

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ *IN VIVO* И *IN VITRO* КОСТНО-ПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ КОМПОЗИЦИИ ГИДРОКСИАПАТИТА, ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА И АЛЬГИНАТА НАТРИЯ

УДК 616.311.001.6–089.844:615.466

Поступила 01.11.2013 г.



Ю.В. Гажва, аспирант кафедры челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ¹;
 А.П. Бонарцев, к.б.н., ведущий научный сотрудник кафедры биоинженерии²;
 Р.Ф. Мухаметшин, аспирант кафедры челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ¹;
 И.И. Жаркова, аспирант кафедры биоинженерии³;
 Н.В. Андреева, соискатель кафедры биоинженерии²;
 Т.К. Махина, научный сотрудник лаборатории азотфиксации микроорганизмов²;
 В.Л. Мышкина, к.б.н., научный сотрудник лаборатории азотфиксации микроорганизмов²;
 А.Е. Беспалова, студент³;
 А.Л. Зернов, аспирант лаборатории азотфиксации микроорганизмов²;
 В.М. Рябова, к.м.н., ассистент кафедры челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ¹;
 Э.В. Иванова, студент³;
 Г.А. Бонарцева, к.б.н., старший научный сотрудник²;
 А.А. Миронов, к.б.н., доцент кафедры физиологии и биохимии человека и животных⁴;
 старший научный сотрудник отдела нейрофизиологии и экспериментального моделирования ЦНИЛ НИИ ПФМ¹;
 К.В. Шайтан, д.ф.-м.н., профессор, зам. зав. кафедрой биоинженерии³;
 А.В. Волков, старший научный сотрудник отдела общей патологии⁵;
 А.А. Мураев, к.м.н., доцент кафедры челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ¹;
 С.Ю. Иванов, д.м.н., профессор, зав. кафедрой челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ¹

¹Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603000, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

²Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН, Москва, 119071, Ленинский проспект, 33, стр. 2;

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991, ГСП-1, Ленинские горы;

⁴Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского — Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

⁵Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 119991, ул. Тимура Фрунзе, 16

Цель исследования — разработка нового синтетического материала на основе поли-3-оксибутирата, альгината натрия и гидроксиапатита в виде пасты и исследование *in vitro* и *in vivo* его эффективности при восстановлении костных дефектов.

Материалы и методы. Для разработки пасты использовали поли-3-оксибутират (ПОБ), полученный микробиологическим путем, с молекулярной массой 52 кДа, гидроксиапатит (ГАП) и альгинат натрия (Sigma-Aldrich, Германия).

Результаты. При сравнительном изучении результатов имплантации ГАП–ПОБ и ксеногенного костного недеминерализованного коллагена с перекрытием дефекта мембраной ПОБ выявлено, что к 180-м суткам наблюдения критический костный дефект полностью зажил в группе с имплантацией ГАП–ПОБ. Несмотря на то, что образование кортикальной пластинки происходит и в группе с имплантацией ксеногенного костного недеминерализованного коллагена, хроническое продуктивное воспаление приводит к разрежению костной ткани и формированию фиброза в межбалочном пространстве, что может негативно отразиться на механических свойствах кости.

Заключение. Полученный биоматериал на основе композитных микрочастиц из ПОБ и ГАП в альгинатном геле можно использовать в качестве наполнителя при устранении дефектов костной ткани, так как в его структуре сочетаются элементы твердой подложки и вещество, способное поддерживать оптимальное микроокружение для клеточной культуры.

Ключевые слова: костно-пластический материал; гидроксиапатит; поли-3-оксибутират.

Для контактов: Гажва Юлия Владимировна, тел. моб. +7 910-797-51-75; e-mail: gzhva@yandex.ru

English

***In vivo* and *in vitro* Development and Study of Osteoplastic Material Based on Hydroxyapatite, Poly-3-Hydroxybutyrate and Sodium Alginate Composition**

J.V. Gazhva, Postgraduate, the Department of Maxillofacial Surgery and Implantology, the Faculty of Doctors' Advanced Training¹;

A.P. Bonartsev, PhD, Leading Research Worker, the Department of Bioengineering²;

R.F. Mukhametshin, Postgraduate, the Department of Maxillofacial Surgery and Implantology, the Faculty of Doctors' Advanced Training¹;

I.I. Zharkova, Postgraduate, the Department of Bioengineering³;

N.V. Andreeva, Applicant for a Degree, the Department of Bioengineering²;

T.K. Makhina, Research Worker, the Laboratory of Microorganism Nitrogen Fixation²;

V.L. Myshkina, PhD, Research Worker, the Laboratory of Microorganism Nitrogen Fixation²;

A.E. Bespalova, Student³;

A.L. Zernov, Postgraduate, the Laboratory of Microorganism Nitrogen Fixation²;

V.M. Ryabova, PhD, Tutor, the Department of Maxillofacial Surgery and Implantology, the Faculty of Doctors' Advanced Training¹;

E.V. Ivanova, Student³;

G.A. Bonartseva, PhD, Senior Research Worker²;

A.A. Mironov, PhD, Associate Professor, the Department of Human and Animal Physiology and Biochemistry⁴; Senior Research Worker, Neurophysiology and Experimental Modeling Unit, Central Scientific Research Laboratory of Scientific Research Institute of Applied and Fundamental Medicine¹;

K.V. Shaitan, D.Phys.-Math.Sc., Professor, Deputy Head of the Department of Bioengineering³;

