

© Коллектив авторов, 2011
УДК 616.716.4-001-003.93:599.323.4

*И.В. Майбородин, В.А. Матвеева, И.С. Колесников, М.Н. Дровосеков, М.С. Тодер
и А.И. Шевела*

РЕГЕНЕРАЦИЯ ПОВРЕЖДЕННОЙ КОСТИ НИЖНЕЙ ЧЕЛЮСТИ КРЫС ПОСЛЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ АУТОЛОГИЧНЫХ СТРОМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК КОСТНОМОЗГОВОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ, АДсорБИРОВАННЫХ НА ФИБРИНОВОМ СГУСТКЕ

Центр новых медицинских технологий (зав. — проф. А.И. Шевела), Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, г. Новосибирск, e-mail: imai@mail.ru

Методами световой микроскопии и рентгеновской денситометрии изучали процессы репарации через различное время после введения в участок повреждения кости нижней челюсти крыс богатого тромбоцитами фибринового сгустка (БТФС), аутологичных стромальных стволовых клеток костномозгового происхождения (АССККП) или АССККП, адсорбированных на БТФС. После использования БТФС с АССККП были получены наилучшие результаты. Через 1 нед отверстие в кости нижней челюсти было на большом протяжении заполнено сформированной костной тканью. Наиболее вероятно, что в данном случае суммируется или даже потенцируется влияние и фибрина, и стволовых клеток на репаративную регенерацию поврежденной кости. Видимо, образование кости в данных случаях начинается с середины дефекта, а не с краев. АССККП располагаются во всем объеме БТФС, более-менее равномерно заполняя весь дефект. В результате этого достигается максимально быстрое и успешное восстановление костной ткани в области дефекта.

Ключевые слова: аутологичные стромальные стволовые клетки костномозгового происхождения, фибриновый сгусток, костная ткань, регенерация

Несмотря на существенный прогресс в травматологии и ортопедии, полное восстановление костной и хрящевой тканей является проблемным, поскольку большие дефекты не могут заживать спонтанно. Все более широкое использование стволовых клеток в регенеративной биологии и медицине дает надежду на успех терапевтических методов лечения ран и травм, на которые невозможно эффективно воздействовать современными хирургическими методами [6, 7].

Использование стромальных стволовых клеток (ССК), называемых также мезенхимальными стволовыми клетками, приводит к ускорению регенерации поврежденных костей, увеличению их плотности по сравнению с результатами при естественном течении репаративных процессов [9, 10, 20].

Продукты деградации фибрина вызывают более быструю регенерацию хирургических костных дефектов как в клинике, так и в эксперименте. Фибрин не только облегчает миграцию фибробластов, но и ускоряет синтез ими коллагена [1, 3, 11].

Цель настоящего исследования — сравнение процессов регенерации кости нижней челюсти крыс после введения в участок ее повреждения аутологичного, богатого тромбоцитами фибринового сгустка (БТФС), суспензии аутологичных ССК костномозгового происхождения (АССККП)

в культуральной среде и БТФС с адсорбированными АССККП.

Материал и методы. Работа проведена на самцах крыс линии Wag массой 180–200 г в возрасте 6 мес. Все манипуляции с животными осуществляли под общим ингаляционным эфирным наркозом в условиях чистой операционной с соблюдением «Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных». На каждую точку исследования было использовано не менее 6 животных.

Модель дефекта костной ткани в эксперименте [11]. С соблюдением указанных выше условий после обработки кожи животного спиртом скальпелем делали разрез кожи длиной 1,5–2 см по нижнему краю нижней челюсти. Тупым способом при помощи распатора отслаивали жевательную мышцу и обнажали поверхность кости нижней челюсти в области ее угла. Стоматологическим бором делали круглое отверстие диаметром 2 мм, с полостью рта дефект кости не сообщался. Животные были разделены на 4 группы в зависимости от способа воздействия на регенерацию участка поврежденной кости: 1-я группа — естественное течение репаративного процесса. Отверстие в кости сразу прикрывали жевательной мышцей, ткани послойно ушивали викрилом — 65 крыс; 2-я группа — регенерация после введения в участок повреждения БТФС. После плотного заполнения отверстия кости БТФС его прикрывали жевательной мышцей и ушивали кожу викриловым швом — 62 животных; 3-я группа — репарация на фоне введения в искусственный дефект нижней челюсти 100 мкл суспензии АССККП в культуральной среде (1×10^6 клеток в 1 мл) — 70 крыс; 4-я группа — использование БТФС с АССККП. Приготовленный ex tempore БТФС погружали в суспензию АССККП в культуральной среде (1×10^6 клеток в 1 мл суспензии) на 2 ч, в связи

с тем, что живые клетки прикрепляются к любому твердому субстрату — 70 животных.

