

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ФЕДЕРАЛЬНЫЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
ЭПИДЕМИОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ ИМЕНИ ПОЧЕТНОГО  
АКАДЕМИКА Н.Ф. ГАМАЛЕИ МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**

---

*На правах рукописи*

**БАРТОВ МИХАИЛ СЕРГЕЕВИЧ**

**НОВЫЕ БИОТЕХНОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К СОЗДАНИЮ  
ОСТЕОИНДУКТИВНЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ БЕЛКА rhBMP-2,  
ПОЛУЧЕННОГО МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИМ СИНТЕЗОМ  
В *ESCHERICHIA COLI***

**Диссертация  
на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук**

**Специальность:  
03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)**

**Научный руководитель:  
профессор,  
доктор биологических наук  
Карягина-Жулина  
Анна Станиславовна**

**Москва - 2015**

## Оглавление

Оглавление .....	2
ВВЕДЕНИЕ .....	5
1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	12
1.1 Костные морфогенетические белки – факторы роста и регенерации костной ткани .....	12
1.1.1 Общая характеристика группы BMP .....	12
1.1.2 Строение, биосинтез и механизм действия BMP-2 .....	13
1.1.3 Функции BMP в организме .....	17
1.2 Способы получения препаратов биологически активного белка BMP-2.....	18
1.2.1 Выделение и очистка белка из костного матрикса .....	18
1.2.2 Выделение rhBMP-2 из эукариотических продуцентов.....	19
1.2.3 Выделение из прокариотических продуцентов.....	20
1.3 Оптимизация экспрессии и очистка димерной формы rhBMP-2, полученного микробиологическим синтезом .....	22
1.4 Osteoplastические материалы – перспективы применения в медицине и ветеринарии .....	25
1.4.1 Требования к современным osteoplastическим материалам .....	25
1.4.2 Тестирование активности osteoplastических материалов .....	26
1.4.3 Многообразие osteoplastических материалов.....	28
1.4.4 Osteoиндуктивные материалы с добавлением BMP и их клиническое применение в медицине и ветеринарии .....	36
2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	40
2.1 Материалы и реактивы .....	40
2.1.1 Генно-инженерные конструкции.....	40
2.1.2 Бактериальные штаммы-продуценты.....	40
2.1.3 Питательные среды .....	40
2.1.4 Реагенты и ветеринарные препараты.....	40
2.1.5 Оборудование и программное обеспечение .....	41
2.1.6 Лабораторные животные .....	43

2.2 Основные методики .....	43
2.2.1 Подготовка компетентных клеток <i>E. coli</i> для трансформации плазмидной ДНК электропорацией .....	43
2.2.2 Трансформация клеток <i>E. coli</i> .....	44
2.2.3 Выращивание штамма-продуцента белка BMPRIA-CBD .....	44
2.2.4 Электрофорез белков в ПААГ-ДСН .....	46
2.2.5 Выделение и очистка димерной формы rhBMP-2 .....	47
2.2.6 Проверка биологической активности rhBMP-2 <i>in vitro</i> .....	48
2.2.7 Проверка остеопластических материалов на стерильность .....	49
2.2.8 Экспериментальные модели тестирования биологической активности остеоиндуктивных материалов <i>in vivo</i> .....	49
2.2.9 Компьютерно-томографическое исследование .....	50
2.2.10 Гистоморфологическое исследование .....	51
2.2.11 Конфокальная микроскопия .....	51
2.2.12 Статистический анализ и представление данных .....	52
3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ .....	53
3.1 Получение остеоиндуктивных материалов на коллагеновом носителе с добавлением rhBMP-2 .....	53
3.1.1 Получение ДКМ в виде различных по размеру фракций костной крошки .....	54
3.1.2 Получение малоинвазивных остеопластических материалов .....	55
3.1.3 Получение ДКМ в виде костных блоков .....	56
3.1.4 Иммобилизация rhBMP-2 на ДКМ .....	56
3.2 Тестирование остеопластических материалов на основе rhBMP-2 на экспериментальных моделях <i>in vivo</i> .....	57
3.2.1 Проверка активности крошки ДКМ с rhBMP-2 на модели индукции эктопического остеогенеза .....	57
3.2.2 Проверка активности малоинвазивных форм остеопластических материалов с rhBMP-2 в комбинации с титановыми имплантатами .....	61
3.2.3 Проверка активности остеоиндуктивных материалов в виде мембраны на модели создания краниальных дефектов критического размера .....	67

3.3 Создание штамма-продуцента химерного белка BMPRIA-CBD .....	80
3.3.1 Создание генно-инженерной конструкции.....	80
3.3.2 Трансформация штамма и индукция экспрессии белка.....	83
3.4 Оптимизация экспрессии BMPRIA-CBD в штамме-продуценте и условий его культивирования в ферментере .....	84
3.5 Разработка метода очистки димерной формы rhBMP-2 с помощью аффинного сорбента на основе BMPRIA-CBD .....	91
3.5.1 Выделение BMPRIA-CBD и получение целлюлозосодержащего сорбента на его основе .....	91
3.5.2 Сорбция димерной формы rhBMP-2 на целлюлозосодержащем сорбенте с BMPRIA-CBD .....	92
3.6 Проверка биологической активности выделенного rhBMP-2 in vitro .....	94
4 ВЫВОДЫ .....	99
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	100
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	102
ПРИЛОЖЕНИЕ А .....	125

## ВВЕДЕНИЕ

**Актуальность проблемы.** Ежегодное увеличение количества случаев заболеваний опорно-двигательного аппарата по всему миру привело к тому, что первое десятилетие XXI века было объявлено ВОЗ декадой по лечению костей и суставов (Tsou et al., 2002). Согласно данным официальной статистики по травматизму в России переломы костей занимают второе место среди случаев обращения населения за медицинской помощью, составив 21,5% от общего числа зарегистрированных травм (Андреева, 2010). Длительные сроки восстановления функциональности опорно-двигательного аппарата оказывают существенное влияние на качество и продолжительность жизни пациентов, а также имеют большое экономическое значение, поскольку являются причиной временной нетрудоспособности и/или инвалидности людей.

Проблема травматизма опорно-двигательного аппарата актуальна также в ветеринарии сельскохозяйственных, домашних и спортивных животных (Innes et al., 2010). Содержание крупного и мелкого рогатого скота, лошадей, а также их транспортировка часто сопряжены с переломами и вывихами конечностей (Mulon, 2013; Nunamaker, 2002), при этом возможность проведения оперативного лечения сильно зависит от его экономической эффективности в каждом конкретном клиническом случае.

Консолидация костных отломков при потерях значительных объемов костной ткани невозможна без применения трансплантационного материала. По данным статистики, ежегодно в мире в медицинской практике проводится около 4 миллионов операций, связанных с трансплантацией костной ткани или с применением остеопластических материалов в качестве заместителей (Brydone et al., 2010).

В настоящее время для восполнения объема костной ткани широко используются аутотрансплантаты, принятые в качестве «золотого стандарта» в трансплантологии (Beaman et al., 2006; Bhatt et al., 2012; Brydone et al., 2010; Finkemeier, 2002). Однако процедура забора аутогенного материала увеличивает время основной операции из-за необходимости дополнительного

оперативного вмешательства, несет риск развития осложнений и имеет ограничения по допустимому объему аутотрансплантата (Brydone et al., 2010; Cricchio et al., 2003). В качестве альтернативы аутологичной кости широко применяются материалы на основе деминерализованного костного матрикса (ДКМ) как аллогенного, так и ксеногенного происхождения (Barneveld et al., 1994; Gruskin et al., 2012; Nandi et al., 2010; Wang et al., 2007). Использование остеопластических материалов на основе ДКМ, содержащих факторы роста и регенерации костной ткани, мультипотентные стромальные клетки и другие компоненты, обеспечивающие направленное стимулирование остеогенеза, признается в настоящее время одной из наиболее перспективных стратегий в лечении переломов (Albrektsson et al., 2001; Vertenten et al., 2010; Wilson-Hench, 1987).

Среди известных факторов роста и регенерации костной ткани одним из наиболее эффективных и хорошо изученных стимуляторов остеогенеза является костный морфогенетический белок 2 (Bone Morphogenetic Protein-2, BMP-2), принадлежащий к суперсемейству трансформирующего фактора роста бета (Transforming Growth Factor beta, TGF- $\beta$ ) (Bessa et al., 2008; Massagué, 1998). Остеоиндуктивные материалы с добавлением рекомбинантного человеческого BMP-2 (rhBMP-2), получившие название «INFUSE Bone Graft», одобрены к ограниченному клиническому использованию Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) и Европейским агентством лекарственных средств (European Medicines Agency, EMEA) в 2002 году.

Помимо использования данных материалов в медицине (Govender et al., 2002; McKay et al., 2007), они могут найти свое применение и в ветеринарной практике, особенно при лечении мелких домашних животных (Pinel et al., 2012). Мировой опыт лечения сельскохозяйственных животных с помощью материалов с факторами роста насчитывает пока лишь единичные случаи из-за высокой стоимости (Lippold et al., 2004). Стоимость зарубежных остеоиндуктивных материалов, содержащих rhBMP-2, на порядки превышает

рыночную стоимость синтетических и аллогенных трансплантатов и достигает нескольких тысяч долларов за единицу, что ограничивает их широкое применение в России. Однако по данным некоторых исследователей, лечение с применением BMP-содержащих материалов в ряде случаев позволяет существенно сократить суммарные затраты на реабилитацию пациентов (Garrison et al., 2007).

Высокая стоимость таких материалов обусловлена тем, что входящий в их состав фактор роста синтезируется в эукариотической экспрессионной системе – культуре овариоцитов китайского хомячка (Chinese hamster ovary, CHO). Однако при использовании rhBMP-2, полученного с помощью более дешевого микробиологического синтеза в *Escherichia coli*, были продемонстрированы схожие показатели остеоиндуктивности (Bessho et al., 2000; Lee et al., 2013).

В клетках *E. coli* rhBMP-2 синтезируется в виде смеси мономерной, димерной и олигомерной форм и накапливается в тельцах включения, при этом биологической активностью обладает только димерная форма белка. Обогащение остеопластических материалов димерной формой rhBMP-2 может повысить их остеоиндуктивные свойства и эффективность. Благодаря способности димера rhBMP-2 специфически связываться со своими клеточными рецепторами (Keller et al., 2004; Kirsch et al., 2000a; Kirsch et al., 2000b), для обогащения препарата белка биологически активной димерной формой можно использовать аффинную хроматографию на сорбенте, представляющем собой иммобилизированный на носителе рецептор rhBMP-2. Heinecke et al. показали, что наиболее устойчивый лиганд-рецепторный комплекс образуется при взаимодействии димера с рецептором BMPRIA (Bone Morphogenetic Protein Receptor IA) (Heinecke et al., 2009). Таким образом, аффинный сорбент может быть получен на основе рекомбинантного белка BMPRIA. В свою очередь, эффективное связывание этого белка с хроматографической матрицей-носителем, например, целлюлозой, не требующее применения сшивающих агентов, может достигаться за счет

использования BMPRIA, слитого с белковым доменом, обладающим высокой аффинностью к целлюлозе, например, целлюлозосвязывающим доменом из *Caldicellulosiruptor bescii* (Tomme et al., 1998).

