

РАЗРАБОТКА И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ОРТОТОПИЧЕСКИХ КОСТНЫХ ИМПЛАНТАТОВ НА ОСНОВЕ ГИБРИДНОЙ КОНСТРУКЦИИ ИЗ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА И АЛЬГИНАТА НАТРИЯ

DOI: 10.17691/stm2016.8.4.06

УДК 546:620.9:57.085.23

Поступила 18.02.2016 г.



А.А. Мураев, к.м.н., доцент кафедры челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ¹;

доцент кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии²;

А.П. Бонарцев, к.б.н., ведущий научный сотрудник кафедры биоинженерии³;

научный сотрудник лаборатории азотфиксации микроорганизмов⁴;

Ю.В. Гажва, к.м.н., ассистент кафедры челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ¹;

В.М. Рябова, к.м.н., ассистент кафедры челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ¹;

А.В. Волков, к.м.н., врач-патологоанатом⁵;

И.И. Жаркова, младший научный сотрудник кафедры биоинженерии³;

И.А. Стамболиев, аспирант кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии²;

Е.С. Кузнецова, студент-магистрант³;

В.А. Жуйков, старший лаборант НИИ биомедицинских технологий¹; аспирант⁴;

В.Л. Мышкина, к.б.н., научный сотрудник лаборатории азотфиксации микроорганизмов⁴;

Т.К. Махина, научный сотрудник лаборатории азотфиксации микроорганизмов⁴;

Г.А. Бонарцева, к.б.н., старший научный сотрудник лаборатории азотфиксации микроорганизмов⁴;

С.Г. Яковлев, старший лаборант НИИ биомедицинских технологий¹;

К.С. Кудряшова, старший лаборант НИИ биомедицинских технологий¹;

ведущий инженер кафедры биоинженерии³;

В.В. Воинова, младший научный сотрудник кафедры биохимии³;

А.А. Миронов, к.б.н., доцент кафедры нейротехнологий Института биологии и биомедицины⁶;

старший научный сотрудник отдела экспериментального моделирования ЦНИЛ; доцент кафедры нормальной физиологии им. Н.Ю. Беленкова¹;

К.В. Шайтан, д.ф.-м.н., профессор, зам. зав. кафедрой биоинженерии³;

С.И. Гажва, д.м.н., профессор, зав. кафедрой стоматологии ФПКВ¹;

С.Ю. Иванов, д.м.н., профессор, зав. кафедрой челюстно-лицевой хирургии и имплантологии ФПКВ¹;

зав. кафедрой челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии²

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

²Российский университет дружбы народов, Москва, 117198, ул. Миклухо-Маклая, 6;

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, 119991, Ленинские горы, 1/12;

⁴Институт биохимии имени А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, Москва, 119071, Ленинский пр., 33/2;

⁵Городская клиническая больница им. Е.О. Мухина, Москва, 111399, Федеративный пр., 17;

⁶Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Н. Новгород, 603950, пр. Гагарина, 23

Цель исследования — разработка технологии изготовления костных имплантатов на основе гибридной полимерной конструкции из поли-3-оксибутирата и альгината натрия для направленной костной регенерации с применением метода 3D-печати.

Материалы и методы. Для изготовления имплантатов сложной формы на основе поли-3-оксибутирата и альгината натрия применяли метод двойного выщелачивания с использованием пресс-формы, выполненной методом 3D-печати. Исследование внешнего вида, морфологии и структуры полученных матриц проводили с помощью сканирующей электронной микроскопии. Биосовместимость *in vivo* определяли по результатам внутримышечной имплантации костных имплантатов и по данным гистологии.

Результаты. Исследование разработанного гибридного 3D-матрикса из поли-3-оксибутирата и альгината натрия показало, что он обладает ограничительной функцией, обеспечивая условия для нормальной регенерации плоских костей черепа у крыс.

Заключение. Разработанный гибридный 3D-матрикс не препятствует течению нормального остеогенеза и обеспечивает благоприятные для регенерации условия.

Ключевые слова: костные имплантаты; полиоксиалканоаты; поли-3-оксибутират; альгинат натрия; регенерация костной ткани; биосовместимость.

Для контактов: Бонарцев Антон Павлович, e-mail: ant_bonar@mail.ru

Как цитировать: Muraev A.A., Bonartsev A.P., Gazhva Yu.V., Riabova V.M., Volkov A.V., Zharkova I.I., Stamboliev I.A., Kuznetsova E.S., Zhuikov V.A., Myshkina V.L., Mahina T.K., Bonartseva G.A., Yakovlev S.G., Kudryashova K.S., Voinova V.V., Mironov A.A., Shaitan K.V., Gazhva S.I., Ivanov S.Yu. Development and preclinical studies of orthotopic bone implants based on a hybrid construction from poly(3-hydroxybutyrate) and sodium alginate. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2016; 8(4): 42–50, <https://doi.org/10.17691/stm2016.8.4.06>

English

Development and Preclinical Studies of Orthotopic Bone Implants Based on a Hybrid Construction from Poly(3-Hydroxybutyrate) and Sodium Alginate

