

ТОКСИЧНОСТЬ И БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ НОВОГО КОСТЕЗАМЕЩАЮЩЕГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ НЕДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОЛЛАГЕНА, СОДЕРЖАЩЕГО ФАКТОР РОСТА ЭНДОТЕЛИЯ СОСУДОВ

УДК 616.71–006.34.04–083.74

Поступила 17.03.2012 г.



А.А. Мураев, к.м.н., ассистент кафедры челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ¹;
С.Ю. Иванов, д.м.н., профессор, зав. кафедрой челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ¹;
В.М. Рябова, ассистент кафедры челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ¹;
А.А. Артифексова, д.м.н., профессор, зав. кафедрой патологической анатомии¹;
Е.В. Володина, аспирант лаборатории генной терапии рака²;
И.Н. Полякова, зав. отделом³

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603005, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Институт биологии гена РАН, Москва, 119334, ул. Вавилова, 34/5;

³ЗАО «Протеинсинтез», Москва, 115035, 3-й Кадашевский пер., 6/2

Цель исследования — изучить *in vitro* и *in vivo* биологические свойства нового остеопластического материала на основе недеминерализованного коллагена, содержащего фактор роста эндотелия сосудов (ФРЭС), оценить его токсичность и влияние на неоангиогенез.

Материалы и методы. В ходе работы *in vitro* (I этап) оценивали биологическую активность и токсичность полученной различными методами композиции — костный коллаген+ФРЭС. На II этапе изучали биологические свойства разработанного материала *in vivo*. Полученные образцы конъюгированных материалов анализировали на предмет токсичности в отношении культивируемых клеток: трансформированных фибробластов мыши линии L929 и эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC (от англ.: *Human umbilical vein endothelial cells*).

Заключение. Наименее токсичным в условиях *in vitro* моделей на основе потенциальных клеток-мишеней, которые наиболее вероятно будут являться основными клеточными элементами в участке регенерации тканей, является биоматериал, полученный с использованием кросс-сшивок недеминерализованного костного коллагена и фактора роста эндотелия сосудов с использованием NHS-аминореактивного эфира. Именно эта методика получения биоматериалов применялась в дальнейшем с целью наработки материала для проведения опытов *in vivo*.

Ключевые слова: остеопластический материал, недеминерализованный коллаген, фактор роста эндотелия сосудов, регенерация костной ткани.

English

Toxicity and biological activity of a new bone substituting material based on nondemineralised collagen containing vascular endothelial growth factor

A.A. Muraev, PhD, Tutor, the Department of Maxillo-Facial Surgery and Implantology, the Faculty of Doctors' Advanced Training¹;
S.Yu. Ivanov, D.Med.Sc., Professor, Head of the Department of Maxillo-Facial Surgery and Implantology, the Faculty of Doctors' Advanced Training¹;
V.M. Ryabova, Tutor, the Department of Maxillo-Facial Surgery and Implantology, the Faculty of Doctors' Advanced Training¹;

Для контактов: Мураев Александр Александрович, тел. моб. +7 903-711-02-46; e-mail: muraev@gmail.com

A.A. Artifexova, D.Med.Sc., Professor, Head of the Department of Pathological Anatomy¹;
E.V. Volodina, Postgraduate, Tumour Gene Therapy Laboratory²;
I.N. Polyakova, Head of the Department³

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005;

²Gene Biology Institute of RAS, Vavilova St., 34/5, Moscow, Russian Federation, 119334;

³Close Joint Stock Company "Proteinsynthesis", 3rd Kadashevsky pereulok, 6/2, Moscow, Russian Federation, 115035

The aim of the investigation is to study *in vitro* and *in vivo* biological properties of a new osteoplastic material on the basis of non-demineralized collagen containing vascular endothelial growth factor (VEGF), and assess its toxicity and its effect on neoangiogenesis.

Materials and methods. *In vitro* (I stage) there was estimated biological activity and toxicity of the composition — bone collagen + VEGF — obtained by various techniques. Biological properties of the developed material were studied *in vivo* at the II stage. The obtained samples of conjugated materials were analyzed for toxicity in regard to cultivated cells: transformed fibroblasts of L929 line mice and HUVEC (Human umbilical vein endothelial cells).

Conclusion. Biomaterial obtained using cross-link of nondemineralized bone collagen and vascular endothelial growth factor using NHS-aminoreactive ester is the least toxic *in vitro* models based on potential target cells that are likely to be the main cellular elements in tissue regeneration area. This technique of obtaining biomaterials was used further in order to receive the material for *in vivo* experiments.

Key words: osteoplastic material, nondemineralized collagen, vascular endothelial growth factor, osseous tissue regeneration.

В практике хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии для заполнения дефектов, возникающих после удаления зубов, опухолей и опухолеподобных образований, с целью предотвращения возможных осложнений, а также для ускорения регенерации костной ткани используются различные биогенные и синтетические материалы [1–4].