Приготовление БТФС. При декапитации нескольких крыс в стерильные стеклянные пробирки собирали 2–7 мл крови, которую центрифугировали при 2800 об/мин в течение 12 мин [1, 3, 11]. После этого из пробирок отбирали верхнюю часть (БТФС), помещали в стерильные чашки Петри, хранили до нескольких часов в термостате при 37 °С до использования. Непосредственно перед применением стерильными ножницами от БТФС отрезали нужный по размерам фрагмент.

АССККП выделяли, вымывая костный мозг из эпифизов бедренных костей. Полученную суспензию клеток помещали в пластиковые флаконы (Nunk, Дания), через 48 ч после эксплантации костного мозга неприкрепившиеся клетки сливали. Прикрепившиеся клетки культивировали в среде α -МЕМ с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Biolog, Россия) при 37 °С в CO_2 -инкубаторе с 5% CO_2 в условиях насыщенной влажности. Среду сменяли каждые 3 сут. При субкультивировании монослойную культуру расщипывали с плотностью 1000–5000 клеток/ cm^2 (в зависимости от ростовых свойств используемой эмбриональной сыворотки), использовали стандартные растворы Версена и трипсина.

Методами световой и флюоресцентной микроскопии и цитологическими методами окрашивания было показано, что культивируемые клетки костного мозга крысы: были CD90^+ , CD105^+ , CD34^- , CD45^- ; *in vitro* прикреплялись к поверхности пластика культивирования; имели фибробластоподобное строение, которое сохраняли все время культивирования; поддерживались в культуре в течение нескольких пассажей; формировали колонии фибробластоподобных клеток при посеве с низкой плотностью; в присутствии линейно-специфичных факторов дифференцировались в клетки костной ткани. Для исследования использовали клетки 2–3 пассажей.

Однако физические, морфологические и фенотипические признаки не являются специфическими критериями, которые могут быть использованы для точной идентификации АССККП. Их способность к индуцированной дифференцировке *in vitro* в костные, жировые и хрящевые клетки является единственным критическим требованием для определения предполагаемых популяций стволовых клеток.

Индукция остеогенной дифференцировки ССК *in vitro*. Поскольку АССККП свойственна дифференцировка в клетки костной ткани и условия ее проведения наиболее воспроизводимы, этот вид дифференцирования обычно используется для характеристики культур стволовых клеток *in vitro*, и он является типичным заданным по умолчанию путем развития для большинства АССККП в культуре. Для индукции остеогенной дифференцировки использовали 0,1 мкмоль дезоксиметазон, 50 мкмоль аскорбиновую кислоту и 10 мкмоль β -глицерофосфат (Sigma, США).

Остеогенную дифференцировку определяли по 2 маркерам: по активности щелочной фосфатазы (ЩФ) и минерализации межклеточного матрикса ионами кальция. Цитохимическое выявление ЩФ проводили с использованием нитротетразолиевого синего в присутствии субстрата ЩФ 5-бromo-4-хлоро-3-индолила. Накопление кальция в межклеточном матриксе регистрировали по окрашиванию ализариновым красным.

Животных выводили из эксперимента через 1, 2, 3, 4 и 5 нед после операции. Участок нижней челюсти с искусственно созданным дефектом фиксировали в 4% растворе параформальдегида на фосфатном буфере (pH 7,4) не менее 24 ч.

Для оценки результатов методом рентгеновской денситометрии использовали фиксированные и препарированные фрагменты нижней челюсти крыс с удаленной кожей, подкожной клетчаткой и жевательными мышцами. В компьютере радиовизиографа «Heliodont+» (Heropa, Германия) установлена программа исследования плотности костной ткани «Tomodent» (Anvisystem, Россия), которая представлена в условных единицах: отношение полученных данных плотности кости в участке повреждения к результатам исследования аналогичных неповрежденных участков на контралатеральной стороне. Статистическую обработку результатов проводили с использованием прикладной статистической программы MS Excel (Microsoft, США), определяли среднее арифметическое и стандартное отклонение. Различия между средними считали значимыми при $P \leq 0,05$.

Далее фрагменты нижней челюсти декальцинировали в растворе «Биодек R» (Bio Optica Milano, Италия) в течение 1 сут, обезжизняли в этаноле возрастающей концентрации, просветляли в ксилоле и заливали в парафин. Срезы толщиной 5–7 мкм окрашивали гематоксилином–эозином и по Романовскому, изучали при увеличении светового микроскопа Axioimager M1 (Zeiss, Германия) до 1200 раз.

Результаты исследования. При естественном течении репаративной регенерации через 1 нед после повреждения кости нижней челюсти было обнаружено, что отверстие частично заполнено кровью, на некоторых участках в дефекте кости уже присутствовали рыхлая волокнистая соединительная ткань и грануляции. Имело место начало образования кости в дефекте (формирование отдельных островков молодой кости и хряща среди грануляций) (рис. 1, а, б). Через 2 нед после операции отверстие было полностью закрыто слившимися островками молодой костной ткани. Среди вновь образованных структур иногда присутствовала хрящевая ткань, особенно в центре искусственного отверстия. Через 3 нед отверстие в кости было полностью закрыто вновь образованной молодой костной тканью. О месте операции можно было судить по хаотично расположенным костным балкам (костная мозоль). К этому моменту в некоторых случаях появились полностью сформированные полости с костным мозгом. Через 4 и 5 нед в большинстве случаев только по следам костной мозоли можно было найти место операции.