A.A. Muraev, MD, PhD, Associate Professor, Department of Maxillofacial Surgery and Implantology, Faculty of Doctors' Advanced Training¹; Associate Professor, Department of Maxillofacial and Oral Surgery²;
A.P. Bonartsev, PhD, Leading Researcher, Department of Bioengineering³; Researcher, Laboratory of Microorganism Nitrogen Fixation⁴;
Yu.V. Gazhva, MD, PhD, Tutor, Department of Maxillofacial Surgery and Implantology, Faculty of Doctors' Advanced Training¹;
V.M. Riabova, MD, PhD, Tutor, Department of Maxillofacial Surgery and Implantology, Faculty of Doctors' Advanced Training¹;
A.V. Volkov, MD, PhD, Forensic Pathologist⁵;
I.I. Zharkova, Junior Researcher, Department of Bioengineering³;
I.A. Stamboliev, PhD Student, Department of Maxillofacial and Oral Surgery²;
E.S. Kuznetsova, Master's Degree Student³;
V.A. Zhuikov, Senior Laboratory Technician, Institute of Biomedical Technologies¹; PhD Student⁴;
V.L. Myshkina, PhD, Researcher, Laboratory of Microorganism Nitrogen Fixation⁴;
T.K. Mahina, Researcher, Laboratory of Microorganism Nitrogen Fixation⁴;
G.A. Bonartseva, PhD, Senior Researcher, Laboratory of Microorganism Nitrogen Fixation⁴;
S.G. Yakovlev, Senior Laboratory Technician, Institute of Biomedical Technologies¹;
K.S. Kudryashova, Senior Laboratory Technician, Institute of Biomedical Technologies¹; Leading Engineer, Department of Bioengineering³;
V.V. Voinova, Junior Researcher, Department of Biochemistry³;
A.A. Mironov, PhD, Associate Professor, Department of Neurotechnology, Institute of Biology and Biomedicine⁶; Senior Researcher, Experimental Modeling Unit, Central Research Laboratory; Associate Professor, Department of Normal Physiology named after N.Y. Belenkov¹;
K.V. Shaitan, DSc, Professor, Deputy Head of the Department of Bioengineering³;
S.I. Gazhva, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Dentistry, Faculty of Doctors' Advanced Training¹;
S.Yu. Ivanov, MD, DSc, Professor, Head of the Department of Maxillofacial Surgery and Implantology, Faculty of Doctors' Advanced Training¹; Head of the Department of Maxillofacial and Oral Surgery²

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

²Peoples' Friendship University of Russia, 6 Miklukho-Maklay St., Moscow, 117198, Russian Federation;

³Lomonosov Moscow State University, 1/12 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russian Federation;

⁴Bach Institute of Biochemistry, Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology" Russian Academy of Sciences, build. 2, 33 Leninskiy Prospekt, Moscow, 119071, Russian Federation;

⁵City Clinical Hospital named after Ye.O. Mukhin, 17 Federativny Prospekt, Moscow, 111399, Russian Federation;

⁶Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod, 23 Prospekt Gagarina, Nizhny Novgorod, 603950, Russian Federation

The aim of the investigation was to develop a technology of manufacturing bone implants based on a hybrid polymer construction composed of poly(3-hydroxybutyrate) and sodium alginate for guided bone regeneration using 3D printing method.

Materials and Methods. Complex shaped bone implants based on poly(3-hydroxybutyrate) and sodium alginate were manufactured by the method of two-stage leaching using a mold obtained by 3D printing. The appearance, morphology and structure of the obtained scaffolds were analyzed by means of scanning electron microscopy. Biocompatibility *in vivo* was determined based on the histology data of scaffolds implantation as bone substitutes.

Results. The study of the developed hybrid 3D scaffolds from poly(3-hydroxybutyrate) and sodium alginate showed that they perform a restrictive function providing conditions for regeneration of flat cranial bones in rats.

Conclusion. The developed hybrid 3D scaffolds do not interfere with normal osteogenesis and provide beneficial conditions for regeneration.

Key words: bone implants; polyhydroxyalkanoates; poly(3-hydroxybutyrate); sodium alginate; bone tissue regeneration; biocompatibility.

Восстановление костных дефектов неправильной геометрической формы остается сложной в выполнении процедурой. Врожденные и особенно посттравматические дефекты и деформации в челюстно-лицевой области отличаются разнообразием форм, для их замещения требуются, как правило, не просто остеопластические материалы, а костные имплантаты (КИ), повторяющие форму восстанавливаемого дефекта [1]. Благодаря современному программному обеспечению, интегрирующему в себе возможность обработки данных компьютерной томографии и виртуального объемного (3D) моделирования, у исследователей и клиницистов появилась возможность проводить компьютерное планирование реконструктивных операций и получать модели костных имплантатов, полностью congruentных воспринимаемому ложу [2, 3], т.е. процесс подготовки модели КИ для производства можно считать вполне решаемой задачей.

Для изготовления самих КИ произвольной формы предложено несколько технологий. Одна из них — фрезерование аллокости [4, 5], керамических блоков [6], сложных костных матриц [7]. Однако многие исследователи отмечают, что аллокость имеет ряд недостатков, а керамика характеризуется длительным сроком резорбции [8]. Другой многообещающей технологией для изготовления КИ является аддитивное производство, или 3D-печать. Одной из первых начала производить индивидуальные костные имплантаты методом 3D-прототипирования компания Oxford Performance Materials, Inc. [9]. В России имеется зарегистрированная и разрешенная к клиническому применению технология производства индивидуальных на костных имплантатов для контурной пластики из политетрафторэтилена, однако данный класс материалов относится к биоинертным, но не биоразлагаемым и не замещается костной тканью [3, 10].

Развитие прямой 3D-печати КИ осложняется тем, что материалы, традиционно используемые для замещения костных дефектов: полимеры (полиоксиданолы (ПОА), полилактиды, полигликолид и др.), минеральные материалы (полигидроксиапатит, соли кальция), ксено- и алломатериалы, — или не подходят для традиционных методов 3D-печати, или меняют свои физико-химические и биологические свойства и становятся непригодными для восстановления кости.

Для непрямых технологий изготовления 3D-изделий с заданной формой выбор материалов также имеет большое значение. Такие материалы должны обеспечивать заданную микроструктуру изделия, его физико-химические и биологические характеристики (достаточную прочность, пластичность, гидрофильность, способность к биодеструкции, биосовместимость). Далеко не всегда один материал может обеспечить сочетание всех данных свойств, в связи с чем в последнее время активно развивается направление создания гибридных конструкций с использованием различных биополимеров и минеральных веществ.

