



Саратовская область, Балтайский район, с. Царевщина. Болото, переходящее на притеррасную часть поймы р. Алай. 27.VII.1934. А. Чигуряева. Рекомендуется для внесения в список редких и охраняемых видов растений.

*Conringia orientalis* (L.) Dumort. – Саратовская область, Лысогорский р-н, с. Широкий Карамыш, сорное, край полевой дороги в пойме р. Карамыш. 11.07.2015. Ю. Буланый. – Евразийский вид. В SARAT хранятся сборы из Саратовской области: 1) Новоузенский у., Камышлейский орошаемый участок, среди посевов пшеницы. 10.VI.1925. Булычев. 2) Пугачёв, не доезжая совх. Аржановского, в балочке близ дороги. 17.VI.1928. И. Тереножкин. 3) Собрано около бывших Смирновских дач. 9.VI.1936. В. Семёнова, Л. Можяева. 4) окр. с. Разбойщина. 7.VI.1951. Р. Иванова. 5) Фёдоровский р-н, о. Льяной, сорное в посевах. 18.VI.1952. Д. С. Минаев.

6) с. Лысье Горы, ячменное поле. 30.VI.1956. Косырева, Воронина. 7) там же, луг в пойме р. Медведицы. 28.VI.1956. Русакова. 8) Саратов, 7-я Дачная, залежь. 20.VI.1959. Школьникова. 9) Перелюбский р-н, с. Куцеба, сыртовый склон. 12.VI.1961. М. Н. Шигаева.

Собранные гербарные образцы хранятся в Гербарии кафедры ботаники и экологии Саратовского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского (SARAT).

#### Список литературы

1. *Маевский П. Ф.* Флора средней полосы европейской части России. М.: Т-во науч. изд. КМК, 2006. 600 с.
2. *Цвелёв Н. Н.* Сем. Santalaceae R.Br. – Санталовые // Флора Восточной Европы: в 11 т. Т. 9. СПб.: Мир и семья-95, 1996. С. 403–407.

УДК 615.466: 616.31-085

## ИЗУЧЕНИЕ ВОЗДЕЙСТВИЯ ХИТОЗАНА НА ПРОЦЕСС ЗАЖИВЛЕНИЯ КОСТНОГО ДЕФЕКТА В ЭКСПЕРИМЕНТАХ *IN VIVO* И *IN VITRO*

И. В. Зудина<sup>1</sup>, А. П. Ведяева<sup>2</sup>, Н. В. Булкина<sup>2</sup>,  
П. В. Иванов<sup>3</sup>, А. Ф. А. Альзубейди<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского

E-mail: ivzudina@mail.ru

<sup>2</sup>Саратовский государственный медицинский университет имени В. И. Разумовского

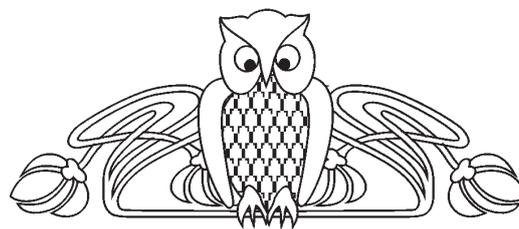
E-mail: navo@bk.ru

<sup>3</sup>Пензенский государственный университет

E-mail: stomatology@pnzgu.ru

Цель исследований *in vivo* и *in vitro* состояла в изучении молекулярных и клеточных механизмов противовоспалительного и ранозаживляющего действия барьеров из хитозана при их использовании для направленной регенерации тканей (GTR) на модели кроликов. Иммуноферментный анализ (ELISA) сыворотки крови кроликов, выполненный в динамике лечения дефектов кости альвеолярного отростка, подтвердил способность хитозана быстро купировать воспаление путем супрессии продукции цитокина ФНО. Данные, полученные в исследованиях *in vitro*, показывают, что хитозан стимулирует фибробласты и эпителиальные клетки к синтезу фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) в раннем послеоперационном периоде. Это может иметь важные клинические последствия, поскольку успех лоскутной операции в значительной степени зависит от срока инициации ангиогенеза и неоваскуляризации.

**Ключевые слова:** хитозан, костный дефект, техника направленной тканевой регенерации, цитокины, ангиогенные факторы.



#### *In Vivo* and *in Vitro* Studies of the Effect of Chitosan on the Bone Defect Repair Process

I. V. Zudina, A. P. Vedyeva, N. V. Bulkina,  
P. V. Ivanov, A. F. A. Alzubaidi

The objective of our *in vivo* and *in vitro* studies was to examine the molecular and cellular mechanisms of the anti-inflammatory and wound-healing effects of chitosan barriers when used for guided tissue regeneration (GTR) in a rabbit model. An ELISA test of the rabbit blood serum conducted during the treatment of alveolar bone defects has confirmed the ability of chitosan to reduce inflammation fast by suppressing the TNF- cytokine production. Our *in vitro* data show that chitosan stimulates fibroblasts and epithelial cells to synthesize the vascular endothelial growth factor (VEGF) and the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in the early post-surgery period. This could have important clinical implications because the success of flap surgery largely depends on the *time of* initiation of angiogenesis and neovascularization.