Использование на финальном этапе очистки вышеупомянутого аффинного сорбента позволит увеличить выход димера, получить препарат rhBMP-2 с большей удельной активностью и, следовательно, остеопластические материалы для трансплантации с высокими остеоиндуктивными свойствами. Также, разработка остеоиндуктивных материалов российского производства, содержащих rhBMP-2, сделает возможным их внедрение в клиническую практику в РФ и ветеринарию сельскохозяйственных, домашних и спортивных животных, где такого рода материалы пока используются в очень ограниченном масштабе.

**Цели и задачи исследования.** Целью диссертационной работы являлась разработка новых биотехнологических подходов к выделению биологически активной димерной формы rhBMP-2, а также оценка эффективности применения остеоиндуктивных материалов на основе rhBMP-2 *in vivo*.

Для достижения цели были поставлены следующие задачи:

- Получить остеопластические материалы из деминерализованного костного матрикса с добавлением rhBMP-2;
- Адаптировать методики оценки регенеративного потенциала для разработанных материалов и провести с их помощью тестирование остеопластических материалов с добавлением rhBMP-2 *in vivo*;
- Создать штамм-продуцент химерного рекомбинантного белка BMPRIA-CBD, представляющего собой рецептор фактора роста и регенерации костной ткани BMP-2 в комплексе с целлюлозосвязывающим доменом (CBD);
- Подобрать условия культивирования штамма-продуцента для повышения выхода BMPRIA-CBD;
- Разработать способ выделения и очистки димерной формы rhBMP-2 с помощью аффинной хроматографии на носителе с иммобилизованным BMPRIA-CBD;



- Доказать биологическую активность выделенного димера rhBMP-2 *in vitro*.

**Научная новизна.** В экспериментальной модели эктопического остеогенеза для оценки эффективности остеоиндуктивных материалов впервые исследован регенеративный потенциал материалов из ДКМ в виде крошки с иммобилизованным rhBMP-2 при их применении в комбинации с обогащенной тромбоцитами плазмой крови (ОТП). На модели регенерации краниальных дефектов критического размера впервые показана перспективность применения материалов из ДКМ в виде губчатых пористых мембран с иммобилизованным rhBMP-2.

Экспериментально доказаны остеоиндуктивные свойства разработанных материалов из коллагенового матрикса в виде костной крошки и губчатых пористых мембран с иммобилизованным на них белком rhBMP-2 на модели эктопического остеогенеза на крысах, на модели регенерации дефектов критического размера после краниотомии на крысах, а также при применении материалов в сочетании с титановыми имплантатами на кроликах.

Разработан эффективный подход для обогащения препаратов rhBMP-2 димерной формой белка, основанный на его специфическом взаимодействии со своим клеточным рецептором BMPRIA. В ходе разработки подхода впервые была сконструирована плаزمиды pBMPRIA-CBD, обеспечивающая экспрессию химерного рекомбинантного белка BMPRIA-CBD, который состоит из сигнала L-аспарагиназы *E. coli*, эктодомена рецептора BMPRIA человека, спейсера из остатков глицина и серина и целлюлозосвязывающего домена CBD из *Caldicellulosiruptor bescii* (ранее – *Anaerocellum thermophilum*) с высокой константой связывания с целлюлозосодержащим сорбентом.

Получен эффективный микробиологический штамм-продуцент *E. coli* M15 [pREP4, pBMPRIA-CBD] и оптимизированы условия экспрессии белка BMPRIA-CBD. Получен новый целлюлозосодержащий сорбент с иммобилизованным белком BMPRIA-CBD, обеспечивающий эффективную сорбцию димерной формы rhBMP-2.

**Практическое значение работы.** По результатам работы получены остеоиндуктивные материалы на основе ДКМ с добавлением rhBMP-2, которые могут применяться в медицине и ветеринарии в таких областях, как травматология, ортопедия, спинальная хирургия, стоматология и т.д. (Бартов и др., 2012; Лунин и др., 2012). В зависимости от клинического случая материалы могут применяться как в самостоятельном виде, так и в сочетании с металлофиксаторами.

Новый подход, разработанный для выделения rhBMP-2, обеспечивает получение препарата белка в биологически активной димерной форме высокой степени чистоты, благодаря чему он может использоваться на финальной стадии выделения белка. Разработанный подход может быть адаптирован для выделения других факторов роста за счет их аффинного связывания со своими клеточными рецепторами, иммобилизованными на носителе.

**Апробация работы.** Результаты диссертационной работы были представлены на всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Илизаровские чтения» (г. Курган, 2011), научно-практической конференции с международным участием «Чаклинские чтения» (г. Екатеринбург, 2011), международной научно-практической конференции «Фармацевтические и Медицинские Биотехнологии» (г. Москва, 2012), всероссийской научно-практической конференции «Технологии оптимизации процесса репаративной регенерации в травматологии, ортопедии и нейрохирургии» (г. Саратов, 2013), XVI съезде ортопедов-травматологов Украины (г. Харьков, 2013), XIV молодежной научной конференции «Биотехнология в растениеводстве, животноводстве и ветеринарии» (г. Москва, 2014), IV Международной научно-практической конференции «Постгеномные методы анализа в биологии, лабораторной и клинической медицине» (г. Казань, 2014).

**Публикации.** По материалам диссертационной работы опубликовано 4 научных статьи, в том числе 3 в рекомендованных ВАК журналах, 7 работ в сборниках тезисов всероссийских и международных конференций, получено 3

патента – №2456003 «Способ получения деминерализованного костного матрикса в виде крошки», №2499048 «Рекомбинантная плазмида, рекомбинантный штамм, рекомбинантный белок BMP-2 и способ выделения рекомбинантного белка в димерной форме», №2469676 «Способ адресной доставки остеопластических материалов, содержащих факторы роста и регенерации костной ткани, в область дефекта альвеолярной кости».

## 1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 Костные морфогенетические белки – факторы роста и регенерации костной ткани

#### 1.1.1 Общая характеристика группы BMP

Костные морфогенетические белки – группа многофункциональных факторов роста и регенерации, принадлежащих к суперсемейству трансформирующего фактора роста бета (TGF- $\beta$ ).

Они были обнаружены Marshall R. Urist, который в 1965 году провел серию экспериментов по внутримышечной имплантации различным видам лабораторных животных декальцинированных кортикальных фрагментов большеберцовой кости и выявил способность к индуцированию имплантатами эктопического образования костной ткани (Urist, 1965). В ходе дальнейших исследований Urist предположил, что стимулирование эктопического остеогенеза происходило под влиянием обособленных химических соединений, описанных им впоследствии как «остеогенные химические компоненты костного матрикса, дентина или других твердых тканей, которые становятся доступными в результате деминерализации и тесно связаны с коллагеновыми фибриллами». В 1971 году белки получили название «Bone Morphogenetic Proteins» (BMPs) (Urist, 1971).

К настоящему времени открыто и охарактеризовано около 20 членов семейства BMP, которые на основании сходства первичной структуры можно объединить в 8 подгрупп (Zhou, 2008) (рисунок 1).

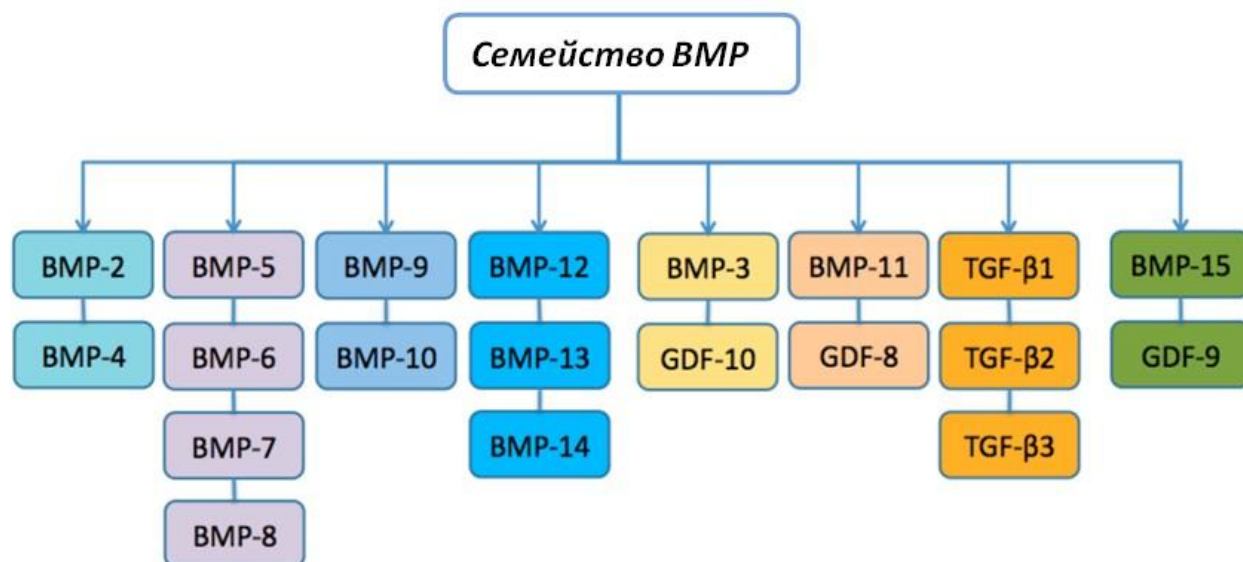


Рисунок 1. Классификация членов семейства BMP по сходству аминокислотных последовательностей. Адаптировано из работы Urist, 1965.

Белки, относящиеся к одной подгруппе сходны по аминокислотной последовательности. Так, BMP-2 и BMP-4 обладают 80%-ным сходством последовательностей, а сходство BMP-5, BMP-6, BMP-7 и BMP-8 достигает 78% (Ozkaynak et al., 1992).

В организме человека BMP содержатся, в основном, в костной ткани, причем в зависимости от пола их количество варьирует. Pietrzak и соавторы в 2006 году изучали уровень нативных BMP-2, BMP-4 и BMP-7, содержащихся в полностью деминерализованном костном матриксе (ДКМ), полученном от 20 доноров разного пола и возраста (17-65 лет). В ходе исследования зависимости количества измеряемых BMP от возраста донора выявлено не было, однако авторы установили, что содержание BMP-2 и BMP-7 у женщин было во всех случаях значительно выше, чем у мужчин (Pietrzak et al., 2006).

### 1.1.2 Строение, биосинтез и механизм действия BMP-2

Костные морфогенетические белки представляют собой трансмембранные гетеро- и гомодимерные белки, состоящие из 110-140 аминокислотных остатков (Зайцев и др., 2009).

