

© Коллектив авторов, 2015

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕН-АКТИВИРОВАННОГО ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ОКТАКАЛЬЦИЕВОГО ФОСФАТА И ПЛАЗМИДНОЙ ДНК С ГЕНОМ VEGF В ВОСПОЛНЕНИИ «КРИТИЧЕСКИХ» КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ

И.Я. Бозо, Р.В. Деев, А.Ю. Дробышев, В.С. Комлев, С.И. Рожков, И.И. Еремин, И.Г. Далгатов, Г.А. Воложин, В.И. Грачев, А.Ю. Федотов, А.А. Исаев

Институт стволовых клеток человека, Москва; ГБОУ ВПО «Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова», Москва; ФГБУ «Государственный научный центр Российской Федерации — Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна» ФМБА России, Москва; ФГАОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань; ФГБУН «Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова» РАН, Москва; ГБОУ ВПО «Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова», Москва; рентгенодиагностические лаборатории «3Dlab», Москва, РФ

Ген-активированные остеопластические материалы являются принципиально новым классом медицинских изделий для костной пластики. В исследовании проведена оценка биологического действия материала на основе октакальциевого фосфата и плазмидной ДНК с геном сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), имплантированного в дефекты теменных костей кроликов диаметром 10 мм. Выявлено формирование костного регенерата вокруг гранул материала даже в центральной части дефекта, а также наличие костного мозга в межтрабекулярном пространстве на сроке 60 сут. В контроле — имплантация носителя без генных конструкций — регенерация осуществлялась главным образом со стороны краев костного дефекта. Использование ген-активированного остеопластического материала приводило к выраженной остеоиндукции, обеспечившей ускорение и повышение интенсивности новообразования костной ткани.

Ключевые слова: ген-активированный остеопластический материал, октакальциевый фосфат, плазмидная ДНК с геном *vegf*, дефекты теменных костей.

Efficacy of Gen-Activated Osteoplastic Material Based on Octacalcium Phosphate and Plasmid DNA containing vegf Gene for Critical-sized Bone Defects Substitution

I.Ya. Bozo, R.V. Deev, A.Yu. Drobyshev, V.S. Komlev, S.I. Rozhkov, I.I. Eryomin, I.G. Dalgatov, G.A. Volozhin, V.I. Grachyov, A.Yu. Fedotov, A.A. Isaev

Human Stem Cells Institute, Moscow; A.I. Evdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow; A.I. Burnazyan Federal Medical and Biophysical Center, Moscow; Kazan (Volga region) Federal University, Kazan; A. A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Moscow; I.M. Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow; X-ray Diagnostics Laboratories «3D Lab», Moscow, Russia.

Gene-activated osteoplastic materials are a principally new class of medical devices for bone plasty. The purpose of the study was to evaluate the biological action of the material based on octacalcium phosphate and plasmid DNA containing vascular endothelial growth factor (VEGF) gene. Study material was implanted into 10 mm diameter rabbit parietal bone defects. Formation of bone regenerates around material granules even in the center of the defect and the presence of bone marrow in intertrabecular space on day 60 after implantation was detected. In control group of animals — implantation of carrier without gene constructions — regeneration took place mainly on the bone defect margins. Use of gene-activated osteoplastic material resulted in pronounced osteoinduction that provided both acceleration of the regeneration and increase of new bone tissue formation intensity.

Key words: gene-activated osteoplastic materials, octacalcium phosphate, plasmid DNA containing *vegf* gene, parietal bone defects.

Остеопластические материалы являются высоко востребованными медицинскими изделиями, они показаны для замещения костных дефектов и восполнения участков атрофии костной ткани [1–3]. Только в США, по данным Национального центра статистики здравоохранения, в 2010 г. общее ко-

личество операций с применением остеопластических материалов у пациентов травматолого-ортопедического профиля составило не менее 1,3–1,5 млн [4].

Абсолютное большинство разрешенных для клинического применения остеопластических ма-

териалов имеют ограниченную эффективность, так как оказывают только остеокондуктивное действие, не содержат биологически активные компоненты, стандартизированные по качественным и количественным показателям и способные обеспечить остеоиндукцию и (или) остеогенность [5].

В этой связи разработки более эффективных остеопластических материалов высоко актуальны и ведутся в рамках трех биотехнологических направлений: постгеномного, клеточного и генного, которые разделены таким образом по природе биологически активного компонента, входящего в их состав — факторы роста, клетки или генные конструкции соответственно.

Первые два подхода имеют ряд недостатков. В частности, факторы роста в условиях операционной раны быстро разрушаются, являются короткоживущими, что не позволяет «протеин-активированному» остеопластическому материалу в полной мере реализовать свое действие. Тканеинженерные костные графты недостаточно эффективны в случае протяженных костных дефектов из-за гибели большинства клеток, входящих в состав; также имеются сложности правового регулирования и регистрации медицинских изделий, содержащих живые клетки. Тем не менее оба указанных направления уже имеют прецеденты успешного внедрения в клиническую практику. При этом более перспективные ген-активированные остеопластические материалы, лишенные недостатков первых двух групп, до недавнего времени как в России, так и за рубежом находились на стадии доклинических испытаний. Отчасти такое отставание коррелирует с меньшим количеством исследований, проведенных в рамках генной терапии, по сравнению с двумя другими биотехнологическими подходами.

