

БИОРЕЗОРБЦИЯ И БИОДЕГРАДАЦИЯ ИЗДЕЛИЯ ИЗ ГЕН-АКТИВИРОВАННОГО ОКТАКАЛЬЦИЕВОГО ФОСФАТА, ИЗГОТОВЛЕННОГО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТРЕХМЕРНОЙ ПЕЧАТИ

Е.В. Пресняков¹, И.Я. Бозо^{2,3}, И.В. Смирнов⁴, В.С. Комлев^{4,5}, В.К. Попов⁵, А.В. Миронов⁵, Р.В. Деев^{6,7}

¹ Рязанский государственный медицинский университет им. И.П. Павлова, Рязань, Россия

² Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, Москва, Россия

³ ООО «Гистографт», Москва, Россия

⁴ Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва, Россия

⁵ Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, Россия

⁶ ПАО «Институт Стволовых Клеток Человека», Москва, Россия

⁷ Северо-Западный медицинский университет им. Мечникова, Санкт-Петербург, Россия

BIORESORPTION AND BIODEGRADATION OF THE 3D-PRINTED GENE-ACTIVATED BONE SUBSTITUTES BASED ON OCTACALCIUM PHOSPHATE

E.V. Presnyakov¹, I.Y. Bozo^{2,3}, I.V. Smirnov⁴, V.S. Komlev^{4,5}, V.K. Popov⁵, A.V. Mironov⁵, R.V. Deev^{6,7}

¹ I.P. Pavlov Ryazan State Medical University, Ryazan, Russia

² A.I. Burnazyana Federal Medical Biophysical Center, FMBA of Russia, Moscow, Russia

³ Histograft, LLC, Moscow, Russia

⁴ A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, RAS, Moscow, Russia

⁵ Federal Research Center "Crystallography and photonics", RAS, Moscow, Russia

⁶ Institute of Human Stem Cells, PJSC, Moscow, Russia

⁷ I.I. Mechnikov North-Western State Medical University, Saint Petersburg, Russia

e-mail:almazov.eugeny@yandex.ru

Ген-активированные материалы входят в клиническую практику, что является результатом увеличения активности исследований в этой области. В представляемом исследовании оценена биорезорбция и тканевая реакция на подкожную имплантацию изделия (диски диаметром 10 мм, толщиной 2 мм) из октакальциевого фосфата и плазмидной ДНК с геном *VEGF*, изготовленное с помощью трехмерной печати. В ходе исследования у крыс описывали динамику биорезорбции материалов в сравнении с контролем, которым служили изделия без генных конструкций. Через 60–90 сут. объемы матриц в обеих группах уменьшались в 2 раза, а диаметр на 20% к сроку 180 сут.; значимых различий по этим показателям между группами выявлено не было. По данным гистологического исследования, признаков длительно поддерживающегося воспаления в зонах имплантации не обнаружено, материалы окружались соединительнотканной капсулой.

Необходимы дальнейшие исследования по оценке влияния ген-активированных материалов, изготовленных с использованием разработанной технологии, на репаративный остеогенез.

Ключевые слова: ген-активированный материал, имплантация, биорезорбция, подкожный тест.

Введение

Аддитивные технологии находят все более широкое применение в медицине: изготовление персонализированных металлических и полимерных имплантатов для реконструкции костей [1], хирургических шаблонов для планирования и выполнения оперативных вмешательств [2], ортопедических конструкций в стоматологии [3] и т.п. Они становятся элементом высокотехнологичного лечения пациентов. Их внедрение в процесс изготовления синтетических биорезорбируемых изделий для костной пластики открывает значимые перспективы для развития реконструктивной хирургии, а также создает дополнительное преимущество материалам синтетического происхождения над натуральными (например, аллогенным и ксеногенным костными матриксами), поскольку персонализация последних выполняется лишь с использованием менее точных технологий фрезеровки стандартных «заготовок» изделий.