**Key words:** chitosan, bone defect, guided tissue regeneration technique, cytokines, angiogenic factors.

DOI: 10.18500/1816-9775-2016-16-2-171-179



## Введение

По данным ВОЗ (Информационный бюллетень № 318, май 2012 г.) тяжелая форма пародонтита обнаруживается у 15–20% людей среднего возраста (35–44 года). Пародонтит – воспалительное заболевание пародонта, характеризующееся повреждением зубодесневого соединения и прогрессирующей деструкцией тканей десны и кости межзубных перегородок, что нередко становится причиной расшатывания и выпадения здоровых зубов. Эффективным хирургическим методом лечения этого заболевания является лоскутная операция в технике направленной регенерации тканей пародонта (НРТ). В процессе хирургического вмешательства стоматолог отслаивает слизисто-надкостничный лоскут и устраняет поддесневые зубные отложения и патологические ткани пародонтального кармана. Направленная регенерация тканей достигается путем наложения на костный дефект специальных аллогенных, ксеногенных или аллопластических барьеров, разобщающих регенерирующие с разной скоростью ткани, для предотвращения прорастания десневого эпителия в область восстановления структур периодонтальной связки.

Несмотря на большое разнообразие материалов, предлагаемых на мировом фармацевтическом рынке для хирургической пародонтологии, наблюдаемый в последнее десятилетие рост интереса к конструированию новых биосовместимых и биорезорбируемых барьеров обусловлен отсутствием гарантированного восстановления тканей пародонта после проводимого лечения. По мнению ряда исследователей, положительный исход лоскутной операции определяется прежде всего способностью барьера фиксировать кровяной сгусток *in situ* в течение первых двух месяцев, вплоть до достижения им необходимой зрелости [1]. Однако резорбция имплантированного материала в тканях в течение столь длительного периода времени будет неизменно сопровождаться ответной воспалительной реакцией, чреватой развитием разного рода осложнений. Очевидно, что повышение эффективности лечения пародонтита методом НРТ можно достичь путем применения барьеров из материалов, обладающих выраженным противовоспалительным действием и способных ускорять течение репаративно-регенеративных процессов и таким образом сокращать время пребывания имплантата в тканях.

Для решения данной задачи крайне перспективным материалом, на наш взгляд, является гетерополисахарид хитозан (2-амино-2-дезоксид-

β-D-глюкан, ХТЗ), который, как ранее было установлено, обладает противовоспалительным, антибактериальным и иммуностропным действием. Целый ряд отечественных препаратов, включающих в свой состав ХТЗ, уже применяется при терапевтическом лечении некоторых воспалительных заболеваний пародонта [2–5]. Для этих лечебных средств характерна способность быстро купировать воспалительный процесс, приостанавливать деструкцию тканей, улучшать кровоснабжение и уменьшать подвижность зубов. Недавно на модели воспроизведенного пародонтита у кроликов было экспериментально показано, что аппликации аскорбата ХТЗ существенно ускоряют процессы заживления раны и формирования костного регенерата за счет быстрого купирования воспалительного процесса в тканях и восстановления архитектоники микроциркуляторного русла [6].

В настоящем исследовании предприняты попытки определить клеточно-молекулярные механизмы стимуляции хитозаном репаративно-регенеративных процессов в ране при применении техники НРТ на животной модели. Полученные данные позволят пролить свет на некоторые аспекты биологической активности хитозана и будут востребованы при создании более совершенных фармацевтических материалов на его основе, в полной мере отвечающих требованиям врачей и позволяющих преодолевать такие нежелательные процессы, как отторжение тканевого трансплантата, инфицирование и др.

## Материал и методы

Образцы барьера в форме пористых пленок ХТЗ со средневязкостной молекулярной массой 200 кДа и степенью деацетилирования 82 мольн.% (ЗАО «Биопрогресс», Россия) были любезно предоставлены специалистами лаборатории высокомолекулярных соединений ОНИ НС и БС при СГУ им. Н. Г. Чернышевского (г. Саратов).

Исследования *in vivo* проводили на модели половозрелых кроликов породы Шиншилла (6 особей) с использованием техники НРТ, дополненной имитацией деструкции межальвеолярных перегородок при пародонтите. Кроликам под наркозом отслаивали слизисто-надкостничный лоскут и хирургической шаровидной фрезой в кости альвеолярной части нижней челюсти в проекции корня зуба делали углубления диаметром и глубиной 3–4 мм. После того как костный дефект заполнялся кровяным сгустком, на область деструкции для изоляции раны накладывали биорезорбируемый барьер таким образом, чтобы



он перекрывал дефект на 2–3 мм по периметру. Далее проводилось ушивание краев раны путем наложения первичных узловых швов (рис. 1).

Для получения сыворотки на 3-, 7- и 14-е сутки после имплантации у кроликов собиралась кровь из краевой вены уха.

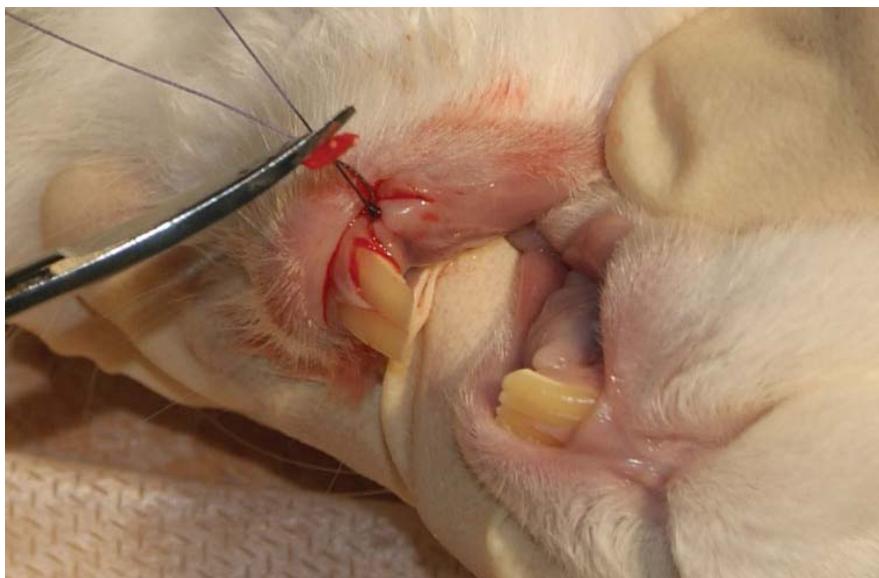
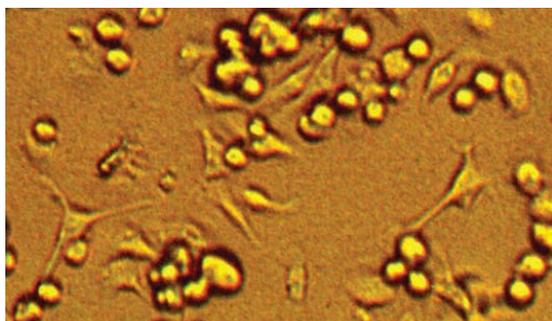