A.V. Volkov, Senior Research Worker, General Pathology Department⁵;

A.A. Muraev, PhD, Associate Professor, the Department of Maxillofacial Surgery and Implantology, the Faculty of Doctors' Advanced Training¹;

S.Y. Ivanov, D.Med.Sc., Professor, Head of the Department of Maxillofacial Surgery and Implantology, the Faculty of Doctors' Advanced Training¹

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603000;

²A.N. Bach Institute of Biochemistry Russian Academy of Sciences, Leninsky prospekt, 33, build. 2, Moscow, Russian Federation, 119071;

³Lomonosov Moscow State University, GSP-1, Leninskie Gory, Moscow, Russian Federation, 119991;

⁴Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod — National Research University, Prospekt Gagarina, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950;

⁵Central Research Institute of Dental and Maxillofacial Surgery, Ministry of Health of the Russian Federation, Timura Frunze St., 16, Moscow, Russian Federation, 119991

The aim of the investigation was to develop a new synthetic material based on poly-3-hydroxybutyrate, sodium alginate and hydroxyapatite in the form of a paste and study *in vitro* and *in vivo* its efficiency when repairing bone defects.

Materials and Methods. For a paste we used poly-3-hydroxybutyrate (PHB) developed microbiologically, with molecular weight of 52 kDa, hydroxyapatite (HAP) and sodium alginate (Sigma-Aldrich, Germany).

Results. A comparative study of implantation results of HAP-PHB and xenogeneic osseous non-demineralized collagen with a defect covered by PHB membrane showed that by day 180 critical bone defect healed completely in a group with HAP-PHB implantation. Despite the fact that cortical plate formed in a group of patients with implantation of xenogeneic osseous non-demineralized collagen, chronic productive inflammation results in osseous tissue rarefaction and fibrosis formation in interjoints that can have a negative effect on mechanical properties of the bone.

Conclusion. The obtained biomaterial based on composite microparticles from PHB and HAP in alginate gel can be used as a filling agent to correct bone tissue defects, since in its structure there are combined solid support elements and a substance able to maintain optimal microenvironment for cell culture.

Key words: osteoplastic material; hydroxyapatite; poly-3-hydroxybutyrate.

Несмотря на достигнутые успехи в области биоинженерии костной ткани, разработка и внедрение в клиническую практику новых видов костно-пластических материалов остается актуальной темой. Большая часть

osteoplastic materials имеют ксено- и аллогенное происхождение и обладают остеокондуктивным и, в некоторых случаях, остеоиндуктивным действием. Несмотря на высокую степень очистки, материалы жи-

вотного происхождения могут вызывать ответ иммунной системы организма, а также служить источником переноса инфекции.

Синтетические материалы — это различные композиты, керамика и цементы на основе синтетического гидроксиапатита кальция, сульфата кальция и их комбинации [1]. Такие материалы также обладают остеокондуктивными свойствами. Однако имеются предположения о наличии остеоиндуктивных свойств у наноразмерных частиц гидроксиапатита кальция [2, 3].

Установлено, что форма материала тоже имеет значение при его клиническом использовании. Заполнение дефектов челюстных костей сложной формы с поднутрениями (полости кист, лунки удаленных зубов, полость верхнечелюстного синуса при синус-лифтинге) остеопластическим материалом в виде порошка крайне неудобно, занимает много времени и не всегда позволяет соблюсти равномерность. Поэтому стали появляться костезамещающие материалы в виде пасты или гелей, которые лишены указанных недостатков.

При разработке таких биоматериалов огромное значение имеет выбор не только композиции, но и компонентов оптимального состава и свойств для этой композиции. Интенсивное развитие полимерной биотехнологии позволяет использовать в качестве основных компонентов разрабатываемой системы новые биоразлагаемые и биосовместимые полимеры — поли-3-оксибутират (ПОБ) и альгинат. ПОБ — это биоразлагаемый полиэфир, получаемый биотехнологическим путем [4–7]. Он обладает такими ценными для применения в медицине биологическими свойствами, как биосовместимость [6–8] и способность к биоразложению в живых тканях без образования токсических продуктов [9–11]. В связи с этим ПОБ используется в ходе разработки целого ряда изделий медицинского назначения для герниопластики, стоматологии, кардиохирургии, ортопедии и других областей, что обуславливает его применение для регенерации костной ткани в челюстно-лицевой хирургии [12, 13]. В тканевой инженерии также часто используют гидрогели на основе альгината. Альгинаты — это полисахариды, получаемые из морских водорослей, которые принадлежат к семейству маннуроновой и гиалуриновой кислот и отличаются последовательностью состава. Они способны образовывать нерастворимый гидрогель при добавлении двухвалентных катионов. Благодаря ионным взаимодействиям в альгинатах происходит обратимое гелеобразование. Альгинатные гели также обладают высокой биосовместимостью [14]. Однако при использовании по отдельности названные биоматериалы не всегда удовлетворяют требованиям современных систем для регенерации костной ткани. Поэтому разработка новых синтетических материалов (с оптимальным составом и формой) для замещения и восстановления костных дефектов будет продолжаться.

Цель исследования — разработка нового синтетического материала на основе поли-3-оксибутирата, альгината и гидроксиапатита в виде пасты и исследование *in vitro* и *in vivo* его эффективности при восстановлении костных дефектов.