BMPs синтезируются в виде пре-про-пептидов длиной 400-525 аминокислотных остатков (Hogan, 1996; Wozney et al., 1990; Yamashita et al.,

1996), которые состоят из N-концевого сигнального пептида, про-домена и С-концевого зрелого белка. До образования активной формы белка пре-про-пептид претерпевает несколько посттрансляционных модификаций (рисунок 2).

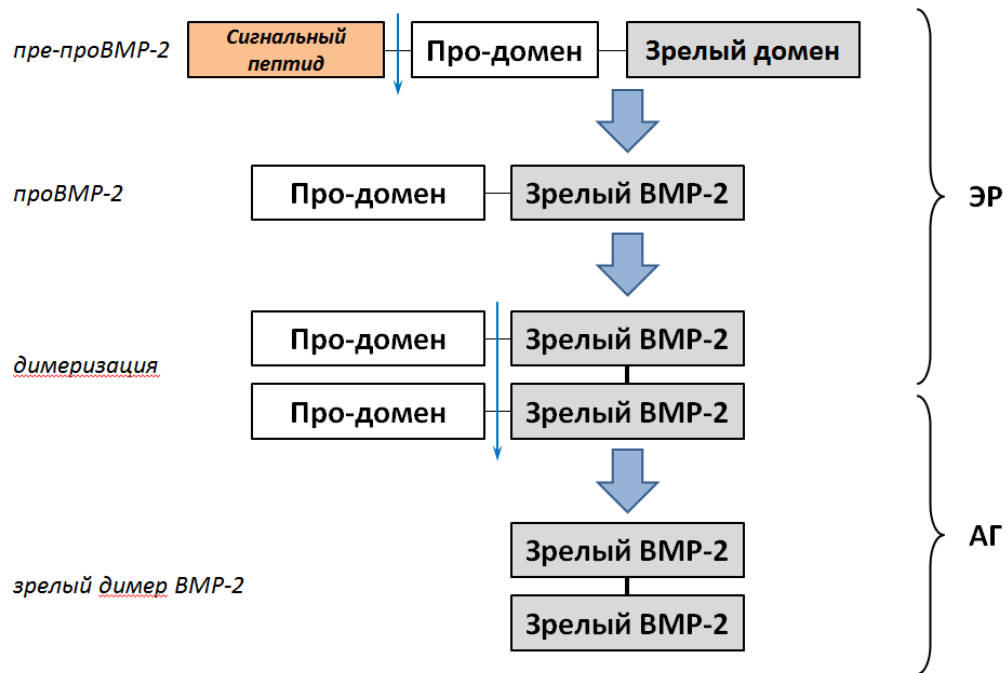


Рисунок 2. Общая схема процессинга VMP-2. ЭР – эндоплазматический ретикулум, АГ – аппарат Гольджи. Адаптировано из работы Zhou, 2008.

Сначала происходит отщепление сигнальной последовательности с образованием молекулы про-VMP-2. Далее два мономера подвергаются димеризации в эндоплазматическом ретикулуме клетки, после чего димер транспортируется в аппарат Гольджи. В транс-отделе комплекса Гольджи под действием ферментов, например, фурина, происходит отщепление про-доменов, что приводит к образованию зрелого димера VMP-2. По окончании биосинтеза молекула белка в биологически активной димерной форме секретируется во внеклеточное пространство (Wozney et al., 1990).

Каждый димер состоит из двух полипептидных цепей, соединенных дисульфидными связями (Ozkaynak et al., 1990; Wang et al., 1990). В первичной структуре зрелого димера каждого члена семейства VMP содержится по 7 цистеиновых остатков, причем 6 из них формируют 3 дисульфидные связи, образующие консервативный структурный мотив – «цистеиновый узел»

(Ebendal et al., 1998), а седьмой остаток цистеина участвует в формировании S-S связи между мономерами в структуре димера BMP (рисунок 3).

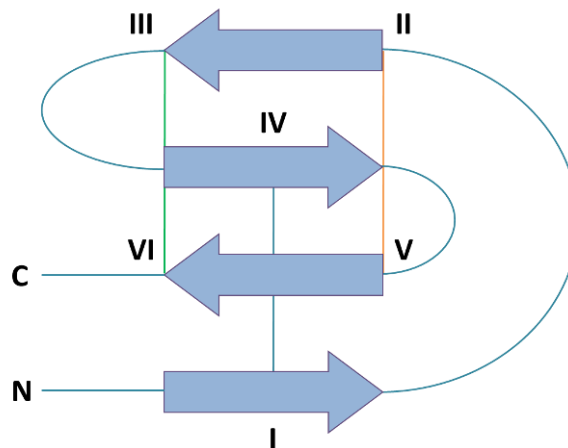


Рисунок 3. Схематическое изображение «цистеинового узла». Римскими цифрами обозначены остатки цистеина, вертикальными линиями – дисульфидные связи, стрелками –  $\beta$ -тяжи, буквами – С- и N-концевые участки. Адаптировано из работы Zhou, 2008.

Трёхмерная структура BMP-2, полученная с помощью рентгеноструктурного анализа приведена на рисунке 4 (Scheufler et al., 1999).



Рисунок 4. 3D-структура димера BMP-2 человека.  $\alpha$ -спирали представлены спиралями,  $\beta$ -тяжи – стрелками, S-S связи – зелеными

мостиками. Синим и оранжевым цветами показаны мономеры BMP-2 (по Scheufler et al., 1999).

Для передачи сигнала димерной молекулы BMP в клетку-мишень необходимо ее связывание с рецепторами клеточной мембраны, представляющими собой серин-треониновые киназы, двух типов (BMPRI и BMPRII), которые слабо взаимодействуют с BMP поодиночке. Для устойчивого связывания и инициации передачи сигнала необходимо формирование комплекса лиганд-рецептор с участием рецепторов обоих типов (Cook et al., 1995; Simic et al., 2007).

После первичного связывания димерной молекулы белка BMPRII фосфорилирует BMPRI, который, в свою очередь, приводит к фосфорилированию С-терминального домена рецептор-активируемых белков Smad (R-Smads: Smad1, Smad5 или Smad8) (Мардарьев и др., 2007). R-Smads образуют гетеромерные комплексы со Smad4 (Co-Smad) и перемещаются в ядро, где оказывают влияние на транскрипцию гена-мишени (рисунок 5).

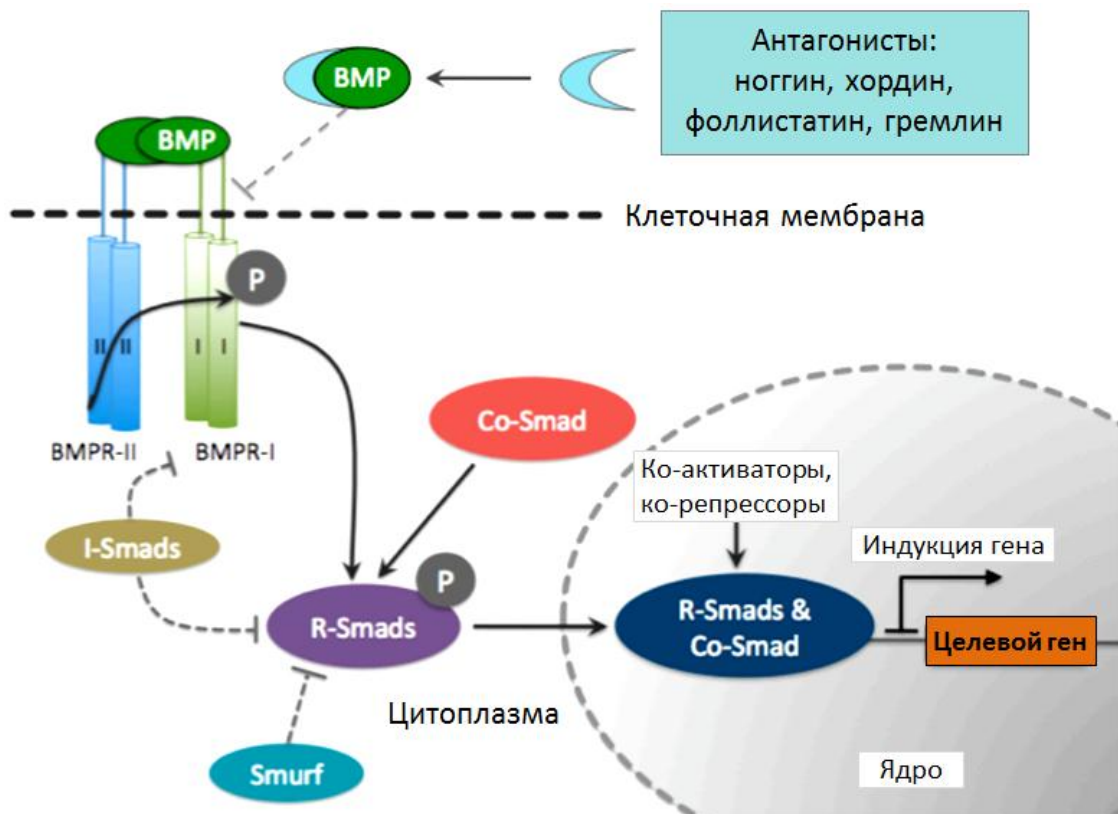


Рисунок 5. Схема сигнального пути BMPs. Адаптировано из работы Yamashita et al., 1996.



Регуляция сигнального каскада опосредуется I-Smads (Smad6 и Smad7), а также Smad6 за счет ингибирования им взаимодействия Smad4 и Smad1 по механизму конкурентного связывания.

### 1.1.3 Функции BMP в организме

BMP являются многофункциональными факторами, способными регулировать в организме различные клеточные процессы. Хотя исторически BMPs приобрели известность благодаря способности индуцировать остеогенез, в настоящее время считается, что наиболее выраженное влияние на формирование костной ткани оказывают BMP-2, -4, -6, -7, и -9 (Israel et al., 1992; Wozney et al., 1988; Wozney et al., 1998). Факторы же BMP-8b, -10 и -15 участия в хондро- и остеогенезе не принимают (Bessa et al., 2008). Многочисленными авторами описано влияние BMP-10 на развитие сердечно-сосудистой системы (Chen et al., 2004), BMP-15 – на физиологические процессы в яичниках (Knight et al., 2006), BMP-8b – на клетки репродуктивной системы (Zhao et al., 1996).

Известно, что BMPs регулируют эмбриогенез (Kishigami et al., 2005), нормальное развитие скелета и мягких тканей (Tsumaki et al., 2005). Например, BMP-2 играет важную роль в морфогенезе сердца (Callis et al., 2005) и пролиферации стволовых клеток (White et al., 2001), BMP-7 – в формировании почек (Simic et al., 2005). Кроме того, многие BMPs оказывают важное влияние на репродуктивные органы (Shimasaki et al., 2004).