Среди синтетических материалов для костной пластики, в наибольшем количестве в клиническую практику внедрены различные изделия на основе

Gene-activated materials are getting translated to the clinical practice that is the result of increased research activity in this area. There is significant success in development of gene-activated materials for bone grafting procedures. In our study, we made the gene-activated bone substitute based on octacalcium phosphate and plasmid DNA with *VEGFA* gene using three-dimensional printing technologies (discs, size of 10×2 mm). During the subcutaneous test in rats, the dynamics of bioreabsorption of materials was evaluated in comparison with the control that was presented by the scaffold without gene constructs. 60–90 days after surgery, volumes of the implants twice decreased while the diameter declined by 20% at 180 days, and there were no significant differences between the groups related to these parameters. According to a histological examination, no signs of pronounced inflammation were found in the operation zone, the materials were surrounded by a connective tissue capsule.

Further studies are needed to evaluate the effect of gene-activated materials produced with the developed technology on reparative osteogenesis.

Keyword: gene-activated material, implantation, bioreabsorption, experiment, subcutaneous test.

β-трикальцийфосфата и гидроксиапатита в виде гранул [4]. Им на смену приходят остеопластические материалы на основе октакальциевого фосфата (ОКФ), отличающиеся большими площадью поверхности гранул за счет более развитого микрорельефа, скоростью биорезорбции, гидрофильностью поверхности [5]. Уже разработаны технологии трехмерной печати, позволяющие с высокой точностью изготавливать персонализированные имплантаты на основе ОКФ [6].

Отдельную категорию изделий для костной пластики представляют активированные остеопластические материалы. В 2019 году был зарегистрирован остеопластический материал «Гистографт» (ООО «Гистографт», Россия), ставший первым в мире ген-активированным остеопластическим материалом, разрешенным для применения в клинической практике. Изделие представляет собой гранулы ОКФ различных размеров с размещенными на их поверхности молекулами плазмидной ДНК, несущей ген сосудистого эндотелиального фактора роста (*VEGF*). Эта генная

конструкция является действующим веществом лекарственного препарата «Неоваскулген» (ПАО «Институт Стволовых Клеток Человека», Россия) [7, 8].

Наряду с биосовместимостью, остеокондукцией и остеиндукцией, важной характеристикой остеопластических материалов, как стандартизированных, так и персонализированных, является скорость биорезорбции, напрямую влияющая на качество костного регенерата в зоне имплантации изделия [9]. В этой связи, одним из первых этапов разработки персонализированного ген-активированного материала на основе ОКФ и плазмидной ДНК с геном *VEGF* являлась оценка этой характеристики в стандартной модели подкожной имплантации лабораторным животным, что стало предметом данного исследования.

Материал и методы

Дизайн исследования

Исследование выполнено на взрослых крысах-самцах ($n=24$) линии Wistar массой 150 г ($n=24$). Каждому животному одновременно имплантировались матриксы на основе ОКФ без плазмидной ДНК (контрольный образец) и ген-активированные материалы (исследуемый образец). Результаты эксперимента оценивали на сроках 15, 30, 90, 120, 180 сут. с помощью микрокомпьютерной томографии (микроКТ) и стандартного гистологического исследования.

Изготовление матриксов на основе ОКФ

Трёхмерная печать матриксов на основе ОКФ осуществлялась по ранее описанной методике, с использованием оригинального 3D-принтера [6]. Способ изготовления матриксов включал в себя 3 этапа. На первом этапе формировалась структура имплантата путем послойного добавления гранул α -трикальцийфосфата (ТКФ) в камеру 3D-принтера и полной пропитки связывающим раствором и дальнейшим получением трёхмерного изделия. На втором этапе изготовленный матрикс выдерживался в буфере до значения pH 5,5, при температуре $35\pm 2^\circ\text{C}$, в соотношении массы материала к жидкости 1/100 соответственно в течение 168 ч. В ходе этого процесса ТКФ объемного изделия трансформировался в дикальцийфосфат дигидрат (ДКФД). На заключительном этапе, полученный ранее матрикс выдерживался в новом буферном растворе, в условиях температуры $35\pm 2^\circ\text{C}$, при соотношении массы материала к жидкости 1/100 соответственно в течение минимум 168 ч. с получением трёхмерного матрикса на основе ОКФ. Посредством указанной технологии изготавливали непористые диски диаметром 10 мм и толщиной 2 мм.