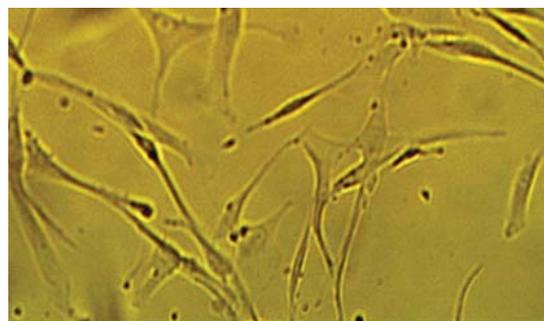
Рис. 1. Этап ушивания краев раны при лечении дефекта кости альвеолярного отростка с использованием техники направленной тканевой регенерации

В исследованиях *in vitro* в качестве тестовых культур использовали стандартную линию эпителиоподобных клеток МА-104 (коллекция НИИ цитологии РАМН, г.Санкт-Петербург, РФ) и клеточные линии человеческих фибробластов, которые были выделены из фрагментов кожи, полученных от здоровых доноров при пластических операциях. Культивирование клеток осуществляли во флаконах (Costar, США) с питательной средой ДМЕМ (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), дополненной 10%-ной эмбриональной телячьей сывороткой («HyClone», США). В каждый флакон вносили стандартизированные суспензии клеток МА-104 или человеческих фибробластов из расчета 300 тыс. клеток на  $1\text{см}^2$ . Флаконы с

клетками помещали в  $\text{CO}_2$ -инкубатор и выращивали при  $37^\circ\text{C}$  в течение 2 часов. Через 2 ч, когда при микроскопировании на поверхности пластика отмечались адгезия и распластывание клеток (рис. 2), во флаконы вносили равные по размеру и увлажненные средой ДМЕМ стерильные фрагменты пленки из ХТЗ или мембраны BioGide. Наблюдение за адгезией и пролиферацией клеток проводили на инвертированном микроскопе Биолам П. В качестве контроля рассматривали клеточные культуры, растущие в питательной среде без добавления тестируемых материалов. Через 4 ч после внесения образцов и потом ежедневно через каждые 24 ч из флаконов отбирали питательную среду в объеме 100 мкл.



а



б

Рис. 2. Адгезия к поверхности пластика и распластывание эпителиоподобных клеток МА-104 (а) и фибробластов (б), увеличение  $\times 150$



Питательную среду во флаконах не меняли до окончания срока наблюдения. Для объективизации исследования в каждой изучаемой группе проводили по три опытных посева.

Концентрацию цитокинов ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , MCP-1, VEGF (фактор роста эндотелия сосудов), GM-CSF (гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор) определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ИФА) на фотометре Stat Fax 4200 (Awareness Technology, США) с использованием ИФА-наборов компаний: Cusabio Biotech co., Ltd. (Китай), MyBioSource (США) и ЗАО Вектор-Бест (Россия).

### Результаты и их обсуждение

**Исследования *in vivo*.** Ответную реакцию тканей пародонта на контакт с ХТЗ изучали на модели кроликов с использованием техники НРТ, дополненной имитацией деструкции межальвеолярных перегородок при пародонтите. Следует отметить, что при любом хирургическом вмешательстве происходит дезорганизации капиллярно-тканевых систем, и от того, с какой скоростью протекает восстановление кровообращения в поврежденных тканях, зависит успех репаративно-регенеративных процессов. В связи с этим о сроках инициации и темпах восстановления микроциркуляторного русла в области костного дефекта судили по изменению концентрации в крови фактора роста эндотелия сосудов (VEGF). Данный цитокин является основным регулятором ангиогенеза, поскольку стимулирует митогенез и миграцию эндотелиальных клеток в область страдающих от гипоксии поврежденных тканей, что в итоге приводит к увеличению числа микрососудов и повышению плотности их расположения [7,8].

Интенсивность развивающейся в месте хирургического вмешательства воспалительной реакции, а также реакцию организма на имплантацию барьеров оценивали по динамике колебаний

концентрации провоспалительных цитокинов (ФНО $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ ) и фактора рекрутинга и транспорта моноцитов из костного мозга в фокус воспаления MCP-1/(CCL2).

Прооперированные животные были разделены на две группы в зависимости от имплантируемого материала. В группе сравнения (группа № 1,  $n=3$ ) кроликам вшивалась коллагеновая мембрана Bio-Gide (Geistlich, Швейцария); в экспериментальной группе (группа № 2,  $n=3$ ) – пленка ХТЗ.