Одними из наиболее используемых полимеров для биоинженерии твердой соединительной ткани являются ПОА и альгинаты [11–13]. По своим свойствам эти полимеры сильно различаются. ПОА — это более гидрофобные, механически прочные, биodeградируемые с низкой скоростью полиэфиры, тогда как альгинаты — гидрофильные, образующие гидрогели, механически непрочные полисахариды. Образование композитов из полимеров этих двух классов позволяет регулировать свойства полученного композитного материала в самых широких пределах. Альгинаты активно используются для изготовления матриц в инженерии костной, хрящевой, мягкой соединительной, мышечной тканей [12], тогда как матрицы на основе ПОА применяются преимущественно для регенерации костной ткани [11]. ПОА, в частности гомополимер поли-3-оксибутират (ПОБ), получают биотехнологическим путем с использованием высокоэффективного штамма-продуцента *Azotobacter chroococcum* 7Б, что дает возможность получать полимеры высокой степени очистки с заданными свойствами [14]. Несмотря на то, что для биомедицинских целей используют альгинаты, выделенные из бурых водорослей, эти биополимеры можно также получать биотехнологическим путем с помощью штаммов-продуцентов того же самого вида бактерий *Azotobacter chroococcum* [15].

Авторами разработан метод изготовления КИ сложной формы на основе ПОБ и альгината натрия методом двойного выщелачивания с использованием пресс-формы, выполненной методом 3D-печати.

Цель исследования — разработка технологии изготовления костных имплантатов на основе гибридной полимерной конструкции из поли-3-оксибутирата и альгината натрия для направленной костной регенерации с применением метода 3D-печати.

Материалы и методы

Реактивы. Использовали ПОБ (молекулярная масса — 150 кДа) и альгинат натрия (Sigma-Aldrich, Германия); трихлорметан (EKOS-1, Россия); карбонат аммония («Химмед», Россия); сахарозу («Химмед», Россия); стрэнг из полилактида для 3D-печати методом послойного наплавления (температура плавления — 200–255°C, плотность — 1,2–1,08 кг/м³, экологически чист, не токсичен, высокая точность при печати, производство Московского завода FDPlast, Россия); Золетил 100 (Virbac, Франция); Рометар (Bioveta, Чехия); Доксциклин («Бинергия», Россия); Тетрациклин («Биохимик», Россия); ализариновый красный («ХимМедСервис», Россия).

Компьютерное моделирование и 3D-печать форм для изготовления КИ. Проведена конусно-лучевая компьютерная томография головы крысы. На основе DICOM-файлов осуществлена реформация 3D-модели черепа (рис. 1). По центру теменной кости смоделирован костный дефект цилиндрической формы диаметром 8 мм (рис. 2). Модель имплантата выполнена таким образом, чтобы не только заполнять костный дефект, но также перекрывать его снаружи.

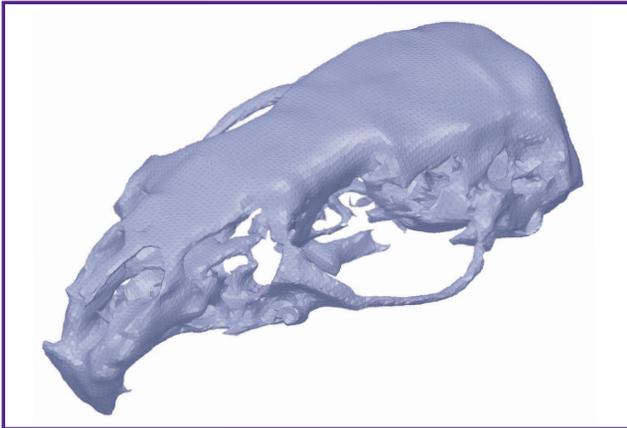


Рис. 1. 3D-модель черепа крысы, реформированная из DICOM-файлов

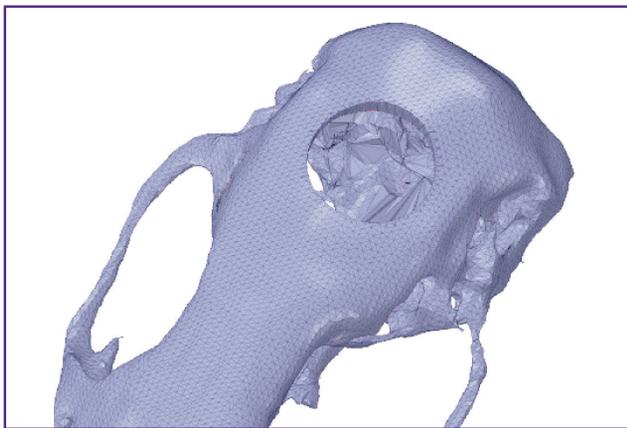


Рис. 2. Модель черепа крысы с искусственно смоделированным дефектом

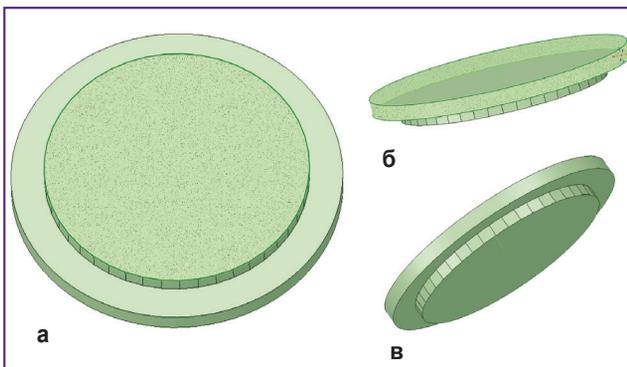


Рис. 3. 3D-модель костного имплантата: а — вид снизу; б — вид сбоку и сверху; в — вид сбоку и снизу. Верхняя часть имплантата будет перекрывать костный дефект, защищая головной мозг