Совмещение матриксов-носителей и плазмидной ДНК

Для изготовления ген-активированных имплантатов, использовали сверхскрученную голую плазмидную ДНК, несущую ген *VEGF*, полученную из препарата «Неоваскулген». Совмещение дисков на основе ОКФ с плазмидной ДНК осуществляли согласно ранее разработанному протоколу [10]. Кратко, диски промывали в 0,5 М растворе дигидрофосфата натрия ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, Химмед, Россия) при 37°C при постоянном встряхивании в течение 10 ч, затем отмывали 10 мМ раствором $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ в объёме 1 мл при 37°C и постоянном встряхивании 4 раза по 10 мин. Далее матриксы выдерживали при 37°C до полного

высыхания в течение 10 ч., после чего помещали в 10 мМ раствор $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ с плазмидной ДНК в концентрации 1 мкг/мкл. Затем изделие инкубировали в растворе плазмидной ДНК при 37°C и постоянном встряхивании в течение 10 ч., после чего отмывали не связавшуюся фракцию генных конструкций 5 мМ раствором $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ 3 раза.

Имплантация материалов

Исследование проводилось с соблюдением международных правил гуманного обращения с лабораторными животными [11]. После седации Sol. Zoletili 100 — 10 мг/кг внутримышечно и асептической обработки операционного поля, под инфильтрационной анестезией Sol. Lidocaini 1% — 2 мл производился срединный разрез кожи длиной 15 мм в нижней части спины крысы. Затем кожу отслаивали от подлежащих тканей и формировали карманы диаметром 20 мм по обе стороны от разреза, в которые помещались исследуемые остеопластические материалы. Операционную рану ушивали узловыми швами Polysorb 5/0.

Животных выводили из эксперимента передозировкой Sol. Zoletili 100, извлекали материалы, и фиксировали в отдельных емкостях в 10% растворе нейтрального формалина.

Микрокомпьютерная томография

Через 2 дня после фиксации материалов выполняли их микрокомпьютерную томографию (Sky Scan, Бельгия). После этого в программе VG Studio Max (Германия) формировали 3D-реконструкции изображений; определяли диаметр, объём и отношение площади поверхности к объёму имплантатов с помощью программного обеспечения Amira (Thermo Fisher Scientific, США). Из трёх полученных значений рассчитывали показатели для статистического анализа.

Гистологическое исследование

Фиксированные в забуференном 10% формалине материалы промывали в проточной воде в течение 60 мин., после чего проводили декальцинацию образцов поместив их в раствор Биодек-Р (Bio-Optica, Италия). Проводку материалов, заключение в парафиновые блоки и изготовление гистологических препаратов осуществляли по стандартной методике. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином. Описательно оценивали состояние соединительнотканной капсулы, ее клеточный состав, врастание в структуру материала элементов реактивно-измененных тканей; кроме этого, характеризовали структуру самого материала.

Статистический анализ

Для статистического анализа данных использовали программу Statistica 10.0 (StatSoft, США). Сравнение групп по количественным признакам выполняли с использованием U-критерия Манна-Уитни.

Результаты

Ни одно из лабораторных животных не погибло за время эксперимента. В период постоперационного наблюдения случаи изменения поведенческих реакций не наблюдали. У всех животных послеоперационные раны зажили первичным натяжением. В послеоперационном