Использование биорезорбируемого барьера из ХТЗ в технике НРТ выявило способность этого гетерополисахарида оказывать сильное противовоспалительное действие и обеспечивать быстрое заживление раны и восстановление дефекта кости альвеолярного отростка. При плановом осмотре животных с имплантированным хитозановым барьером было установлено, что операционные раны заживали первичным натяжением, термометрические показатели колебались в пределах нормы. Не было зафиксировано ни одного случая общей реакции на имплантат или осложнений в виде коллатерального отека, аллергии и нагноения швов. Практически с первых суток после операции кролики активно питались и были подвижны. У животных из группы сравнения №1 раны также заживали первичным натяжением, однако отмечались повышение температуры тела и отечность тканей десны, а также угнетенное состояние и плохой аппетит, что, по всей видимости, было вызвано испытываемым ими дискомфортом в области оперативного вмешательства.

Имуноферментный анализ сыворотки крови животных, проведенный в динамике лечения, позволил установить, что на 3-и сутки после операции в крови кроликов из группы № 1 содержание провоспалительных цитокинов ФНО $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  возросло относительно значения до операции в 17,6 ( $p \leq 0,05$ ) и 18,4 ( $p \leq 0,05$ ) раза соответственно (таблица). Также отмечался существенный рост

Содержание цитокинов в сыворотке крови кроликов в динамике лечения костного дефекта с применением разобщающих барьеров из ХТЗ и коллагена (Bio-Gide)

Группа	Срок наблюдения, сут	Среднее значение концентрации цитокина, пкг/мл			
		ФНО $\alpha$	ИЛ-1 $\beta$	VEGF	MCP-1
№ 1, (BioGide)	3	28,2 $\pm$ 1,8	40,5 $\pm$ 3,8	0	2,0 $\pm$ 0,0
	7	4,4 $\pm$ 0,9	18,5 $\pm$ 1,3	40,0 $\pm$ 3,3	0
	14	14,5 $\pm$ 4,3	24,0 $\pm$ 2,0	0	17,0 $\pm$ 0,8
№ 2, (ХТЗ, 200 кДа)	3	1,5 $\pm$ 0,1	0	21,1 $\pm$ 1,4	0
	7	14,8 $\pm$ 3,8	10,2 $\pm$ 0,9	95,4 $\pm$ 7,5	0
	14	11,0 $\pm$ 1,7	0	0	4,5 $\pm$ 0,1
Норма*		1,6 $\pm$ 0,1	2,2 $\pm$ 0,1	7,5 $\pm$ 1,7	0

Примечание. (\*) – среднее значение концентрации цитокина в сыворотке крови кроликов до оперативного вмешательства.



концентрации хемоаттрактанта для циркулирующих моноцитов MCP-1. При этом активатор ангиогенеза VEGF обнаружен не был. У кроликов из экспериментальной группы № 2 концентрация ФНО $\alpha$  в крови к 3-м суткам полностью нормализовалась, а цитокины ИЛ-1 $\beta$  и MCP-1 не детектировались. В то же время уровень ангиогенного фактора VEGF поднялся в 2,8 ( $p \leq 0,05$ ) раза относительно значения до операции.

По профилю цитокинов, выявленных в крови кроликов группы №1 на 3-и сутки, можно заключить, что хирургическое вмешательство и имплантация мембраны Bio-Gide индуцировали классическую активацию тканевых макрофагов (M1), что выразилось в выбросе ключевых активаторов воспаления ФНО $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  с последующим развитием острой воспалительной реакции, отека мягких тканей и обильной лимфогистиоцитарной инфильтрации. Лишь к 7-м суткам отмечалось снижение концентраций провоспалительных цитокинов. Однако их значения существенно ( $p \leq 0,05$ ) превышали соответствующие показатели до операции (ФНО $\alpha$  – в 2,8 раза, ИЛ-1 $\beta$  – в 8,4 раза), что свидетельствует о медленном затухании воспалительной реакции в поврежденных тканях в этот период.

Сильный противовоспалительный эффект, который наблюдался при использовании барьеров из ХТЗ, по всей видимости, был обусловлен способностью молекул гетерополисахарида индуцировать альтернативную активацию тканевых макрофагов (M2), которые, как известно, нивелируют воспаление, стимулируют процессы репарации и регенерации поврежденных тканей через продукцию ряда хемокинов, ангиогенных факторов (VEGF), аргиназы-1, но не ФНО $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  [9–11]. Поэтому в пользу ранней инициации репаративно-регенерационных процессов у кроликов из группы №2 свидетельствует не только крайне низкий уровень провоспалительных цитокинов в крови на 3-и сутки, но и рост концентрации VEGF. Как видно из таблицы, у кроликов из этой группы экспрессия VEGF достигает своего пика к 7-м суткам, а к 14-м полностью прекращается. У кроликов из группы сравнения повышение уровня VEGF наблюдается гораздо позднее – лишь на 7-е сутки, и концентрация этого фактора в крови в 2,4 ( $p \leq 0,05$ ) раза ниже, чем у кроликов из группы №2 в этот же срок. Таким образом, на основании мониторинга концентрации VEGF в крови кроликов можно заключить, что восстановление микроциркуляторной сети и топологическое упорядочение ее конструкции в присутствии ХТЗ начинается в более ранние сроки и проходит более интенсивно.

Переход воспалительного процесса в пролиферативную фазу у кроликов из обеих групп сопровождался повторным подъемом уровня цитокинов ФНО $\alpha$  и ИЛ-1 $\beta$  в сыворотке крови (см. таблицу). У кроликов из группы сравнения он наблюдался на 14-е сутки, у кроликов из группы № 2 – на 7-е. Высокая концентрация ИЛ-1 $\beta$  необходима для стимуляции роста и пролиферации фибробластов [12]. Именно с этого момента фибробласты начинают массивно проникать в локус повреждения и заполнять костный дефект соединительной тканью различной степени зрелости, формируя при этом первичную соединительнотканную мозоль.