На ранних стадиях эмбриогенеза BMPs двусторонне регулируют развитие плода: BMP-2 и -4 определяют дорзовентральное направление развития эмбриона, а BMP-3 и -3b – полярность дифференциации (Hino et al., 2004). В период гаструляции антагонисты BMP создают градиент сигнального каскада, который регулирует миграцию клеток в закладывающиеся органы (кости, хрящи, почки и сердце) в зависимости от уровня активности BMP и других цитокинов (Yamamoto et al., 2004).

Благодаря своей способности стимулировать хондро- и остеогенез, BMPs рассматриваются в качестве перспективных компонентов для получения и

клинического применения материалов, направленных на восстановление поврежденной костной ткани человека. Это предположение подтверждено многочисленными доклиническими исследованиями их активности на различных моделях лабораторных и домашних животных (Herford et al., 2008; Hyun et al., 2005). Литературные источники, в целом, сходятся во мнении, что среди всех BMP наиболее выраженными остеоиндуктивными свойствами обладает BMP-2 (Alt et al., 2009; Barr et al., 2010; Govender et al., 2002; Sykaras et al., 2003). В связи с этим, необходимо рассмотреть возможные способы получения BMP-2 для дальнейшего применения в разработке остеоиндуктивных материалов на его основе.

## **1.2 Способы получения препаратов биологически активного белка BMP-2**

К настоящему времени известно два способа получения биологически активного BMP-2 – биохимический, подразумевающий выделение нативного белка из костной ткани организма, и синтез рекомбинантного человеческого BMP-2 (rhBMP-2) в эукариотических и прокариотических экспрессионных системах с последующим выделением белка из биомассы продуцента.

### **1.2.1 Выделение и очистка белка из костного матрикса**

Исторически этот метод выделения является первым. После обнаружения способности влияния BMPs на остеогенез они были выделены исследователями из костей кролика (Urist et al., 1979), КРС (Wang et al., 1998) и человека (Urist et al., 1983). Биохимическую экстракцию BMP-2 из костного матрикса осуществляют путем гидролиза коллагеназой, 2 N соляной кислотой, 6 M мочевиной, 4 M гуанидином, к воздействию которых BMP-2 устойчив (Зайцев и др., 2009). Серьезный недостаток метода состоит в том, что он позволяет получить крайне низкие количества белка – всего лишь 1-2 мкг на 1 кг кортикальной кости (Bessa et al., 2008). При этом, помимо невысокого выхода белка, использование данного подхода сопряжено с затратой значительных временных, трудовых и материальных ресурсов (Zhou et al., 2008), что

обуславливает необходимость поиска других способов для повышения выхода целевого продукта.

Развитие генно-инженерных технологий позволило сделать качественный скачок в разработке новых направлений синтеза, благодаря чему к 2008 году с помощью различных экспрессионных систем продуцировалось уже более 130 разнообразных белков и протеинов, одобренных FDA для применения в клинической практике (Leader et al., 2008). В настоящее время все рекомбинантные белки продуцируются главным образом в двух экспрессионных системах – эукариотических и прокариотических (Bessa et al., 2008; Hellwig et al., 2004).

### **1.2.2 Выделение rhBMP-2 из эукариотических продуцентов**

Использование рекомбинантных ДНК позволяет продуцировать в клетках млекопитающих и растений в норме отсутствующие в них белки (Hellwig et al., 2004). Преимущество применения данного подхода заключается в обеспечении возможности посттрансляционной модификации рекомбинантных белков и получении их в нативной конформации.

Впервые rhBMP-2 был получен и в дальнейшем выделен в клеточной линии овариоцитов китайского хомячка (СНО). Биологическая активность наработанного белка *in vivo* была доказана авторами по способности индуцировать эктопический хондро- и остеогенез на модели внутримышечной имплантации крысам уже спустя 2 недели после операции (Wang et al., 1994).

Однако так же, как и в методе биохимической экстракции, при использовании эукариотических систем не удается достичь достаточно высокого выхода продукта (Israel et al., 1992). Кроме этого, синтез в эукариотах достаточно дорог по сравнению с прокариотическими системами, поскольку для выращивания культур клеток эукариот требуются дорогостоящие питательные среды и специальные условия культивирования (Zhou, 2008). Имеются литературные данные о том, что BMP-2, синтезированный в прокариотической системе экспрессии, также обладает физиологической

активностью (Bessho et al., 2000; Harada et al., 2012; Hwang et al., 2013; Kim et al., 2011, Lee et al., 2013).

В связи со всем вышеперечисленным, использование прокариотических систем экспрессии выглядит перспективным для наработки больших количеств относительно недорогого и физиологически активного rhBMP-2, и получения на его основе материалов для применения в клинике и ветеринарии.

### 1.2.3 Выделение из прокариотических продуцентов

Бактериальные продуценты позволяют получить большие количества целевого белка, нежели другие экспрессионные системы, снижая при этом затраты на производство за счет низкой стоимости микробиологического синтеза и возможности работы с большими объемами биомассы. По данным Rader, в настоящее время до 40% всех рекомбинантных белков получено в бактериальных системах-продуцентах, при этом наиболее популярным является использование штаммов на основе *Escherichia coli* (39%) (Rader, 2008).

Однако и эта система экспрессии не лишена недостатков. При синтезе в клетках бактерий зачастую ограничена возможность посттрансляционной модификации, в частности, правильного фолдинга белка и его гликозилирования. Синтезируемый в *E. coli* rhBMP-2 малорастворим и формирует в клетках тельца-включения, которые для выделения белка необходимо денатурировать с последующим восстановлением нативной структуры целевого продукта, включающим формирование внутри- и межмолекулярных S-S связей (Long et al., 2006), что увеличивает стадийность и затраты на продукцию белка.

Опубликован ряд работ, посвященных сравнению биологической активности rhBMP-2, полученного в культуре клеток CHO (CrhBMP-2), и rhBMP-2, наработанного с помощью микробиологического синтеза в *E. coli* (ErhBMP-2).

Lee с соавт. на модели с созданием супраальвеолярного дефекта критического размера у собак продемонстрировали, что количественные показатели остеогенеза на сроке 8 недель после проведения операции в

опытных группах с использованием и CrhBMP-2, и ErhBMP-2 сравнимы. При использовании CrhBMP-2 и ErhBMP-2 площадь новообразованной костной ткани составила  $35,8 \pm 3,6$  и  $30,1 \pm 2,2$  мм, плотность костной ткани  $31,8 \pm 1,6\%$  и  $35,6 \pm 2,5\%$ , показатель остеointеграции  $32,9 \pm 7,4\%$  и  $33,7 \pm 8,1\%$ , соответственно, без статистически достоверных отличий (Lee et al., 2013).

В экспериментах Bessho с соавт. также изучались остеоиндуктивные свойства CrhBMP-2 и ErhBMP-2 в трех различных концентрациях (2, 10, 50 мкг/имплантат) на модели внутримышечной имплантации крысам. Данные радиографического анализа мягких тканей животных в области имплантации показали, что во всех опытных группах с ErhBMP-2 наблюдались более выраженные и большие по размеру рентгеноконтрастные тени по сравнению с группами, получившими CrhBMP-2. Авторы отмечают также выраженный положительный дозозависимый эффект. Биохимические исследования активности ErhBMP-2 не выявили преимущества над CrhBMP-2, однако, по данным гистоморфометрических исследований имплантатов, площадь новообразованного костного матрикса и объем красного костного мозга в группах с ErhBMP-2 превышали таковые показатели в группах с CrhBMP-2. При этом бактериальный белок индуцировал остеогенез преимущественно в периферических областях имплантата, в то время как rhBMP-2 из культуры клеток СНО – в центральной части, что предположительно объясняется более быстрым выходом ErhBMP-2 из имплантата (Bessho et al., 2000).

Таким образом, по своей биологической активности rhBMP-2, полученный с помощью микробиологического синтеза, не только не уступает белку, полученному в экспрессионной системе СНО, но и по некоторым показателям превосходит его. При оптимизации экспрессии rhBMP-2, его свойств и увеличении выхода биологически активной формы белка, бактериальный синтез выглядит предпочтительнее остальных способов получения. Дешевизна синтеза рекомбинантных белков в бактериологических продуцентах позволит уменьшить экономические затраты на производство

rhBMP-2 и получить коммерчески более доступные остеоиндуктивные материалы.

### **1.3 Оптимизация экспрессии и очистка димерной формы rhBMP-2, полученного микробиологическим синтезом**

Для оптимизации экспрессии и свойств rhBMP-2, получаемого с помощью микробиологического синтеза, а также эффективного выделения биологически активной димерной формы может быть использовано несколько подходов:

- 1) Коэкспрессия белков, облегчающих формирование дисульфидных связей в периплазме;
- 2) Использование мутантных штаммов продуцентов *E. coli*, в которых могут образовываться дисульфидные связи.
- 3) Обеспечение секреции целевого белка в периплазматическое пространство клетки;
- 4) Очистка димерной формы белка с помощью его связывания со специфическим рецептором клеточной мембраны.

Образование дисульфидных связей направлено на стабилизацию конформации молекулы белка (Creighton, 1986), поэтому уменьшение их количества приводит к невозможности правильного фолдинга белка даже в отсутствие каких-либо денатурирующих агентов. Также, дисульфидные связи могут оказывать опосредованное влияние на функциональность белка: неправильное связывание цистеиновых остатков в структуре белка может привести лишь к частичному фолдингу и потере термодинамической стабильности молекулы и, следовательно, ее биологической активности (Missiakas et al., 1997).

Формирование дисульфидных связей *in vitro* – достаточно продолжительный процесс, который может занимать от нескольких часов до нескольких суток, однако *in vivo* подобные реакции протекают намного быстрее. У эукариотических продуцентов S-S связи образуются в эндоплазматическом ретикулуме, у бактерий – в периплазматическом

пространстве клетки, при этом катализ образования дисульфидных связей у бактерий намного сложнее, чем у эукариот. Данный процесс регулируется ферментами тиолдисульфидредуктазной системы, тиоредоксинредуктазой и глутаредоксинредуктазой, которые препятствуют образованию стабильных дисульфидных связей (Holmgren, 1989).

Существуют коммерческие мутантные штаммы (SHuffle *E. coli*), в генотип которых внесены делеции генов, кодирующие тиолдисульфидредуктазы. Кроме того, в хромосомах этих штаммов есть ген, экспрессирующий цитоплазматическую форму дисульфидизомеразы С (DsbC), которая обладает шаперонной активностью и облегчает образование «правильных» S-S связей в процессе фолдинга белков. Показано, что способность DsbC катализировать образование дисульфидных связей выше, чем у дисульфидизомеразы А (DsbA) или протеиндисульфидизомеразы (PDI) (Zapun et al., 1995).

Таким образом, использование штаммов, мутантных по генам, кодирующим ферменты тиолдисульфидредуктазной системы, представляется перспективным для последующей трансформации в них плазмид, кодирующих rhBMP-2.