В настоящее время ведутся поиск и разработка новых биологических и синтетических агентов, добавление которых в имплантируемый костнопластический материал будет способствовать улучшению микроциркуляции в области операции, ускорению прорастания сосудов и репаративной регенерации костной ткани в месте дефекта [5–10]. Ранее [11–13] было показано, что насыщение остеопластических биокомпозиционных материалов незаменимой аминокислотой L-аргинин, являющейся донором оксида азота (NO), стимулирует неоангиогенез в зоне реконструкции. Большой интерес представляют исследования иностранных авторов, посвященные биологической роли фактора роста эндотелия сосудов — ФРЭС (англ.: *vascular endothelial growth factor* — VEGF) в регенерации костной ткани [14–16].

Цель исследования — изучить *in vitro* и *in vivo* биологические свойства нового остеопластического материала на основе недеминерализованного коллагена, содержащего фактор роста эндотелия сосудов, оценить его токсичность и влияние на неоангиогенез.

Материалы и методы. Новый материал для замещения костных дефектов разработан в ЗАО «Протеинсинтез» (Москва). За основу взят недеминерализованный костный коллаген в виде блоков 5х5х5 мм (рис. 1) (ООО «НПК ВИТАФОРМ», Москва), который насыщали ФРЭС. В ходе работы *in vitro* (I этап) оценивали биологическую активность и токсичность полученной различными методами композиции: 1) костный коллаген+ФРЭС (в среде глутарового альдегида); 2) костный коллаген+ФРЭС (в среде NHS-аминореактивного эфира); 3) костный коллаген+ФРЭС (в среде водорастворимого карбодиамидного крослинкерного реагента ЭДАК). На II этапе изучали биологические свойства разработанного материала *in vivo*. Получен-

ные образцы конъюгированных материалов анализировали на предмет токсичности в отношении культивируемых клеток: трансформированных фибробластов мыши линии L929 и эндотелиальных клеток пупочной вены человека HUVEC (от англ.: *Human umbilical vein endothelial cells*).

Фибробласты были выбраны в качестве модельных клеток, поскольку они, во-первых, являются важными участниками процессов регенерации и формирования новой кости, во-вторых, токсичность именно в отношении их может нарушать процессы нормального послеоперационного восстановления, в-третьих, они активно функционируют в условиях *in vitro* и успешно и стабильно перевиваются в культуре. Перечисленные свойства позволяют использовать анализ пролиферативной активности фибробластов для оценки токсичных эффектов новых материалов.

Суть метода оценки состоит в использовании тест-системы, представляемой перевиваемыми линиями фибробластов и эндотелиальных клеток. Зная характеристики тест-системы и следя за их изменением после добавления к культуре клеток фрагментов изучаемых biomaterialов, можно выяснить, насколько токсичны сами материалы или их компоненты для клеток L929 и HUVEC.



Рис. 1. Недеминерализованный костный коллаген в виде блоков 5х5х5 мм, используемый в качестве носителя ФРЭС

Регуляция пролиферации фибробластов и эндотелиальных клеток может осуществляться благодаря присутствию в биоматериале проангиогенных факторов или токсических соединений, обладающих как стимулирующим, так и ингибирующим действием. Отличительной особенностью метода является использование двух исходных концентраций засеваемых клеток, что, соответственно, создает условия для высокого и низкого уровня пролиферации, так как клетки отличаются разным уровнем чувствительности к супрессорным и стимулирующим факторам при различных уровнях пролиферации. Для каждой экспериментальной точки использовали три параллельные пробы. Учет пролиферации проводили с помощью набора CellTiter 96® AQueous Cell Proliferation Assay (Promega, США) согласно инструкции производителя.

Индекс пролиферации (ИП) рассчитывали по формуле: $ИП = \frac{ОП(культура+биоматериал)}{ОП(интактная\ культура)} \times 100\%$, где ОП (культура+биоматериал) — значение оптической плотности, полученное в лунках клеток, культивируемых в присутствии биоматериала; ОП (интактная культура) — значение оптической плотности, полученное в контрольных лунках, содержащих интактные клетки.

Для оценки биологической активности ФРЭС после его нанесения на костный коллаген и сохранения проангиогенных свойств биоматериала, содержащего ФРЭС, проводили исследование его биологической активности на модели клеток HUVEC. Данная модель является общепринятой в литературе системой оценки для биологической активности проангиогенных белков, в том числе и ФРЭС. Пролиферация клеток HUVEC является ФРЭС-зависимой и полностью тормозится в отсутствие данного цитокина.

Для оценки сохранности биологической активности ФРЭС фрагменты биоматериалов, покрытых ФРЭС, инкубировали в присутствии клеток HUVEC в среде ЕВМ-2 в течение 24 ч при 37°C. В дальнейшем образцы среды, полученной таким образом, использовали в пролиферативном тесте клеток HUVEC. Параллельно с экспериментальными пробами, полученными при инкубации покрытого ФРЭС матрикса, готовили образцы контрольной среды, полученной при инкубации исходного немодифицированного коллагена в среде ЕВМ-2. Полученные среды добавляли в культивируемые клетки HUVEC и определяли их пролиферативную активность в ответ на присутствующий в средах ФРЭС.