Повышение уровня ФНО $\alpha$  инициирует продукцию MCP-1. Под действием MCP-1 моноциты мигрируют из кровеносного русла и костного мозга в фокус воспаления, где после дифференцировки и созревания превращаются в остеокласты, тканевые макрофаги и включаются в процесс резорбции имплантатов [13]. Оказалось, что у кроликов с имплантированными барьерами, содержащими ХТЗ, возрастание пула моноцитов в области лоскутной операции оказывается несколько отсроченным во времени. Так, индукция экспрессии MCP-1 в группе № 1 наблюдалась на 3-и и 14-е сутки, а в группе № 2 – только на 14-е сутки (см. таблицу). Наблюдаемая разница между группами в динамике продукции этого цитокина, по всей видимости, обусловлена различиями в молекулярно-клеточных механизмах биорезорбции барьеров, состоящих из разных по природе полимеров. Кроме того, этот факт наводит на мысль, что высокие уровни продукции VEGF, наблюдаемые в группе №2 в ранние сроки после хирургического вмешательства, могут быть обеспечены не за счет макрофагов M2, а за счет окружающих имплантат тканей и клеток, прежде всего, фибробластов и эпителиоцитов. Для подтверждения данного предположения потребовались дополнительные исследования *in vitro* с использованием чистых клеточных линий.

**Исследования *in vitro*.** Для установления участия окружающих имплантат тканей в индукции процесса реваскуляризации хирургической раны проводили *in vitro* сравнение секреторной активности чистых линий резидентных клеток при их прямом контакте с барьерами из ХТЗ и из коллагена (Bio-Gide). В частности, изучали биосовместимость имплантатов с культурами эпителиальных клеток MA-104 и человеческих фибробластов и динамику колебаний концентрации ФНО $\alpha$ , VEGF и GM-CSF в культуральной жидкости.



Установлено, что присутствие фрагментов пленки ХТЗ или мембраны BioGide в питательной среде существенно не отражается на скорости пролиферации клеток (рис. 3). На 3-и сутки после посева все тестируемые культуры

формировали полноценный монослой, а форма клеток соответствовала таковой в норме, что свидетельствовало о высокой биосовместимости и хороших биологических свойствах исследуемых материалов.

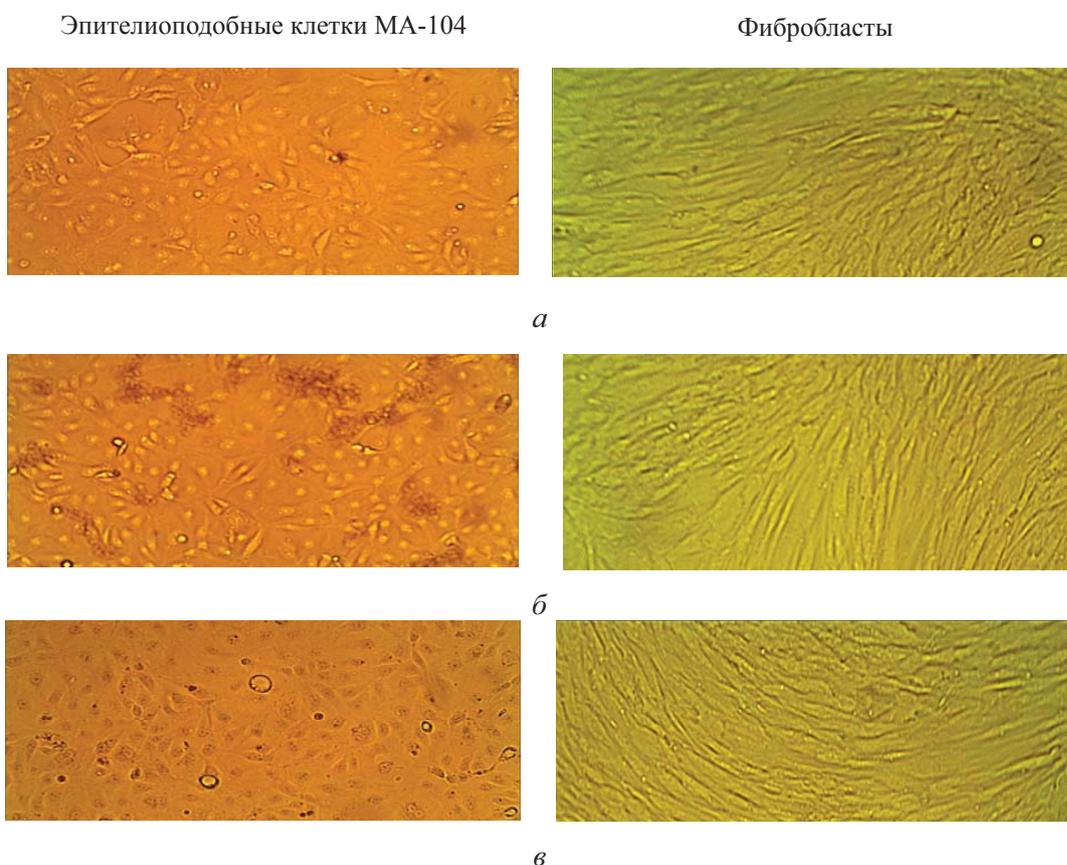


Рис. 3. Морфология культур клеток МА-104 и фибробластов через 72 ч культивирования на пластике в отсутствие (а) и в присутствии пленки из ХТЗ (б) или мембраны BioGide (в), увеличение  $\times 100$

Сравнительный анализ динамики колебаний уровня цитокинов в среде роста клеток в отсутствие (контроль) или в присутствии разобщающих барьеров позволил выявить ряд закономерностей. Так, культуры клеток МА-104 и фибробластов продуцировали цитокин ФНО $\alpha$  в интервале близких значений: от 0 до 120 пкг/мл. В то же время максимальные значения концентрации факторов VEGF и GM-CSF у клеток МА-104 более чем на порядок превышали таковые у фибробластов (рис. 4).