После статистической обработки данных денситометрии процессов регенерации дефекта кости нижней челюсти крыс при естественном заживлении обнаружили, что плотность кости в участке повреждения (рис. 2, а) была меньше таковой в соответствующем участке на контралатеральной стороне на 1-, 2-, 3-й и 5-й неделе на 12,1, 11, 10,5 и 9,3% соответственно (таблица).

После повреждения кости и заполнения дефекта БТФС, спустя 1 нед, отверстие было полностью слившимися островками вновь образованной костной ткани (см. рис. 1, в, г). Через 2 нед в

большинстве случаев отверстие было полностью закрыто вновь образованной костной тканью. Спустя 3 нед после повреждения отверстие было полностью закрыто костной тканью с хаотично расположенными костными балками сформированной костной мозоли и полостями с костным мозгом. Через 4 и 5 нед отверстие, так же как и при самостоятельном заживлении, было полностью заполнено костной тканью.

После использования БТФС плотность кости в дефекте (см. рис. 2, б) была меньше, чем на противоположной стороне кости только через 1 и 2 нед на 9,5 и 4,9% соответственно (см. таблицу).

На фоне введения суспензии АССККП в культуральной среде спустя 1 нед дефект кости был полностью заполнен кровью, между кровяным сгустком и краем дефекта обнаружены типичные грануляции. Среди них отмечено начало формирования отдельных островков молодой костной и хрящевой тканей, т.е. состояние тканей в дефекте кости соответствовало контролю, однако, обращало на себя внимание значительно большее число кровеносных сосудов в структурах, заполняющих отверстие в кости, в том числе и в грануляциях. Через 2 нед отверстие в кости нижней челюсти было полностью замещено молодой костной и хрящевой тканями (множество слившихся островков) с большим содержанием полнокровных тонкостенных кровеносных сосудов. Уже в этот срок наблюдалось формирование структур красного костного мозга (см. рис. 1, д, е), т.е. происходило значительное ускорение процессов, приведшее к быстрому развитию или регенерации в костной мозоли гемопоэтической структуры — костного мозга.

В последующие сроки происходило дальнейшее слияние островков костной ткани с последующим формированием костной мозоли и про-

грессирующее восстановление красного костного мозга.

В условиях введения АССККП различия в плотности костной ткани с таковой в неповрежденном участке были обнаружены через 2 и 5 нед. Она была меньше на 10,7 и 16,8% соответственно. При этом спустя 5 нед после операции плотность кости в дефекте при применении АССККП (см. рис. 2, в) была даже меньше, чем при естественном ходе репаративного процесса (см. таблицу).

При использовании БТФС с АССККП уже через 1 нед после операции в большинстве случаев дефект кости нижней челюсти был более чем на $\frac{2}{3}$ заполнен молодой сформированной костной тканью. Однако эта ткань была отделена от края «старой» кости (край дефекта) соединительной тканью с грануляциями. Не исключено, что образование кости в этих случаях начинается или идет быстрее с середины дефекта, а не с краев, и постепенно подходит к краям дефекта, где еще остаются грануляции. В месте самого дефекта, еще не заполненном молодой костной тканью, также присутствовали грануляции с большим числом кровеносных сосудов (см. рис. 1, ж, з). Спустя 2 нед в большинстве случаев дефект был полностью замещен молодой костной и хрящевой тканью. Спустя 3–5 нед дефект костной ткани был полностью закрыт костной тканью, которую можно отличить от таковой в норме только по наличию структур костной мозоли.

После применения БТФС с АССККП статистически значимые отличия плотности костной ткани от ее плотности в контралатеральном участке нижней челюсти были обнаружены через 1 и 4 нед, в эти сроки величина значения данного показателя была меньше на 9,1 и 8,5% соответственно. Кроме того, в этой группе животных спустя 5 нед после операции были отмечены значимые различия плотности костной ткани (на

Плотность кости в дефекте нижней челюсти крыс при регенерации в различных условиях по сравнению с таковой интактной кости ($\bar{x} \pm SD$, усл. ед.)

Срок после операции (нед)	Репаративный процесс			
	Естественное течение	После использования БТФС	После введения АССККП	После применения БТФС с АССККП
1	0,89±0,05*	0,913±0,017*	0,93±0,04	0,92±0,04*
2	0,90±0,04*	0,953±0,021*	0,90±0,05*	0,90±0,06
3	0,905±0,021*	0,95±0,04	0,96±0,09	0,93±0,04
4	0,91±0,06	0,94±0,05	0,93±0,05	0,92±0,03*
5	0,915±0,016*	0,92±0,06	0,856±0,028*	0,978±0,021**

Примечание. Плотность интактной кости принята за единицу; БТФС — богатый тромбоцитами фибриновый сгусток; АССККП — аутологичные стромальные стволовые клетки костномозгового происхождения; SD — стандартное отклонение.