Задачи исследования: 1) разработать методику получения синтетического костезамещающего материала, содержащего микрочастицы композита гидроксиапатита и поли-3-оксибутирата (ГАП–ПОБ) в альгинатном гидрогеле, в виде пасты; 2) изучить биосовместимость разрабатываемого материала на культуре клеток; 3) исследовать эффективность разрабатываемого материала при регенерации костных дефектов в эксперименте на животных.

Материалы и методы. Для получения пасты в работе использовали поли-3-оксибутират, полученный микробиологическим путем, с молекулярной массой 52 кДа, гидроксиапатит и альгинат натрия (Sigma-Aldrich, Германия).

Биосинтез и выделение ПОБ. Для синтеза полимера использовали штамм-продуценты *Azotobacter chroococcum* 7Б, способные к сверхсинтезу ПОБ (до 80% ПОБ от сухой массы клеток). Для достижения сверхсинтеза поли-3-гидроксибутирата в клетках культуры азотобактера выращивали при 30°C на среде Берка в условиях избыточного содержания источника углерода в среде (г/л): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,4; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ — 0,01; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ — 0,006; цитрат Na — 0,5; $CaCl_2$ — 0,1; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ — 1,05; KH_2PO_4 — 0,2; сахароза — 40. С целью снижения молекулярной массы в культуральную среду был добавлен ацетат натрия в концентрации 12 г/л [4].

Процесс выделения и очистки полимера из биомассы *Azotobacter chroococcum* включал следующие стадии: 1) выделение ПОБ из бактериальной массы экстракцией хлороформом при встряхивании на качалке в течение 12 ч при 37°C; 2) отделение раствора ПОБ от клеточных остатков фильтрованием; 3) выделение ПОБ из раствора хлороформа осаждением изопропиловым спиртом; 4) последующее многократное растворение в хлороформе и осаждение изопропанолом; 5) высушивание при 60°C.

Получение микрочастиц. Микрочастицы с инкапсулированным гидроксиапатитом ГАП–ПОБ получали методом двухэтапного эмульгирования W/O/W: эмульсию гидроксиапатита в 3% растворе полимера (1:5 по массе) постепенно добавляли к 100 мл 1,5% водного раствора поливинилового спирта при перемешивании с помощью верхнеприводной мешалки (R2R 2021, Heidolph, Германия) при 600–800 об./мин. После полного испарения органического растворителя микрокапсулы отделяли центрифугированием (10 мин при 4400 об./мин), а затем 3 раза промывали дистиллированной водой для полного удаления эмульгатора.

Получение пасты. Необходимая форма материала достигалась тщательным эмульгированием микрочастиц в 1% растворе альгината натрия в соотношении 60:40. Во избежание высыхания и, следовательно, изменения количественного состава полученной биополимерной системы, а также ее механических характеристик полученная эмульсия требует герметичной упаковки.

Исследование биосовместимости пасты *in vitro* на культуре клеток. Для оценки биосовместимости пасты *in vitro* выбрана модель данной системы с до-

бавлением в альгинатный золь ионов кальция (CaCl_2) для придания прочности конструкции. В качестве контроля использовали альгинатный гель без полимерных микрочастиц. В эксперименте применяли фибробласты зеленой мартышки линии COS-1 («Биолот», Россия). Клетки культивировали в среде DMEM (Dubecco's Modified Eagle Medium; Invitrogen, США) с повышенным содержанием глюкозы (4,5 г/л), которая включала 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Затем клетки инкубировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO_2 , смена среды производилась ежедневно. По шесть образцов биоматериала размером 5×5 мм помещали в лунки 96-луночного планшета и сверху на каждый образец наносили клеточную суспензию из расчета 4000 клеток на образец. Планшеты инкубировали 2, 5, 7, 9, 12 сут. Фибробласты снимали с подложки раствором трипсина-версена (0,05% трипсин и 0,02% версен в фосфатно-солевом буфере (Serva, Германия) и подсчитывали с помощью камеры Горяева. Биосовместимость полимерных систем оценивали с помощью стандартного теста на выживаемость клеток ХТТ Cell Proliferation Kit (Biological Industries, Израиль). Количество живых клеток определяли по стандартной калибровочной кривой для теста ХТТ [8].

Микроскопия. Первичное изучение свойств микрочастиц и их формы проводили с помощью световой микроскопии. Использовали микроскоп Биомед-1; вар. 2 («Биомед», Россия) с цифровым окуляром MYscore 300M (Webbers, Тайвань). Микрофотографии методами сканирующей электронной микроскопии в электронном и ионном излучениях получены на микроскопе FEI-SMAQUANTA 200 и SMA QUANTA FEG (ООО «Системы для микроскопии и анализа», Россия).

Исследование материала на регенерацию костных дефектов в эксперименте на животных. Исследование включало два этапа. *Первый этап* проводили на 10 половозрелых крысах породы Wistar. Животные содержались в виварии ЦНИЛ НижГМА при 15-часовом световом дне при температуре 22°C. Крысам под внутривенным наркозом (Золетил 5 мг/кг) производили разрез кожи в области бедра, скелетировали бедренную кость, формировали цилиндрический

дефект диаметром 2 мм, заполняли его исследуемым биоматериалом. Рану послойно ушивали. Через 2 нед животных выводили из эксперимента, выделяли фрагмент костной ткани с исследуемой областью, фиксировали в 10% растворе формалина и направляли на гистологическое исследование.