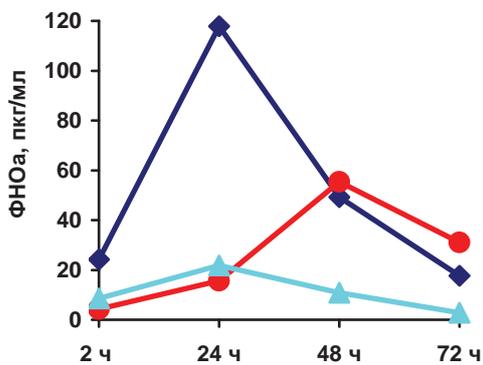
В средах контрольных культур концентрация ФНО $\alpha$  достигала максимум через 24 ч, а затем плавно снижалась к третьим суткам (см. рис. 4, а, б). Аналогичная динамика наблюдалась в эксперименте с мембраной Bio-Gide, с тем лишь отличием, что концентрация ФНО $\alpha$  в среде роста клеток МА-104 во всех точках измерения

была статистически значимо ниже ( $p \leq 0,05$ ) таковой в контроле. В присутствии барьера из ХТЗ концентрация ФНО $\alpha$  в среде роста фибробластов была крайне низка весь период наблюдения, а в среде роста клеток МА-104 она неуклонно росла и ко 2-м суткам превышала таковую в контроле в 1,1 ( $p \geq 0,05$ ) раза, а в эксперименте с мембраной Bio-Gide – в 5,1 ( $p \leq 0,05$ ) раза. Тем не менее в первые сутки совместного с ХТЗ культивирования и фибробласты, и эпителиальные клетки продуцировали ФНО $\alpha$  существенно ниже контроля ( $p \leq 0,05$ ).

Динамика изменения уровня VEGF в среде роста клеток МА-104 во всех группах была сходной (см. рис. 4, в). Концентрация этого фактора постепенно нарастала и к 3-м суткам достигала максимума, а к 4-м снижалась до значений, близких к таковым в первые часы культивирования.

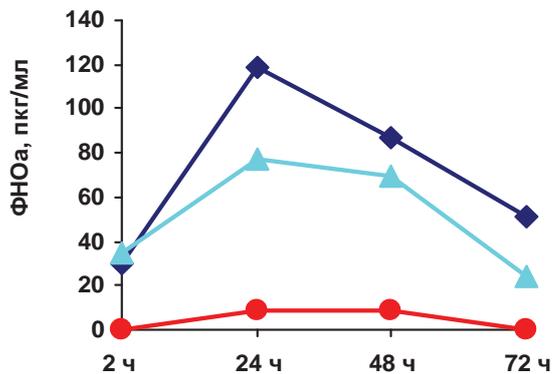


Эпителиоподобные клетки MA-104

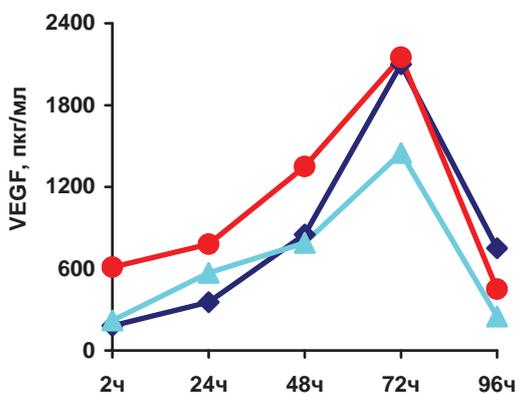


а

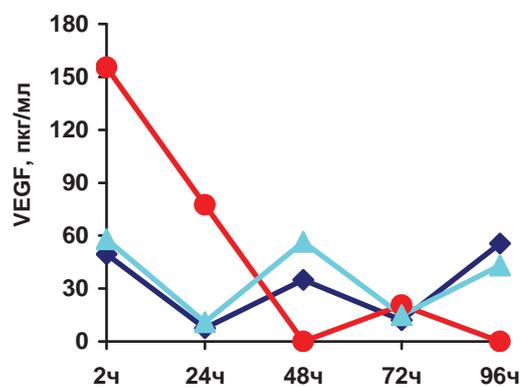
Фибробласты



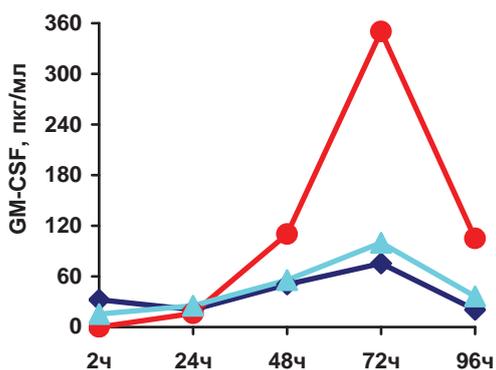
б



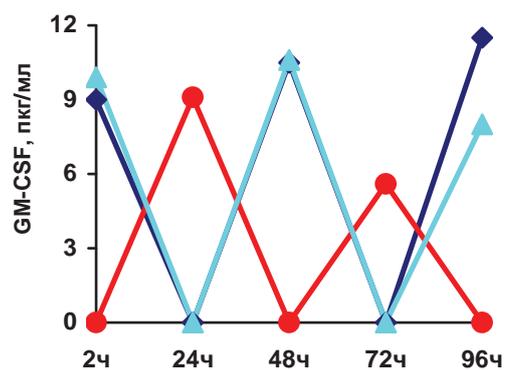
в



г



д



е

◆ Контроль    ● XT3    ▲ BioGide

Рис. 4. Динамика колебаний концентрации FНОα и факторов VEGF и GM-CSF в питательной среде в процессе культивирования клеток без (контроль) и совместно с барьерами из XT3 и коллагена (BioGide)



