина. Такие объекты всегда были расположены в интрамуральных сосудах, иногда на выстилке клапанов или собственно предсердия или желудочка. Ни в одном наблюдении не было обнаружено тканевого детрита или клеток с такими пылевидными светящимися красным цветом объектами (рис. 3, в).

ЭМСК из места введения самостоятельно, с детритом или в клетках с током крови попадают в правые отделы сердца. Из правых предсердия и желудочка сердца ЭМСК не могут попасть в непосредственно миокард, а могут там оказаться только пройдя через легкие. Именно поэтому в сердечной мышце присутствуют только единичные ЭМСК – мелкие пылевидные объекты с очень ярким красным свечением при установке родаминового фильтра.

Спустя 7 сут картина в миокарде практически не изменилась. По-прежнему в структурах сердечной мышцы присутствовали очень мелкие объекты с интенсивной красной флюоресценцией в условиях применения фильтра для родамина. Эти специфически светящиеся объекты, так же как и в предыдущий срок, были расположены с определенной тропностью к сосудистым структурам. Расположение ЭМСК в просвете капилляров, на клапанах и хордах, а также в стенке сосудов является дополнительным доказательством, что такие объекты с красным свечением – не артефакты, а структуры, которые попали в сердце через сосудистое русло с током крови. Благодаря высокому давлению в сосудах сердца, а также сократительной деятельности миокарда, ЭМСК продвигаются по сосудам в глубину сердечной мышцы, попадая даже в ее капилляры.

К концу наблюдения, к 10-м суткам, в миокарде можно было обнаружить только слабо светящиеся на фоне применения родаминового фильтра мелкие объекты, которые встречались крайне редко и были обнаружены только у 2 кроликов из 9 (рис. 3, г). Учитывая затихание воспаления в травмированных тканях задней конечности к этому сроку, а также снижение количества и яркости красной флюоресценции в легких, можно предположить, что практически полное исчезновение ярко люминесцирующих объектов обусловлено прекра-

щением поступления детрита в кровь из места имплантации. К этому же сроку из сердечной мышцы элиминировались и попавшие туда ранее ЭМСК.

В *селезенке* через 3 сут после операции с применением ЭМСК только в 1 случае из 12 был обнаружен пылевидный объект с четким преобладанием флюоресценции при использовании фильтра для родамина. Этот объект находился рядом с крупным макрофагом с сильной аутофлюоресценцией, расположенном в красной пульпе органа, и, возможно, был адгезирован к поверхности фагоцита или даже находился в процессе поглощения (рис. 3, д). Во всех остальных наблюдениях в этот и остальные сроки подобные объекты не выявлены.

Выше показано, что введенные ЭМСК из мышелка большеберцовой кости попадают в легкие, проходят, скорее всего, частично, мимо легочных макрофагов и оказываются в сердечной мышце. Так как селезенка кровоснабжается через довольно толстую селезеночную артерию (ветвь *truncus celiacus*, отходящая от брюшного отдела аорты), то в этот орган также должны попадать ЭМСК, прошедшие через сосуды легких. Можно предположить, что ЭМСК действительно оказываются в селезенке, но, попав туда, они сразу фагоцитируются макрофагами, присутствующими в органе в большом количестве. Так как макрофаги селезенки адсорбируют, кроме ЭМСК, еще множество других веществ, часть из которых обладает способностью к аутофлюоресценции (эритроциты и гемосидерин) (Wu X. et al., 2010; Campo J.J. et al., 2011; Watson J., 2011), то свечение макрофагов за счет метки ЭМСК РКН26 может маскироваться люминесценцией других объектов, также находящихся в фагосомах.

В *печени* каждого животного через 3 сут после имплантации с использованием ЭМСК были найдены отдельные включения с красным оттенком флюоресценции в макрофагах, которые были расположены вблизи синусоидов. Кроме этого, у 4 из 12 кроликов были обнаружены объекты с преимущественным свечением при установке фильтра для родамина непосредственно в паренхиме печени (рис. 3, е). То есть ЭМСК из места введения в ткани задней конечности кроликов через 3 сут можно зарегистрировать в печени. Эти ЭМСК, прежде чем попасть в печень, должны пройти капиллярную сеть легких. Скорее всего, в печень ЭМСК транспортируются с кровью по системе печеночной артерии, затем ЭМСК в синусоидах адгезируются к эндотелию, фагоцитируются купферовскими клетками или адсорбируются гепатоцитами и другими клетками данного органа.