Второй этап проводили на 6 половозрелых минипигах. Животные содержались в виварии Научного центра биомедицинских технологий ФМБА России при 15-часовом световом дне при температуре 22°C. Минипигам под внутривенным наркозом (Золетил 5 мг/кг) и местной анестезией проводили скелетирование тела нижней челюсти справа и слева, трепаном формировали цилиндрические дефекты размерами 10×10×5 мм (всего 4 дефекта). Животным 1-й, опытной, группы (n=3) костный дефект заполняли исследуемым материалом и закрывали мембраной из ПОБ. Раны ушивали. Животным 2-й, контрольной, группы (n=3) в костный дефект помещали крошку ксеногенного костного недеминерализованного коллагена и закрывали мембраной из ПОБ. Рану послойно ушивали. Процесс заживления костного дефекта наблюдали через 1, 3 и 6 мес после операции. Выделенные фрагменты кости (по 4 от каждого животного) фиксировали в 10% растворе формалина и направляли на гистологическое исследование.

Работа проведена в полном соответствии с этическими принципами, установленными 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.), и одобрена Этическим комитетом НижГМА.

Результаты и обсуждение.

Характеристика материала. Разработанная методика позволяет варьировать размеры микрочастиц от единиц до 300–400 мкм. Средний диаметр используемых нами микрочастиц составил 52 ± 11 мкм. Данное значение было выбрано из-за соразмерности с клетками, которые, как предполагается, смогут прикрепляться и расти на микрочастицах как на опорном субстрате.

На фотографии, полученной методом сканирующей электронной микроскопии, видно, что поверхность

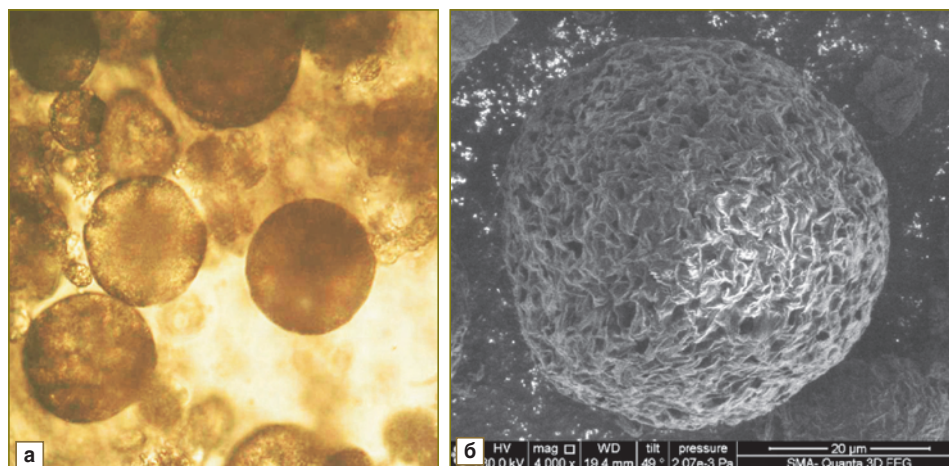


Рис. 1. Микрофотографии композитных частиц ПОБ с ГАП, сделанные с помощью световой микроскопии (а) и сканирующей электронной микроскопии (б); ×4000



Рис. 2. Внешний вид биополимерной пасты

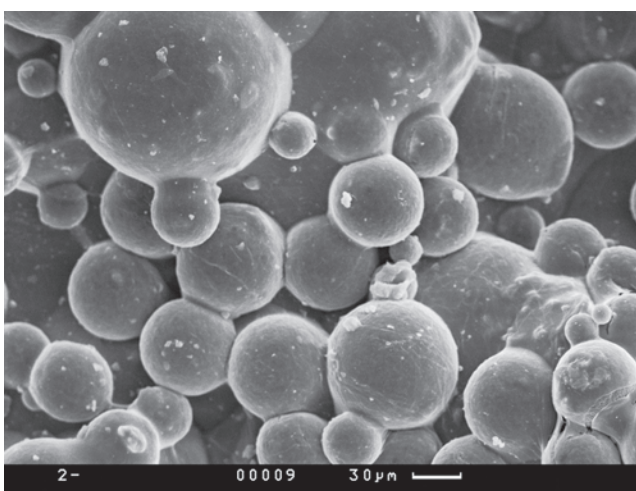


Рис. 3. Биополимерная паста из микрочастиц ГАП–ПОБ в альгинатном геле. Сканирующая электронная микроскопия; $\times 2000$

микрочастиц — высокопористая, состоит из переплетенных полимерных тяжей (рис. 1). Такая шероховатая поверхность, как нами установлено ранее [8], может способствовать прикреплению и росту клеток на поверхности микрочастиц.

Рассматриваемая биополимерная система представляет собой пасту из микрочастиц ПОБ с ГАП в альгинатном золе (рис. 2), которая за счет своей конст-

рукции идеально подходит для заполнения дефектов костной ткани.

На фотографии, сделанной с помощью сканирующей электронной микроскопии (рис. 3), представлено скопление микрочастиц, связанных между собой и погруженных в альгинатный гель. Отчетливо видны кристаллы гидроксиапатита, находящиеся на поверхности микрочастиц. Это очень существенный факт для свойств полученной системы, поскольку данная конструкция должна индуцировать образование костной ткани за счет остеостимулирующих свойств гидроксиапатита, находящегося на поверхности микрочастиц и высвобождающегося в ходе их биодеградации.