Это позволит защитить твердую мозговую оболочку и головной мозг от внешнего воздействия (рис. 3). Так как исследование проводилось на крысах одной массы и размера, все модели были изготовлены также од-

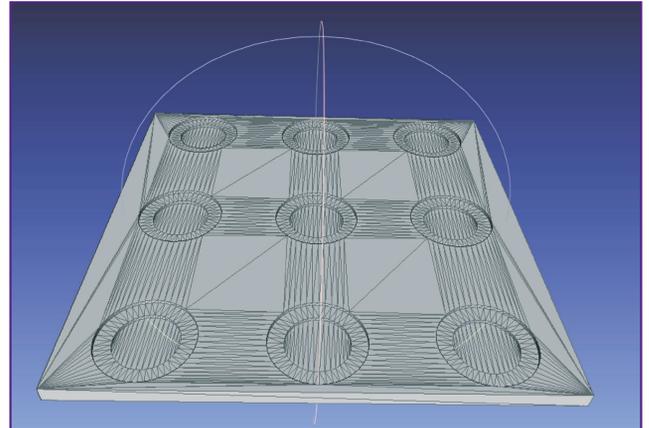


Рис. 4. 3D-модель формы для отливки имплантатов

ного размера. На рис. 4 представлена 3D-модель формы для изготовления КИ.

Изготовление костных имплантатов по напечатанным 3D-формам. С использованием 3D-принтера PrusaMendel v2 (NWRepRap, США), работающего по принципу послойного наплавления, были выполнены формы для КИ из полилактида. Так как в процессе изготовления КИ применяется органический растворитель хлороформ, растворяющий полилактид, формы были изолированы алюминиевой фольгой (рис. 5).

Такой процесс отливки легко масштабируется для изготовления имплантатов размером не менее 5×5×5 см.

Получение полимерных матриц для изготовления костных имплантатов. С целью получения пористых матриц использована новая модификация широко применяемого для изготовления матриц в тканевой инженерии метода выщелачивания — метод двойного выщелачивания [16]. В качестве порообразующих агентов выбраны карбонат аммония и сахароза. Размер кристаллов карбоната аммония составлял 40–94 мкм, сахарозы — 94–315 мкм. Нормирование размеров производили с помощью лабораторных сит U1-ESL с ячейками 40, 94 и 315 мкм («Крафт», Россия).

На первой стадии метода двойного выщелачивания происходит термическое разложение карбоната аммония:



при этом образуются поры меньшего диаметра. На второй стадии воду меняли несколько раз до полного вымывания сахарозы.

Раствор ПОБ (65 мг на 1 мл трихлорметана) добавляли к смеси карбоната аммония и сахарозы (1:3) до состояния смеси, близкого к жидкой пасте. Этой смесью заполняли форму, изготовленную ранее. После испарения растворителя форму погружали в горячую воду (~90°C). После прекращения газообразования полученные матрицы удаляли из формы и промывали

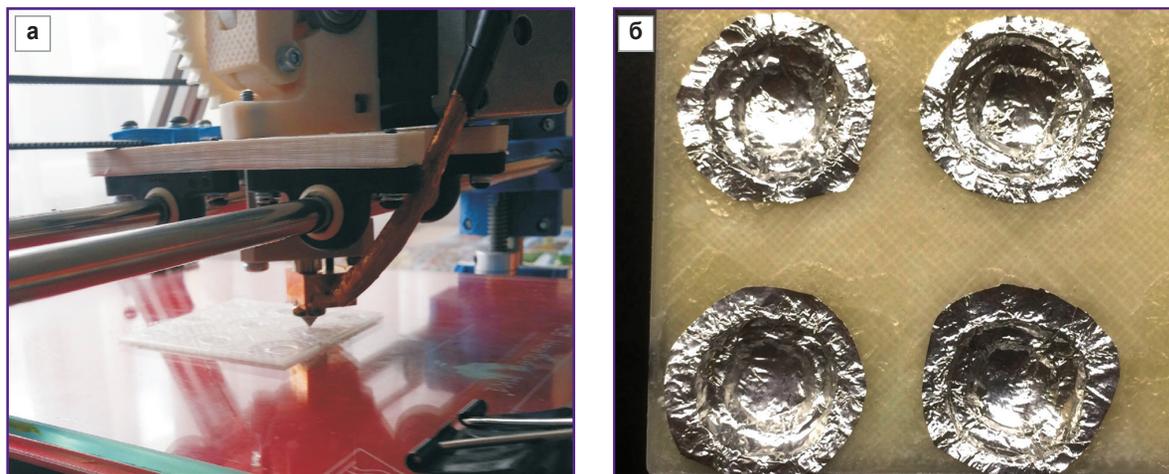


Рис. 5. Форма для отливки имплантатов: а — на этапе печати; б — на этапе изоляции фольгой

вали дистиллированной водой — 5 раз по 30 мин на шейкере.

Перед имплантацией матрикса заполняли 1% раствором альгината натрия до полного насыщения и затем помещали в 50 мМ раствора CaCl_2 до полного гелирования альгината в матриксе, после чего полученный гибридный матрикс промывали фосфатно-буферным солевым раствором.

Подобная гибридная конструкция из матрикса на основе ПОБ, заполненного альгинатом натрия, была разработана с учетом ранее полученных данных [17, 18]. Нами установлено, что барьерная мембрана из ПОБ и паста для заполнения костных дефектов на основе микросфер из ПОБ в альгинатном геле являются эффективными для регенерации костной ткани. Кроме того, альгинат натрия может быть использован в дальнейшем в качестве средства для инкапсулирования и введения в матрикс мезенхимальных стволовых клеток и других клеток, применяемых для стимуляции регенерации костной и хрящевой тканей [19].