Однако следует отметить, что во всех точках измерения уровень VEGF был существенно ниже в среде с мембраной Bio-Gide, чем в среде с ХТЗ. Динамика и уровень продукции VEGF фибробластами в контроле и в среде с мембраной из коллагена практически не отличались (см. рис. 4, з). В то же время в среде с барьером из ХТЗ концентрация VEGF в первые часы культивирования в 3,1 ( $p \leq 0,05$ ) раза превышала таковую в контроле и в 2,7 ( $p \leq 0,05$ ) раза в среде с мембраной Bio-Gide, а через сутки – в 10,3 и 7 раз соответственно. В последующие трое суток концентрация VEGF в среде с барьером из ХТЗ колебалась на уровне тех же значений, что и в двух других группах ( $p \geq 0,05$ ).

Анализ выявил сходство в динамике экспрессии факторов VEGF и GM-CSF у эпителиоподобных клеток MA-104 (см. рис. 4, в, д). Как и в случае с VEGF, концентрация GM-CSF в культуральной среде достигала максимума к 3-м суткам, а затем отмечалось ее резкое падение. Причем на 3-и сутки уровень GM-CSF в среде с барьером из ХТЗ превышал таковой в контроле в 4,6 ( $p \leq 0,05$ ) раза, а в среде с Bio-Gide – в 3,5 ( $p \leq 0,05$ ) раза; на 4-е сутки – в 5,1 ( $p \leq 0,05$ ) и 2,9 ( $p \leq 0,05$ ) раза соответственно. При культивировании фибробластов в контроле и в среде с коллагеновой мембраной значения концентрации GM-CSF практически совпадали ( $p \geq 0,05$ ) во всех точках измерения (см. рис. 4, е). В среде с ХТЗ наблюдался суточный сдвиг инициации продукции этого фактора. Однако интервал колебаний концентрации GM-CSF (от 0 до 9,1 пкг/мл) практически не отличался от такового в контроле (от 0 до 11,5 пкг/мл) и в среде с Bio-Gide (от 0 до 10,6 пкг/мл).

Полученные данные подтверждают сделанное нами предположение, что фибробласты и эпителиальные клетки участвуют в обеспечении ранней инициации ангиогенеза в присутствии ХТЗ за счет способности этого гетерополисахарида индуцировать продукцию VEGF. Однако, как оказалось, такая стимуляция не длительна: в культуральной среде *in vivo* и в сыворотке крови кроликов *in vivo* вслед за резким подъемом уровня VEGF отмечалось быстрое снижение концентрации этого цитокина. Это крайне важно, поскольку непрерывное и длительное воздействие высоких концентраций VEGF на ткани может спровоцировать развитие отека [14] или иницировать остеокластогенез и резорбцию костной ткани через индукцию экспрессии цитокинов ИЛ-6, ММП-1 и ММП-2 стромальными клетками костного мозга [15, 16]. Более того, зарубежными исследователями было показано,

что в зонах с повышенным уровнем VEGF могут оседать VEGFR1-позитивные гемопоэтические клетки, которые, продуцируя специфический набор адгезионных молекул и протеаз, привлекают опухолевые клетки и стимулируют их размножение [17].

Вероятно, что в присутствии ХТЗ резкое снижение уровня VEGF в культуральной среде (см. рис. 4, в) опосредовано одновременным ростом в ней концентрации GM-CSF (см. рис. 4, д). Как известно, GM-CSF участвует в активной регуляции концентрации VEGF в тканях путем стимуляции моноцитов к синтезу растворимого рецептора sVEGFR-1, который распознает и связывает свободно циркулирующие молекулы VEGF и таким образом ограничивает неоангиогенез [18, 19]. И если VEGF играет важнейшую роль на ранних стадиях ангиогенеза, инициируя формирование примитивных трубчатых структур из одного слоя эндотелиальных клеток и потому ломких и склонных к кровоизлияниям, то повышение уровня GM-CSF в тканях обеспечивает увеличение плотности новообразованных сосудов, их созревание и стабилизацию [20].

Не так давно было показано, что обработка ран очищенным рекомбинантным белком GM-CSF существенно ускоряет их заживление [21]. По всей видимости, наблюдаемая в наших экспериментах высокая скорость заживления операционных ран у кроликов из группы № 2, обусловлена способностью ХТЗ стимулировать эпителиальные клетки к продукции GM-CSF в крайне высоких концентрациях (см. рис. 4, д).

### Выводы

В экспериментах *in vivo* установлено, что барьеры, включающие в свой состав ХТЗ, благотворно влияют на процессы заживления раны и восстановления костного дефекта при хирургическом вмешательстве с применением техники НРТ. ХТЗ способствует быстрому купированию воспалительной реакции за счет супрессии продукции ФНО $\alpha$ .

Доказано *in vitro*, что при контакте с ХТЗ резидентные клетки – фибробласты и эпителиоциты – синтезируют VEGF и GM-CSF в высоких концентрациях, что важно для ранней инициации процессов неоваскуляризации и ангиогенеза.