Биологическую активность очищенного белка ФРЭС определяли по его способности поддерживать пролиферацию клеток эндотелия человека HUVEC. Эндотелиальные клетки засеивались в лунки 96-луночного планшета (2000 клеток/лунку) в базальной среде ЕВМ-2 (Lonza, Швейцария) для их роста. После прикрепления клеток (через 4 ч) добавляли белок ФРЭС в концентрации от 1 до 100 нг/мл. Количество клеток определяли через 96 ч.

Для учета количества жизнеспособных клеток HUVEC в зависимости от биологической активности ФРЭС использовали набор CellTiter 96® AQueous Cell Proliferation Assay (Promega, США).

К исследуемым образцам и контрольным лункам добавляли по 20 мкл реагента MTS (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-сульфофенил)-2Н-тетразолий), через 3 ч определяли оптическую плотность в лунках с помощью прибора Multiscan EX (Labsystems, США).

На втором этапе проводили исследования разработанного материала *in vivo*, анализировали: 1) влияние имплантированного материала на течение послеоперационного периода (биосовместимость); 2) влияние материала на развитие сосудов в периимплантационной зоне при внутримышечной имплантации у кроликов (неоангиогенез).

Для проведения эксперимента использовали 40 кроликов породы шиншилла массой 2–3 кг, которые были разделены на две группы по 20 животных — опытную и контрольную. В качестве имплантируемого материала применяли блоки недеминерализованного коллагена размером 5x5x5 мм, для опытной группы — насыщенные ФРЭС, для контрольной группы — ненасыщенные. При проведении исследования неукоснительно соблюдались этические принципы, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.).

Всех животных оперировали под наркозом путем внутримышечной инъекции 4 мл раствора Золетила-100 (Франция). После введения в наркоз и проведения местной анестезии (Лидокаин 1%, 2 мл) выполняли продольный линейный разрез в области верхней трети бедра с рассечением мышц. Затем в толще мышц размещали исследуемые блоки. Рану послойно ушивали узловыми швами (Vicryl, 5.0).

В послеоперационном периоде в сроки 6 ч, 48 ч, 2 нед, 1 и 2 мес по 4 животных из каждой группы выводили из эксперимента. Иссекали фрагмент мышцы с имплантированным блоком и отправляли материал на гистоморфологическое исследование. Данное исследование проводилось на кафедре патологической анатомии НижГМА (Н. Новгород).

Результаты и обсуждение. При анализе влияния материалов, полученных с применением различных методов конъюгации, на пролиферацию клеток L929 и HUVEC получены следующие значения ИП (табл. 1, 2).

Данные экспериментов позволяют сделать вывод, что наименее токсичным в условиях *in vitro* для моделей на основе потенциальных клеток-мишеней, которые наиболее вероятно служат основными клеточными элементами в участке регенерации тканей, является биоматериал, полученный с применением кросс-сшивок недеминерализованного костного коллагена и ФРЭС с использованием NHS-аминореактивного эфира. Именно эта методика получения биоматериалов применялась в дальнейшем для наработки материала при проведении опытов *in vivo* [17].

При изучении влияния костного коллагена, насыщенного ФРЭС, на культуру клеток HUVEC с использованием стандартного теста для оценки пролиферативной активности (Cell Titer 96: Aqueous Cell Rvo Promega) за

Таблица 1

Значения ИП клеток L929 для различных биоматериалов

Материал	ИП, %
Костный коллаген	72
Костный коллаген + ФРЭС (глутаровый альдегид)	32
Костный коллаген + ФРЭС (NHS-аминореактивный эфир)	64
Костный коллаген + ФРЭС (водорастворимый карбодиамидный крослинкерный реагент ЭДАК)	47

Таблица 2

Значения ИП клеток HUVEC для различных биоматериалов

Материал	ИП, %
Костный коллаген (негативный контроль)	11
Костный коллаген + ФРЭС (позитивный контроль)	63
Костный коллаген + ФРЭС (глутаровый альдегид)	24
Костный коллаген + ФРЭС (NHS-аминореактивный эфир)	37
Костный коллаген + ФРЭС (водорастворимый карбодиамидный крослинкерный реагент ЭДАК)	33

100% ответа принимали значение оптической плотности после остановки реакции в лунках планшета, содержащих 50 нг/мл контрольного рекомбинантного ФРЭС с известной ED_{50} , равной 2,3 нг/мл.

Среды, полученные в ходе инкубации с препаратами костного коллагена, покрытого ФРЭС, проявляли биологическую активность, свойственную образцам чистого ФРЭС, что нашло отражение в пролиферации ФРЭС-зависимых клеток HUVEC. Аналогичные результаты наблюдались в работе [18].

Таким образом, можно говорить о наличии у недеминерализованного коллагена, насыщенного ФРЭС по разработанной методике, проангиогенной активности *in vitro* в рамках традиционных моделей.

В эксперименте установлено, что ранние сроки эксперимента (6 и 48 ч) характеризуются одинаковыми тканевыми изменениями в окружающей имплантат мышечной ткани. Регенераторные изменения в обеих группах минимальны, а имплантат проявляет структурную стабильность как в контроле, так и у животных с использованием ФРЭС.