Внедрение на территории Российской Федерации и Украины геннотерапевтического лекарственного препарата «Неоваскулген» (Институт стволовых клеток человека, Россия), обладающего ангиогенной активностью, стало научно-техническим заделом в разработке ген-активированных остеопластических материалов. Учитывая критическую значимость ангиогенеза в репаративной регенерации костной ткани [6], представлялось целесообразным использовать плазмидную ДНК с геном, кодирующим сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), для создания ген-активированного остеопластического материала.

Целью данного исследования являлась оценка биологического действия ген-активированного остеопластического материала, состоящего из октакальциевого фосфата (ОКФ) и плазмидной ДНК с геном *vegf*, в ортотопических условиях — в модели костного дефекта «критических» размеров.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Октакальциевый фосфат. Керамические гранулы ОКФ получали обработкой солями ортофос-

форной кислоты карбоната кальция согласно [7]. На первом этапе гранулы карбоната кальция переводили в дикальцийфосфат дигидрат (ДКФД) в растворах солей ортофосфорной кислоты (40°C, pH 4,1–5,5; 7 сут). Затем проводили гидролиз ДКФД с образованием ОКФ в растворе ацетата натрия (37°C, значение pH ? 6,5; 7 сут).

Ген-активированный остеопластический материал. Совмещение гранул ОКФ и плазмидной ДНК с геном *vegf* выполняли по ранее разработанному лабораторному протоколу [8]. Лекарственный препарат «Неоваскулген» разводили в воде для инъекций согласно инструкции производителя. Отмытые в растворах фосфатного буфера различных концентраций гранулы ОКФ инкубировали с раствором плазмидной ДНК в течение 10 ч при постоянном встряхивании и температуре 37°C. Затем раствор с неабсорбированными генными конструкциями эвакуировали, ген-активированный материал подвергали сушке при температуре 37°C в течение 10 ч.

Дизайн исследования. Исследование выполнено на 15 кроликах породы Шиншилла массой 2–2,5 кг обоего пола с соблюдением международных правил гуманного обращения с лабораторными животными. У каждого животного формировали по два одинаковых симметричных полнослойных дефекта обеих теменных костей диаметром по 10 мм, которые являются «критическими» для кроликов, так как естественный восстановительный процесс без каких-либо оптимизирующих влияний не завершается полной консолидацией. В дефекты правых теменных костей имплантировали ген-активированный остеопластический материал (экспериментальная группа), состоящий из ОКФ и плазмидной ДНК с геном *vegf*, в дефекты левых теменных костей — носитель без плазмидной ДНК (контрольная группа).

Протокол операции. После премедикации (атропин 0,04 мг/кг, цефазолин 25 мг/кг внутримышечно) и седации (золетил 100 в концентрации 10 мг/кг), асептической обработки операционного поля под инфильтрационным обезболиванием (ультракаин 1,7 мл) производили линейный разрез мягких тканей до надкостницы в проекции сагиттального шва от бугра затылочной кости кпереди длиной 2–2,5 см. Кожу и мышцы отводили латерально с обнажением надкостницы. Затем рассекали надкостницу, надкостничные лоскуты отводили латерально с обнажением поверхности теменных костей. У каждого животного с помощью трепана (наружный диаметр 10 мм) формировали дефекты теменных костей без повреждения твердой мозговой оболочки (рис. 1). Костные дефекты заполняли исследуемыми материалами. Операционную рану ушивали послойно узловыми швами Vicryl 4/0 (надкостница, мышцы), 5/0 (кожа). Сведение краев рассеченной надкостницы узловыми швами обеспечивало надежную фиксацию имплантированных материалов в пределах костных дефектов.

Животных выводили из эксперимента путем передозировки зоветила через 30, 60 и 90 сут. Удаляли крышу черепа с зонами ранее выполненных дефектов, фиксировали в 4% растворе нейтрального формалина и подвергали дальнейшим исследованиям.

Конусно-лучевую компьютерную томографию эксплантированных материалов выполняли не позднее 7 сут после фиксации в 4% растворе нейтрального формалина на компьютерном томографе J. Morita 3D Accuitomo 170 («J. Morita Corporation», Япония). Каждый образец сканировали отдельно, не извлекая его из банки с фиксирующим раствором, при одинаковых режимах и параметрах экспозиции: размер воксела 0,08 мм, 80кВ, 2 мА.

Анализ томограмм проводили стандартными инструментами в программном обеспечении Planmeca Romexis viewer («Planmeca Oy», Финляндия). Плотность регенерата измеряли в аксиальной плоскости в относительных единицах, приближенных к единицам Хаунсфилда (HU) на трех уровнях: наружная, внутренняя кортикальные пластинки, а также в срединной плоскости (уровень губчатого вещества). Для измерений использовали инструмент ROI (region of interest) округлой формы, подбирая диаметр круга в 10 мм и точно позиционируя его в границах ранее выполненных костных дефектов. Из трех полученных значений плотности регенерата в области костного дефекта (на трех уровнях в аксиальной проекции) рассчитывали показатели для статистического анализа.