### Список литературы

1. Грудянов А. И., Чупахин П. В. Методика направленной регенерации тканей. Подсадочные материалы. М. : ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. 64 с.



2. Булкина Н. В., Ведяева А. П., Токмакова Е. В., Попкова О. В. Опыт применения аскорбата хитозана в комплексной терапии заболеваний пародонта // Саратовский научно-медицинский журн. 2013. Т. 9, № 3. С. 372–375.
3. Зудина И. В., Булкина Н. В., Иванов П. В., Ведяева А. П., Иванова Е. В. Противовоспалительный эффект аскорбата хитозана в комплексной терапии заболеваний пародонта // Рос. стоматол. журн. 2013. № 2. С. 16–19.
4. Способ лечения хронического катарального гингивита : пат. 2240770 РФ / Солнцев А. С., Большаков И. Н., Старостенко Т. Д., Майгуров А. А., Насибов С. М. Опубл. 2004.
5. Способ лечения хронического пародонтита: пат. 2301064 РФ / Большаков И. Н., Солнцев А. С., Майгуров А. А., Насибов С. М., Еремеев А. В. Опубл. 2005.
6. Иванов П. В. Патогенетическое обоснование и внедрение в практику новых регенеративных методов лечения генерализованного пародонтита : автореф. дис. ... д-ра мед. наук. Саратов, 2013. 51 с.
7. Asahara T., Masuda H., Takahashi T., Kalka C., Pastore C., Silver M., Kearne M., Magner M., Isner J. M. Bone marrow origin of endothelial progenitor cells responsible for postnatal vasculogenesis in physiological and pathological neovascularization // *Circ Res.* 1999. Vol. 85, № 3. P. 221–228.
8. Hoeben A., Landuyt B., Highley M. S., Wildiers H., Van Oosterom A. T., De Bruijn E. A. Vascular endothelial growth factor and angiogenesis // *Pharmacol. Rev.* 2004. Vol. 56, № 4. P. 549–580.
9. Hoemann C. D., Chen G., Marchand C., Tran-Khanh N., Thibault M., Chevrier A., Sun J., Shive M. S., Fernandes M. J., Poubelle P. E., Centola M., El-Gabalawy H. Scaffold-guided subchondral bone repair : implication of neutrophils and alternatively activated arginase-1+ macrophages // *Amer. J. Sports Med.* 2010. Vol. 38, № 9. P. 1845–1856.
10. Schraufstatter I. U., Zhao M., Khaldoyanidi S. K., Discipio R. G. The chemokine CCL18 causes maturation of cultured monocytes to macrophages in the M2 spectrum // *Immunology.* 2012. Vol. 135, № 4. P. 287–298.
11. Eaton K. V., Yang H. L., Giachelli C. M., Scatena M. Engineering macrophages to control the inflammatory response and angiogenesis // *Exp. Cell Res.* 2015. Vol. 339, № 2. P. 300–309.
12. Ono M., Inkson C. A., Kilts T. M., Young M. F. WISP-1/CCN4 regulates osteogenesis by enhancing BMP-2 activity // *J. Bone Miner Res.* 2011. Vol. 26, № 1. P. 193–208.
13. Khan U. A., Hashimi S. M., Bakr M. M., Forwood M. R., Morrison N. CCL2 and CCR2 are essential for the formation of osteoclasts and foreign body giant cells // *J. Cell Biochem.* 2016. Vol. 117, № 2. P. 382–389.
14. Endo I., Mitsui T., Nishino M., Oshima Y., Matsumoto T. Diurnal fluctuation of edema synchronised with plasma VEGF concentration in a patient with POEMS syndrome // *Intern. Med.* 2002. Vol. 41. P. 1196–1198.
15. Henriksen K., Karsdal M., Delaisse J. M., Engsig M. T. RANKL and vascular endothelial growth factor (VEGF) induce osteoclast chemotaxis through an ERK1/2-dependent mechanism // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278. P. 48745–48753.
16. Yang Q. VEGF enhancement of osteoclast survival and bone resorption involves VEGF receptor-2 signaling and beta3-integrin // *Matrix Biol.* 2008. Vol. 27. P. 589–599.
17. Kaplan R. N., Riba R. D., Zacharoulis S., Bramley A.H., Vincent L., Costa C., MacDonald D. D., Jin D. K., Shido K., Kerns S. A., Zhu Z., Hicklin D., Wu Y., Port J. L., Altorki N., Port E. R., Ruggero D., Shmelkov S. V., Jensen K. K., Rafii S., Lyden D. VEGFR1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche // *Nature.* 2005. Vol. 438. P. 820–827.
18. Eubank T. D., Roberts R., Galloway M., Wang Y., Cohn D. E., Marsh C. B. GM-CSF induces expression of soluble VEGF receptor-1 from human monocytes and inhibits angiogenesis in mice // *Immunity.* 2004. Vol. 21, № 6. P. 831–842.
19. Roda J. M., Wang Y., Sumner L. A., Phillips G. S., Marsh C. B., Eubank T. D. Stabilization of HIF-2 $\alpha$  induces sVEGFR-1 production from tumor-associated macrophages and decreases tumor growth in a murine melanoma model // *J. Immunol.* 2012. Vol. 189, № 6. P. 3168–3177.
20. Zhao J., Chen L., Shu B., Tang J., Zhang L., Xie J., Liu X., Xu Y., Qi S. Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Influences Angiogenesis by Regulating the Coordinated Expression of VEGF and the Ang/Tie System // *PLoS ONE.* 2014. Vol. 9, № 3. e92691.
21. Yan H., Chen J., Peng X. Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor hydrogel promotes healing of deep partial thickness burn wounds // *Burns.* 2012. Vol. 38. P. 877–881.