Стабильность экспрессируемых рекомбинантных белков также может увеличить их секреция в периплазму. Было показано, что при секреции в периплазму, например, молекулы проинсулина, ее период полураспада увеличивался до 10 раз (Talmadge et al., 1982). Повышенная стабильность целевого белка, вероятно, обусловлена содержанием меньшего количества протеаз в периплазме *E. coli* (Gottesman, 1996; Mergulhao et al., 2004). Таким образом, присоединение сигнала, обеспечивающего выход белка в периплазматическое пространство клетки, к гену, кодирующему rhBMP-2, может способствовать облегчению формирования внутримолекулярных S-S связей, повысить стабильность димерной формы белка и увеличить ее выход.

Известно, что различные BMP способны связываться с клеточными рецепторами двух типов: типа I и типа II (Massagué, 1998; Miyazono et al., 2001).

Наиболее хорошо изучены условия взаимодействия BMP с рецепторами типа I, к которым относятся такие рецепторы, как BMPRIA (ALK3), BMPRIВ (ALK6), ActRIA (ALK2) и другие, способные взаимодействовать с этими белками только в форме димера и образовывать с ними комплексы (Kirsch et al., 2000a). Например, в работе ten Dijke P. и др. показано, что в присутствии рецептора типа II (DAF4) BMP-4 максимально эффективно взаимодействует с BMPRIA и BMPRIВ, BMP-7 – с ActRIA и BMPRIВ, и гораздо слабее – с BMPRIA (ten Dijke et al., 1994).

Kirsch с соавторами было показано, что BMP-2 одним своим эпитопом связывается с рецепторами первого типа (BMPRIA и BMPRIВ), а другим – с BMP-рецептором второго типа и активиновым рецептором второго типа (Kirsch et al., 2000b). При этом максимальной способностью к связыванию с BMP-2 обладает рецептор клеточной мембраны BMPRIA ( $K_D = 0,8$  нМ) (рисунок 6) (Heinecke et al., 2009)

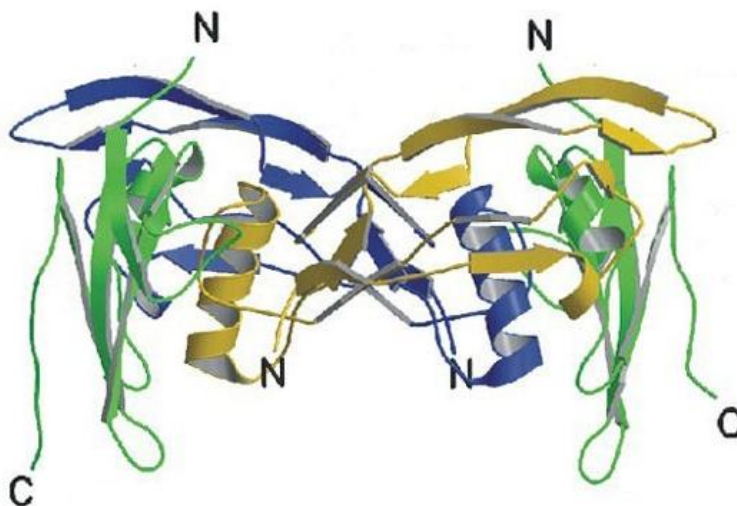


Рисунок 6. Архитектура взаимодействия BMP-2 и BMPRIA. Молекула BMP-2 показана синим и желтым цветами, BMPRIA – зеленым. Адаптировано из работы Keller et al., 2004.

Способность рецепторов к специфическому связыванию со своим клеточным лигандом может быть использована для эффективной финальной очистки димерной формы rhBMP-2, а ее комбинирование с подходами, облегчающими формирование дисульфидных связей в процессе биосинтеза



белка, может привести к увеличению биологической активности препарата rhBMP-2.

#### **1.4 Остеопластические материалы – перспективы применения в медицине и ветеринарии**

Остеопластическими называют материалы, применяемые для восстановления целостности костной ткани животных и человека. Важность их использования подтверждается данными статистики: ежегодно в мире проводится около 4 миллионов операций, связанных с трансплантацией костной ткани или применением остеопластических материалов в качестве заместителей (Brydone et al., 2010).

##### **1.4.1 Требования к современным остеопластическим материалам**

Важнейшие качества остеопластических материалов, влияющие на регенерацию костной ткани: структура материала, остеогенность, остеокондуктивность, остеоиндуктивность, остеоинтеграция (Albrektsson et al., 1982; Bhatt et al., 2012; Brydone et al., 2010).

Физическая структура и характеристики материалов (объем, форма, размер частиц, пористость, пластичность, компрессионная и торсионная устойчивость и т.д.) во многом определяют их остеогенную активность и должны соответствовать конкретному случаю их применения в клинической практике.

Благодаря наличию остеокондуктивных качеств материалы обеспечивают образующуюся *de novo* костную ткань матрицей для адгезии остеогенных клеток и проникновения их вглубь пор и каналов пористых материалов.

Остеоиндуктивность, по определению Wilson-Hench, – это способность стимулировать остеогенез при введении в организм (Wilson-Hench, 1987). Благодаря этому свойству происходит активация клеток-предшественников, индукция их пролиферации и дифференцировки в остеогенные клетки.

Остеоинтеграция обеспечивает устойчивое закрепление имплантированного материала за счет его непосредственного взаимодействия с

поверхностью материнской кости, что порой играет решающую роль в хирургических операциях, в частности, челюстно-лицевого отдела (Albrektsson et al., 2001).

Получение остеопластических материалов сопряжено не только с подбором их компонентов и других параметров для достижения оптимального набора свойств, но и с выбором адекватных экспериментальных моделей и методов тестирования материалов *in vivo* и *in vitro*.

#### **1.4.2 Тестирование активности остеопластических материалов**

*In vitro* исследования применяются, в основном, для оценки цитотоксичности материалов и/или их составляющих, а также для проверки их цитосовместимости, остеиндуктивности, влияния на клеточную пролиферацию и дифференцировку (Pearce et al., 2007; Pizzoferrato et al., 1994).

Преимуществом тестирования *in vitro* является относительная дешевизна, высокая стандартизованность проведения эксперимента, однако на данной модели невозможно продемонстрировать реальное поведение материала в организме. Например, цитотоксичность может варьировать в зависимости от того, на какой клеточной линии тестируются материалы. Невозможно также оценить хроническую токсичность применения из-за относительно короткого срока жизни клеток (Pizzoferrato et al., 1994). Кроме того, на материал, имплантированный *in vivo*, оказывают влияние многие типы клеток и биологические жидкости, что невозможно смоделировать в культуре клеток.

Таким образом, крайне важным становится выбор модели исследования биологической активности остеопластических материалов *in vivo*, который сопряжен с несколькими существенными моментами.

При выборе экспериментальных животных для достижения целей эксперимента следует учитывать их стоимость и доступность, среднюю продолжительность жизни, видовые особенности строения костной ткани, генетическую, возрастную, половую, весовую однородность, условия содержания и кормления, удобство проведения манипуляций и наблюдения за состоянием здоровья и поведением животных в послеоперационном периоде

(Egermann et al., 2005; Pearce et al., 2007). Во время проведения хирургических манипуляций следует стараться минимизировать травматизацию тканей, так как после повреждения запускается каскад направленных на заживление ткани клеточных реакций, которые потенциально могут оказать опосредованное влияние на остеогенез (Anderson, 2000).

Остеоиндуктивность материалов *in vivo* оценивают по их влиянию на остео- и хондрогенез при имплантации в различные ткани животных.

Классическая и исторически первая модель – оценка способности материалов индуцировать эктопический остеогенез при внутримышечной и подкожной имплантации (An et al., 1999; Barradas et al., 2011; Meretoja et al., 2012; Park et al., 2012; Pearce et al., 2007).

По некоторым литературным данным, интенсивность формирования костной ткани *de novo* при внутримышечной имплантации в целом выше, чем в случае подкожной, что можно объяснить, вероятно, более обильным кровоснабжением (Habibovic et al., 2006). Большое значение имеют физические параметры имплантируемого материала, например, его консистенция и размеры по отношению к животному могут оказывать существенное влияние на интенсивность процессов остеогенеза. В экспериментах Barradas на мелком рогатом скоте показано, что при внутримышечной имплантации козам материалов одинакового состава, но вдвое различающихся по размерам, количество новообразованной кости было выше в группе с более крупными имплантатами (Barradas et al., 2011). По данным Habibovic, эктопический остеогенез начинался раньше также в случае имплантации более крупных образцов материала (Habibovic et al., 2006).

В клинической практике остеопластические материалы применяются для регенерации именно костной ткани, поэтому для всесторонней оценки необходимо проводить их исследование на моделях имплантации в костные дефекты *in vivo*. В ортопедии при лечении дефектов их размеры порой могут быть настолько велики, что возможность восстановления целостности за счет собственных способностей организма к регенерации отсутствует (Burg et al.,

2000). В таком случае, целесообразным становится изучение поведения остеопластических материалов на моделях с созданием у животных дефектов критического размера. По определению, таковыми называются дефекты, которые в отсутствии постороннего вмешательства в течение всей жизни животного могут быть заполнены новообразованной костной тканью не более чем на 10% (Hollinger et al., 1990; Schmitz et al., 1986). При этом, помимо очагов костной ткани дефект заполняется соединительной и фиброзной тканями, однако достижения полной первоначальной анатомо-физиологической функциональности поврежденного сегмента не наблюдается (Habibovic et al., 2006). Остеогенез протекает за счет дифференцировки мезенхимальных клеток в хондро- и остеобласты под действием факторов роста, выделяющихся при повреждении кости.

В попытках создания унифицированной, высоковоспроизводимой и приближенной к реальным условиям применения материалов экспериментальной модели были предложены различные варианты создания дефектов критического размера пластинчатых (кости черепа, нижняя челюсть), либо трубчатых костей (бедренная, большеберцовая, лучевая, локтевая кости) (Jones et al., 2008; Rapp et al., 2012; Shand et al., 2010; Tanuma et al., 2013; Yu et al., 2012).

Для контроля и оценки скорости и степени выраженности регенерации костной ткани применяются визуально-макроскопические, биомеханические, рентгенологические, томографические, гистоморфологические, иммуногистохимические методы исследования, а также мечение остеотропными флуоресцентными метками.

### **1.4.3 Многообразие остеопластических материалов**

В настоящее время широко применяется множество костных трансплантатов и их заместителей естественного и искусственного (синтетического) происхождения.

«Золотым стандартом» материалов для восстановления костной ткани в травматологии и ортопедии считается аутогенный трансплантат губчатой кости

пациента. Наиболее распространенным местом биопсии является гребень подвздошной кости, хотя для забора аутотрансплантата используют также костномозговые каналы длинных трубчатых костей (проксимальный или дистальный отделы большеберцовой кости, дистальный отдел лучевой кости) и большой вертел бедренной кости (Myeroff et al., 2011).