Через 2 нед эксперимента воспалительные явления в области имплантированного материала меняют свой характер, переходя из фазы экссудативного воспаления в фазу пролиферативного. Однако у животных контрольной группы в зоне контакта «имплантат–мышца» еще сохраняется зона демаркационного воспаления с преобладанием в инфильтрате нейтрофильных лейкоцитов. У животных опытной группы имплантат начинает подвергаться резорбции путем гладкого и пазушного рассасывания (рис. 2), при этом формируются множественные очаги грануляционной ткани, содержащей большое количество кровеносных сосудов капиллярного типа с тонкой стенкой (рис. 3). На периферии этих очагов появляются фокусы созревания грануляций с формированием зрелой соединительной ткани, расту-

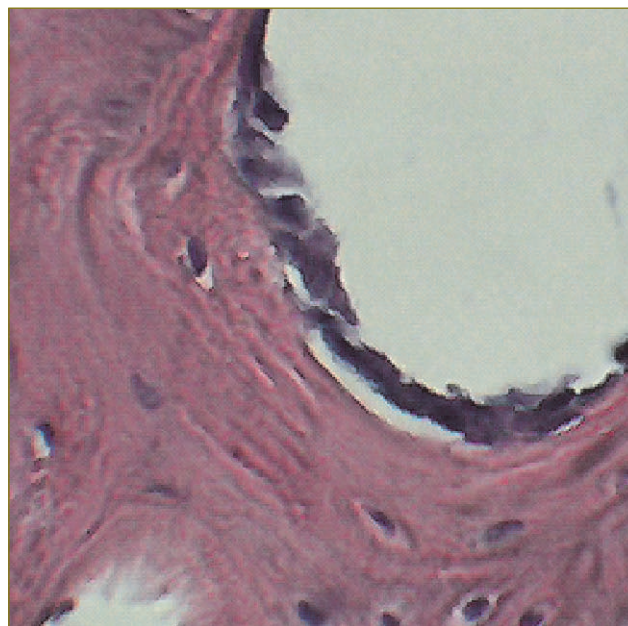


Рис. 2. Зоны рассасывания имплантата через 2 нед эксперимента у животных опытной группы (гематоксилин-эозин; ок. $\times 15$, об. $\times 40$)

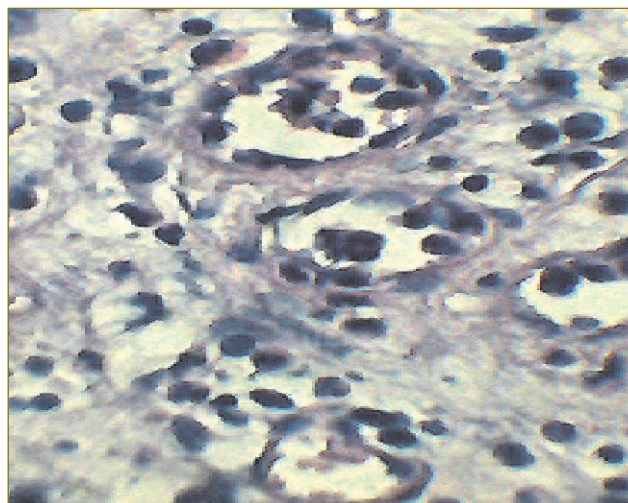


Рис. 3. Грануляционная ткань, содержащая большое количество кровеносных сосудов капиллярного типа, в периферических зонах имплантата на границе с мышечной тканью (гематоксилин-эозин; ок. $\times 15$, об. $\times 40$)

щей из периферических зон со стороны фиброзно-мышечной ткани, окружающей имплантат (рис. 4).

Данные морфометрического изучения соотношений тканевых структур имплантата (табл. 3) показывают, что рост соединительной ткани происходит более быстро у животных с использованием ФРЭС, однако на этом этапе различия статистически не значимы ($p \geq 0,05$). Попутно на границе костной и окружающей фиброзно-мышечной ткани у животных обеих групп появляются гигантские многоядерные клетки, выполняющие, по видимому, макрофагальную функцию.

Гистологическое изучение имплантата и тканей, его окружающих, через 1 мес эксперимента у контрольных

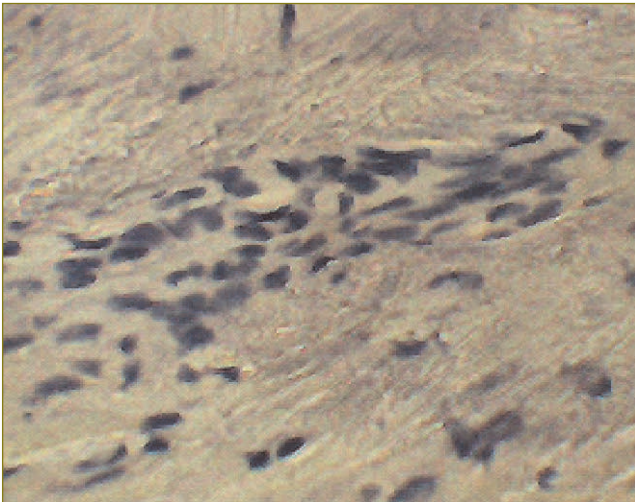


Рис. 4. Вростание соединительной ткани в имплантат у животных опытной группы через 2 нед эксперимента (гематоксилин-эозин; ок. $\times 15$, об. $\times 40$)

