

- submerged guided bone regeneration: A prospective case series. *Clin. Implant Dent. Relat. Res.* 2020;22(3):342-350. <https://doi.org/10.1111/cid.12913>
17. Lin C.-Y., Chen Z., Chiang H.-L., Pan W.-L., Wang H.-L. The impact of implantoplasty in regenerated and non-regenerated treatment modalities in peri-implantitis: a systematic review and meta-analysis. *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* 2022;37(5):859-868. <https://doi.org/10.11607/jomi.9436>
18. Labussiere M., Badran Z., Rethore G., Verner C., Soueidan A., Struillou X. Combination of bone substitutes and vectors in periodontology and implantology: A systematic review. *Dent. Mater. J.* 2021;40(5):839-852. <https://doi.org/10.4012/dmj.2020-361>
19. Щетинин Е. В., Сирак Е. С., Афанасьева Г. А., Петросян Г. Г., Щетинина Е. Е., Сирак С. В. Влияние мелатонина на репаративную регенерацию костной ткани челюстных костей в эксперименте. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2020;15(4):570-572. [Shchetinin E. V., Sirak E. S., Afanaseva G. A., Petrosyan G. G., Shchetinina E. E., Sirak S. V. Effect of melatonin on reparative regeneration of bone tissue in the jaw bones experiment. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza. – Medical News of North Caucasus.* 2020;15(4):570-572. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2020.15135>

Поступила 20.09.2023

Сведения об авторах:

Сирак Сергей Владимирович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой стоматологии; тел.: +7(8652)350551; e-mail: sergejsirak@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-4924-5792>

Ленев Вадим Николаевич, кандидат медицинских наук, доцент кафедры; тел.: +7(8652)350551; e-mail: lenvadim@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2189-7147>

Романенко Алина Рашитовна, ассистент кафедры; тел.: +79283228644; e-mail: 09-kit-kat@mail.ru

Сирак Екатерина Сергеевна, студентка; тел.: +7(8652)350551; e-mail: sergejsirak@yandex.ru

Щетинина Елизавета Евгеньевна, студентка; тел.: +7(8652)352684; e-mail: patphysiology@stgmu.ru; <https://orcid.org/0000-0002-8035-2641>

Петросян Григорий Григорьевич, кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры патологической физиологии; тел.: +7(8652)352684; e-mail: patphysiology@stgmu.ru; <https://orcid.org/0000-0003-0052-4077>

Щетинин Евгений Вячеславович, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии; тел.: +7(8652)352684; e-mail: ev.cliph@rambler.ru; <https://orcid.org/0000-0001-6193-8746>

© Коллектив авторов, 2023

УДК 616.717.3:021.2

DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2023.18096>

ISSN – 2073-8137

ВЛИЯНИЕ ЭКЗОСОМ МЕЗЕНХИМНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК И ДЕФЕНЗИНА НА БИОСОВМЕСТИМОСТЬ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНО-ХРЯЩЕВЫХ ДЕФЕКТОВ

Н. Н. Диденко¹, Е. М. Бойко², А. А. Чагаров¹,
А. Д. Болатчиев¹, Д. В. Бобрышев¹, А. А. Долгалев¹

¹ Ставропольский государственный медицинский университет,
Российская Федерация

² Пятигорский медико-фармацевтический институт, Российская Федерация

INFLUENCE OF THE MESENCHYMAL STEM CELLS EXOSOMES AND DEFENSIN ON THE BIOCOMPATIBILITY OF MATERIAL FOR REPLACEMENT OF OSTEOCARTILAGE DEFECTS

Didenko N. N.¹, Boyko E. M.², Chagarov A. A.¹,
Bolatchiev A. D.¹, Bobryshev D. V.¹, Dolgalev A. A.¹

¹ Stavropol State Medical University, Russian Federation

² Pyatigorsk Medical and Pharmaceutical Institute, Russian Federation

Проведена оценка пролиферативной активности первичных культур мезенхимных стромальных клеток жировой ткани кролика при использовании экспериментальных образцов на основе коллагена из подслизистого тонкого кишечника свиньи, содержащего экзосомы мезенхимных стволовых клеток (МСК) и дефензины (DEFb103A). Материалы не обладают цитотоксичностью, не препятствуют пролиферативной активности клеток. Полученные результаты позволяют проводить исследования биосовместимости материалов *in vivo*.

Ключевые слова: коллагеновый гель, внеклеточный матрикс, имплантация

The proliferative activity of primary cultures of rabbit adipose tissue derivate mesenchymal stromal cells was assessed using experimental samples based on collagen from the submucosa of the pig small intestine, containing MSC exosomes and DEFb103A. The materials are not cytotoxic and do not interfere with the proliferative activity of cells. The results obtained are allow providing the in vivo studies of the biocompatibility of materials.