Биосовместимость. Из литературных источников (например, [14]) известно, что альгинат натрия является хорошим субстратом для роста клеток. При культивировании культуры в альгинатном геле мы заметили, что количество живых клеток остается примерно на постоянном уровне (рис. 4), что действительно позволяет говорить об альгинате как о хорошей среде для поддержания жизнеспособности клеток, но недостаточной — для их роста и пролиферации. При культивировании клеток на нашей конструкции мы обнаружили, что со временем количество живых клеток в объеме системы начинает увеличиваться — это свидетельствует об улучшении условий для роста клеток. Основным отличием пасты от простого альгинатного геля служит наличие твердых микрочастиц размером 52 ± 11 мкм, т.е. соизмеримых с размером самих клеток (25–35 мкм). Это дает возможность утверждать, что данные частицы обладают хорошей адгезией и клетки используют их как подложку для прикрепления и дальнейшего активного роста. Таким образом, в структуре разработанной биополимерной системы сочетаются элементы твердой подложки и вещества, способное поддерживать оптимальное микроокружение для клеточной культуры.

Результаты исследований *in vivo*. При изучении регенерации костного дефекта бедренной кости крысы выявлено, что имплантация материала ГАП–ПОБ существенно улучшает условия регенерации костной ткани в модели костного дефекта бедренной кости у крысы, материал обладает osteoconductive свойствами, о чем свидетельствует распространение костного регенерата по поверхности полюса материала. Материал не вызывает воспалительной реакции,

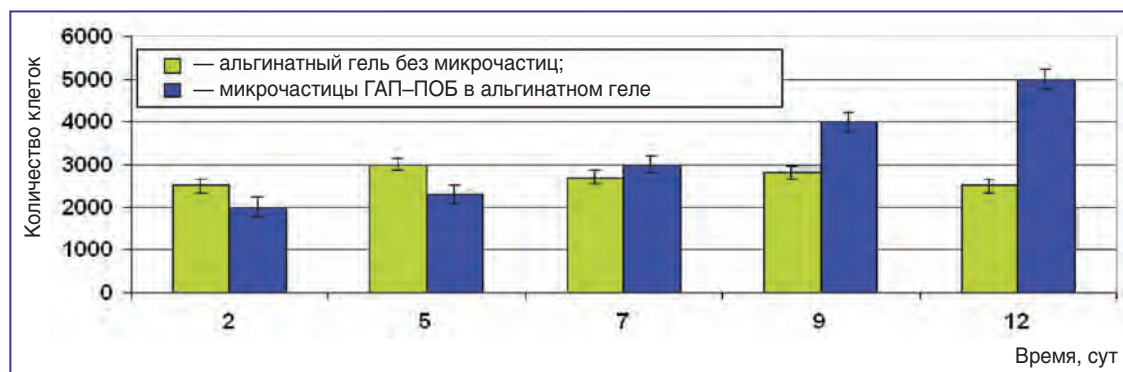


Рис. 4. Рост клеточной культуры COS-1 на полимерных системах

резорбируется с участием гигантских клеток инородных тел, а также не меняет направления распространения фронта регенерации, о чем свидетельствует восстановление анатомической целостности кортикальной пластинки бедренной кости (рис. 5, 6).

В процессе исследования образцов костной ткани на 30, 90 и 180-е сутки при моделировании костной раны нижней челюсти у минипигов диаметром 1 см и заполнении костного дефекта материалом ГАП–ПОБ с перекрытием его мембраной из ПОБ обнаружено, что регенерация костной ткани идет с материнской кости от периферии к центру регенерата. Среди соединительной ткани в центральной части регенерата отмечаются остатки остеопластического материала, вокруг которых располагается недифференцированная соединительная ткань. На 180-е сутки эксперимента кортикальная пластинка все еще содержит округлый воронкообразный дефект, заполненный соединительной тканью. На поверхности костных балок — большое количество остеобластов, практически все активные. На границе фиброзной и костной ткани — очаги ретикулофиброзной костной ткани (рис. 7).

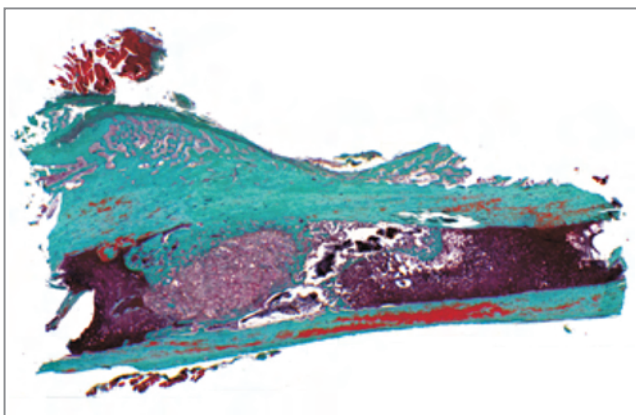


Рис. 5. Гистотопограмма. Костный регенерат через 30 дней после имплантации материала ГАП–ПОБ в костный дефект бедренной кости крысы. Материал в виде конгломерата расположен в костномозговом канале в окружении костной ткани