Гистологическое исследование. После декальцинации в растворе Биодек-Р («Bio-optica», Италия) крышу черепов разделяли на две половины по сагитальному шву. Затем выполняли разрез во фронтальной плоскости через середину ранее выполненного костного дефекта. Для последующего гистологического анализа использовали дистальную (затылочную) половину теменной кости с регенератом. Избыток костной ткани со стороны затылочной кости отсекали. Микропрепараты изготавливали по стандартной методике. Выполняли окраску срезов гематоксилином и эозином, а также трихромными красителями (по Маллори или Массону — Голднеру). Все изготовленные препараты подвергали сканированию (Mirax scanner, Carl Zeiss), цифровые изображения анализировали при различных увеличениях. Для количественной оценки костного регенерата в зоне имплантации материалов выполняли гистоморфометрический анализ по стандартному протоколу. На первом этапе в программе анализа цифровых изображений Panoramic Viewer («3DHISTECH Ltd», США) определяли границы костных дефектов, выполняли разметку гистотопограммы на 4 равные части по

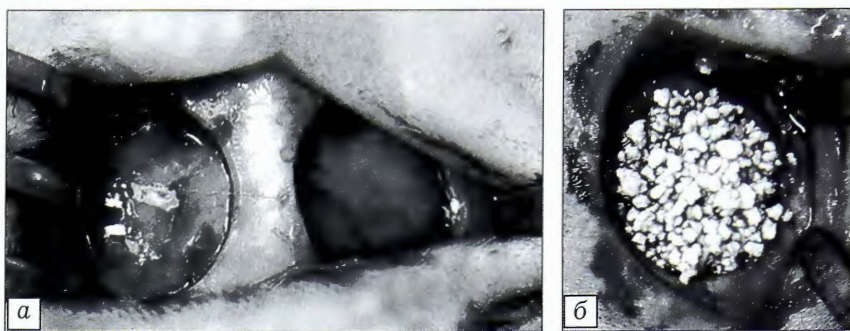


Рис. 1. Дефекты теменных костей кролика диаметром 10 мм.

а — до имплантации остеопластических материалов, б — после имплантации ген-активированного остеопластического материала.

2,5 мм: 2 периферических и 2 центральных. Две внутренние обозначались как одна центральная зона, две крайние — как одна периферическая. В каждой из четырех частей гистотопограммы определяли долю костного регенерата с использованием программы ImageJ (National Institutes of Health, США).

Статистический анализ. На первом этапе для статистического анализа полученных данных (плотность регенерата в области костного дефекта, доля костного регенерата в зонах дефекта, диаметр гранул остеопластических материалов) были использованы описательные методы: определение среднего значения, медианы, среднего квадратического отклонения, стандартной ошибки среднего значения, нижнего и верхнего квартилей. Затем определено соответствие распределения выявленных количественных параметров в каждой группе (серии) закону нормального распределения с помощью критерия Шапиро — Уилка. В случае непараметрического распределения количественных признаков для одновременного сравнения более двух независимых групп использовали непараметрический критерий Краскелла — Уоллиса, а для выявления различий между двумя независимыми группами по-отдельности — *U*-критерий Манна — Уитни с поправкой Бонферрони. Для сравнения количественных параметров на разных сроках в пределах одной группы применяли критерий Вилкоксона. Во всех случаях уровень статистической значимости различий был принят за $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследования ни одно из лабораторных животных не погибло до срока выведения. В процессе ежедневного динамического наблюдения не было выявлено ни одного случая значимого изменения поведенческих реакций и аппетита. Послеоперационные раны у всех животных зажили первичным натяжением. Ни в одном случае не было зафиксировано каких-либо побочных явлений общего или местного характера.

По данным конусно-лучевой компьютерной томографии через 30 сут в контрольной группе границы дефектов теменных костей прослеживались более четко, чем в случае применения ген-акти-