Keywords: collagen gel, extracellular matrix, implantation

Для цитирования: Диденко Н. Н., Бойко Е. М., Чагаров А. А., Болатчиев А. Д., Бобрышев Д. В., Долгалева А. А. ВЛИЯНИЕ ЭКЗОСОВ МЕЗЕНХИМНЫХ СТЕВЛОВЫХ КЛЕТОК И ДЕФЕНЗИНА НА БИОСОВМЕСТИМОСТЬ МАТЕРИАЛА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНО-ХРЯЩЕВЫХ ДЕФЕКТОВ. *Медицинский вестник Северного Кавказа*. 2023;18(4):406-408. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2023.18096>

For citation: Didenko N. N., Boyko E. M., Chagarov A. A., Bolatchiev A. D., Bobryshev D. V., Dolgaleva A. A. INFLUENCE OF THE MESENCHYMAL STEM CELLS EXOSOMES AND DEFENSIN ON THE BIOCOMPATIBILITY OF MATERIAL FOR REPLACEMENT OF OSTEOCARTILAGE DEFECTS. *Medical News of North Caucasus*. 2023;18(4):406-408. DOI – <https://doi.org/10.14300/mnnc.2023.18096> (In Russ.)

ВКМ – внеклеточный матрикс
МСК – мезенхимные стволовые клетки

ПТК – подслизистая оболочка тонкого кишечника

Направленная тканевая регенерация является одним из распространенных методов восстановления костной и хрящевой ткани при критических дефектах опорного аппарата. Основными компонентами для методов направленной тканевой регенерации являются барьерные мембраны и матриксы биологического происхождения на основе коллагена [1]. Оптимизация направленной регенерации обеспечивается, среди прочего, качеством биологических веществ в окружающей клеточной культуре, включая матрикс [2]. Экзосомы, продуцируемые клетками, включая МСК, содержат необходимые для направленной дифференцировки биологически активные вещества, обеспечивая сохранение фенотипа клеток [3].

Микробная контаминация является серьезной проблемой при культивировании клеток, но существует ряд процедур, которые могут быть приняты для предотвращения или устранения контаминации [4]. Один из возможных методов деконтаминации клеточных культур может заключаться во внесении в среду с культивируемыми клетками антимикробных пептидов, в частности дефензинов. Антибактериальное действие дефензинов обусловлено их проникновением в клеточную стенку микроорганизмов с образованием пор и последующим лизисом.

Цель исследования – изучение цитотоксичности экспериментальных образцов биоматериалов на основе внеклеточного коллагенового матрикса, содержащего экзосомы, при добавлении дефензинов с оценкой пролиферативной активности клеток, культивируемых на образцах биоматериалов *in vitro*.

Материал и методы. Объектами исследования явились следующие материалы для направленной тканевой регенерации:

1-й экспериментальный образец – коллагеновый гель из подслизистой оболочки тонкого кишечника (ПТК) свиньи;

2-й экспериментальный образец – гель из ПТК + секретом МСК (ПТК + EXs);

3-й экспериментальный образец – гель из ПТК + дефензин (ПТК + DEF);

4-й экспериментальный образец – гель из ПТК + секретом МСК + дефензин (ПТК + EXs + DEF).

Ранее была показана эффективность использования геля из ПТК в сравнении с коллагеновым биоматериалом FibroMatrix (ООО «Кардиоплант», Россия) [5].

Первичные культуры МСК жировой ткани кролика получали при помощи ферментативной дезагрегации коллагеназой и культивировали в среде DMEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10 % фетальной телячьей сыворотки (Gibco, США) в культуральных флаконах площадью 25 см² (Thermo Scientific, США) при 37 °C и 5 % CO₂. Смена среды осуществлялась каждые 3–4 дня. После достижения 80–90 % конфлюэнтности монослоя клетки отделяли с помощью 0,25 % раствора трипсина (Биолот, Россия).

Секретом получали от некоммитированных МСК на 3 пассаже. Клетки переносили в стерильный раствор фосфатного буфера на 24 ч, после чего выделяли секретом из супернатанта путем его центрифугирования и фильтрации.

Рекомбинантный человеческий дефензин DEF-b103A (Cloud-Clone Corp., Китай) разводили стерильным раствором Хэнкса (Биолот, Россия) и вносили в концентрации 50 мкг/мл.

Все экспериментальные образцы помещали в 24-луночный культуральный планшет. В каждую лунку планшета с 1–4 образцами вносили по 2·10⁴ МСК в 800 мкл полной среды. Планшет инкубировали при 37 °C и 5 % CO₂ в атмосфере 72 ч.

Пролиферативную активность клеток определяли с использованием набора реактивов EZ4U (Biomedica), модификации теста МТТ, который оценивает метаболическую активность клеток, коррелирующую с количеством живых клеток. Образец каждого типа переносили после инкубации в другой 24-луночный планшет с 0,8 мл свежей среды в ДМЕМ. Затем к каждой лунке добавляли 80 мкл активированного раствора EZ4U и инкубировали при 37 °C и 5 % CO₂ в течение 3,5 часов. После чего образцы извлекали и измеряли оптическое поглощение раствора с использованием многофункционального фотометра-имиджера Cytation1 (BioTek, США) при длине волны 450 нм с референсной длиной волны 620 нм. Вычисляли оптическую плотность относительно положительного контроля в 1 экспериментальном образце (в %).