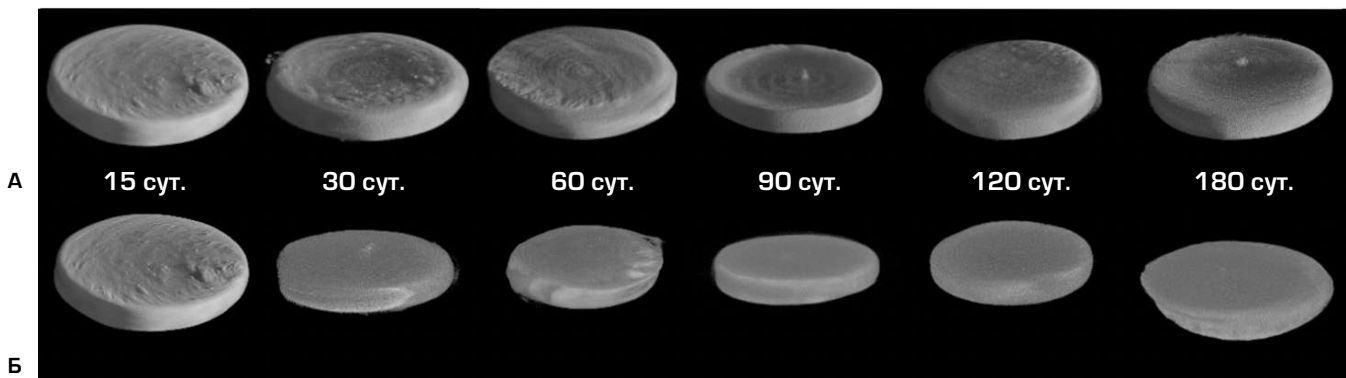


Рис. 1. Имплантаты, помещенные подкожно, через разные сроки наблюдения: А — контрольная группа (ОКФ без плазмидной ДНК); Б — экспериментальная группа (ОКФ с плазмидной ДНК). 3D-реконструкции данных микроКТ

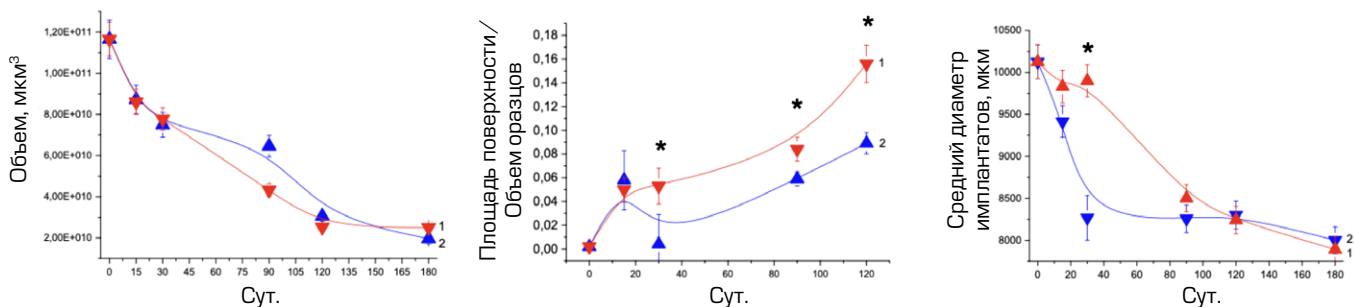


Рис. 2. Параметры биорезорбции имплантированных материалов (объем изделия, отношение площади поверхности изделия к его объему; средний диаметр имплантатов): синие кривые — экспериментальная группа, красные — контрольная. * различия значимы при межгрупповом сравнении ($p \leq 0,05$)

периоде не были выявлены осложнения общего и местного характера. Всех животных выводили из эксперимента в соответствии с планом исследования.

Исходный размер изготовленных имплантатов составил 10,1 × 0,2 мм, объем $116,53 \pm 8,16$ мм³, отношение поверхности к объему 0,002. Биорезорбция изделий *in vivo* происходила в зоне интимного прилегания к мягким тканям со стороны поверхности образцов. Постепенное уменьшение диаметра, объема и увеличение отношения поверхности имплантатов к объему наблюдалось как в случае контрольных образцов на основе ОКФ, так и в случае экспериментальных. В тестовой группе средний диаметр снижался более интенсивно с резким, статистически значимым падением к сроку 30 сут. с последующими стабилизацией и плавным снижением, в то время как в контрольной группе изменение диаметра имело практически линейный вид. К срокам 60–90 сут. наблюдалось уменьшение объема в два раза в контрольной и экспериментальной группах, соответственно ($p > 0,05$), а на сроке 180 сут. уменьшение объема достигало 85% в обеих группах. При этом уменьшение диаметра в обеих группах к сроку 180 сут. составляло не более 20–22%, что может быть экстраполировано на срок полурезорбции в 12 мес. По параметру отношения площади поверхности имплантатов к объему наблюдались статистически значимые различия между группами на сроках 30, 90 и 120 сут. (рис. 1, 2).