К 7-м суткам в печени выявлено множество макрофагов с четким красным оттенком люминесценции при установке родаминового фильтра. Вместе с этим из всех структур печени исчезали мелкие пылевидные объекты. После операции на костях задних конечностей детрит с ЭМСК какое-то время поступает в кровь. Детрит и часть ЭМСК адсорбируется макрофагами легких, а оставшиеся ЭМСК распространяются по системе большого круга кровообращения по всему организму. По-видимому, к 7-м суткам поступление ЭМСК из места имплантации в кровь в связи с репарацией поврежденных тканей прекращается или значительно уменьшается. Поэтому из печени исчезают собственно ЭМСК (очень мелкие пылевидные объекты с ярким свечением при использовании родаминового фильтра) и остаются макрофаги, несколько ранее адсорбировавшие из протекающей крови находящиеся там ЭМСК и приобретшие вследствие этого способность к красному свечению за счет присутствия фрагментов ЭМСК с мечеными РКН26 мембранами в фагосомах или окрашивания РКН26 лизосомальных и других мембран самих фагоцитов.

Через 10 сут в печени объекты с преимущественным свечением (даже слабым) на фоне применения фильтра для родамина не выявлены. К этому сроку завершилась альтеративная фаза воспаления в поврежденных при имплантации тканях задних конечностей. Соответственно значительно уменьшилось поступление детрита и ЭМСК из места хирургического вмешательства в кровь и диссеминация с кровью после фильтрации в легких по всему организму. Постепенно из печени фагоциты с ЭМСК или их фрагментами в лизосомах мигрируют или концентрация в них флюоресцентного красителя снижается до уровня, незаметного при визуальном наблюдении.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, применение ЭМСК в процессе внутрикостной имплантации является целесообразным для достижения стабильности успехов процедуры внедрения инородных тел в костную ткань. Применение этой технологии снижает зависимость остеоинтеграции имплантатов от количества костных фрагментов, находящихся в костных тканях рядом с внедренным изделием. В условиях предварительного введения ЭМСК, эти костные частицы не лизируются, а консолидируются между собой и встраиваются в растущие костные балки. Однако положительные результаты использования ЭМСК могут быть достигнуты только при условии предварительного очищения мягких тканей вокруг места внедрения имплантата от нежизнеспособной мышечной ткани, костных фрагментов и детрита.

ВЫВОДЫ

1. По данным патоморфологического анализа, введение ЭМСК в стандартизированный хирургический дефект костной ткани способствует более эффективному очищению послеоперационной раны, ее быстрому заживлению, формированию менее грубой костной мозоли и увеличению частоты завершённой регенерации повреждённой кости (до 90% случаев к 21-м суткам) по сравнению с контролем (полное заживление костного дефекта в 40% случаев).

2. К особенностям патоморфологических реакций после применения ЭМСК для влияния на приживание инородного тела относятся супрессия воспаления и, как следствие, консолидация между собой и с регенерирующей костью образовавшихся при имплантации костных фрагментов. При использовании ЭМСК у всех животных через 10 сут происходит почти полное сращение винтового имплантата с костной тканью, тогда как после операции без введения ЭМСК наблюдается разнородная патоморфологическая картина: от практически полной остеоинтеграции имплантата до абсолютного отсутствия контакта между инородным телом и новыми фрагментами костной ткани.

3. В мягких тканях на поверхности проксимального мышечка большеберцовой кости в области внутрикостных имплантатов у кроликов с предварительным введением ЭМСК в результате угнетения воспалительного процесса замедляется рассасывание геморрагий, элиминация фибриновых сгустков, тканевого детрита и мелких костных фрагментов. Присутствие детрита, при невозможности его элиминации наружу, задерживает очищение послеоперационной раны, способствует пролонгации воспалительного процесса, приобретению им гранулематозного характера и отсрочиванию репарации.

4. Применение ЭМСК при внутрикостной имплантации в эксперименте, по данным денситометрии, способствует увеличению плотности костной ткани рядом с внедренным металлическим изделием (через 3 сут на 47,2%) относительно контроля без ЭМСК. Сжатие отщепленных костных фрагментов при закручивании винтового изделия в условиях менее интенсивного воспалительного процесса и при менее выраженных гиперемии и отеке является главной причиной увеличения плотности костной ткани. После операции без применения ЭМСК быстро развивающиеся гиперемия и отек способствуют разобщению этих фрагментов кости, тем самым обуславливая уменьшение плотности тканей рядом с имплантатом.