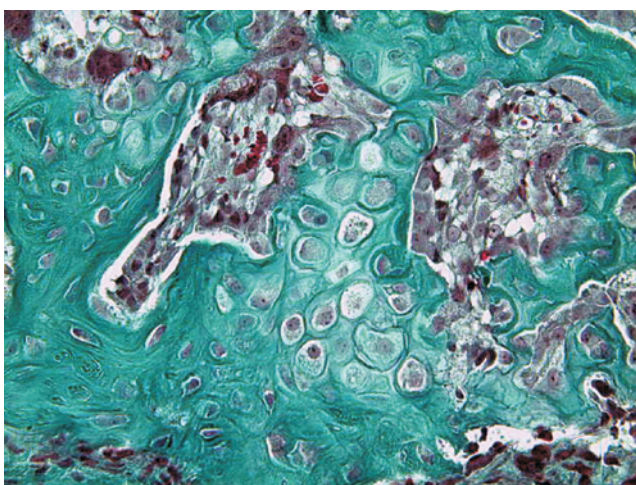


Рис. 6. Образование хондроиды и его созревание. Окраска по Массону–Голднеру; $\times 200$

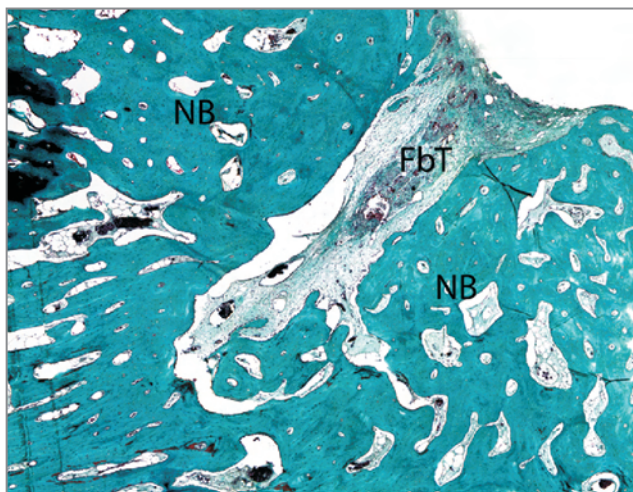


Рис. 7. Гистологическая картина заживающей костной раны после имплантации остеопластического материала ГАП–ПОБ и закрытия мембраной ПОБ через 180 дней. В центральной части — остаточная полость, заполненная фиброзной тканью (FbT). Новообразованная костная ткань (NB) располагается по периферии. Окраска по Массону–Голднеру; $\times 40$

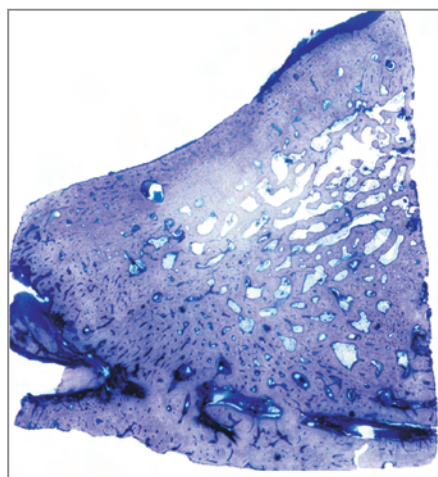


Рис. 8. Завершение процесса образования костной ткани через 90 дней после имплантации остеопластического материала ГАП–ПОБ и закрытия мембраной из ПОБ. Окраска ализариновым синим; $\times 32$

При гистологическом исследовании образцов костной ткани через 180 дней после имплантации в критический дефект кости материала ксеногенного костного недеминерализованного коллагена и закрытия снаружи дефекта мембраной ПОБ обращало на себя внимание, что, несмотря на нормальное формирование кортикальной пластинки, в нижележащих отделах выявляются очаги грубоволокнистой соединительной ткани с разрежением костного вещества, выраженным фиброзом межбалочного пространства, проникающим по ходу костномозгового канала во всех направлениях.

Изучение гистологических препаратов также показало, что применение этого материала приводит к развитию хронического гранулематозного воспаления

сроком как минимум 90 дней после имплантации с образованием на месте очага воспаления зоны фиброза межбалочного пространства к 180-м суткам (рис. 8).

Таким образом, сравнительное изучение результатов имплантации биополимерной системой ГАП–ПОБ и ксеногенным костным недеминерализованным коллагеном с перекрытием дефекта мембраной ПОБ показало, что к 180-м суткам наблюдения критический костный дефект полностью заживает в группе с имплантацией ГАП–ПОБ. Несмотря на то, что образование кортикальной пластинки происходит и в группе с имплантацией ксеногенного костного недеминерализованного коллагена, хроническое продуктивное воспаление приводит к разрежению костной ткани и формированию фиброза в межбалочном пространстве, что может негативно отразиться на механических свойствах кости.

Заключение. Разработанный костно-пластический биоматериал на основе композитных микрочастиц из поли-3-оксибутирата и гидроксиапатита в альгинатном геле можно использовать в качестве наполнителя при устранении дефектов костной ткани, так как в его структуре сочетаются элементы твердой подложки и вещество, способное поддерживать оптимальное микроокружение для клеточной культуры. Этот материал обладает выраженными остеокондуктивными свойствами и при биологической резорбции полностью замещается костной тканью.

Финансирование исследования. Работа проведена на личные средства авторов.