* Различия значимы по сравнению с интактной костью.

** Различия значимы по сравнению с костью при естественном течении регенерации при $P \leq 0,05$.

6,9% больше) по сравнению с аналогичным сроком при естественном течении репаративных процессов (см. рис. 2, г; таблицу).

Обсуждение полученных данных. Фибрин в тканях, согласно литературным данным, уменьшает выраженность воспалительного процесса и ограничивает распространение инфекции [1–3, 11], т.е. при введении БТФС в полость раны можно защитить окружающие ткани как от распространения микроорганизмов, так и от излишнего воздействия лизосомальных ферментов фагоцитов. Происходит ограничение деструкции и, в связи с этим, раньше начинаются регенераторные процессы, в тканях оказывается меньше антигенов и детрита, происходит более быстрое очищение раны.

Плазма или фибриновый сгусток содержат множество цитокинов и ростовых факторов в высокой концентрации: тромбоцитарный фактор роста (Platelet-Derived Growth Factor — PDGF), трансформирующий фактор роста — бета (Transforming Growth Factor Beta — TGF- β), тромбоцитарный эпидермальный фактор роста, тромбоцитарный фактор ангиогенеза, инсулиноподобный фактор роста (Insulin-Like Growth Factor 1 — IGF-1) и тромбоцитарный фактор 4. Эти факторы вызывают миграцию и деление всех клеток мезенхимального происхождения (включая хондроциты и ССК) и эпителиальных клеток, стимулируют синтез коллагена и матрикса соединительной ткани [4, 5, 16].

Кроме этого, фибриновый сгусток является матрицей, по которой мигрируют лейкоциты (нейтрофилы), эндотелиоциты и фибробласты. Мигрируя по фибрину, нейтрофилы более быстро достигают всех участков раны, даже покрытых наслоениями гноя и детрита, и, таким образом, ткани быстрее очищаются от антигенных веществ (микроорганизмы и тот же детрит). Кроме того, при передвижении по фибриновому сгустку нейтрофилы частично «разжижают» его своими ферментами, и даже плотный сгусток становится похожим на сеть. Фибробласты, располагаясь в фибриновой сети [4, 5, 16], начинают синтез кол-

лагена не только со дна раны, но и из ее полости, таким образом, быстрее на месте формируется рубцовая ткань. Таким образом, применение БТФС способствует более быстрой регенерации поврежденного участка кости.

При естественном ходе процессов регенерации поврежденной кости нижней челюсти восстановление дефекта начинается с его краев, откуда остеобласты и стволовые клетки, которые есть в самой кости [12, 17] и надкостнице [8], мигрируют в кровяной сгусток. За счет их функционирования появляются отдельные изолированные очаги остеогенеза в кровяном сгустке в дефекте кости через 1 нед после операции.

После введения суспензии АССККП стволовые клетки сразу и в большом количестве появляются во всем искусственно созданном отверстии в кости. При этом не происходит затрат времени на миграцию стволовых клеток к самому участку травмы и на проникновение их непосредственно в дефект тканей.