5. ЭМСК, попавшие в мягкие ткани при коррекции костного дефекта и внутрикостной имплантации, выявляются с помощью люминесцентной микроскопии на протяжении всего эксперимента, но в убывающих количествах. Наибольшее количество обнаруживается через 3 сут, наименьшее – спустя 10 – 12 сут, когда большинство экзосом оказывается в клетках. К 21-м суткам свободные ЭМСК практически полностью элиминируются из тканей.

6. Титановые имплантаты, независимо от характера обработки поверхности, инертны для живого организма и хорошо совместимы с его тканями, о чем свидетельствуют отсут-

ствии активной воспалительной реакции, гигантских клеток инородных тел, обширной грубой соединительнотканной капсулы в дерме и костной ткани экспериментальных животных непосредственно в месте контакта в течение 6 мес эксперимента.

7. Прочность фиксации винтовых титановых имплантатов с гладкой или шероховатой поверхностью практически одинакова, что доказывается измерением усилия, прилагаемого для выкручивания изделий, спустя 6 мес после внедрения в проксимальные мышечки большеберцовых костей кроликов. Поверхность имплантатов при их внедрении в кость также не влияет на характер тканевых реакций: отсутствуют статистически значимые различия в выраженности сосудистых реакций и интенсивности лейкоцитарной инфильтрации во все сроки наблюдения.

8. После внедрения твердых титановых имплантатов как с шероховатой, так и с полированной поверхностью в окружающих тканях присутствуют мелкие фрагменты металла, инкапсулированные тонкой полоской плотной или грубоволокнистой соединительной ткани без воспалительной реакции. Даже очень твердые металлические имплантаты с гладкой поверхностью подвергаются медленной деструкции в тканях организма, в том числе и костных.

9. Применение водяного охлаждения в процессе имплантации не приводит к полному удалению мелких костных фрагментов из тканей вокруг места операции. Отщепленные костные частицы впоследствии или элиминируются из тканей наружу с раневым отделяемым, или подвергаются деструкции и длительному лизису макрофагами. В случае большого числа костных отломков и супрессии воспалительного процесса возможен некроз с последующим обызвествлением нежизнеспособных фрагментов.

10. Введенные после имплантации металлического винтового изделия в проксимальный мышечок большеберцовой кости кроликов меченные люминесцентным красителем ЭМСК диссеминируют в легкие, миокард, печень и селезенку, где их можно обнаружить вплоть до 10-х сут наблюдения при использовании световой люминесцентной микроскопии. В указанных органах ЭМСК достигают капилляров, откуда адсорбируются периваскулярными фагоцитами. В легких локализуется максимальное количество введенных ЭМСК, которые находятся в просвете альвеол и часто ассоциированы с детритом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Целесообразно изготовление имплантатов для внедрения в кость на основе титана и его сплавов, так как титановые изделия инертны для живого организма и хорошо совместимы с его тканями, о чем свидетельствуют отсутствие активной воспалительной реакции, гигантских клеток инородных тел, обширной грубой соединительнотканной капсулы в дерме и костной ткани экспериментальных животных непосредственно в месте контакта во всех наблюдениях в течение 6 мес эксперимента.

2. ЭМСК, меченные люминесцентным красителем РКН26 или Vybrant® CM-Dil, можно обнаружить в тканях методами световой флуоресцентной микроскопии с использованием фильтра для родамина (Rhod – диапазон возбуждения 540–552 нм, диапазон регистрации 575–640 нм). ЭМСК в данном случае выглядят как мелкие, интенсивно светящиеся, пылевидные объекты.

3. Даже применение водяного охлаждения в процессе внутрикостной имплантации не приводит к полному удалению мелких костных фрагментов как из мягких тканей рядом с местом внедрения изделия, так и из созданного для внедрения имплантата дефекта кости. Эти отщепленные костные частицы впоследствии или элиминируются из мягких тканей наружу с раневым отделяемым, или подвергаются деструкции и медленному лизису макрофагами. Необходима разработка мер, направленных на быстрое и более эффективное очищение всех тканей от костных отломков, что может ускорить и улучшить интеграцию вводимых изделий.

4. Введение ЭМСК в процессе внутрикостной имплантации показано для увеличения плотности кости и консолидации костного детрита вокруг имплантатов. Но этот способ лечения может быть применен только при условии предварительного тщательного очищения послеоперационной раны в мягких тканях от детрита, в том числе и нежизнеспособной мышечной ткани и костных фрагментов.