При гистологическом исследовании, в зоне имплантации матриц на основе ОКФ без плазмидной ДНК (контроль) на всех сроках наблюдения признаки воспаления не были обнаружены. На ранних сроках (15 сут.) вокруг имплантатов формировалась соединительнотканная капсула толщиной 50–70 мкм, ее клеточный состав в основном был представлен вытянутыми по оси фибробластами-фибробlastами; клеточные и тканевые элементы

не проникали в структуру изделий. Следует подчеркнуть, что, как и в контроле, к концу эксперимента капсула состояла преимущественно из плотной упорядоченной соединительной ткани с мощно развитыми коллагеновыми волокнами и умеренным количеством фиброцитов.

Материал на гистологических срезах характеризовался бифазностью: полигональные интенсивно-прокрашенные, визуально более плотные элементы были скреплены аморфным гомогенным материалом. Начиная с 45 сут. появлялись дефекты структуры на некоторых участках имплантатов, количество и размер которых к 180 сут. постепенно увеличивались, формируя собой «полости растворения» с фестончатыми краями, диаметром 30–50 мкм, что свидетельствует о протекании процессов биорезорбции. Гигантские многоядерные клетки инородных тел не формировались. Признаки врастания соединительной ткани внутрь имплантатов на 50–70 мкм от поверхности выявлены на единичных участках через 180 сут. после имплантации (рис. 3, 4). Выявленные временные особенности, позволяют говорить о том, что с периода 45–60 суток на смену фазе минимальной деградации образца приходит фаза достоверной деградации.

Как и в контроле, в группе ген-активированных материалов признаков воспаления не наблюдалось. При исследовании биорезорбции ген-активированных изделий, уже с 15 сут. после имплантации отмечалось разрыхление их структуры в некоторых участках и врастание единичных клеток соединительной ткани в их толщу. Покрывающая материал капсула интенсивно кровоснабжалась, что выражалось в большем количестве регистрируемых визуально полнокровных кровеносных сосудов, чем в контрольной группе, также она включала большое количество активных фибробластов. На сроках 45–120 сут. прослеживалось дальнейшее разрыхление структуры материала; в некоторых полях

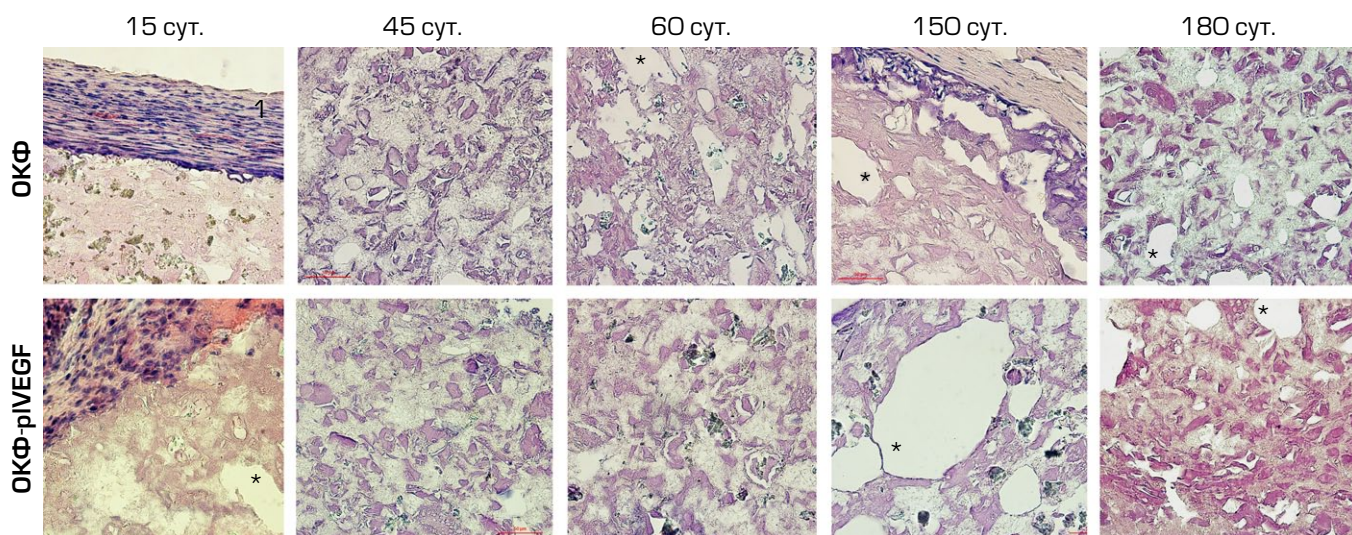


Рис. 3. Структура материала имплантатов на разных сроках эксперимента: 1 — соединительнотканная капсула; 2 — базофильный субкапсулярный слой с единичными фиброцитами; * — полости (поры) в материале. Окраска: гематоксилин и эозин. Ув. $\times 250$