Структура и морфология матриксов. Исследование внешнего вида, морфологии и структуры полученных матриксов проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (Токуо Воеки Ltd., Япония). С этой целью образцы закрепляли на алюминиевых столиках и напыляли золотом 15 мин при силе тока 15 мА (IB-3; Giko Engineering Co., Япония).

Пористость. Пористость матриксов оценивали с помощью метода определения пористости через массу. Сначала измеряли массу пористого матрикса (Acculab AL-64, США), его диаметр и высоту, рассчитывали теоретический объем монолитного матрикса, а с учетом плотности полимера ($1,25 \text{ г/см}^3$) определяли массу сплошного непористого образца. Пористость рассчитывали по формуле:

$$P = (1 - m_1/m_2) \cdot 100\%,$$

где m_1 — измеренная масса пористого образца, а

m_2 — расчетная масса монолитного образца без пор, объем которого совпадает с объемом пористого образца.

Наличие открытых пор выявляли путем окраски чернилами. Образец матрикса обмакивали в чернила, высушивали, после чего разрезали.

In vivo исследования на критическом костном дефекте. Для изучения регенерации костей черепа наиболее показательной является модель критического дефекта свода черепа (теменной кости) у крысы [20], позволяющая получить воспроизводимые данные и сравнить их с многочисленными результатами других исследований [8, 16–18]. Эту модель используют для оценки эффективности и безопасности различных костезамещающих материалов, в том числе матриксов с факторами роста и клетками [21–23].

Методика операции. Исследование проводили на 24 самцах крыс линии Wistar с массой тела 400 г. Эксперимент соответствовал рекомендациям локального биоэтического комитета НижГМА, при его постановке руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с приказами МЗ СССР №755 от 12.08.1977 г., №701 от 24.07.1978 г. и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 19.06.2003 г.

Под внутрибрюшинным наркозом (Золетил 100, 125 мкг/кг массы тела) крысам производили поперечный и вертикальный латерально-смещенный разрез кожи головы, формируя треугольный лоскут, и последовательно тупым и острым путем обнажали теменные кости. Посередине сагиттального шва на теменных костях формировали круглое отверстие с помощью трепана C-teamer диаметром 8 мм и высотой 1,5 мм из набора Neobiotech SLA (Neobiotech, Корея), избегая перфорации сагиттального венозного синуса. Рану послойно ушивали (рис. 6).

Введение флюоресцентных меток для изучения скорости регенерации костных дефектов.

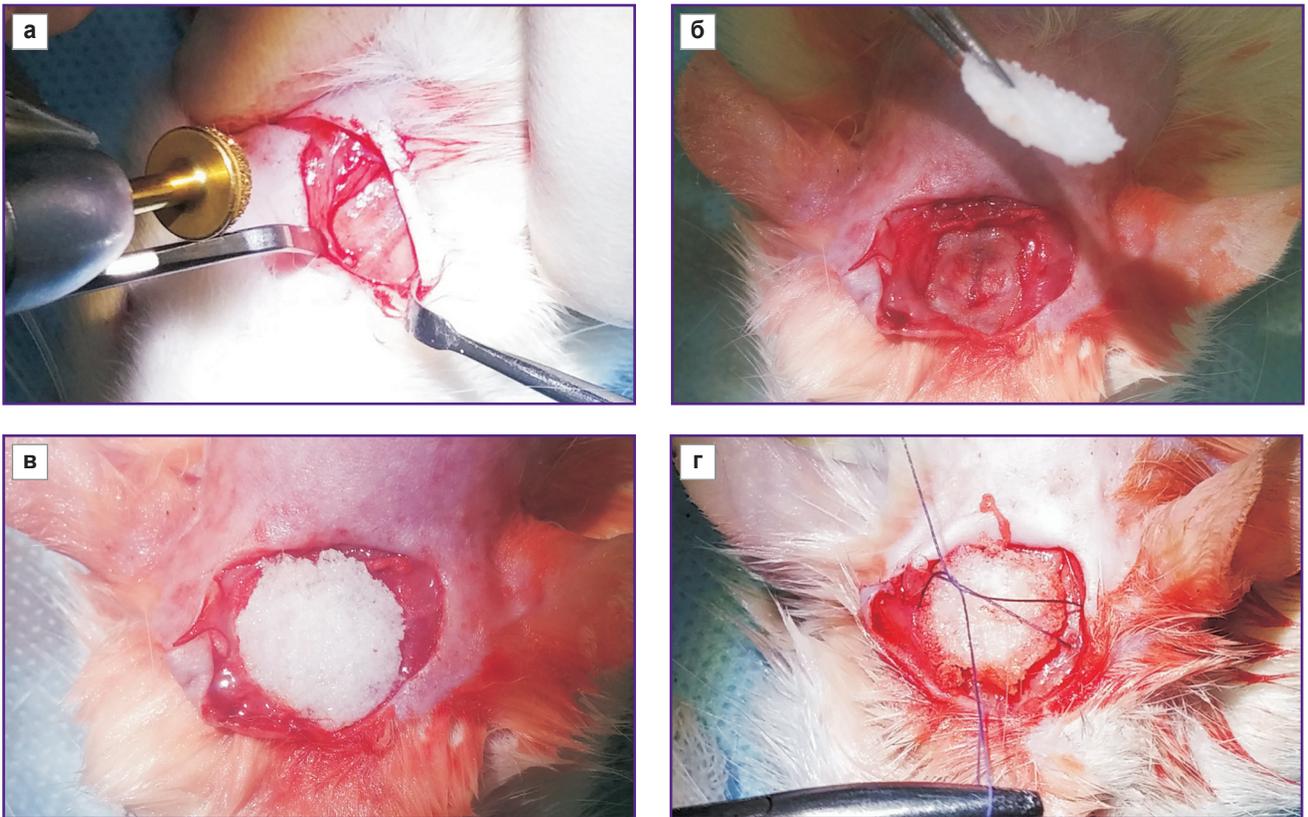


Рис. 6. Этапы операции: а — хирургический доступ; б — формирование критического костного дефекта; в — закрытие дефекта костным матриксом; г — подшивание костного матрикса к надкостнице