Недостатки использования аутотрансплантата – ограничения по его объему и риск возникновения дальнейших осложнений, сопутствующих травмированию во время биопсии – переломов, развитие гематом, инфекционных процессов, гипертрофических разрастаний рубцовой ткани (Dimitriou et al., 2011). Кроме того, существуют возрастные ограничения забора аутогенного материала, связанные с явлением остеопороза.

В силу перечисленных причин зачастую вариантами выбора для оперативного лечения становятся материалы аллогенного, ксеногенного или искусственного происхождения.

Аллокостные материалы получают из фрагментов костей доноров или умерших людей и животных. Обычно их применяют в случае недоступности или недостаточного количества аутокости пациента. Перед использованием аллокость человека подвергают замораживанию или замораживанию с последующим высушиванием до достижения ~5% содержания остаточной влаги, для того, чтобы удалить клетки донора и снизить иммуногенность и потенциальную вероятность трансмиссивной передачи болезней (Dick et al., 1994). Вымороженная аллокость более иммуногенна, чем выморожено-высушенная, и обладает меньшим сроком хранения – до 5 лет при соблюдении всех необходимых условий. Кроме того, остеоиндуктивные свойства материала ухудшаются во время стерилизации (Bhatt et al., 2012).

В клинической практике широко применяются аллотрансплантаты из костного матрикса ксеногенного (животного) происхождения. Основным источником их получения служат кости крупного рогатого скота (КРС), обработанные специальным образом. Материалы из костного матрикса могут содержать минеральные компоненты, либо подвергаться их удалению с

получением ДКМ. Удаление минерального компонента во время обработки увеличивает доступность нативных белковых факторов роста и регенерации, но одновременно с этим снижает прочность материала. Материалы ДКМ по занимаемой ими доле на рынке превосходят все остальные. В частности, согласно данным Millenium Research Group по состоянию на 2005 год ДКМ используется в 108000 операциях в год, занимает 20% прибыли рынка, и тенденция к применению ДКМ постоянно растет (Gruskin et al., 2012; Mendenhall Associates Inc., 2008).

ДКМ доступен в разнообразных формах исполнения (гранулы, порошок, чипсы, клинья, блоки, гвозди и т.д.), что увеличивает удобство и расширяет области его использования для заполнения дефектов костной ткани (Finkemeier, 2002). Благодаря удачному сочетанию остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств ДКМ активно применяется в трансплантологии. По данным Wang, полученным на экспериментальной модели артродеза позвонков крыс, коммерчески доступные материалы Osteofit и Grafton на основе ДКМ демонстрировали более высокую эффективность стимулирования эктопического остеогенеза в сравнении с аутотрансплантатом (Wang et al., 2007). Наиболее широко применяемые в клинической практике зарубежные аллопластические материалы без дополнительных компонентов: Allopure, линейки продуктов Cornerstone, Graftech и Raptos (Bhatt et al., 2012).

Для улучшения характеристик трансплантатов, предотвращения рисков возможного трансмиссивного заражения болезнями и минимизирования иммуногенности разработано множество синтетических заместителей костных трансплантатов. Их можно условно классифицировать на 3 группы: керамики, цементы и биоактивные стекла.

К керамическим костнозамещающим материалам относятся гидроксиапатит (ГАП), трикальций фосфат (ТКФ), двухфазный фосфат кальция (ДФК) и сульфат кальция (Veaman et al., 2006).

Около 70% сухой массы кости приходится на минеральный компонент, представляющий собой одну из форм фосфата кальция – гидроксиапатит

( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$  или  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{OH}$ ). Синтетический ГАП по кристаллической структуре схож с природным и обладает остеокондуктивными свойствами. Безопасность и эффективность применения ГАП в качестве материала для восполнения объема костной ткани была продемонстрирована в доклинических исследованиях на собаках. Авторы имплантировали пористый ГАП в дефект проксимального метафиза большеберцовой кости. По данным гистологического анализа, через 12 месяцев после операции область имплантации была заполнена ГАПом на 35%, мягкими тканями – на 52% и новообразованной костной тканью – на 13%. При этом отмечено, что костной тканью было покрыто до 67% поверхности имплантированного материала (Holmes et al., 1986).

Matsumine с соавторами провели ретроспективный анализ результатов оперативного лечения доброкачественных опухолей костной ткани у 51 пациента. Средний период послеоперационного наблюдения составлял 11,4 года. За это время не было отмечено никаких новообразований и осложнений, связанных с аллергизацией. Рентгенологические данные свидетельствуют об инкорпорации ГАП в материнскую кость. Несмотря на то, что резорбция активнее протекала у мужчин и подростков, во всех случаях применения ГАП не наблюдалось его полного замещения новообразованной костью (Matsumine et al., 2004). Среди зарубежных коммерчески доступных ГАП-материалов можно перечислить Cerabone, Ostim, Endobon, ProOsteon 500. Однако отсутствие остеоиндуктивности и низкая биорезорбируемость ограничивают их клиническое применение (Bohner, 2000).

Другой синтетический керамический материал – ТКФ (эмпирическая формула  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ). Он менее прочный по сравнению с гидроксиапатитом, но более подвержен резорбции. ТКФ существует в  $\alpha$ - и  $\beta$ - кристаллических формах. Наиболее часто в клинической практике применяется  $\beta$ -ТКФ. Он обладает пористой структурой (50% пор имеют диаметр 250-400 мкм) и резорбируется в 10-20 раз быстрее ГАПа (Ducheune et al., 1993; LeGeros, 1993). Гранулы и блоки из  $\beta$ -ТКФ по прочности сравнимы с губчатой костной тканью, но вместе с тем хрупки и обладают малой прочностью на разрыв (Jarcho, 1981).

Остеокондуктивные свойства ТКФ были продемонстрированы в многочисленных доклинических испытаниях. Например, Luvizuto с соавторами в экспериментах на крысах показали, что при заполнении ТКФ краниальных дефектов наибольшее количество новообразованной костной ткани спустя 60 суток после операции наблюдается в группе с использованием ТКФ (Luvizuto et al., 2012).  $\beta$ -трикальцийфосфат успешно применяется в стоматологии и спинальной хирургии (Epstein, 2009; Ogose et al., 2005). Hirata с соавторами использовали  $\beta$ -ТКФ в лечении доброкачественных новообразований костной ткани различной локализации у 53 разновозрастных пациентов. По данным радиографического исследования в 43% случаев к 13 месяцу отмечена полная резорбция материала с завершением костного ремоделирования. Случаев возникновения осложнений или побочной реакции на материал в послеоперационном периоде отмечено не было (Hirata et al., 2006). Среди наиболее перспективных коммерческих материалов на основе  $\beta$ -ТКФ: Cerasorb, ChronOS, Orthograft, Osferion, Vitoss.

ДФК представляет собой смесь ГАП и  $\beta$ -ТКФ в разных пропорциях. В зависимости от соотношения компонентов, метода и температуры получения ДФК, можно варьировать его микроструктуру (в частности, пористость) и остеогенные свойства (Habibovic et al., 2006; Habibovic et al., 2008).

Двухфазный фосфат кальция сочетает в себе ускоренную биорезорбируемость  $\beta$ -ТКФ и механическую прочность ГАП. В настоящее время коммерчески доступны материалы MBCP, OpteMx, Eclipse и другие, различающиеся соотношением компонентов, пористостью, формой. Например, BoneSave представляет собой гранулы (20% ГАП и 80%  $\beta$ -ТКФ) и используется в реконструктивной хирургии в импакционной трансплантации и заполнении костных дефектов, не несущих функциональной нагрузки (Blom et al., 2009; Friedmann et al., 2009; Fujibayashi et al., 2001; Kasai et al., 2003). При использовании ДФК следует учитывать, что по сравнению с ауто- и аллотрансплантатами, их механические свойства существенно отличаются. Так, частицы более жесткие, не подвержены деформации и не обладают



вязкоупругими свойствами, что ограничивает их области применения (Verdonschot et al., 2001).

Сульфат кальция ( $\text{CaSO}_4$ ) был впервые применен для заполнения полостей дефектов костной ткани в 1892 году. Кристаллы  $\text{CaSO}_4$  получают нагреванием гипса. Этот материал остеокондуктивен, обладает большим сопротивлением на сжатие по сравнению с губчатой костью, но меньшим пределом прочности на растяжение. Сульфат кальция резорбируется в течение 6 недель (Atilgan et al., 2007) и создает вокруг себя кислую среду, что может ингибировать рост бактерий. Благодаря этому свойству, сульфат кальция долгое время применялся в лечении остеомиелитов самостоятельно или в сочетании с антибиотиками (Russel, 2010).

Активность этого материала была изучена в многочисленных доклинических исследованиях на разных животных. Показано, что он обеспечивает раннее поступление остеопрогениторных клеток в трансплантат и, по некоторым данным, стимулирует ангиогенез, играющий важную роль в регенерации костной ткани (Strocchi et al., 2002). Согласно результатам ряда ретроспективных анализов клинических данных по использованию сульфата кальция в случаях переломов, остеомиелита, доброкачественных новообразований костной ткани, полная остеорепарация наблюдается в 62-100% случаев (Borelli et al., 2003; Gitelis et al., 2004; Helgeson et al., 2009; Mik et al., 2009). Lee с соавторами, однако, отмечают довольно высокий риск возможного развития побочных реакций (в 13,8-19,0% случаев) при заполнении костных полостей материалом Osteoset в ходе лечения доброкачественных новообразований (Lee et al., 2002).

Цементы – это группа пластичных материалов на основе фосфата кальция. Они представляют собой смесь фосфатов кальция, карбоната кальция и ТКФ пастообразной консистенции. В результате экзо- или изотермической кристаллизации компоненты, взаимодействуя друг с другом, отверждаются с образованием даллита, обеспечивающего структурную прочность в месте использования цемента. Его компрессионная прочность превышает таковую

губчатой костной ткани и достигает максимума спустя 24 часа после применения (Wang et al., 2007). Благодаря пастообразной консистенции цементы можно вводить инъекционно, таким образом, равномерно заполняя область дефекта. Цементные материалы обладают osteoconductive свойствами и способностью к osteointegration. Главные недостатки – отсутствие osteoinductivity и потенциальный риск попадания в мягкие ткани во время инъекции, что может привести к травмированию после отверждения (Bhatt et al., 2012).

Кальцийфосфатные цементы в настоящее время часто применяются в вертебропластике, при лечении кавитационных метафизарных дефектов лучевой кости, плато большеберцовой кости, переломов пяточной кости с сопутствующей фиксацией (Bhatt et al., 2012). Cassidy et al. исследовали эффект применения цемента Norian SRS в лечении 323 пациентов с переломами дистального отдела лучевой кости. В одной группе проводилась закрытая репозиция отломков с последующей чрезкожной инъекцией Norian SRS, в другой – закрытая репозиция с наружной фиксацией. В обеих группах в отдельных случаях для дополнительной фиксации использовали спицы Киршнера. По результатам наблюдения пациентов спустя 6 недель после операции в группе с применением цемента наблюдались ускоренные признаки реабилитации (Cassidy et al., 2003). В настоящее время кроме Norian SRS коммерчески доступны материалы BoneSource, ChronOS Inject, Callos, Hydroset, Alpha BSM, Mimix, Calcibon.