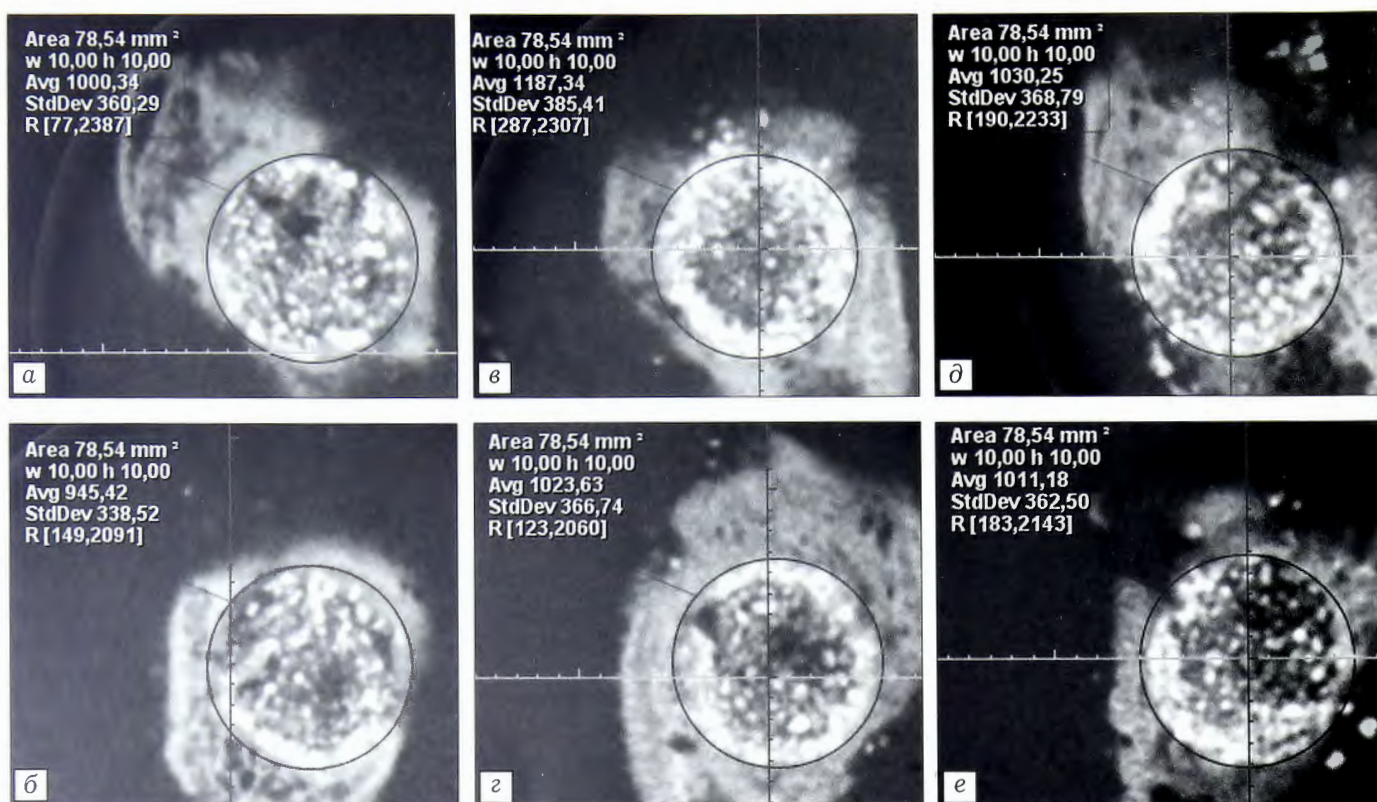


Рис. 2. Данные конусно-лучевой компьютерной томографии (аксиальная проекция) зон дефектов теменных костей кроликов, заполненных исследуемыми материалами, через 30 (а, б), 60 (в, г) и 90 (д, е) сут после имплантации. а, в, д — контрольная группа; б, г, е — экспериментальная группа. Кругом обозначена область интереса (ROI).

вированного остеопластического материала. В обеих группах костные дефекты были заполнены рентгенконтрастными гранулами материалов повышенной по сравнению с окружающей костной тканью плотности по НУ. Большинство гранул материалов определялись как дискретные участки повышенной рентгенконтрастности. Между гранулами имплантированного материала выявлялись участки пониженной плотности. Средняя плотность по площади костного дефекта (при диаметре 10 мм — 78,54 мм²) в контрольной группе составила от 944,3±361,4 до 1061±412,2 НУ, а в экспериментальной — от 916,2±418,6 до 1177,5±329,3 НУ (рис. 2, а, б).

Через 60 сут границы костных дефектов в обеих группах прослеживались менее четко: практически не определялась зона пониженной рентгенконтрастности между расположенными на периферии гранулами материалов и краями костного дефекта, наблюдалось внедрение гранул материала в окружающую дефект костную ткань. Характерной особенностью также являлось увеличение плотности периферической зоны регенерата, что было обусловлено, вероятно, как смещением гранул ОКФ к периферии, так и образованием костной ткани со стороны теменных костей. При этом в центральной части определялись участки с резко пониженной плотностью: менее 100 НУ. Как и в случае с ОКФ, плотность периферической зоны регенерата (2–4 мм от края ранее выполненного

дефекта) увеличивалась (рис. 2, в, г). Средняя плотность тканей в зоне костного дефекта в контрольной и экспериментальной группах варьировала от 1153,8±362,2 до 1272,4±327,6 НУ и от 994,8±361,4 до 1098,3±418,6 НУ соответственно.

Через 90 сут в обеих группах края теменных костей плавно переходили в гранулы материалов, формируя нечеткую, трудно различимую, неровную границу. Кроме того, как в контрольной, так и в экспериментальной группе наблюдалось увеличение минимальной плотности регенерата в центральной части костного дефекта до 200–220 НУ, что, по-видимому, обусловлено новообразованием костной ткани и ее минерализацией. Гранулы в периферической зоне характеризовались меньшей дискретностью: большинство гранул сливались в относительно гомогенные участки с повышенной плотностью, что могло быть обусловлено объединением их костным регенератом (рис. 2, д, е). Средняя плотность тканей в зоне ранее выполненного костного дефекта в контрольной группе составила от 986,5±384 до 1106,5±391,6 НУ, а в экспериментальной — от 1010,3±374,7 до 1275,3±368,3 НУ.

В целом в экспериментальной группе средняя плотность тканей в зоне костного дефекта на всех сроках наблюдения несколько превышала значение показателя в контроле, хотя различия не были статистически значимыми (рис. 3).

По данным гистологического исследования через 30 сут в обеих группах большая часть костного

дефекта была выполнена реактивно измененной рыхлой волокнистой соединительной тканью (РВСТ), окружающей гранулы материалов. Образование костной ткани наблюдалось главным образом со стороны опилов теменных костей: средняя протяженность костного регенерата с периферии составила 1–1,5 мм. В контроле вокруг некоторых гранул ОКФ, расположенных на расстоянии 3 мм от границ дефекта, определялись участки репаративного остеогистогенеза в виде «ободков» новообразованной ретикулофиброзной костной ткани толщиной от 10 до 105 мкм. Однако большая часть гранул, в том числе в центральной части дефекта, была окружена только РВСТ без признаков остеогистогенеза, с единичными гигантскими многоядерными клетками инородных тел и остеокластами. В экспериментальной группе большинство гранул, локализованных в центральной части дефекта (в 2,5–2,8 мм от края растущего с периферии регенерата), было окружено новообразованной костной тканью.