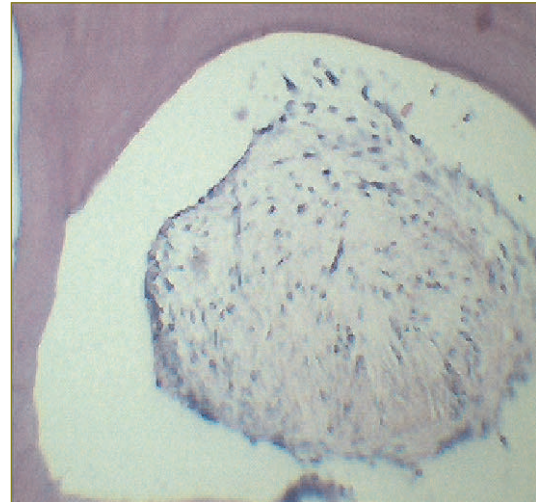


Рис. 5. Вростание соединительной ткани, бедной кровеносными сосудами, в лакуны имплантата животных контрольной группы через 1 мес эксперимента (гематоксилин-эозин; ок. $\times 15$, об. $\times 40$)

Таблица 3

Тканевые соотношения в имплантате через 2 нед эксперимента, %

Группы	Некроз	Ткань имплантата	Лакуны имплантата	Грануляционная ткань	Соединительная ткань
Контрольная (n=20)	0	33,6 \pm 7,1	37,6 \pm 4,2	11,1 \pm 1,3	15,1 \pm 3,3
Опытная (n=20)	0	24,8 \pm 3,9	20,9 \pm 6,5	30,9 \pm 7,5*	24,6 \pm 8,6

* — статистически значимая разница значений с контрольной группой, $p \leq 0,001$.

животных показало, что ткань имплантата лизирована остеокластами на больших участках, лакуны расширены, в них врастает соединительная ткань (рис. 5). У животных опытной группы имплантат представляет собой отдельные островки, не связанные друг с другом, разделенные прослойками новообразованной соединительной ткани, которая характеризуется наличием нежных волокнистых структур, расположенных без определенной ориентации, и содержит большое количество кровеносных сосудов (рис. 6).

Грануляционная ткань присутствует у животных обеих групп, однако занимаемая ею площадь у кроликов в опытной группе статистически значимо ниже, чем в контрольной.

Гистологические исследования зоны имплантации через 2 мес после проведения операции у кроликов опытной группы показали, что имплантат в препаратах не определяется, вся его площадь замещена зрелой волокнистой соединительной тканью, тогда как в контроле даже в эти сроки обнаруживаются единичные островки имплантата, подвергающиеся макрофагальной резорбции (табл. 4).

К концу 2-го месяца эксперимента площадь грануляционной ткани уменьшается, что особенно видно в группе контроля, где имплантат заместился зрелой во-

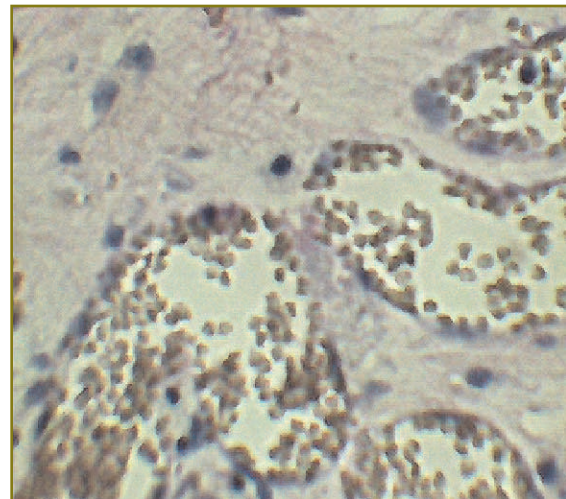


Рис. 6. Соединительная ткань заполняет лакуны имплантата животных опытной группы через 1 мес эксперимента (гематоксилин-эозин; ок. $\times 15$, об. $\times 40$)

Таблица 4

Тканевые соотношения в имплантате через 2 мес эксперимента

Группы	Ткань имплантата	Грануляционная ткань	Соединительная ткань
Контрольная (n=20)	2,2 \pm 0,1	25,6 \pm 5,7	69,1 \pm 5,3
Опытная (n=20)	0	5,3 \pm 1,6*	92,6 \pm 7,1

* — статистически значимая разница значений с сравнением с контрольной группой, $p \leq 0,001$.

локнистой тканью, содержащей большое количество кровеносных сосудов зрелого типа (рис. 7).