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература

1. Иванов С.Ю., Мухаметшин Р.Ф., Мураев А.А., Бонарцев А.П., Рябова В.М. Синтетические материалы, используемые в стоматологии для замещения дефектов костной ткани. Современные проблемы науки и образования 2013; 1. URL: www.science-education.ru/107-8345.
2. Li B., Liao X., Zheng L., Zhu X., Wang Z., Fan H., Zhang X. Effect of nanostructure on osteoinduction of porous biphasic calcium phosphate ceramics. *Acta Biomater* 2012 Oct; 8(10): 3794–3804, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.021>. Epub 2012 Jun 21.
3. Götz W., Lenz S., Reichert C., Henkel K.O., Bienengraber V., Pernicka L., Gundlach K.K., Gredes T., Gerber T., Gedrange T., Heinemann F. A preliminary study in osteoinduction by a nano-crystalline hydroxyapatite in the mini pig. *Folia Histochem Cytobiol* 2010 Dec; 48(4): 589–596, <http://dx.doi.org/10.2478/v10042-010-0096-x>.
4. Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. Влияние условий культивирования на молекулярную массу поли-3-гидроксибутирата, синтезируемого *Azotobacter chroococcum* 7 Б. Прикладная биохимия и микробиология 2008; 44(5): 533–538.
5. Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Филатова Е.В., Ружицкий А.О., Бонарцева Г.А. Биосинтез сополимера поли-3-гидроксибутирата-3-гидроксиалевалерата штаммом *Azotobacter chroococcum* 7 Б. Прикладная биохимия и микробиология 2010; 46(3): 1–8.
6. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Boskhomdzhiiev A.P., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Makhina T.K., Kharitonova E.P., Samsonova O.V., Feofanov A.V., Voinova V.V., Zernov A.L., Efremov Yu.M., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. Cell attachment on poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol) copolymer produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. *BMC Biochemistry* 2013; 14: 12.

7. Bonartsev A., Yakovlev S., Boskhomdzhiiev A., Zharkova I., Bagrov D., Myshkina V., Mahina T., Charitonova E., Samsonova O., Zernov A., Zhukov V., Efremov Yu., Voinova V., Bonartseva G., Shaitan K. The terpolymer produced by *Azotobacter chroococcum* 7B: effect of surface properties on cell attachment. *PLoS ONE* 2013; 8(2): e57200, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057200>.

8. Жаркова И.И., Бонарцев А.П., Босхомджиев А.П., Ефремов Ю.М., Багров Д.В., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Воинова В.В., Яковлев С.Г., Зернов А.Л., Филатова Е.В., Андреева Н.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. Влияние модификации поли-3-оксибутирата полиэтиленгликолем на жизнеспособность клеток, культивируемых на полимерных пленках. *Биомедицинская химия* 2012; 58(5): 579–591.

9. Босхомджиев А.П., Бонарцев А.П., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Багров Д.В., Филатова Е.В., Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А. Сравнительное изучение кинетики биодеградации биополимерных систем на основе поли-3-оксибутирата. *Биомедицинская химия* 2009; 55(6): 625–635.

10. Босхомджиев А.П., Бонарцев А.П., Иванов Е.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Багров Д.В., Филатова Е.В., Бонарцева Г.А., Иорданский А.Л. Гидролитическая деструкция биополимерных систем на основе поли-3-оксибутирата. Кинетический и структурный аспекты. *Пластические массы* 2009; 8: 13–18.

11. Bonartsev A.P., Boskhomdzhiiev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.A., Filatova E.A., Ivanov E.A., Bagrov D.V., Zaikov G.E. Hydrolytic degradation and medical application of poly(3-hydroxybutyrate), polylactide and their derivatives: kinetics, crystallinity, and surface morphology. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 2012; 556(1): 288–300.

12. Бонарцев А.П., Яковлев С.Г., Филатова Е.В., Соболева Г.М., Махина Т.К., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Попов В.О., Кирпичников М.П. Пролонгированное высвобождение противопухолевого лекарственного вещества, паклитаксела, из микросфер на основе поли-3-оксибутирата. *Биомедицинская химия* 2011; 57(2): 232–240.

13. Artsis M.I., Bonartsev A.P., Iordanskii A.L., Bonartseva G.A., Zaikov G.E. Biodegradation and medical application of microbial poly(3-hydroxybutyrate). *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 2012; 555(1): 232–262.

14. Биосовместимые материалы. Под ред. Севастьянова В.И., Кирпичникова М.Н. М; 2011.

References

1. Ivanov S.Y., Mukhametshin R.F., Muraev A.A., Bonartsev A.P., Rabova V.M. Sinteticheskie materialy, ispol'zuemye v stomatologii dlya zameshcheniya defektov kostnoy tkani [Synthetic materials used in dentistry to fill bone defects]. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya — Modern Scientific and Educational Problems* 2013; 1. URL: www.science-education.ru/107-8345.
2. Li B., Liao X., Zheng L., Zhu X., Wang Z., Fan H., Zhang X. Effect of nanostructure on osteoinduction of porous biphasic calcium phosphate ceramics. *Acta Biomater* 2012 Oct; 8(10): 3794–3804, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.021>. Epub 2012 Jun 21.
3. Götz W., Lenz S., Reichert C., Henkel K.O., Bienengraber V., Pernicka L., Gundlach K.K., Gredes T., Gerber T., Gedrange T., Heinemann F. A preliminary study in osteoinduction by a nano-crystalline hydroxyapatite in the mini pig. *Folia Histochem Cytobiol* 2010 Dec; 48(4): 589–596, <http://dx.doi.org/10.2478/v10042-010-0096-x>.
4. Myshkina V.L., Nikolaeva D.A., Makhina T.K., Bonartsev A.P., Bonartseva G.A. Vliyaniye usloviy kul'tivirovaniya na molekulyarnuyu massu poli-3-gidroksibutirata, sinteziruemogo *Azotobacter chroococcum* 7 B [The effect of culture conditions on molecular weight of poly-3-hydroxybutyrate synthesized by *Azotobacter chroococcum* 7 B]. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya — Applied Biochemistry and Microbiology* 2008; 44(5): 533–538.
5. Myshkina V.L., Ivanov E.A., Nikolaeva D.A., Makhina T.K., Bonartsev A.P., Filatova E.V., Ruzhitskiy A.O., Bonartseva G.A. Biosintez sopolimera poli-3-gidroksibutirata-3-gidroksivalerata shtammom *Azotobacter chroococcum* 7 B [Biosynthesis of poly-