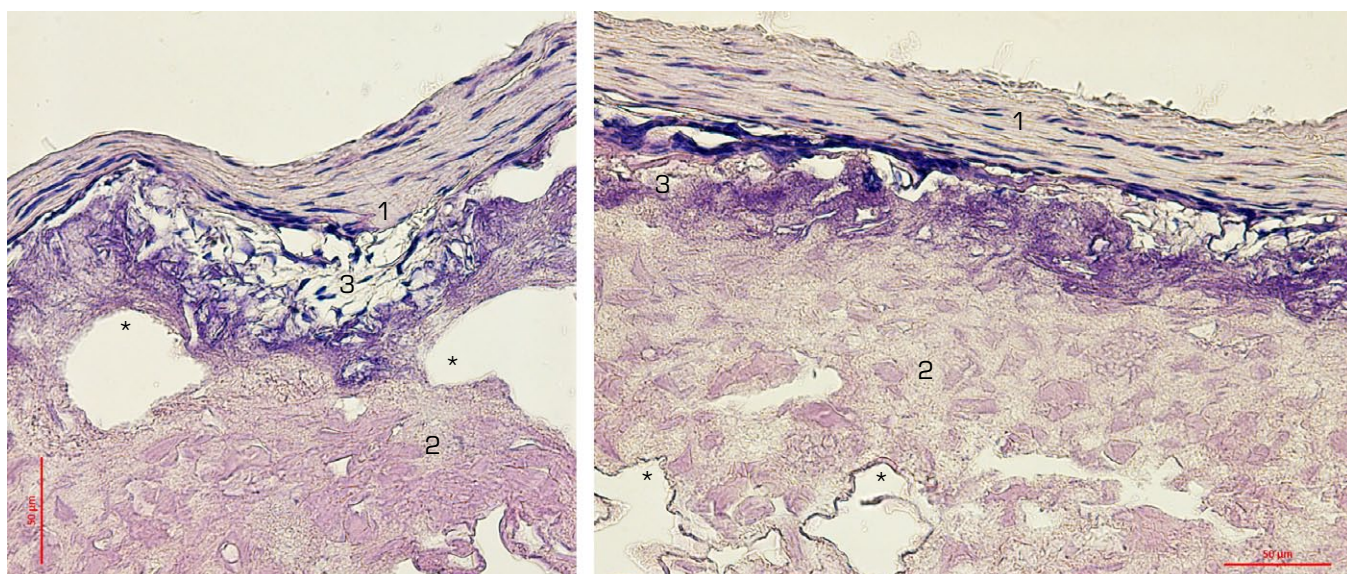


Рис. 4. Капсула вокруг образца из ОКФ при подкожной имплантации, 180 сут. эксперимента: 1 — плотная волокнистая соединительная ткань капсулы; 2 — материал; 3 — базофильный субкапсулярный слой с единичными фиброцитами; * — полости (поры) в материале. Окраска: гематоксилин и эозин. Масштабный отрезок — 50 мкм

зрения аморфный компонент был уменьшен в объеме и деформирован («смят»). Для изделий этой группы была характерна большая степень узурирования краев ген-активированных матриксов. Характерной особенностью образцов через 150–180 сут. являлась высокая пористость: значительную долю объема (около 60%) занимали оптически пустые вакуоли, диаметром 200–250 мкм. Соединительная ткань врастала на глубину 100–150 мкм. В целом, персонализированные ген-активированные материалы имели более выраженный биорезорбционный профиль, а фаза достоверной деградации образца была достоверно определена с 45 суток.

Обсуждение

Как известно, керамические материалы в условиях *in vivo* подвергаются биodeградации (разрушение структуры под действием физико-химических условий в зоне имплантации) и биорезорбции (процессы деструкции, обусловленные морфофункциональной активностью специализированных клеток реципиентного ложа).