С целью выяснения причин достоверно более быстрого хода регенераторного процесса в основной группе животных проведен морфометрический анализ площа-

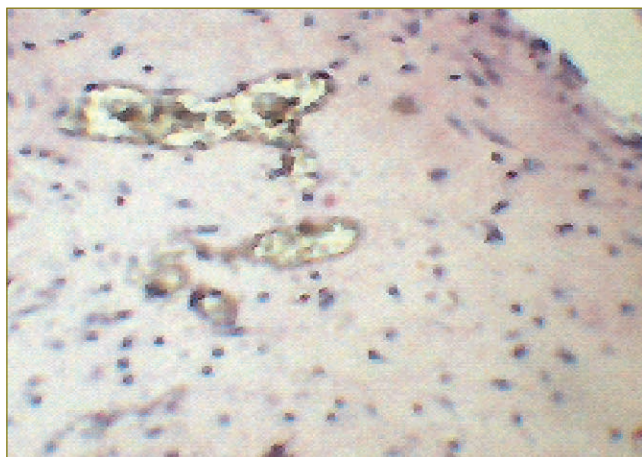


Рис. 7. Разрастание зрелой соединительной ткани с наличием в ней кровеносных сосудов в контрольной группе (гематоксилин-эозин; ок. $\times 15$, об. $\times 20$)

Таблица 5

Площадь кровеносного русла и средняя толщина стенки кровеносных сосудов в разные сроки эксперимента, мкм

Срок эксперимента	Группы	
	Контрольная (n=20)	Опытная (n=20)
Площадь первого русла		
48 ч	0	5,2 \pm 1,1
2 нед	10,2 \pm 0,6	34,5 \pm 4,1*
1 мес	34,6 \pm 3,8	156,8 \pm 14,7**
2 мес	37,3 \pm 6,6	124,3 \pm 9,0**
Средняя толщина стенки		
48 ч	0	2,2 \pm 0,1
2 нед	2,2 \pm 0,6	2,5 \pm 0,3
1 мес	3,6 \pm 0,8	6,8 \pm 0,7**
2 мес	4,3 \pm 1,6	8,3 \pm 1,0*

* — статистически значимая разница значений с контрольной группой, $p \leq 0,05$; ** — $p \leq 0,001$.

ди кровеносного русла в зоне регенерации, поскольку процесс регенерации должен быть обеспечен полноценной доставкой к тканям кислорода и питательных веществ. Известно, что в грануляционной ткани присутствует большое количество тонкостенных кровеносных сосудов капиллярного типа, тогда как в зрелой соединительной ткани определяются сосуды с наличием полноценно сформированной стенки. Полученные нами данные (табл. 5) свидетельствуют о выраженной ангиогенной активности имплантированного материала. Строение сосудов в срок 2 нед характеризует их как незрелые (тонкая стенка), что типично для процесса регенерации соединительной ткани в эти сроки и соответствует данным других авторов [19–21].

В эксперименте установлено, что в зоне имплантата прогрессивно нарастает площадь микроциркуляторного русла — это особенно выражено в основной группе, где максимальная площадь кровеносного русла наблюдается в срок 1 мес. В этот срок объем грануляционной ткани также является максимальным. В последующие сроки площадь кровеносных сосудов несколько снижается, оставаясь, однако, статистически значимо выше,

чем в контрольной группе животных. Это связано с процессом созревания грануляционной ткани и трансформацией ее в зрелую фиброзную ткань, в которой определяются зрелые кровеносные сосуды, обеспечивающие адекватное питание ткани.

Кровеносные сосуды регенерата животных опытной группы через 2 мес эксперимента имеют стенку максимальной толщины — 8,3 \pm 1,0 мкм, т.е. соответствуют толщине стенки зрелого кровеносного сосуда (см. табл. 5).

Полученные данные свидетельствуют о том, что имплантат из недеминерализованного коллагена, обработанный ФРЭС, быстрее рассасывается, являясь матрицей для образования фиброзной ткани, формирование которой происходит в более ранние сроки за счет стимуляции роста кровеносных сосудов микроциркуляторного русла.

Менее выраженные тканевые показатели воспаления у опытных животных в отличие от контрольных позволяют предположить наличие противовоспалительного действия у ФРЭС. Подобные данные получены и иностранными авторами [15, 16, 18].

Заключение. Разработанный новый биокомпозиционный материал для замещения костных дефектов на основе костного недеминерализованного коллагена и фактора роста эндотелия сосудов обладает способностью индуцировать эндотелиальные клетки человека и неангиогенез. Он является нетоксичным, биосовместимым и хорошо интегрирует в окружающие ткани при имплантации.