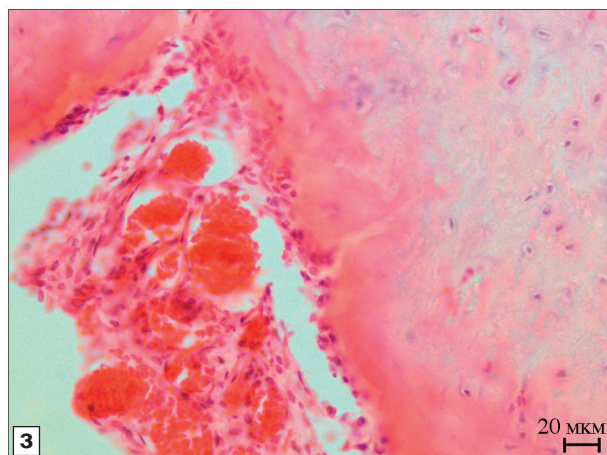
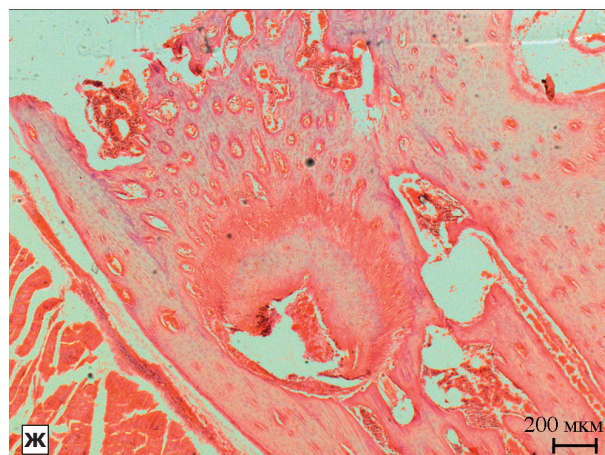
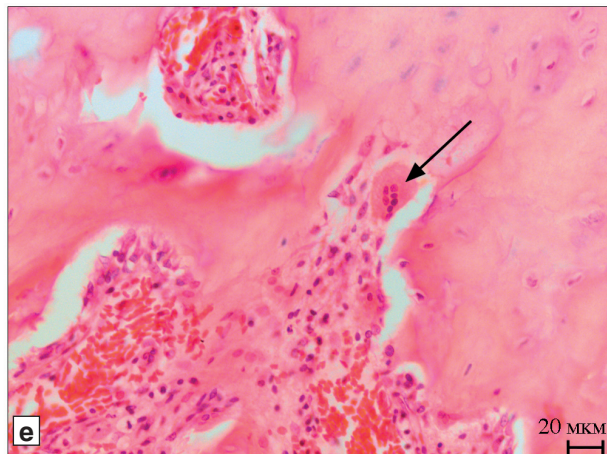
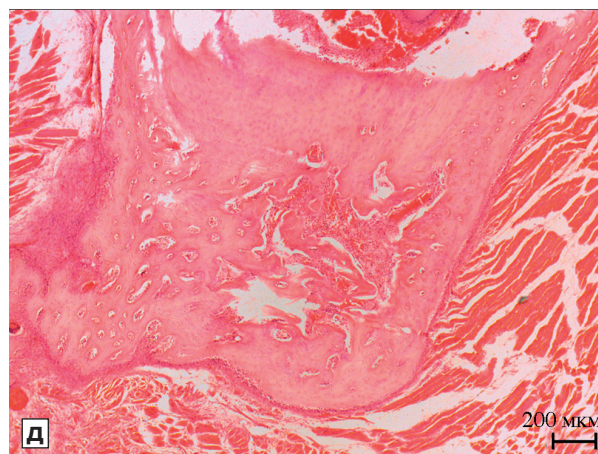
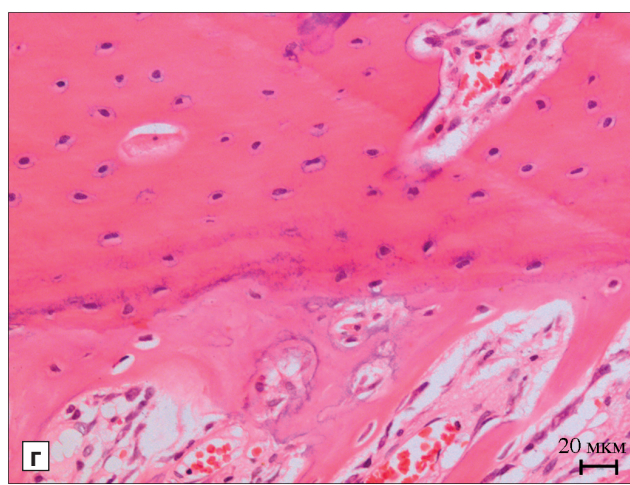
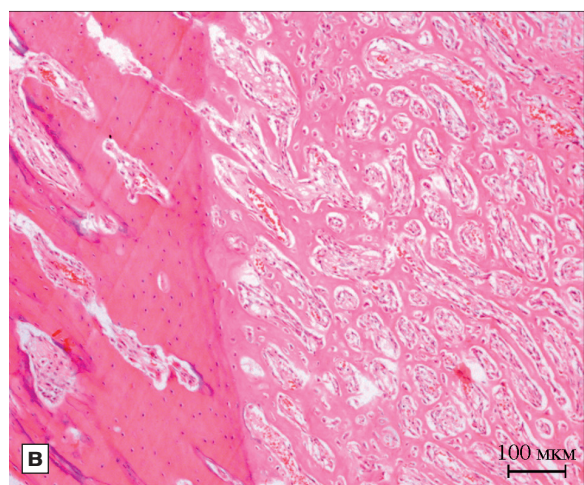
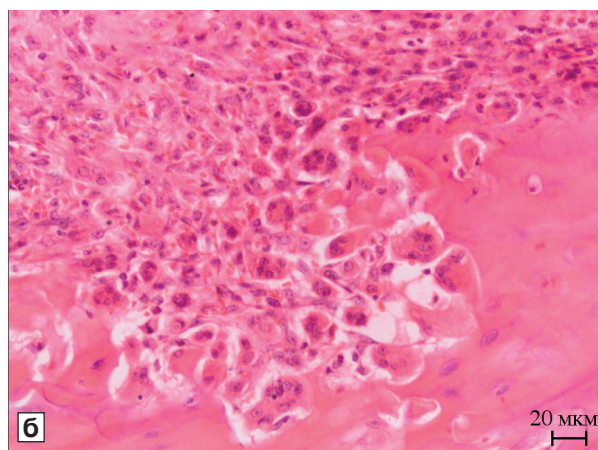
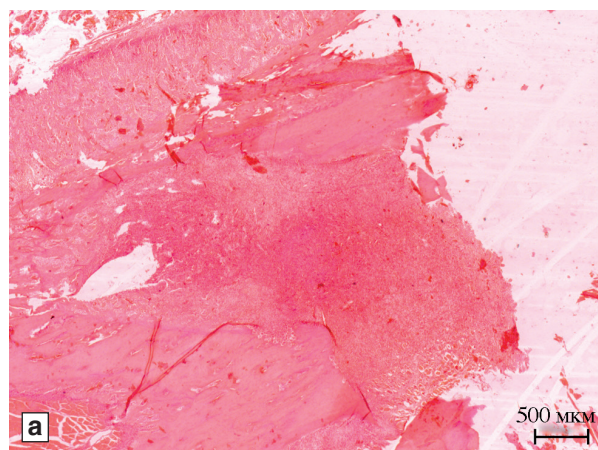
Так как в данном эксперименте были использованы АССККП, не исключено присутствие среди них небольшого числа гемопоэтических клеток. Видимо, за счет действия этих клеточных элементов и объясняется быстрая и ранняя регенерация гемопоэтической структуры — красного костного мозга. Необходимо отметить возможность трансдифференцировки АССККП в гемопоэтические стволовые клетки [15].