Для устранения дефектов небольших размеров возможно использование аутокостных трансплантатов или ординарных остеопластических материалов. Однако в случае объемных дефектов, сопряженных с «остеогенной недостаточностью», помимо восстановления объема утраченной костной ткани, требуется компенсировать функцию камбиального резерва и остеоиндуцирующих факторов [12], в том числе и за счет применения экзогенных биологически активных компонентов для высокотехнологических изделий. Аддитивный подход к изготовлению костных имплантатов формирует дополнительное подспорье для решения проблемы лечения пациентов с протяженными дефектами костей, т.к. позволяют создавать изделия, точно соответствующие геометрическим особенностям дефекта.

Тест гетеротопической имплантации изделия из костнопластических материалов может преследовать различные цели, базовыми из которых является оценка влияния его компонентов на живые ткани (цито- и тканетоксичность), способность индуцировать разнообразные гистогенетические реакции, а также определение скорости

биорезорбции [13]. Представленный эксперимент не преследовал целью определить возможность индукции гетеротопического остеогенеза, для реализации которого необходимо сочетать иные остеогенные факторы.

Поскольку макро- и микропоры неизбежно меняют динамику биодеградации имплантата, для оценки базовой, наиболее длительной, скорости биорезорбции мы изготавливали непористые имплантаты. Было выявлено, что биодеградация по объему составляла 50% к срокам 60 и 90 сут. в контрольной и экспериментальной группах, соответственно. Динамика уменьшения диаметра матрикса в обеих группах была сходной, кроме срока в 30 сут., на котором наблюдалось статистически значимое снижение в экспериментальной группе, составив 20% к 180 сут. Более интенсивное уменьшение объема по сравнению с диаметром может свидетельствовать о большей активности процессов разрушения матрикса внутри их структуры, чем со стороны поверхности. Учитывая отсутствие выраженной гистиоцитарной и гигантоклеточной реакции со стороны соединительнотканной капсулы, следует предполагать превалирование биодеградации над биорезорбцией. При этом отношение площади поверхности к объему матрикса было большим на сроках 30, 90 и 120 сут. в контроле, что может быть связано с большим диаметром матрикса на сроке 30 сут. и меньшим объемом, хоть и не достигшим статистически значимых значений, на сроке 90 сут. Таким образом, наличие плазмидной ДНК на поверхности матрикса из ОКФ не приводит к существенному изменению скорости его биодеградации.

В исследовании на протяжении всего периода наблюдения не выявлялись признаки воспалительной реакции, что связано с биосовместимостью разработанных изделий. В обоих случаях: как при имплантации контрольных, так и ген-активированных материалов, вокруг них формировалась соединительнотканная капсула с полнокровными сосудами. Однако в случае ген-активированных изделий соединительная ткань имела большее количество сосудов и фибробластов, что позволяло ей локально проникать в структуру изделия, чего не наблюдалось в контрольной группе. Данный факт подтвердил активацию ангиогенеза, обусловленную, по всей видимости, действием VEGF. Выявленная нами динамика генной индукции ангиогенеза

соотносится с литературными данными, описывающими пик синтеза мРНК VEGF через 2 сут. после трансфекции клеток плазмидной ДНК, а наибольший уровень продукции терапевтического белка — на 5–7 сут. Более того, именно в экспериментальной группе на ранних сроках наблюдались дефекты поверхности материалов, сформированные проникающей в них соединительной тканью, что может быть связано с активацией ангиогенеза. Постепенное уменьшение размеров и увеличение отношения поверхности имплантатов к объему наблюдалось в обеих группах. Однако более интенсивное снижение размеров диаметра изделий выявлялось в экспериментальной группе к сроку 40 сут., после чего процесс резорбции приобретал менее активную форму, а в контрольной группе изменение диаметра имело практически линейный вид. Такая особенность полученных результатов может быть связана с высвобождением и непродолжительным эффектом генной конструкции.