Через 60 сут после имплантации ОКФ центральная часть дефекта диаметром 6,5–7 мм была заполнена преимущественно РВСТ, протяженность костного регенерата из опилов теменных костей составила более 3 мм (рис. 4, а). В ряде случаев даже в центральной части дефекта определялись единичные гранулы ОКФ, окруженные новообразованной костной тканью (рис. 4, б). В образцах с ген-активированным остеопластическим материалом новообразованная костная ткань определялась на всем протяжении костного дефекта (рис. 4, в). Около 3 мм центральной части все еще были выполнены преимущественно РВСТ, хотя вокруг гранул, локализующихся даже в этой зоне, наблюдался костный регенерат (рис. 4, г). Только в экспериментальной группе на данном сроке был выявлен красный костный мозг между трабекулами регенерата, исходящего из опилов теменных костей. В ряде полей зрения «ниши» костного мозга были ограничены гранулами ген-активированного материала, непосредственно контактирующими с клетками стромы (см. рис. 4, в).

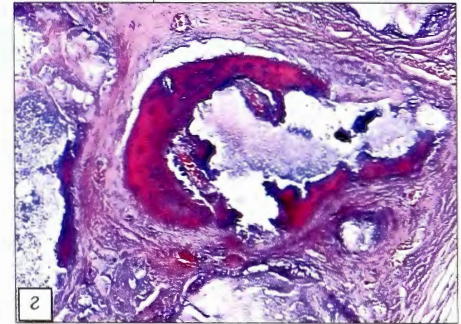
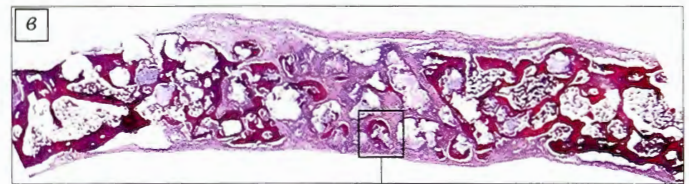
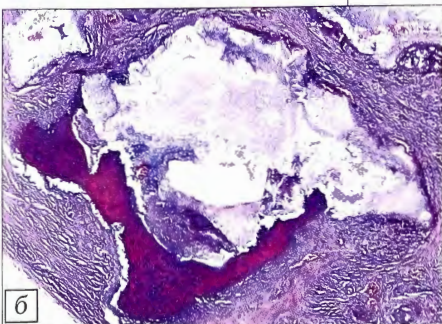
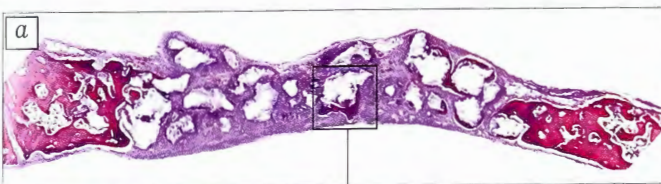


Рис. 4. Гистотопограммы дефектов теменных костей кроликов контрольной (а, б) и экспериментальной (в, г) групп через 60 сут после имплантации. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.: а, в ×40; б, г ×250.

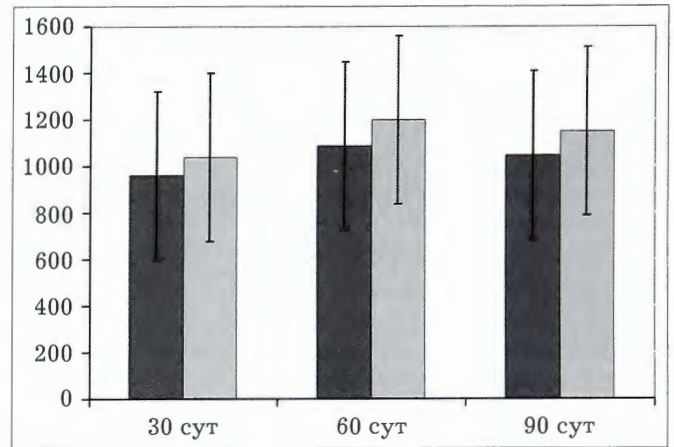


Рис. 3. Изменение средней плотности тканей (в HU) в пределах дефектов теменных костей на разных сроках наблюдения после имплантации исследуемых материалов. Здесь и на рис. 5: ■ — контрольная группа; ■ — экспериментальная группа.

Через 90 сут в контроле костный регенерат простирался от одного опилов теменной кости до другого. В периферических зонах новообразованная костная ткань была более объемной, ремоделированной в пластинчатую; в центральной части дефекта — прослеживалась только вокруг гранул имплантированного материала. Участки дефекта, свободные от гранул, были выполнены РВСТ. В экспериментальной группе наблюдалась практически полная консолидация костного дефекта. В каждом случае определялся лишь небольшой участок протяженностью менее 1 мм, выполненный РВСТ. Большая же часть дефекта была замещена новообразованной костной тканью, частично ремоделированной в пластинчатую. Трабекулы костного регенерата с инкрустированными в них гранулами материала формировали единую, связанную структуру. Костный мозг определялся в периферических зонах новообразованной костной ткани.