На основании данных литературы, мы ожидали ускорения регенерации поврежденной кости и соответственно большей ее плотности, чем при естественном течении репаративных процессов [9, 10, 20].

Скорее всего, снижение плотности в очаге повреждения, по данным денситометрии, через 2 и 5 нед после операции связано с развитием красного костного мозга. На 1-й неделе идет активное развитие кости, и было отмечено повышение плотности костной ткани, далее формируется красный костный мозг, который расположен в полостях, и соответственно плотность снижается. После введения АССККП костный мозг образу-

Рис. 1. Поврежденный участок кости нижней челюсти крыс после различных методов влияния на репаративный процесс.

а — естественное заживление участка повреждения кости спустя 1 нед после операции; дефект заполнен детритом; б — начало образования кости на периферии отверстия; в — заживление участка повреждения кости после использования богатого тромбоцитами фибринового сгуста (БТФС) через 1 нед после операции; дефект кости заполнен слившимися островками молодой костной ткани с большим числом сосудов; г — граница участка повреждения (фрагмент рис. 1, в); д — отверстие в нижней челюсти полностью замещено слившимися островками молодой костной ткани со сформированными структурами красного костного мозга между ними через 2 нед после операции и применения аутологичных стромальных стволовых клеток костномозгового происхождения (АССККП); е — полость со структурами красного костного мозга, в котором на некоторых участках присутствуют большие многоядерные клетки — мегакариоциты (стрелка) (фрагмент рис. 1, д); ж — дефект кости почти заполнен молодой сформированной костной тканью через 1 нед после операции и введения БТФС с АССККП; з — соединительная ткань и грануляции в участке повреждения костной ткани (фрагмент рис. 1, ж). Окраска гематоксилином–эозином.



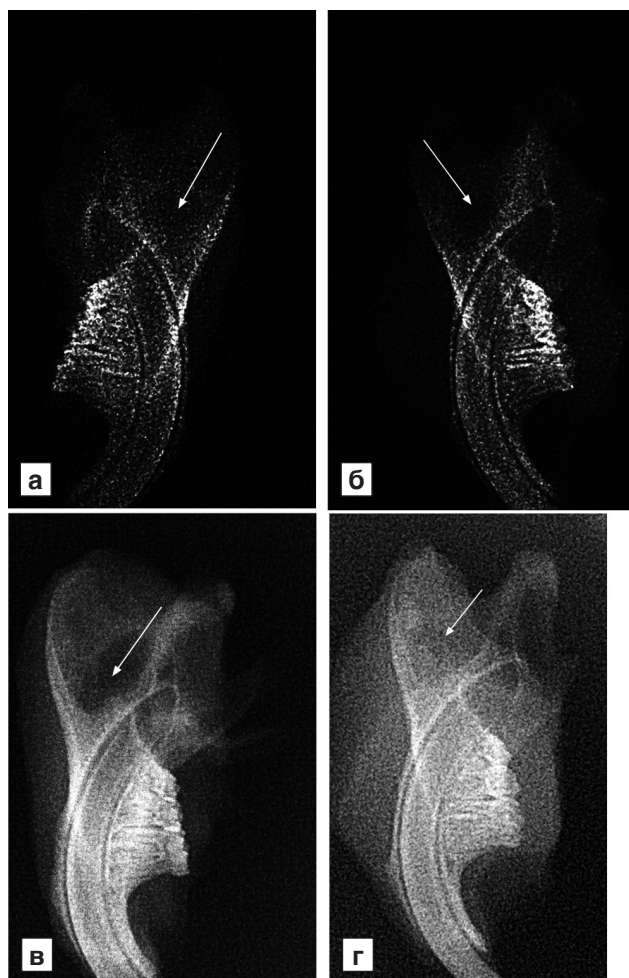


Рис. 2. Участок повреждения кости нижней челюсти крыс через 5 нед после различных методов влияния на репаративный процесс.