5. В связи с возможностью поступления тканевого детрита в правые полости сердца и легкие при обширных хирургических вмешательствах необходимо принимать меры по профилактике диссеминации антигенов по всему организму и тромбозам легочных артерий.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Майбородин И.В., Матвеева В.А., Якимова Н.В., Шевела А.И., Бабко А.Н., Морозов В.В., Шевела А.А. Ангиогенез у крыс после введения аутологичных мезенхимальных стволовых клеток костномозгового происхождения // *Фундаментальные науки – медицине: Сб. тез. ежегод. науч. конф.* – Новосибирск, 2010. – С. 50.

2. Maiborodin I.V., Shevela A.I., Kolesnikov I.S., Drovosekov M.N., Toder M.S., Shevela A.A., Brombin A.I., Beregovoy E.A. Peculiarities of using stem cells for regeneration of the bone and cartilage tissue // **Bulletin of Experimental Biology and Medicine.** – 2011. – Vol. 152, № 3. – P. 112-119. DOI: 10.1007/s10517-011-1468-8 8 стр.

3. Майбородин И.В., Шевела А.А., Колесников И.С., Шеплев Б.В., Рагимова Т.М., Миникеев И.М., Ким С.А. Клеточные технологии в стоматологии и челюстно-лицевой хирургии // *Новые технологии в стоматологии: Материалы 8-го Всерос. симп. с международ. участием.* – Новосибирск: Сибмедиздат НГМУ, 2013. – С. 142-152.

4. Майбородин И.В., Тодер М.С., Шевела А.И., Разумахина М.С., Шевела А.А., Патрушев А.Ю., Рагимова Т.М., Кузнецова И.В. Гистологические результаты имплантации металлических изделий с шероховатой и гладкой поверхностью в костную ткань в эксперименте // **Фундаментальные исследования.** – 2014. – № 7, Ч. 1. – С. 114-118.

5. Toder M.S., Shevela A.I., Shevela A.A., Zheleznyi P.A., Zheleznaia A.P., Maiborodin I.V. The tissue reactions and changes of a surface of various metal implants after their introduction in a bone tissue in experiment // *Surgical Science.* –2016. – Vol. 7, № 2. – P. 100-106. DOI: 10.4236/ss.2016.72014

6. Toder M.S., Shevela A.I., Shevela A.A., Zheleznyi P.A., Zheleznaia A.P., Maiborodin I.V. Some features of the bone reaction after implant insertion with rough or smooth surface in experiment // *British Journal of Medicine and Medical Research.* – 2016. – Vol. 14, № 2. – P. 1-6. DOI : 10.9734/BJMMR/2016/24649

7. Toder M.S., Shevela A.I., Shevela A.A., Zheleznyi P.A., Zheleznaia A.P., Maiborodin I.V. Changes of the surfaces of various metal implants after introduction into rabbits' bone tissue // *International Journal of Dental Sciences and Research.* – 2016. – Vol. 4, № 3. – P. 38-41. DOI:10.12691/ijdsr-4-3-2

8. Toder M.S., Shevela A.I., Shevela A.A., Zheleznyi P.A., Zheleznaia A.P., Maiborodin I.V. Dependence between durability of the experimental dental implant attachment, feature of their surface and expressiveness of surrounding tissue changes // *Oral Health and Dentistry Research.* – 2016. – Vol. 1, № 1. – P. 1-7.

9. Toder M.S., Shevela A.I., Shevela A.A., Zheleznyi P.A., Zheleznaia A.P., Maiborodin I.V. Some features of the dental metal implant changes with different character of a surface after administration into bone tissue of rabbits // *International Journal of Dental Medicine.* – 2016. – Vol. 2, № 1. – P. 1-4. DOI: 10.11648/j.ijdm.20160201.11

10. Тодер М.С., Шевела А.А., Шевела А.И., Майбородин И.В. Подробный протокол экспериментальных работ на кроликах: внутрикостное внедрение металлических имплантов // **Современные проблемы науки и образования.** – 2017. – № 3.; URL: <https://www.science-education.ru/ru/article/view?id=26413>