Биоактивные стекла были впервые созданы Larry Hench в 1969 году. Он показал, что стекло с молекулярно-весовым соотношением компонентов 46,1% SiO<sub>2</sub>, 24,4% Na<sub>2</sub>O, 26,9% CaO и 2,6% P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>, позднее получившее название Bioglass 45S5, настолько сильно интегрировалось с костью, что его нельзя было удалить, не повредив ее (Hench et al., 1971). В настоящее время известно три типа биоактивных стекол: классические (наподобие 45S5) и полученные на основе фосфатов или боратов (Jones, 2013). Стоит, однако, отметить, что наилучшими биологическими свойствами обладает Bioglass 45S5.

На модели имплантации материалов в дефект критического размера мышечков бедренной кости кроликов материал Bioglass 45S5 продемонстрировал в 17 раз большее количество новообразованной костной ткани спустя 1 неделю и вдвое большее количество через 24 недели после операции по сравнению с дефектом, заполненным ГАП (Oonishi et al., 2000). Также показано, что Bioglass 45S5 обладает улучшенной биodeградируемостью за счет своих физических свойств. Среди наиболее успешных коммерческих продуктов: Cortoss, Rhakoss, NovaBone.

Многообразие костных трансплантатов доказывает, что в настоящее время не существует идеального материала, успешно сочетающего в себе все необходимые для быстрой регенерации костной ткани характеристики (таблица 1).

Таблица 1 – Некоторые коммерчески доступные заместители костной ткани на основе различных компонентов.

<i>Основной компонент</i>	<i>Название материала</i>
ДКМ	Osteofit, Grafton, Allopure, линейки продуктов Cornerstone, Graftech и Raptos
ГАП	Cerabone, Ostim, Endobon, ProOsteon 500
$\beta$ -ТКФ	Cerasorb, ChronOS, Orthograft, Osferion, Vitoss.
ДФК	MBCP, OpteMx, Eclipse BoneSave
CaSO <sub>4</sub>	Osteoset, BonePlast, MIIG X3, Calceon, Stimulan
Цементы	Norian SRS, BoneSource, ChronOS Inject, Callos, Hydroset, Alpha BSM, Mimix, Calcibon
Биостекла	Cortoss, Rhakoss, NovaBone
Коллаген с добавлением BMP-2	Infuse Bone Graft Kit, InductOs
Коллаген с добавлением BMP-7	OP-1 Implant, Osigraft

С целью повышения osteoиндуктивности трансплантатов в них добавляют факторы роста и регенерации, что позволяет в значительной степени увеличить интенсивность osteогенеза и, как следствие, ускорить заживление дефектов.

#### **1.4.4 Остеоиндуктивные материалы с добавлением BMP и их клиническое применение в медицине и ветеринарии**

Материалы, содержащие в своем составе BMP, считаются наиболее перспективными на современном рынке костных трансплантатов. Несмотря на то, что было открыто около 20 членов семейства BMP, Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) и Европейским агентством лекарственных средств (European Medicines Agency, EMEA) к ограниченному клиническому применению одобрены материалы, содержащие только два из них – BMP-2 и BMP-7 (Friedlaende et al., 2001; Giannoudis et al., 2005; Govender et al., 2002).

Многочисленные испытания на моделях животных показали эффективность применения BMP-содержащих материалов при лечении переломов длинных трубчатых костей, метафизарных переломов, спондилодезах и т.д. (Mauffrey et al., 2011; Pluhar et al., 2006).

В 2002 году FDA одобрила материал на основе rhBMP-2, связанного с абсорбируемой коллагеновой губкой в концентрации 1,5 мг/см<sup>3</sup> («INFUSE Bone Graft», Medtronic Spinal and Biologics, Memphis, TN), для применения в качестве заменителя аутокости в случаях переднего поясничного межтелового спондилодеза. В 2004 году «INFUSE Bone Graft» разрешили к применению для лечения открытых переломов большеберцовой кости в сочетании с интрамедуллярной фиксацией штифтом. В марте 2007 года этот материал был одобрен FDA к применению в стоматологии в качестве альтернативы аутологичным трансплантатам в операциях по поднятию синуса и альвеолярного гребня (McKay et al., 2007).

После многочисленных сообщений врачей о благоприятных исходах применения «INFUSE Bone Graft» в передних поясничных межтеловых спондилодезах в комбинации с титановыми кейджами появились случаи нерегламентированного FDA использования материала, например, в шейных и задних поясничных межтеловых спондилодезах. По данным Ong к 2010 году

количество таких случаев составило до 85% от общего числа операций (Ong et al., 2010).

Литературные данные о послеоперационных осложнениях при использовании rhBMP-2 противоречивы. У пациентов наблюдались случаи образования сером, массивных отеков мягких тканей, послеоперационных радикулитов и ретроградной эякуляции. Хотя не было отмечено никаких специфических осложнений, развившихся вследствие применения rhBMP-2, а не по причине полученной операционной травмы, частота их возникновения, вероятно, выше в случаях использования материала с белком, по сравнению с ауто трансплантатом (Even et al., 2012; Sanfilippo et al., 2007).

Остеоиндуктивный материал «OP-1 Implant» (Stryker Biotech) на основе rhBMP-7 применяется намного реже, чем «INFUSE Bone Graft». В 2001 году он был одобрен к применению в лечении длительно несрастающихся переломов длинных трубчатых костей, а в 2004 году – для ревизионной хирургии постеролатеральных поясничных артродезов, если применение ауто трансплантата не позволяет достигнуть благоприятного исхода (Barr et al., 2010; Vaccaro et al., 2005). Согласно сообщениям некоторых исследователей «OP-1 Implant» в сочетании с различными аппаратами фиксации успешно используется в лечении переломов и несращений длинных трубчатых костей верхней конечности (Bilic et al., 2006; Bong et al., 2005; Papanna et al., 2012; Van Houwelingen et al., 2005).

Применение остеиндуктивных материалов с BMP в сельском хозяйстве, в основном, ограничивается их тестированием в рамках экспериментальных моделей для оценки регенеративного потенциала трансплантатов. В клинической же практике оно затруднено ввиду экономической нецелесообразности, поэтому лечение переломов в условиях хозяйств проводится либо с помощью классической иммобилизации после репонирования, либо с дополнительным введением в пространство между отломками более дешевых ауто- и аллотрансплантатов (Barneveld, 1994; Kasari et al., 1992; Mulon, 2013; Nunamaker, 2002). Тем не менее, есть несколько

упоминаний об успешном клиническом применении rhBMP-2 для стимулирования регенерации костной ткани у лошадей. Например, Lippold с соавторами использовали rhBMP-2 в комбинации с металлофиксаторами для артродеза путового сустава (Lippold et al., 2004).

В большинстве случаев лечения домашних животных для улучшения регенерации костной ткани достаточно применения аутологичного трансплантата. Однако когда его биопсия недоступна или не позволяет получить необходимого количества ауотрансплантата, а также в случаях длительного замедленного сращения отломков, целесообразно проводить лечение с применением BMP-содержащих материалов.

В 1996 году в литературе был описан первый клинический случай успешного применения BMP для лечения несращения костей и псевдоартроза у двух собак (Raatsama et al., 1996). Также есть сообщения о применении rhBMP-2 у собак для лечения переломов бедренной кости (Itoh et al., 1998), лучевой кости (Hong, 2001), реконструкции тела нижней челюсти после огнестрельного ранения (Lewis et al., 2008) и гемимандибулоэктомии (Boudrieau et al., 2004) и другие (Kirker-Head et al., 2007).

В работе Milovancev et al. описано применение rhBMP-2 у 4 собак в виде чрезкожной инъекции в случаях запоздалого сращения или несращения переломов, остеотомии, артродеза (Milovancev et al., 2007). У трех пациентов в качестве носителя белка использовали кальцийфосфатный матрикс, а у одного коммерчески доступный материал «INFUSE Bone Graft». У всех пациентов исход лечения был положительным, а побочные эффекты минимальны.

В работе Pinel проведен анализ клинического использования коммерчески доступных материалов с rhBMP-2 и rhBMP-7 у 11 собак и 2 кошек (Pinel et al., 2012). Случаи были разделены на 3 категории: несращения, замедленные сращения, переломы с осложнениями в процессе операции и послеоперационном периоде. «OP-1 Implant» использовали в 3 случаях (1 кошка, 2 собаки), в остальных случаях применяли «INFUSE Bone Graft». Ни у одного животного в послеоперационном периоде наблюдения не было

отмечено побочных эффектов, а средняя оценка удовлетворенности исходом лечения питомцев при опросе хозяев составила 9,7 баллов из 10.

Таким образом, применение ВМР-содержащих материалов представляет собой многообещающую и перспективную стратегию лечения травм костного аппарата в медицине и ветеринарии. Garrison et al провели статистический анализ применения ВМР-содержащих материалов в лечении пациентов Великобритании и оценили его экономическую эффективность по состоянию на 2006 год (Garrison et al., 2007). Экономическая оценка показала, что использование ВМР-содержащих материалов для сращений переломов позвонков на момент исследования не приносило явной экономической выгоды. Однако, в случаях лечения острых открытых переломов использование ВМР в дополнение к стандартным методам более эффективно, и при снижении рыночной стоимости этих материалов можно дополнительно повысить экономическую эффективность их применения (Alt et al., 2009).

## **2 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ**

### **2.1 Материалы и реактивы**

Экспериментальные работы проводились с использованием нижеперечисленных материалов и реактивов.

#### **2.1.1 Генно-инженерные конструкции**

Использовали плазмидный вектор pQE6 фирмы Qiagen (США) и вектор ptt10, содержащий участок, кодирующий глицин-сериновый спейсер, соединенный с целлюлозосвязывающим доменом (Cellulose Binding Domain, CBD) из *Caldicellulosiruptor bescii*.

#### **2.1.2 Бактериальные штаммы-продуценты**

В работе использовали бактериальный штамм *E. coli* M15 [Rep4].

#### **2.1.3 Питательные среды**

Жидкая среда LB (Luria-Bertani) (Маниатис и др., 1984) для выращивания бактерий состава: 1% бакто-триптона (Difco, США), 0,5% дрожжевой экстракт (Difco, США), 1% NaCl (Difco, США). Среду титровали до pH 7,4-7,6 при помощи 0,1 М раствора NaOH. Среда LB для электропорации содержала: 1% бакто-триптон, 0,5% дрожжевой экстракт, 0,5% NaCl.

Твердая питательная среда – среда LB – содержала 1,7% бакто-агара и 1% глюкозы. Все среды перед употреблением подвергались стерилизации автоклавированием при 121°C и давлении 0,1 МПа в течение 15 мин.