Механизм мечения костного регенерата основывается на связывании тетрациклиноподобных флюорохромо- и ионов кальция с образованием хелатных соединений, которые накапливаются в новообразованной костной ткани, что обеспечивает их последующую визуализацию. Для оценки динамики неоостеогенеза на разных сроках проводили прижизненное тройное мечение новообразованной костной ткани. Всем экспериментальным крысам делали внутрибрюшинные инъекции раствора доксицилина к началу активной минерализации остеоида на 8, 9 и 10-й день после операции. Затем на 15, 16 и 17-й день эксперимента крысам внутрибрюшинно вводили раствор тетрацилина, который, включаясь в новообразованную костную ткань, образует новую меченую область. На 22, 23 и 24-й день вводили ализарин красный С для полного окрашивания краев минерализованного регенерата. Метки вводили в дозировке 25 мг/кг массы тела. Таким образом, мечение осуществляли по схеме 7–3–4–3–4–3–4 (три дня введения чередовались с четырехдневными перерывами).

На 28-й день, что соответствовало окончанию процессов первичного остеогенеза [24], крыс выводили из эксперимента передозировкой наркоза Золетил/Рометар. Скелетировали свод черепа, область регенерата выделяли с использованием хирургиче-

ских цилиндрических боров и физиодиспенсера. Полученные образцы свода черепа фиксировали в 40% этиловом спирте в течение 24 ч. Такой способ фиксации широко употребляется для сохранения флюоресцентных меток и хорошей пропитки костной ткани [25].

Гистологическое исследование. Образцы фиксировали в 70% этаноле в течение 24–72 ч. Затем промывали, обезжизивали и заливали в метилметакрилат (Osteo-Bead; Sigma-Aldrich, США) по стандартной методике, рекомендованной производителем, с последующей полимеризацией. Из полученных блоков изготавливали первичные срезы толщиной 200 мкм (Low Speed Saw, Швейцария), из которых в свою очередь готовились вторичные срезы толщиной 40–50 мкм. Контроль толщины среза осуществляли стандартным механическим микрометром барабанного типа.

Микроскопическое исследование проводили на флюоресцентном микроскопе Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Микрофотографирование выполняли с помощью стандартного набора светофильтров с последующим сложением RGB-каналов в единое изображение с использованием штатного программного продукта Leica для флюоресцентной микроскопии (мультиканальная гистопантограмма).

Результаты и обсуждение

Структура и морфология матриц. По методике двойного выщелачивания нами получены трехмерные матрицы из ПОБ (молекулярная масса — 150 кДа) (рис. 7). Изучение образцов полимерных подложек методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 8) показало, что матрицы имеют трехмерную пористую структуру с разным размером пор: микропоры — 23 ± 8 мкм, макропоры — 410 ± 75 мкм.

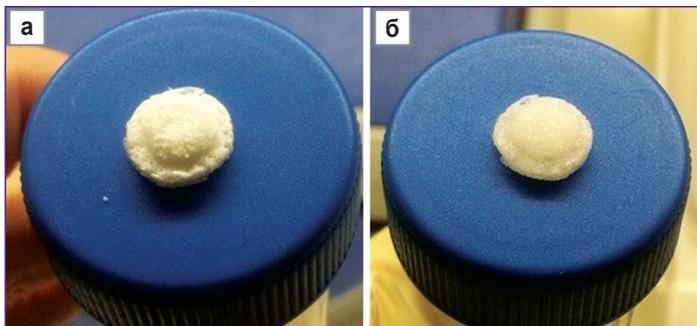


Рис. 7. Внешний вид матриц из поли-3-оксибутирата: а — до и б — после насыщения альгинатом натрия

Размер микропор более 300 мкм считается оптимальным для проникновения питательных веществ и клеток во всем объеме материала [26].

С помощью окрашивания чернилами определяли характер системы пор. Установлено, что матрицы из ПОБ имеют сообщающуюся систему пор. В среднем пористость матриц составила 93%.

Гистологическое исследование. При микроскопическом исследовании с использованием флуоресцентной микроскопии образцов костной ткани теменных костей крыс выявлено, что накопление флуоресцирующих меток в костной ткани произошло успешно. Однако четкого градиента окрасок на гистологических срезах при микроскопии выявить не удалось, поскольку объем костной ткани накапливался постепенно и области окрашивания перекрывались. Поканальное изучение свечения флюорохромов выявило их присутствие и накопление в своем спектре, однако совмещение изображений в единое целое уже не позволяло четко идентифицировать области накопления флюорохромов в зависимости от срока наблюдения (рис. 9).