Заключение

Ген-активированные имплантаты на основе ОКФ и плазмидной ДНК с геном VEGF характеризовались биосовместимостью и длительной биорезорбцией (срок полурезорбции по объему составил 2–3 мес., по диаметру — около 12 мес.), динамика которой, в целом, соответствовала резорбции матрикса на основе ОКФ без генных конструкций. Полученные данные могут быть использованы для изготовления пористых персонализированных ген-активированных имплантатов с расчетной скоростью биорезорбции для последующей оценки их влияния на восстановление целостности костей в моделях протяженных костных дефектов, т.е. в ортотопическом ложе с прослеживанием отдаленных в отношении костной пластики результатов.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части разработки процесса 3D печати и РФФИ (проект № 18-29-11081_мк) в части исследования экспериментальных образцов.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Goodson A.M., Kittur M.A., Evans P.L. et al. Patient-specific, printed titanium implants for reconstruction of mandibular continuity defects: A systematic review of the evidence. *J Craniomaxillofac Surg.* 2019; 47(6): 968–76.
2. Ren W.H., Gao L., Li S.M. et al. Virtual planning and 3D printing modeling for mandibular reconstruction with fibula free flap. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2018; 98(33): 2666–2670.
3. Scarano A, Stoppaccioni M, Casolino T. Zirconia crowns cemented on titanium bars using CAD/CAM: a five-year follow-up prospective clinical study of 9 patients. *BMC Oral Health.* 2019; 19(1): 286.
4. Guillaume B. Filling bone defects with β -TCP in maxillofacial surgery: A review. *Morphologie.* 2017; 101(334): 113–9.
5. Komlev V.S., Barinov S.M., Bozo I.I. et al. Bioceramics composed of octacalcium phosphate demonstrate enhanced biological behaviour. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2014; 6(19): 16610–20.
6. Komlev V.S., Popov V.K., Mironov A.V. et al. 3D printing of octacalcium phosphate bone substitutes. *Front Bioeng Biotechnol.* 2015; 3: 81.
7. Deev R.V., Bozo I.Y., Mzhavanadze N.D. et al. pCMV-veg165 intramuscular gene transfer is an effective method of treatment for patients with chronic lower limb ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2015; 20(5): 473–82.
8. Деев Р.В., Бозо И.Я., Мжаванадзе Н.Д. и др. Эффективность применения гена VEGF165 в комплексном лечении пациентов с хронической ишемией нижних конечностей 2а-3 стадии. *Ангиология и сосудистая хирургия* 2014; 20(2): 38–48. [Deev R.V., Bozo I.Y., Mzhavanadze N.D. et al. Efficacy of using VEGF165 gene in comprehensive treatment of patients with stage 2A-3 lower limb chronic ischaemia. *Angiol Sosud Khir.* 2014; 20(2): 38–48].

9. Бонарцев А.П., Мураев А.А., Деев Р.В., Волков А.В. Материал-ассоциированная костная резорбция. *Современные технологии в медицине* 2018; 10(4): 26–33. [Bonartsev A.P., Muraev A.A., Deev R.V., Volkov A.V. Material-associated bone resorption. *Modern technologies in medicine* 2018; 10 (4): 26–33].

10. Бозо И.Я., Деев Р.В., Дробышев А.Ю. и др. Эффективность ген-активированного остеопластического материала на основе октакальциевого фосфата и плазмидной днк с геном VEGF в восполнении «критических» костных дефектов. *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова* 2015; 1: 35–42. [Bozo I.Ya., Deev R.V., Drobyshev A.Yu. et al. Efficacy of Gen-Activated Osteoplastic Material Based on Octacalcium Phosphate and Plasmid DNA containing vegf Gene for Critical-sized Bone Defects Substitution. *N.N. Priorov Bulletin of Traumatology and Orthopedics* 2015; 1: 35–42.].

11. Animal Welfare Act; 2013. <https://www.nal.usda.gov/awic/animal-welfare-act>

12. Деев Р.В., Дробышев А.Ю., Бозо И.Я. Обычные и активированные остеопластические материалы. *Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова* 2015; 1: 51–69. [Deev R.V., Drobyshev A.Yu., Bozo I.Ya. Ordinary and Activated Osteoplastic Materials. *N.N. Priorov Bulletin of Traumatology and Orthopedics* 2015; 1: 51–69.].

13. ГОСТ ISO 10993–6:2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации. [ISO 10993–6:2011. *Medical devices. Biological evaluation of medical devices. Part 6. Tests for local effects after implantation*].

Поступила: 16.01.2020