Вышеуказанные результаты были подтверждены количественно гистоморфометрическим анализом. Если доля костного регенерата в периферической зоне в обеих группах была сопоставима, то

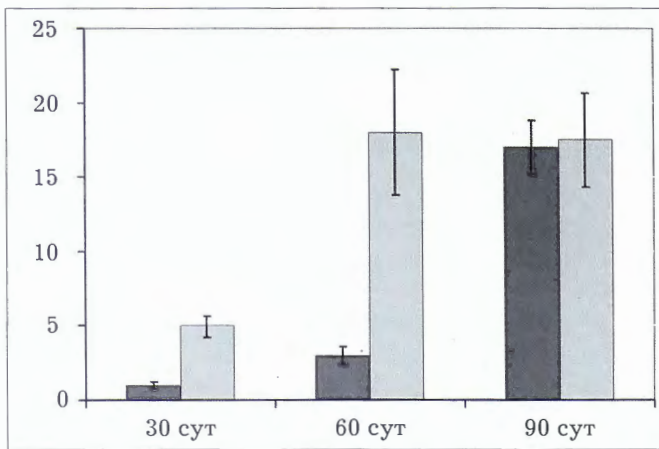


Рис. 5. Доля (в %) костного регенерата в центральной части костных дефектов на разных сроках после имплантации исследуемых материалов.

в центральной зоне различия, особенно на ранних сроках наблюдения, были статистически значимы. На сроке в 60 сут в случае использования ген-активированного материала показатель превышал таковой в группе с ОКФ в 5,3 раза. При этом к сроку в 90 сут доля костного регенерата в центре дефекта в обеих группах практически выравнивалась (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Основу биологического действия ген-активированных остеопластических материалов обеспечивают генные конструкции, входящие в их состав [9–11]. За более чем 10 лет разработок в данной области количество исследуемых генных конструкций с учетом вариаций векторов (вирусные и невирусные) и трансгенов превысило 60. Выбор же плазмидной ДНК с геном *vegf* — действующего вещества лекарственного препарата «Неоваскулген», был продиктован, с одной стороны, доказанной безопасностью и ангиогенной активностью, а с другой — подтвержденным индуцирующим влиянием ангиогенеза на образование костной ткани. Ряд авторов ранее уже использовали аналогичные генные конструкции, но с другими носителями (коллаген и β -трикальция фосфат) для создания ген-активированных материалов, которые показали в иных ортотопических модельных системах положительное на репаративный остеогистогенез влияние [12, 13].

В качестве носителя для генных конструкций нами был выбран новый кальцийфосфатный материал — ОКФ, так как в ряде исследований уже была показана способность данного материала оптимизировать репаративную регенерацию костной ткани [7, 14], а также зарегистрирован протокол клинического исследования ОКФ в рамках стоматологических показаний (НСТ02155764) [15]. Данные, полученные нами в контрольной группе, подтвердили наличие у ОКФ выраженных остеокондуктивных свойств, обеспечивших формирование костного регенерата на всем протяжении дефекта

через 90 сут после имплантации материала. Без использования каких-либо материалов до 80% площади дефекта теменной кости кролика с исходным диаметром 10 мм остается заполненным только РВСТ [8, 15]. Гранулы ОКФ были тесно связаны с формирующейся костной тканью без образования вокруг них соединительнотканной капсулы, а регенерат распространялся от периферии к центру в виде «мостиков», соединяющих соседние гранулы материала. Кроме того, наличие участков новообразованной костной ткани вокруг единичных гранул ОКФ в центральной части дефектов может свидетельствовать о некотором остеиндуктивном действии материала.

Однако выраженность остеиндуктивных свойств ОКФ недостаточна для существенного ускорения и повышения активности репаративного остеогистогенеза. В этой связи уже предпринимались попытки наделить его такими свойствами за счет совмещения с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками, т.е. в составе альтернативного варианта активированного материала — тканеинженерного. Несмотря на успешные результаты исследования *in vitro* и *in vivo*, в гетеротопических условиях костный регенерат не формировался [16].

В настоящем исследовании ген-активированный материал из ОКФ и плазмидной ДНК с геном *vegf* продемонстрировал две важные особенности, выгодно отличающие его от ОКФ без биологически активных компонентов. Первая заключается в выраженной остеиндукции, подтверждением которой является тот факт, что уже на ранних сроках наблюдения гранулы материала в центральной части дефекта, не связанные с периферическим регенератом, были окружены новообразованной костной тканью. Если в случае ОКФ такие участки были единичны, то значимо большее количество гранул ген-активированного материала являлись источниками образования костной ткани. Важно, что аналогичная остеиндукция была показана в той же модельной системе и для других вариантов ген-активированных материалов, состоящих из плазмидной ДНК с геном *vegf* и носителей из коллагена-гидроксиапатита и ксеногенного костного матрикса [8]. Вторая особенность биологического действия заключается в заселении пространств между трабекулами костного регенерата и гранулами ген-активированного остеопластического материала уже через 60 сут после его имплантации.

В результате наиболее существенная разница в динамике репаративного процесса между экспериментальной и контрольной группой была обнаружена на сроке 60 сут. Доля костного регенерата после имплантации ген-активированного остеопластического материала была существенно выше прежде всего за счет образования костной ткани в центральной части дефекта. Фактически гистологическая картина в экспериментальной группе через 60 сут после операции была сопоставима с та-

ковой в контроле на сроке 90 сут. Иными словами, остеоиндуктивное действие ген-активированного материала позволило существенно ускорить репаративный остеогистогенез.