11. Тодер М.С., Шевела А.А., Шевела А.И., Майбородин И.В. Экспериментальная модель дентальной имплантации // **Морфологические ведомости.** – 2017. – Т. 25, № 3. – С. 22-25. doi: 10.20340/mv-mn.17(25).03.22-25.
12. Шевела А.А., Тодер М.С., Матвеева В.А., Артемьева Л.В., Матвеев А.Л., Мейснер С.Н., Мейснер Л.Л., Шевела А.И., Аникеев А.А., Фигуренко Н.Ф., Маслов Р.В., Байбородин С.И., Майбородин И.В. Химически чистое кремниевое и танталовое покрытие не токсично для мезенхимальных стромальных клеток и усиливает цитосовместимость электрополированного сплава никелида титана // **Вопросы реконструктивной и пластической хирургии.** – 2017. – № 3 (62). – С. 45-50.
13. Майбородин И.В., Шевела А.А., Тодер М.С., Шевела А.И. Особенности взаимодействия дентальных имплантатов с живыми тканями и современные методы придания антибактериальных свойств материалам для имплантации // **Российская стоматология.** – 2017. – Т. 10, № 4. – С. 32-41. DOI: 10.17116/rosstomat201710432-40
14. Майбородин И.В., Михеева Т.В., Ярин Г.Ю., Хоменюк С.В., Агзаев М.К., Майбородина В.И., Шевела А.А., Вильгельми И.А., Шевела А.И. Некоторые морфологические особенности тканевых реакций на имплантацию металлических изделий // **Новости хирургии.** – 2020. – Т. 28, № 1. – С. 74-83. doi: 10.18484/2305-0047.2020.1.74
15. Maiborodin I.V., Maslov R.V., Mikheeva T.V., Marchukov S.V., Maiborodina V.I., Shevela A.A. Opportunity for elimination of injected multipotent stromal cells via lungs // **Cellular Therapy and Transplantation (CTT).** – 2020. – Vol. 9, N 1. doi: 10.18620/ctt-1866-8836-2020-9-1-67-73
16. Майбородин И.В., Шевела А.А., Марчуков С.В., Морозов В.В., Матвеева В.А., Майбородина В.И., Новиков А.М., Шевела А.И. Регенерация костного дефекта в условиях экспериментального применения экстрацеллюлярных микровезикул мультипотентных стромальных клеток // **Новости хирургии.** – 2020. – Т. 28, № 4. – С. 366-376. doi: 10.18484/2305-0047.2020.4.366
17. Кузькин С.А., Майбородин И.В., Майбородина В.И., Шевела А.А. Возможность попадания в миокард экзосом мультипотентных стромальных клеток, введенных в дефект кости конечности в эксперименте // **Фундаментальные аспекты компенсаторно-приспособительных процессов: Материалы 9-й Всерос. науч.-практ. конф.** – Новосибирск: СО РАН, 2020. – С. 76-77.
18. Шевела А.А., Шевела А.И., Матвеева В.А., Морозов В.В., Ковальчук О.И., Тодер М.С., Майбородина В.И., Майбородин И.В. Экзосомы мультипотентных стромальных клеток и экспериментальная остеоинтеграция дентальных имплантатов // **Мат. II Международ. науч.-практ. конф. «Бородинские чтения» в 2-х томах.** – Новосибирск: ИПЦ НГМУ, 2020. – Т. 2. – С. 41-55.
19. Maiborodin I., Shevela A., Toder M., Marchukov S., Tursunova N., Klinnikova M., Maiborodina V., Lushnikova E., Shevela A. Multipotent Stromal Cell Extracellular Vesicle Distribution in Distant Organs after Introduction into a Bone Tissue Defect of a Limb // **Life.** – 2021. – Vol. 11. 306.
20. Maiborodin I., Shevela A., Matveeva V., Morozov V., Toder M., Krasil'nikov S., Koryakina A., Shevela A., Yanushevich O. First Experimental Study of the Influence of Extracellular Vesicles Derived from Multipotent Stromal Cells on Osseointegration of Dental Implants // **Int. J. Mol. Sci.** – 2021. – Vol. 22. – 8774.
21. Майбородин И.В., Шевела А.А., Марчуков С.В., Морозов В.В., Матвеева В.А., Майбородина В.И., Новиков А.М., Торнуев Ю.В., Чурин Б.В., Шевела А.И. Пролонгация очищения поврежденных тканей от детрита в условиях применения экзосом мультипотентных стромальных клеток // **Новости хирургии.** – 2021. – Т. 29, № 4. – С. 401-411. doi: 10.18484/2305-0047.2021.4.401