а — естественный ход регенерации, плотность тканей приближается к таковой на соседних участках; б — после применения богатого тромбоцитами фибринового сгустка (БТФС) плотность тканей в дефекте выше, чем при естественном заживлении; в — после введения аутологических стромальных стволовых клеток костномозгового происхождения (АССККП) плотность тканей меньше, по сравнению с состоянием при естественной репарации и после применения клеток в предыдущий срок, само отверстие в кости шире; г — при использовании БТФС с АССККП дефект тканей практически отсутствует; стрелка — искусственно созданное отверстие. Радиовизиографическое исследование.

ется быстрее и лучше развит, поэтому более значительно уменьшается плотность костной ткани в участке повреждения и становится даже ниже, чем при заживлении без использования клеток. Следует учитывать возможность снижения прочности восстановленной кости из-за присутствия больших полостей, заполненных костным мозгом.

После применения БТФС с АССККП уже через 1 нед дефект кости нижней челюсти был на большом протяжении заполнен молодой сформированной костной тканью. Скорее всего, образование кости в этих случаях начинается с середины дефекта, а не только с краев. Спустя 2 нед

от начала эксперимента дефект кости нижней челюсти был полностью закрыт молодой костной тканью.

Хорошие результаты были получены при совместном применении ССК и обогащенной тромбоцитами плазмы для ускорения регенерации костной ткани и остеоинтеграции имплантатов. Такая плазма сама поддерживает рост костной ткани и служит матрицей для роста кости из ССК [13, 14, 19]. Это основано на том, что цитокины мегакариоцитов влияют на дифференцировку ССК, кроме того, взаимодействие тромбопоэтических структур и ССК способствует эндохондральной оссификации [18]. ССК с плазмой или тромбоцитами возможно доставлять в участки регенерируемых костных и хрящевых тканей инъекционным путем [19]. Модификацией обогащенной тромбоцитами плазмы являются фибриновые гели, клеи и губки, которые также можно с высокой эффективностью применять совместно с АССККП.

Наиболее вероятно, что после применения БТФС с АССККП суммируется или даже потенцируется влияние фибрина и стволовых клеток на репаративную регенерацию участка повреждения кости нижней челюсти. Стволовые клетки располагаются во всем объеме фибринового сгустка и более-менее равномерно заполняют весь дефект, эти клетки не мигрируют из места введения (активно или пассивно, как при введении суспензии АССККП в культуральной среде). Содержащиеся в БТФС цитокины, в частности факторы мегакариоцитов и тромбоцитов, стимулируют как пролиферативную активность, так и дифференцировку АССККП в остеогенном направлении. Таким образом достигается максимально быстрое и успешное восстановление костной ткани в области дефекта.

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Фундаментальных исследований Президиума РАН «Фундаментальные науки — медицине» (проект № 21.31 «Разработка технологий управления процессами регенерации костных тканей с применением биodeградируемых полимеров»).

ЛИТЕРАТУРА

1. Майбородин И.В., Колесников И.С., Шеплев Б.В. и др. Гранулематозное воспаление после применения препаратов фибрина. Морфол. ведомости, 2007, № 3–4, с. 116–118.
2. Майбородин И.В., Колесников И.С., Шеплев Б.В. и Рагинова Т.М. Применение фибрина и его препаратов в стоматологии. Стоматология, 2008, т. 87, № 6, с. 75–77.
3. Майбородин И.В., Колесников И.С., Шеплев Б.В. и др. Морфология подлежащих тканей десны после дентальной имплантации с применением препаратов фибрина. Стоматология, 2009, т. 88, № 1, с. 9–13.