Хотя признаки биодеградации материалов выявлялись уже с 30 сут, в обеих экспериментальных группах гранулы сохранялись на всем протяжении костного дефекта вплоть до крайнего срока наблюдения. При этом, оценивая кинетику репаративного остеогистогенеза, можно сделать вывод, что скорость биорезорбции материалов была существенно ниже скорости формирования костного регенерата. В связи с асинхронностью указанных процессов гранулы ОКФ были «инкрустированы» в новообразованную костную ткань, вероятно, препятствуя дальнейшей консолидации дефектов. Выявленные данные требуют дальнейшей детализации с использованием более длительных сроков наблюдения и методов, позволяющих точнее оценить процесс биодеградации материалов.

Учитывая исходно высокую плотность ОКФ, превышающую 1800 НУ, и длительность биодеградации материала в выбранной модельной системе, с помощью компьютерной томографии не удалось объективно оценить динамику репаративного процесса. Однако данный метод исследования позволил осуществлять контроль количества имплантированного материала, равенства размеров дефектов, а также, в определенной степени, оценивать кинетику биодеградации материала и качественных изменений структуры регенерата.

Заключение. Разработанный ген-активированный материал обеспечивает ускорение и повышение интенсивности репаративного остеогистогенеза даже в случае восполнения костных дефектов критических размеров. Однако, несмотря на выявленное влияние ген-активированного материала на образование костной ткани, требуют дальнейшего изучения фундаментальные вопросы, касающиеся его механизма действия, кинетики высвобождения генных конструкций из структуры носителя, эффективности трансфекции и длительности экспрессии терапевтического белка. Отчасти ответы на поставленные вопросы уже были получены в ходе исследования других вариантов ген-активированных материалов, что в сочетании с подтвержденной безопасностью позволило перейти к стадии клинических исследований.

Благодарности

Авторы выражают благодарность С.Л. Киселеву, К.В. Никитину, Я.В. Толь за участие в исследовании. Работа выполнена при финансовой поддержке Фонда содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере.

ЛИТЕРАТУРА [REFERENCES]

1. Дробышев А.Ю., Рубина К.А., Сысоева В.Ю. и др. Клиническое исследование применения тканеинженерной конструкции на основе аутологичных стромальных клеток из жировой ткани у пациентов с де-

фицитом костной ткани в области альвеолярного отростка верхней челюсти и альвеолярной части нижней челюсти. Вестник экспериментальной и клинической хирургии. 2011; IV (4): 764–72 [Drobyshev A.Yu., Rubina K.A., Sysoeva V.Yu., et al. Clinical study of the use of tissue engineered constructions based on human adipose tissue-derived stromal cells in patients with bone tissue deficit in the region of alveolar process of the maxilla and alveolar part of the mandible. Vestnik eksperimental'noy i klinicheskoy khirurgii. 2011; IV (4): 764–72 (in Russian)].

2. Кулаков Л.А., Робустова Т.Г., Неробеев Л.И., ред. Хирургическая стоматология и челюстно-лицевая хирургия: Национальное руководство. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2010 [Kulakov L.A., Robustova T.G., Nerobeev L.I., ed. Surgical dentistry and maxillofacial surgery: National manual. Moscow: GEOTAR-Media; 2010 (in Russian)].
3. Лекишвили М.В., Родионова С.С., Ильина В.К., Косымов И.А., Юрасова Ю.Б., Семенова Л.А., Васильев М.Г. Основные свойства деминерализованных костных аллоимплантатов, изготавливаемых в тканевом банке ЦИТО. Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2007; 3: 80–6 [Lekishvili M.V., Rodionova S.S., Il'ina V.K., Kosymov I.A., Yurasova Yu. B., Semyonova L.A., Vasil'ev M.G. Main characteristics of demineralized bone allografts produced at CITO tissue bank. Vestnik travmatologii i ortopedii im. N.N. Priorova. 2007; 3: 80–6 (in Russian)].
4. http://www.cdc.gov/nchs/data/nhds/10DetailedDiagnosesProcedures/2010det10_alllistedprocedures.pdf
5. Омеляненко Н.П., Миронов С.П., Денисов-Никольский Ю.И., Матвейчук И.В., Дорохин А.И., Карпов И.Н. Современные возможности оптимизации репаративной регенерации костной ткани. Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2002; 4: 85–8 [Omel'yanenko N.P., Mironov S.P., Denisov-Nikol'skiy Yu.I., Matveichuk I.V., Dorokhin A.I., Karpov I.N. Modern possibilities for optimization of bone tissue reparative regeneration. Vestnik travmatologii i ortopedii im. N.N. Priorova. 2002; 4: 85–8 (in Russian)].
6. Santos M.I., Reis R.L. Vascularization in bone tissue engineering: physiology, current strategies, major hurdles and future challenges. Macromol. Biosci. 2010; 10 (1): 12–27.
7. Komlev V.S., Barinov S.M., Bozo I.I., Deev R.V., Eremin I.I., Fedotov A.Y. et al. Bioceramics composed of octacalcium phosphate demonstrate enhanced biological behaviour. ACS Appl. Mater. Interfaces 2014; 6 (19): 16610–620.
8. Деев Р.В., Дробышев А.Ю., Бозо И.Я., Галецкий Д.В., Королев В.О., Еремин И.И. и др. Создание и оценка биологического действия ген-активированного остеопластического материала, несущего ген VEGF человека. Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. 2013; VIII (3): 78–85 [Deev R.V., Drobyshev A.Yu., Bozo I.Ya., Galetskiy D.V., Korolyov V.O., Eryomin I.I., et al. Construction and biological effect evaluation of gene-activated osteoplastic material with human VEGF gene. Genes & cells. 2013; VIII (3): 78–85 (in Russian)].
9. Evans C.H. Gene delivery to bone. Adv. Drug Deliv. Rev. 2012; 64 (12): 1331–40.
10. Feichtinger G.A., Hofmann A.T., Slezak P., Schuetzenberger S., Kaipel M., Schwartz E. et al. Sonoporation increases therapeutic efficacy of inducible and constitutive BMP2/7 in vivo gene delivery. Hum. Gene Ther. Methods. 2014; 25 (1): 57–71.
11. Betz V.M., Betz O.B., Glatt V., Gerstenfeld L.C., Einhorn T.A., Bouxsein M.L. et al. Healing of segmental bone defects by direct percutaneous gene delivery: effect of vector dose. Hum. Gene Ther. 2007; 18 (10): 907–15.