Литература

1. Аснина С.А., Агапов В.С., Воложин А.И., Белозеров М.Н., Мазур Л.Г., Малько Е.В. Анализ ближайших и отдаленных результатов применения остеопластических материалов гидроксиапол и колапол в поликлинической хирургической практике. В кн.: Юбилейный список работ, посвященный 60-летию кафедры госпитальной хирургической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии. М: ММСИ; 1998; с. 25–27.
2. Белозеров М.Н. Оценка остеопластических свойств различных биокомпозиционных материалов для заполнения дефектов челюстей. Дис. ... канд. мед. наук. М; 2004; 146 с.
3. Иванов С.Ю., Панин А.М., Володина Д.Н. Разработка биоматериалов для остеопластики на основе коллагена костной ткани. Клиническая стоматология 2005; 4: 108–111.
4. Ямуркова Н.Ф., Иванов С.Ю., Мураев А.А., Бородин Н.Н., Янцен И.Е. Комплексный подход к хирургическому лечению пациентов с атрофией альвеолярного отростка верхней челюсти и альвеолярной части нижней челюсти. Российский вестник дентальной имплантологии 2010; 2(22): 61–65.
5. Германов В.Г., Кавалерский Г.М., Чернашина З.А., Семенов В.А. Костно-пластическая хирургия: от костного трансплантата до современных биокомпозиционных материалов. Медицинская помощь 2006; 4: 16–18.
6. Кирилова Н.А., Фомичев Н.Г., Подорожная В.Т., Трубников В.И. Новые виды материалов для костной пластики в свете современных представлений о костных трансплантатах. Хирургия позвоночника 2007; 2: 66–70.
7. Володина Д.Н., Панин А.М., Ларионов Е.В., Автандилов Г.Г. Морфологические исследования биосовместимости материала для замещения костных дефектов челюстных костей на основе костного коллагена, насыщенного сульфатированными гликозаминогликанами. Стоматология 2008; 3(87): 9–12.
8. Трунин Д.А., Волова Л.Т., Безубов А.Е., Кириллова В.П., Белозерцева Е.А. Особенности регенерации костной ткани при

использовании различных остеопластических материалов в эксперименте. *Стоматология* 2008; 5(87): 4–8.

9. Иванов С.Ю., Зайцев А.Б., Ямуркова Н.Ф., Мигура С.А., Губова М.М., Янцен И.Е., Мураев А.А. Экспериментальное исследование особенностей регенерации костных дефектов, заполненных биоматериалом из недеминерализованного коллагена Остеопласт-К с использованием и без использования коллагеновой мембраны Остеопласт. *Российский вестник дентальной имплантологии* 2010; 2(22): 66–71.

10. Иванов С.Ю., Зайцев А.Б., Ямуркова Н.Ф., Мигура С.А., Губова В.М., Янцен И.Е., Акулов М.М., Мураев А.А. Исследование барьерной функции коллагеновой мембраны «Остеопласт» при заживлении костных дефектов в эксперименте. *Соврем технол мед* 2011; 3: 35–38.

11. Зефирова А.Л., Халиуллина Р.Р., Анучин А.А., Яковлев А.В. Влияние эндогенного оксида азота на функцию нервно-мышечного синапса. *Росс физиол журн им И.М. Сеченова* 2001; 4: 499–506.

12. Каменский А.А., Савельева К.В. Оксид азота и поведение. М: Изд-во НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН; 2002; 156 с.

13. Смешко Н.В. Разработка биокomпозиционного материала, содержащего L-аргинин, для замещения костных дефектов при хирургических стоматологических вмешательствах. Дис. ... канд. мед. наук. М; 2009; 127 с.

14. Gerber H.P., Vu T.H., Ryan A.M., Kowalski J., Werb Z., Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999; 5: 623–628.

15. Zelzer E., McLean W., Ng Y.S., Fukai N., Reginato A.M., Lovejoy S., D'Amore P.A., Olsen B.R. Skeletal defects in VEGF (120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 2002; 129: 1893–1904.

16. Maes C., Carmeliet P., Moermans K., Stockmans I., Smets N., Collen D., Bouillon R., Carmeliet G. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech Dev* 2004; 111: 61–73.

17. Иванов С.Ю., Мураев А.А., Рябова В.М., Солодкин В.Г., Володина Е.В., Кибардин А.В. Блок композиционного материала для костной тканевой инженерии на основе костного недеминерализованного коллагена, содержащего фактор роста эндотелия сосудов. Заявка на патент, вх. №050959, рег. №2011134417 от 17.08.2011 г.

18. Wernike E., Hofstetter W., Liu Y., Wu G., Sebald H.J., Wismeijer D., Hunziker E.B., Siebenrock K.A., Klenke F.M. Long-term cell-mediated protein release from calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res A* 2010; 92: 463–474.

19. Komatsu D.E., Hadjiargyrou M. Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes, VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair. *Bone* 2004; 34: 680–688.

20. Uchida S., Sakai A., Kudo H., Otomo H., Watanuki M., Tanaka M., Nagashima M., Nakamura T. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone* 2003; 32: 491–501.

21. Kleinheinz J., Stratmann U., Joos U., Wiesmann H.P. VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 1310–1316.

References

1. Asnina S.A., Agapov V.S., Volozhin A.I., Belozherov M.N., Mazur L.G., Mal'ko E.V. *Yubileyny spisok rabot, posvyashchenny 60-letiyu kafedry gosital'noy khirurgicheskoy stomatologii i chelyustno-litsevoy khirurgii* [Festschrift devoted to the 60th anniversary of the Department of Hospital Surgical Dentistry and Maxillo-Facial Surgery]. Moscow: MMSI; 1998; p. 25–27.

2. Belozherov M.N. *Otsenka osteoplasticheskikh svoystv razlichnykh biokompozitsionnykh materialov dlya zapolneniya defektov chelyustey*. Dis. ... kand. med. nauk [The assessment of osteoplastic properties of various biocomposite materials to fill jaw defects. Abstract

of Dissertation for the degree of Candidate of Medical Science]. Moscow; 2004; 146 p.