4. Anitua E., Sanchez M., Nurden A.T. et al. New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol.*, 2006, v. 24, № 5, p. 227–234.
5. Anitua E., Sanchez M., Nurden A.T. et al. Autologous fibrin matrices: a potential source of biological mediators that modulate tendon cell activities. *J. Biomed. Mater. Res. A.*, 2006, v. 77, № 2, p. 285–293.
6. Chanda D., Kumar S. and Ponnazhagan S. Therapeutic potential of adult bone marrow-derived mesenchymal stem cells in diseases of the skeleton. *J. Cell. Biochem.*, 2010, v. 111, № 2, p. 249–257.
7. Clines G.A. Prospects for osteoprogenitor stem cells in fracture repair and osteoporosis. *Curr. Opin. Organ. Transplant.*, 2010, v. 15, № 1, p. 73–78.
8. Hayashi O., Katsube Y., Hirose M. et al. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif. Tissue Int.*, 2008, v. 82, № 3, p. 238–247.
9. Kallai I., Lenthe van G.H., Ruffoni D. et al. Quantitative, structural, and image-based mechanical analysis of nonunion fracture repaired by genetically engineered mesenchymal stem cells. *J. Biomech.*, 2010, v. 43, № 12, p. 2315–2320.
10. Kumar S., Wan C., Ramaswamy G. et al. Mesenchymal stem cells expressing osteogenic and angiogenic factors synergistically enhance bone formation in a mouse model of segmental bone defect. *Mol. Ther.*, 2010, v. 18, № 5, p. 1026–1034.
11. Maiborodin I., Shevela A., Perrin T. et al. Experimental results of the fibrin clot use to accelerate the regeneration of damaged bone in the rat lower jaw. *Surg. Sci.*, 2010, v. 1, № 1, p. 1–6.
12. Neumann K., Dehne T., Endres M. et al. Chondrogenic differentiation capacity of human mesenchymal progenitor cells derived from subchondral cortico-spongy bone. *J. Orthop. Res.*, 2008, v. 26, № 11, p. 1449–1456.
13. Niemeyer P., Fechner K., Milz S. et al. Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials.*, 2010, v. 31, № 13, p. 3572–3579.
14. Pieri F., Lucarelli E., Corinaldesi G. et al. Effect of mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma on the healing of standardized bone defects in the alveolar ridge: a comparative histomorphometric study in minipigs. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 2009, v. 67, № 2, p. 265–272.
15. Ratajczak M.Z., Kucia M., Reza R. et al. Stem cell plasticity revisited: CXCR4-positive cells expressing mRNA for early muscle, liver and neural cells 'hide out' in the bone marrow. *Leukemia*, 2004, v. 18, № 1, p. 29–40.
16. Schwartz-Arad D., Levin L. and Aba M. The use of platelet rich plasma (PRP) and platelet rich fibrin (PRF) extracts in dental implantology and oral surgery. *Refuat Hapeh Vehashinayim.*, 2007, v. 24, № 1, p. 51–55, 84.
17. Steenhuis P., Carr K.M., Pettway G.J. and Ignelzi M.A. Jr. Osteogenic and adipogenic cell fractions isolated from postnatal mouse calvaria. *Cells Tissues Organs*, 2009, v. 190, № 3, p. 150–157.
18. Sumiyoshi K., Kubota S., Furuta R.A. et al. Thrombopoietic-mesenchymal interaction that may facilitate both endochondral ossification and platelet maturation via CCN2. *J. Cell. Commun. Signal.*, 2010, v. 4, № 1, p. 5–14.
19. Yoshimi R., Yamada Y., Ito K. et al. Self-assembling peptide nanofiber scaffolds, platelet-rich plasma, and mesenchymal stem cells for injectable bone regeneration with tissue engineering. *J. Craniofac. Surg.*, 2009, v. 20, № 5, p. 1523–1530.
20. Zhang Z.Y., Teoh S.H., Chong M.S. et al. Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. *Biomaterials*, 2010, v. 31, № 4, p. 608–620.

Поступила в редакцию 30.02.2011

REGENERATION OF THE DAMAGED MANDIBULAR BONE IN RAT AFTER THE INJECTION OF AUTOLOGOUS MESENCHYMAL STEM CELLS OF BONE MARROW ORIGIN ADSORBED ON THE FIBRIN CLOT

I.V. Maiborodin, V.A. Matveyeva, I.S. Kolesnikov, M.N. Drovosekov, M.S. Toder and A.I. Shevela

The processes of the repair of the damaged mandibular bone in rats were studied using light microscopy and x-ray densitometry at various time intervals after the local injection of the platelet-rich fibrin clot (PRFC), autologous mesenchymal (stromal) stem cells of bone marrow origin (AMSCBMO) or AMSCBMO, adsorbed on PRFC, into the damaged site. The best results were obtained after the application of PRFC with AMSCBMO. One week after the operation, the mandibular bone defect was largely filled with the newly formed bone tissue. It seems most probable that in this case the effects of fibrin and stem cells on the damaged bone were summarized or even amplified. Bone formation in these cases appeared to begin in the center, but not at the edges, of the defect. AMSCBMO were distributed over the whole volume of PRFC, filling all the defect more or less uniformly. As a result, maximally fast and successful restoration of bone tissue was reached in the area of the defect.

Key words: *autologous mesenchymal stem cells of bone marrow origin, fibrin clot, bone tissue, regeneration*

The Center of New Medical Technologies, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine, RAS Siberian Branch, Novosibirsk