12. Keeney M., van den Beucken J.J., van der Kraan P.M., Jansen J.A., Pandit A. The ability of a collagen/calcium phosphate scaffold to act as its own vector for gene delivery and to promote bone formation via transfection with VEGF(165). *Biomaterials*. 2010; 31 (10): 2893–2902.
13. Zhao D.M., Yang J.F., Wu S.Q., Qiu L.P., Liu J.L., Wang H.B. et al. Effect of vascular endothelial growth factor 165 gene transfection on repair of bone defect: experiment with rabbits. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*. 2007; 87 (25): 1778–82.
14. Гурин А.Н., Федотов А.Ю., Деев Р.В., Комлев В.С. Направленная регенерация костной ткани с использованием барьерной мембраны на основе альгината натрия и октакальциевого фосфата. *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. 2013; VIII (4): 70–7 [Gurin A.N., Fedotov A.Yu., Deev R.V., Komlev V.S. Sodium alginate bioresorbable membrane and octacalcium phosphate biomaterial for guided bone regeneration. *Genes & cells*. 2013; VIII (4): 70–7 (in Russian)].
15. Ridge Preservation With New Class of Osteoplastic Materials (RP). <http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02155764?term=octacalcium&rank=1>
16. Zorin V.L., Komlev V.S., Zorina A.I., Khromova N.V., Solovieva E.V., Fedotov A.Y. et al. Octacalcium phosphate ceramics combined with gingiva-derived stromal cells for engineered functional bone grafts. *Biomed. Mater*. 2014; 9 (5): 055005.
17. Gene-activated Matrix for Bone Tissue Repair in Maxillofacial Surgery. <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02293031?term=NCT02293031&rank=1>

Сведения об авторах: Деев Р.В. — канд. мед. наук, директор по науке ИСКЧ; Дробышев А.Ю. — доктор мед. наук, проф., зав. кафедрой челюстно-лицевой хирургии МГМСУ; Бозо И.Я. — челюстно-лицевой хирург, аспирант кафедры челюстно-лицевой хирургии МГМСУ; Комлев В.С. — доктор техн. наук, вед. науч. сотр. лаборатории керамических композиционных материалов; Рожков С.И. — аспирант кафедры факультетской хирургической стоматологии и имплантологии МГМСУ; Еремин И.И. — канд. мед. наук, рук. Центра биомедицинских технологий ФМБЦ им. А.И. Бурназяна; Далгатов И.Д. — студент Первого МГМУ им. И.М. Сеченова; Воложин Г.А. — канд. мед. наук, ассистент каф. факультетской хирургической стоматологии и имплантологии МГМСУ; Грачев В.И. — врач-рентгенолог, главный врач рентгенодиагностической лаборатории «3Dlab»; Федотов А.Ю. — канд. техн. наук, старший науч. сотр. лаборатории керамических композиционных материалов ИМЕТ РАН; Исаев А.А. — генеральный директор ИСКЧ.

Для контактов: Бозо Илья Ядигерович. 199333, Москва, ул. Губкина, д. 3, стр. 2. Тел.: +7 (965) 437–89–46. E-mail: bozo.ilya@gmail.com.

ВНИМАНИЮ АВТОРОВ!

При направлении статей в редакцию просим обращать особое внимание на правильность представления материала.

Библиографические списки составляются с учетом «Единых требований к рукописям, представляемым в биомедицинские журналы» Международного комитета редакторов медицинских журналов (Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals). Правильное описание используемых источников в списках литературы является залогом того, что цитируемая публикация будет учтена при оценке научной деятельности ее авторов и организаций, где они работают.

В оригинальных статьях допускается цитировать не более 30 источников, в обзорах литературы — не более 60, в лекциях и других материалах — до 15. Библиография должна содержать помимо основополагающих работ, публикации за последние 5 лет. В списке литературы все работы перечисляются в порядке цитирования. Библиографические ссылки в тексте статьи даются в квадратных скобках. Ссылки на неопубликованные работы не допускаются.

Библиографическое описание книги (после ее названия): город (где издана); после двоеточия название издательства; после точки с запятой год издания. Если ссылка дается на главу книги: авторы; название главы; после точки ставится «В кн.» или «In:» и фамилия(и) автора(ов) или редактора(ов), затем название книги и выходные данные.

Библиографическое описание статьи из журнала: автор(ы); название статьи; название журнала; год; после точки с запятой номер журнала (для иностранных журналов том, в скобках номер журнала), после двоеточия цифры первой и последней страниц. При авторском коллективе до 6 человек включительно упоминаются все, при больших авторских коллективах — 6 первых авторов «и др.», в иностранных «et al.»; если в качестве авторов книг выступают редакторы, после фамилии следует ставить «ред.», в иностранных «ed.»