Результаты и обсуждение. При добавлении в культуральную среду бета-дефензина отмечалось статистически достоверное снижение пролиферативной активности МСК – всего 64,47±8,848 % (t=3,180, p<0,05) относительно 1 экспериментального образца. В 3 образце (ПТК + EXs) показана сопоставимая с контрольным образцом пролиферативная активность (95,09±8,292 %), что свидетельствует

об отсутствии при данном подходе стимулирования экзосомами пролиферации МСК.

Вместе с тем клетки, культивированные на образцах с добавлением как дефензина, так и экзосом (4 образца, ПТК + EXs + DEF), обладали сходной пролиферативной активностью с клетками контрольной группы (1 образец) – $86,97 \pm 3,85$ % ($t=1,662$, $p>0,05$), но достоверно более высокой пролиферативной активностью по сравнению с группой без добавления экзосом (2 образца, ПТК + DEF) – $134,91 \pm 5,97$ % ($t=3,174$, $p<0,05$), что свидетельствует о нивелировании антипролиферативного эффекта дифензина при введении в среду экзосом.

Заключение. Полученные данные позволяют предположить наличие цитопротективного эффекта секрета МСК при его введении в образец вместе с дефензином. Выявленный эффект может обусловить

лучшие результаты регенерации тканей с профилактикой контаминации клеточных культур при внесении в область повреждения биоматериалов на основе внеклеточного коллагенового матрикса, содержащего экзосомы и дефензин.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование: Научно-исследовательская работа выполнена в рамках Государственного задания Министерства здравоохранения Российской Федерации на научные исследования и разработки по теме «Разработка материала на основе внеклеточного коллагенового матрикса, содержащего экзосомы, для индукции процессов регенерации костно-хрящевых структур млекопитающих», НИОКТР № 121031700342-8.

Литература/References

1. Tang V. W. Collagen, stiffness, and adhesion: the evolutionary basis of vertebrate mechanobiology. *Mol. Biol. Cell.* 2020;31(17):1823-1834. <https://doi.org/10.1091/mbc.E19-12-0709>
2. Kirkness M. W., Lehmann K., Forde N. R. Mechanics and structural stability of the collagen triple helix. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2019;53:98-105. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2019.08.001>
3. Hade M. D., Sui C. N., Suo Z. Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosomes: Applications in Regenerative Medicine. *Cells.* 2021;10(8):1959. <https://doi.org/10.3390/cells10081959>
4. Baust J. M., Buehring G. C., Campbell L., Elmore E., Harbell J. W. [et al.]. Best practices in cell culture: an overview. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 2017;53(8):669-672. <https://doi.org/10.1007/s11626-017-0177-7>
5. Долгалев А. А., Бойко Е. М., Бобрышев Д. В., Диденко Н. Н., Гумскова Ю. А. [и др.]. Исследование цитотоксичности коллаген-содержащих гелей на экспериментальных образцах биоматериалов. *Медицинский вестник Северного Кавказа.* 2022;17(1):74-75. [Dolgaliev A. A., Boyko E. M., Bobryshev D. V., Didenko N. N., Gumsikova Yu. A. [et al.]. Issledovaniye tsitotoksichnosti kollagen-soderzhashchikh geley na eksperimental'nykh obraztsakh biomaterialov. *Meditsinskii vestnik Severnogo Kavkaza.* – *Medical News of North Caucasus.* 2022;17(1):74-75. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.14300/mnnc.2022.17020>

Поступила 10.09.2023

Сведения об авторах:

Диденко Николай Николаевич, ассистент кафедры патологической физиологии;
тел.: +7(8652)352684; e-mail: patphysiology@stgmu.ru; <https://orcid.org/0000-0001-9734-8158>

Бойко Евгений Михайлович, кандидат медицинских наук, преподаватель;
тел.: +79188664905; e-mail: evgedentzub@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0002-1827-8487>

Чагаров Артур Ахматович, заочный аспирант кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии;
тел.: +79286550677; e-mail: Megalowin188@mail.ru; <https://orcid.org/0000-0003-4625-6266>

Болатчиев Альберт Добаевич, кандидат медицинских наук, ассистент кафедры клинической фармакологии, заведующий лабораторией антимикробных пептидов;
тел.: +79288205551; e-mail: bolatalbert@yandex.ru; <https://orcid.org/0000-0003-2391-9135>

Бобрышев Дмитрий Викторович, кандидат медицинских наук, заведующий лабораторией регенеративной медицины;
тел.: +7(8652)357369; e-mail: bobryshevrg@ya.ru; <https://orcid.org/0000-0002-3947-4786>

Долгалев Александр Александрович, доктор медицинских наук, доцент, заведующий лабораторией трансфера инновационных медицинских технологий и изделий, профессор кафедры стоматологии общей практики и детской стоматологии;
тел.: +79624404861; e-mail: dolgalev@dolgalev.pro; <https://orcid.org/0000-0002-6352-6750>