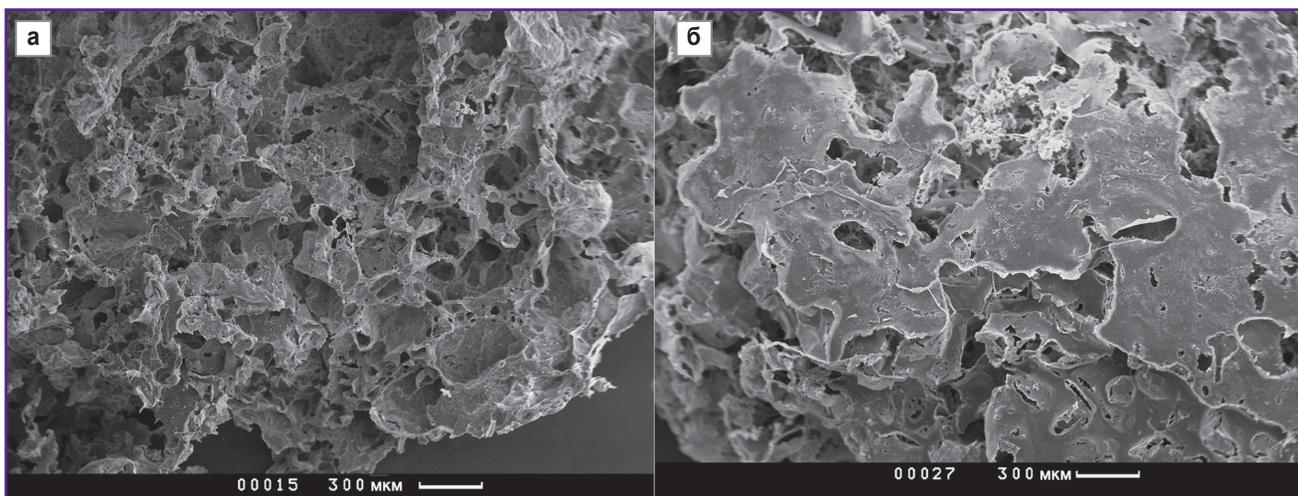


Рис. 8. Микроструктура матриц на основе поли-3-оксибутирата: а — до и б — после заполнения альгинатом натрия. Сканирующая электронная микроскопия

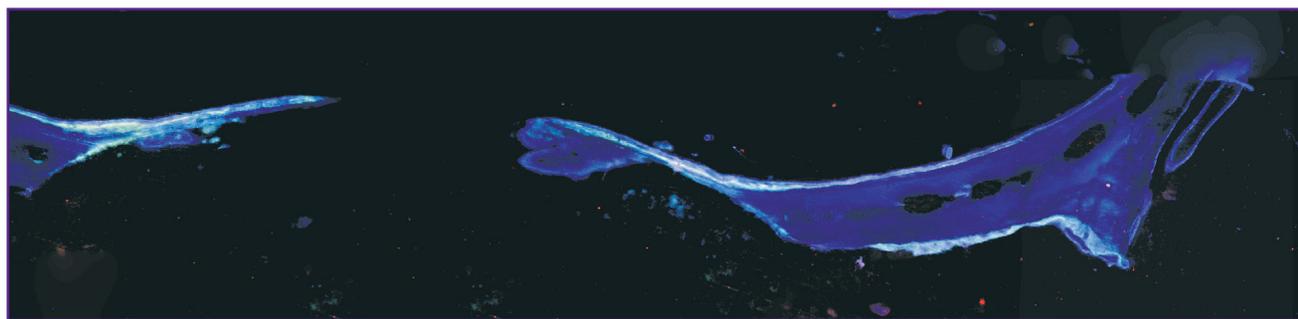


Рис. 9. Мультиканальная гистопантограмма гистологического среза теменных костей крыс с раздельным флуоресцентным окрашиванием через 28 дней после трепанации

Заключение. Разработана комплексная методика получения гибридных полимерных 3D-матрицек заданной формы и микроструктуры, включающая методы 3D-печати, двойного выщелачивания и создания гибридных полимерных конструкций. Метод 3D-печати позволяет создавать форму для изготовления шаблонов для заполнения черепных дефектов не менее 5 мм в диаметре. Метод двойного выщелачивания позволяет изготавливать матрицы, предназначенные для заполнения костных дефектов. Полученные матрицы представляют собой гибридную конструкцию из различных биосовместимых полимеров — поли-3-оксибутирата и альгината натрия, в которой альгинат служит гидрогелем-наполнителем твердого высокопористого матрикса из поли-3-оксибутирата.

Исследования гистологических срезов образцов костной ткани при помощи флуоресцентной микроскопии с отдельным окрашиванием флюорохромами показали, что гибридный матрикс из поли-3-оксибутирата и альгината натрия обладает ограничительной функцией, обеспечивая условия для нормальной регенерации плоских костей черепа у крыс. Разработанный гибридный 3D-матрикс не препятствует течению нормального остеогенеза и обеспечивает благоприятные для регенерации условия.

Благодарности. Коллектив авторов благодарит Арутюнян Ирину Владимировну за помощь в проведении исследования.

Финансирование исследования. Работа выполнена при поддержке гранта Российского научного фонда (соглашение №15-15-10014 от 01.05.2015 г.).

Конфликт интересов. У авторов нет конфликта интересов.

Литература/References

- Jardini A.L., Larosa M.A., Maciel Filho R., Zavaglia C.A., Bernardes L.F., Lambert C.S., Calderoni D.R., Kharmandayan P. Cranial reconstruction: 3D biomodel and custom-built implant created using additive manufacturing. *J Craniomaxillofac Surg* 2014; 42(8): 1877–1884, <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2014.07.006>.
- van der Meer W.J., Bos R.R., Vissink A., Visser A. Digital planning of cranial implants. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2013; 51(5): 450–452, <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2012.11.012>.
- Muraev A.A., Dymnikov A.B., Korotkova N.L., Kobets K.K., Ivanov S.Y. Planning technique in maxillofacial plasty. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2013; 5(3): 57–62.
- Knox G. *Surgical bone and cartilage shaping on demand with 3D CAD/CAM*. Patent US 8,483,63 B1. 2013.
- Jacotti M., Barausse C., Felice P. Posterior atrophic mandible rehabilitation with onlay allograft created with CAD-CAM procedure: a case report. *Implant Dent* 2014; 23(1): 22–28, <https://doi.org/10.1097/ID.000000000000023>.
- Garagiola U., Grigolato R., Soldo R., Bacchini M., Bassi G., Roncucci R., De Nardi S. Computer-aided design/computer-aided manufacturing of hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction in jawbone atrophy: a systematic review and case report. *Maxillofac Plast Reconstr Surg* 2016; 38(1), <https://doi.org/10.1186/s40902-015-0048-7>.

- Mangano F., Macchi A., Shibli J.A., Luongo G., Iezzi G., Piattelli A., Caprioglio A., Mangano C. Maxillary ridge augmentation with custom-made CAD/CAM scaffolds. A 1-year prospective study on 10 patients. *J Oral Implantol* 2014; 40(5): 561–569, <https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-12-00122>.