3. Ivanov S.Yu., Panin A.M., Volodina D.N. *Klinicheskaya stomatologiya — Clinical Stomatology* 2005; 4: 108–111.

4. Yamurkova N.F., Ivanov S.Yu., Muravov A.A., Borodin N.N., Yantsen I.E. *Rossiyskiy vestnik dental'noy implantologii — Russian Reporter of Dental Implantology* 2010; 2(22): 61–65.

5. Germanov V.G., Kavalerskiy G.M., Chernashina Z.A., Semenov V.A. *Meditsinskaya pomoshch' — Health Care* 2006; 4: 16–18.

6. Kirilova N.A., Fomichev N.G., Podorozhnaya V.T., Trubnikov V.I. *Hir Pozvonoc — Spinal Surgery* 2007; 2: 66–70.

7. Volodina D.N., Panin A.M., Larionov E.V., Avtandilov G.G. *Stomatologiya — Dentistry* 2008; 3(87): 9–12.

8. Trunin D.A., Volova L.T., Bezzubov A.E., Kirillova V.P., Belozertseva E.A. *Stomatologiya — Dentistry* 2008; 5(87): 4–8.

9. Ivanov S.Yu., Zaitsev A.B., Yamurkova N.F., Migura S.A., Gubova M.M., Yantsen I.E., Muravov A.A. *Ross Vestn Dent Implantol — Russian Reporter of Dental Implantology* 2010; 2(22): 66–71.

10. Ivanov S.Yu., Zaytsev A.B., Yamurkova N.F., Migura S.A., Gubova V.M., Yantsen I.E., Akulov M.M., Muravov A.A. *Sovrem Tehnol Med — Modern Technologies in Medicine* 2011; 3: 35–38.

11. Zefirov A.L., Khaliullina R.R., Anuchin A.A., Yakovlev A.V. *Rossiyskiy fiziologicheskii zhurnal im. I.M. Sechenova — Russian Physiological Journal named after I.M. Sechenov* 2001; 4: 499–506.

12. Kamenskiy A.A., Savel'eva K.V. *Oksid azota i povedenie* [Nitrogen oxide and behaviour]. Moscow: Izd-vo NTsSSKh im. A.N. Bakuleva RAMN; 2002; 156 p.

13. Smeshko N.V. *Razrabotka biokompozitsionnogo materiala, soderzhashchego L-arginin, dlya zameshcheniya kostnykh defektov pri khirurgicheskikh stomatologicheskikh vmeshatel'stvakh*. Dis. ... kand. med. nauk [Development of biocomposite material containing L-arginine for replacing bone defects in surgical dental interventions. Abstract of Dissertation for the degree of Candidate of Medical Science]. Moscow; 2009; 127 p.

14. Gerber H.P., Vu T.H., Ryan A.M., Kowalski J., Werb Z., Ferrara N. VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat Med* 1999; 5: 623–628.

15. Zelzer E., McLean W., Ng Y.S., Fukai N., Reginato A.M., Lovejoy S., D'Amore P.A., Olsen B.R. Skeletal defects in VEGF(120/120) mice reveal multiple roles for VEGF in skeletogenesis. *Development* 2002; 129: 1893–1904.

16. Maes C., Carmeliet P., Moermans K., Stockmans I., Smets N., Collen D., Bouillon R., Carmeliet G. Impaired angiogenesis and endochondral bone formation in mice lacking the vascular endothelial growth factor isoforms VEGF164 and VEGF188. *Mech Dev* 2004; 111: 61–73.

17. Ivanov S.Yu., Muravov A.A., Ryabova V.M., Solodkin V.G., Volodina E.V., Kibardin A.V. *Blok kompozitsionnogo materiala dlya kostnoy tkanevoy inzhenerii na osnove kostnogo nedemineralizovannogo kollagena, soderzhashchego faktor rosta endoteliiya sosudov* [Block of composite material for bone tissue engineering based on bone non-demineralized collagen containing vascular endothelial growth factor]. *Zayavka na patent, vkh. No.050959, reg. No.2011134417*. 17.08.2011.

18. Wernike E., Hofstetter W., Liu Y., Wu G., Sebald H.J., Wismeijer D., Hunziker E.B., Siebenrock K.A., Klenke F.M. Long-term cell-mediated protein release from calcium phosphate ceramics. *J Biomed Mater Res A* 2010; 92: 463–474.

19. Komatsu D.E., Hadjiargyrou M. Activation of the transcription factor HIF-1 and its target genes, VEGF, HO-1, iNOS, during fracture repair. *Bone* 2004; 34: 680–688.

20. Uchida S., Sakai A., Kudo H., Otomo H., Watanuki M., Tanaka M., Nagashima M., Nakamura T. Vascular endothelial growth factor is expressed along with its receptors during the healing process of bone and bone marrow after drill-hole injury in rats. *Bone* 2003; 32: 491–501.

21. Kleinheinz J., Stratmann U., Joos U., Wiesmann H.P. VEGF-activated angiogenesis during bone regeneration. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 1310–1316.