3-hydroxybutyrate-3-hydroxyvalerate copolymer by *Azotobacter chroococcum* 7B strain]. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya — Applied Biochemistry and Microbiology* 2010; 46(3): 1–8.

6. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Boskhomdzhev A.P., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Makhina T.K., Kharitonova E.P., Samsonova O.V., Feofanov A.V., Voinova V.V., Zernov A.L., Efremov Yu.M., Bonartseva G.A., Shaitan K.V., Kirpichnikov M.P. Cell attachment on poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol) copolymer produced by *Azotobacter chroococcum* 7B. *BMC Biochemistry* 2013; 14: 12.

7. Bonartsev A., Yakovlev S., Boskhomdzhev A., Zharkova I., Bagrov D., Myshkina V., Mahina T., Charitonova E., Samsonova O., Zernov A., Zhuikov V., Efremov Yu., Voinova V., Bonartseva G., Shaitan K. The terpolymer produced by *Azotobacter chroococcum* 7B: effect of surface properties on cell attachment. *PLoS ONE* 2013; 8(2): e57200, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057200>.

8. Zharkova I.I., Bonartsev A.P., Boskhomdzhev A.P., Efremov Yu.M., Bagrov D.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Ivanov E.A., Voinova V.V., Yakovlev S.G., Zernov A.L., Filatova E.V., Andreeva N.V., Bonartseva G.A., Shaytan K.V. Vliyanie modifikatsii poli-3-oksibutirata polietilenglikolem na zhiznesposobnost' kletok, kul'tiviruemykh na polimernykh plenkach [The effect of polyethylenglycol modification poly-3-hydroxybutyrate on viability of cells cultured on polymer films]. *Biomeditsinskaya khimiya — Biomedical Chemistry* 2012; 58(5): 579–591.

9. Boskhomdzhev A.P., Bonartsev A.P., Makhina T.K., Myshkina V.L., Ivanov E.A., Bagrov D.V., Filatova E.V., lordanskiy A.L., Bonartseva G.A. Sravnitel'noe izuchenie kinetiki biodegradatsii biopolimernykh sistem na osnove poli-3-oksibutirata [Comparative study of biodegradation kinetics of biopolymer systems

based on poly-3-hydroxybutyrate]. *Biomeditsinskaya khimiya — Biomedical Chemistry* 2009; 55(6): 625–635.

10. Boskhomdzhev A.P., Bonartsev A.P., Ivanov E.A., Makhina T.K., Myshkina V.L., Bagrov D.V., Filatova E.V., Bonartseva G.A., lordanskiy A.L. Gidroliticheskaya destruktivnaya biopolimernykh sistem na osnove poli-3-oksibutirata. Kineticheskiy i strukturnyy aspekty [Hydrolytic destruction of biopolymer systems based on poly-3-hydroxybutyrate. Kinetic and structural aspects]. *Plasticheskie massy — Plastic Masses* 2009; 8: 13–18.

11. Bonartsev A.P., Boskhomdzhev A.P., lordanskiy A.L., Bonartseva G.A., Rebrov A.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Yakovlev S.A., Filatova E.A., Ivanov E.A., Bagrov D.V., Zaikov G.E. Hydrolytic degradation of poly(3-hydroxybutyrate), polylactide and their derivatives: kinetics, crystallinity, and surface morphology. *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 2012; 556(1): 288–300.

12. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Filatova E.V., Soboleva G.M., Makhina T.K., Bonartseva G.A., Shaytan K.V., Popov V.O., Kirpichnikov M.P. Prolongirovannoe vysvobozhdenie protivopukhlevogo lekarstvennogo veshchestva, paklitaksela, iz mikrosfer na osnove poli-3-oksibutirata [Prolonged release of antitumor agent, paclitaxel, from microspheres based on poly-3-hydroxybutyrate]. *Biomeditsinskaya khimiya — Biomedical Chemistry* 2011; 57(2): 232–240.

13. Artsis M.I., Bonartsev A.P., lordanskiy A.L., Bonartseva G.A., Zaikov G.E. Biodegradation and medical application of microbial poly(3-hydroxybutyrate). *Molecular Crystals and Liquid Crystals* 2012; 555(1): 232–262.

14. *Biosovmestimye materialy* [Biocompatible materials]. Pod red. Sevast'yanova V.I., Kirpichnikova M.N. [Sevast'yanov V.I., Kirpichnikov M.N. (editors)]. Moscow; 2011.