- Kuznetsova D.S., Timashev P.S., Bagratashvili V.N., Zagaynova E.V. Scaffold- and cell system-based bone grafts in tissue engineering (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2014; 6(4): 201–212.

- OPM Receives FDA clearance for 3D printed OsteoFab patient-specific facial device. 2014. URL: <https://www.oxfordpm.com/opm-receives-fda-clearance-3d-printed-osteofab-patient-specific-facial-device>.

- Greenstein G., Carpentieri J.R. Utilization of d-PTFE barriers for post-extraction bone regeneration in preparation for dental implants. *Compend Contin Educ Dent* 2015; 36(7): 465–473.

- López N.I., Pettinari M.J., Nikel P.I., Méndez B.S. Polyhydroxyalkanoates: much more than biodegradable plastics. In: *Advances in applied microbiology*. Elsevier BV; 2015; p. 73–106, <https://doi.org/10.1016/b.s.aamb.2015.06.001>.

- Venkatesan J., Bhatnagar I., Manivasagan P., Kang K.H., Kim S.K. Alginate composites for bone tissue engineering: a review. *Int J Biol Macromol* 2015; 72: 269–281, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.07.008>.

- Rezwan K., Chen Q.Z., Blaker J.J., Boccaccini A.R. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27(18): 3413–3431, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.039>.

- Bonartsev A.P., Zharkova I.I., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Mahina T.K., Voinova V.V., Zernov A.L., Zhuikov V.A., Akoulina E.A., Ivanova E.V., Kuznetsova E.S., Shaitan K.V., Bonartseva G.A. Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate) copolymers by *Azotobacter chroococcum* 7B: a precursor feeding strategy. *Prep Biochem Biotechnol* 2016, <https://doi.org/10.1080/10826068.2016.1188317>. [Epub ahead of print].

- Бонарцева Г.А., Акулина Е.А., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Махина Т.К., Бонарцев А.П. Биосинтез альгинатов бактериями рода *Azotobacter*. Прикладная биохимия и микробиология 2017 (в печати). Bonartseva G.A., Akulina E.A., Myshkina V.L., Voinova V.V., Makhina T.K., Bonartsev A.P. Alginate biosynthesis by bacteria of the genus *Azotobacter*. *Prikladnaya biokhimiya i mikrobiologiya* 2017 (in print).

- Kundu J., Pati F., Hun Jeong Y., Cho D.-W. Biomaterials for biofabrication of 3D tissue scaffolds. In: *Biofabrication. Micro- and nano-fabrication, printing, patterning and assemblies*. Elsevier BV; 2013; p. 23–46, <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-2852-7.00002-0>.

- Gazhva J.V., Bonartsev A.P., Mukhametshin R.F., Zharkova I.I., Andreeva N.V., Makhina T.K., Myshkina V.L., Bespalova A.E., Zernov A.L., Ryabova V.M., Ivanova E.V., Bonartseva G.A., Mironov A.A., Shaitan K.V., Volkov A.V., Muraev A.A., Ivanov S.Y. In vivo and in vitro development and study of osteoplastic material based on hydroxyapatite, poly-3-hydroxybutyrate and sodium alginate composition. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2014; 6(1): 6–13.

- Ivanov S.Y., Bonartsev A.P., Gazhva Y.V., Zharkova I.I., Mukhametshin R.F., Mahina T.K., Myshkina V.L., Bonartseva G.A., Voinova V.V., Andreeva N.V., Akulina E.A.,

Kharitonova E.S., Shaitan K.V., Muraev A.A. Development and preclinical studies of insulating membranes based on poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate for guided bone regeneration. *Biomed Khim* 2015; 61(6): 717–723, <https://doi.org/10.18097/PBMC20156106717>.

19. Bai H.Y., Chen G.A., Mao G.H., Song T.R., Wang Y.X. Three step derivation of cartilage like tissue from human embryonic stem cells by 2D–3D sequential culture in vitro and further implantation in vivo on alginate/PLGA scaffolds. *J Biomed Mater Res A* 2010; 94(2): 539–546, <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32732>.

20. Spicer P.P., Kretlow J.D., Young S., Jansen J.A., Kasper F.K., Mikos A.G. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc* 2012; 7(10): 1918–1929, <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.113>.

21. Pellegrini G., Seol Y.J., Gruber R., Giannobile W.V. Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies. *J Dent Res* 2009; 88(12): 1065–1076, <https://doi.org/10.1177/0022034509349748>.

22. Lee C.H., Jin M.U., Jung H.M., Lee J.T., Kwon T.G. Effect of dual treatment with SDF-1 and BMP-2 on ectopic and

orthotopic bone formation. *PLoS One* 2015; 10(3): e0120051, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120051>.

23. Васильев А.В. Влияние опиоида периферического действия даларгина на клеточную пролиферацию in vitro и репаративную регенерацию костной ткани in vivo. Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М; 2015. Vasil'ev A.V. *Vliyanie opioida perifericheskogo deystviya dalargina na kletochnuyu proliferatsiyu in vitro i reparativnuyu regeneratsiyu kostnoy tkani in vivo*. Avtoref. dis. ... kand. med. nauk [The influence of peripherally-acting opioid dalargin on cellular proliferation in vitro and reparative regeneration of bone tissue in vivo. PhD Thesis]. Moscow; 2015.

24. Burr D.B., Allen M.R. *Basic and applied bone biology*. Academic Press; 2013; 392 p.

25. *Handbook of histology methods for bone and cartilage*. An Y.H., Martin K.L. (editors). Springer Science + Business Media; 2003; 588 p., <https://doi.org/10.1007/978-1-59259-417-7>.

26. Karageorgiou V., Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005; 26(27): 5474–5491, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>.