Среда для культивирования эукариотических клеток: DMEMF12 (Biofluids, США) с 10% и 0,5% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США), среда  $\alpha$ -MEM с 15% эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия).

#### **2.1.4 Реагенты и ветеринарные препараты**

В работе использовались следующие реагенты: эндонуклеазы рестрикции NcoI, NcoII и BamHI, Трис-ацетат, Трис-HCl, магния ацетат, калия ацетат, бычий сывороточный альбумин (БСА), ДНК-лигаза фага T4, магния хлорид,



дитиотреитол (ДТТ), аденозинтрифосфат (АТФ), канамицин, ампициллин, стерильная бидистиллированная деионизированная вода, глицерин, изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид (ИПТГ), глюкоза, магния сульфат, пептон, дрожжевой экстракт, аммиак, тритон X-100, натрия хлорид, лизоцим, сорбент perloza MT 200 (Iontosorb, Чехия), акриламид, N,N-метиленабисакриламид, N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин, аммония персульфат, бромфеноловый синий, Кумасси R-250, изопропанол, уксусная кислота, коктейль ингибиторов протеаз Sigma P8340, мочевины, L-аргинин, этанол, диэтиловый эфир, соляная кислота, кальция хлорид, дрожжевой автолизат, бактопептон, дрожжевой пептон, гидролизат казеина (ГК) CM7, калия гидрофосфаты, калия дигидрофосфаты, 10% нейтральный забуференный формалин, муравьиная кислота, дистиллированная вода, гематоксилин Майера, эозин, ксилол, карбол, канадский бальзам, тритон-X 100, пара-нитрофенилфосфат, азур-эозин, бычий тромбин (PZ SOPMAY S.A., Польша), натриевая соль гиалуроновой кислоты FL53747 (Fluka, Германия).

Также, для работы с животными использовали следующие ветеринарные препараты: «Золетил 100» (Virbac S.A., Франция), «Рометар» (Bioveta, Чехия), «Normigel» (Mölnlycke Health Care AB, Швеция), «Велтосепт-2» (ООО «НПО «ВЕЛТ», Россия), «Тетрацилин» (Pfizer Animal Health, США), «Новокаин».

### **2.1.5 Оборудование и программное обеспечение**

Качалка Ecotron (Infors HT, Швейцария), центрифуги Centrifuge 5810R (Eppendorf, Германия) и Sigma 1-14 Microfuge (Sigma, Германия), прибор для электропорации Gene Pulser (Bio-Rad, США), спектрофотометр iEMS Reader MF (ThermoLabsystems, Финляндия), камера для проведения вертикального электрофореза (Amersham, США), ферментер Bioflo 415 (New Brunswick Scientific, США), автоклав Sanyo Labo Autoclave MLS-3020U (Sanyo, Япония), аквадистиллятор электрический АЭ-10 МО (Тюмень, Россия), установка водоподготовки серии УВОИ-«МФ»-1812 (НПК Медиана-Фильтр, Россия), система жидкостной колоночной ионнообменной хроматографии низкого давления BioLogic «BioRad» (BioRad, США), сорбенты для хроматографии

СПС-Био SP (50мкм), СПС-Био Q (150мкм), WorkBeads 40S, ленточная пила C/E165 (La Minerva, Испания), сушильный шкаф ED53 (Binder, Германия), мельница SM100 (Restch, Германия), мельница MF 10 basic (IKA WERKE, Германия), виброгрохот ВП-30Т (Вибротехник, Россия), экстрактор ХТ10 (АНКОМ Technology, США), электронный сканирующий микроскоп Quanta 200 (FEI Company, США), анализатор влажности MB45 (Ohaus, Швейцария), лёдогенератор (Frimont, Италия), рН-метр S20 SevenEasy (Mettler Toledo, Швейцария), установка для радиационной стерилизации ГУ-200, установка для СО<sub>2</sub>-эвтаназии (ООО «НПК Открытая Наука», Россия), гистологический процессор Tissue-Tek (БиоВитрум, Россия), микроскоп Nikon Eclipse E200 (Nikon Instruments Europe B.V.), конфокальный лазерный сканирующий микроскоп Nikon DIGITAL ECLIPSE C1 plus (Nikon Instruments Europe B.V.), микрокомпьютерный томограф SkyScan 1178 (Bruker, США), СО<sub>2</sub>-инкубатор (Sanyo, Япония), ламинарный бокс Lamsystems (ЗАО «Ламинарные системы», Россия), ламинарный бокс Esco (Китай), хирургический столик для лабораторных животных (Medax, Германия), аппарат для хирургии и имплантологии Surgic AP (NSK Nakanishi Inc., Япония), трепан №227C.204.070 (Komet, Германия), бормашина ИВ/Е (Проххон, Германия).

В работе было использовано следующее программное обеспечение: система визуализирования и документирования NIS-Elements D (Nikon Instruments, Europe B.V.); программы фирмы Bruker (США): NRecon (версия 1.6.9.4) для реконструкции томограмм, Data Viewer (версия 1.5.0) и CTvox (версия 2.6.0 r908) для визуализации исходных и реконструированных данных, CT-Analyser (версия 1.13.5.1+) для количественного анализа данных; для оформления работы использовался текстовый редактор MS Office Word 2013, табличный редактор Excel 2013, программа для анализа и графического представления данных OriginPro 9.0.0 (OriginLab Corporation, США), пакет для статистического анализа Statistica 6.0 (StatSoft, США).

### 2.1.6 Лабораторные животные

В работе были использованы половозрелые особи следующих животных: самцы лабораторных крыс стока Wistar весом  $350 \pm 50$  г., полученные из Питомника Филиал "Столбовая" ГУ НЦБМТ РАМН; самцы мышей линии СВА весом  $19,0 \pm 1,0$  г, полученные из Центрального питомника лабораторных животных «Крюково»; кролики обоих полов стадного разведения весом 3-4 кг.

Животные содержались в условиях конвенционального вивария, в качестве подстилки использовались древесные опилки. Воду и комбикорм полнорационный для лабораторных животных (Лабораторкорм, Россия) давали *ad libitum*.

## 2.2 Основные методики

Экспериментальные работы проводились с использованием следующих методик.

### 2.2.1 Подготовка компетентных клеток *E. coli* для трансформации плазмидной ДНК электропорацией

В 100 мл среды LB для электропорации инокулировали 1 мл свежей ночной культуры клеток *E. coli* M15 (с добавлением канамицина в концентрации 25 мкг/мл и ампициллина в концентрации 100 мкг/мл) и выращивали при 37°C с аэрацией на качалке (200 об./мин) до достижения ОП<sub>550</sub> значения 0,5–0,6 ОЕ. После этого клетки переносили в стерильные пробирки для центрифугирования, охлаждали во льду 30 мин и центрифугировали 15 мин при температуре +4°C и скорости 4000 г. После тщательного удаления супернатанта, осадок ресуспендировали в 100 мл (общий объем) стерильной охлажденной до +4°C бидистиллированной деионизированной воды и центрифугировали в вышеописанных условиях. Тщательно удалив супернатант, осадок снова ресуспендировали в 50 мл бидистиллированной деионизированной воды и повторно центрифугировали. Полученный осадок ресуспендировали в 1 мл 10% стерильного охлажденного глицерина и

центрифугировали при параметрах, указанных ранее. После удаления супернатанта осадок ресуспендировали в 2 мл 10% глицерина.

### **2.2.2 Трансформация клеток *E. coli***

Трансформацию плазмидной ДНК в клетки *E. coli* [pREP4] осуществляли методом электропорации согласно инструкции к прибору для электропорации фирмы Bio-Rad (США).

В охлажденной на льду пробирке смешивали 80 мкл суспензии компетентных клеток и раствор ДНК в воде (5-10 мкл лигазной смеси или 1-2 мкл препарата плазмидной ДНК с концентрацией 0,1-0,3 мкг). Смесь хорошо перемешивали и оставляли во льду на 1-2 минуты. Переносили клетки и ДНК в охлажденную, но сухую с наружной стороны, кювету для электропорации. Поместив кювету в камеру прибора проводили трансформацию при следующих условиях: 2,5 кВ, 25 мкФ, 200 Ом. После трансформации кювету извлекали из прибора и быстро добавляли в нее 1 мл среды LB, энергично перемешивали с помощью пипетирования и переносили в пробирку. Суспензию клеток инкубировали в течение 1 часа при 37°C на качалке при 100 об./мин.

Трансформированные клетки отбирали на агаризованной среде LB с антибиотиками канамицином (25 мкг/мл) и ампициллином (100 мкг/мл). Из отобранных рекомбинантных клонов выделяли плазмидную ДНК pBMPRIA-CBD методом щелочного лизиса. Отобранные клоны секвенировали и подтвердили наличие вставки, кодирующей эктодомен рецептора BMPRIA человека.

### **2.2.3 Выращивание штамма-продуцента белка BMPRIA-CBD**

Проверку штамма-продуцента на экспрессию рекомбинантного белка проводили согласно стандартным протоколам фирмы Qiagen (США). Ночную культуру штамма *E. coli* M15 [pREP4, pBMPRIA-CBD], выращивали при температуре 37°C на качалке со скоростью 90 об./мин в 3 мл среды LB с антибиотиками. Для выращивания штамма добавляли 100 мкг/мл ампициллина и 25 мкг/мл канамицина. В качестве контроля при тех же условиях выращивали

штамм-продуцент без рекомбинантной плазмиды. На следующий день 30 мкл каждой ночной культуры пересевали в пробирку с 3 мл среды LB и антибиотиками, выдерживали при той же температуре, но при скорости вращения 180 об./мин в течение примерно 3-х часов до достижения показателя ОП значения 0,6-1,0, а затем индуцировали синтез целевого белка 1 мМ раствором ИПТГ (3,5 мкл) и растили еще 3-4 часа. Синтез белка контролировали с помощью электрофореза в полиакриламидном геле по Лэммли.

Для получения биомассы в небольших количествах с целью подбора состава сред и условий выращивания, а также отработки метода выделения белка, культуры выращивали в колбах объемом 500 мл (количество среды 200 мл). Среды готовили на основе среды LB. Процесс контролировали с помощью электрофореза, а также по весу биомассы и телец включения.

Масштабирование процесса получения биомассы проводили в ферментере. Работы вели, культивируя штамм *E. coli* M15 в ферментере Bioflo 415 (New Brunswick Scientific, США) объемом 14 л (рабочий объем 10 л). Ферментер оснащен магнитной мешалкой с регулируемым числом оборотов, датчиками pH, pO<sub>2</sub>, температуры и уровня пены, перистальтическими насосами для контроля и поддержания pH, пеногашения и подачи подпитки, а также системой сенсорного управления.

Модифицированную среду (LB) готовили в объеме 10 л и стерилизовали непосредственно в ферментере. В качестве пеногасителя использовали разбавленную в 10 раз эмульсию силиконового пеногасителя в количестве 10 мл на 10 л среды.

Раствор глюкозы и сернокислого магния стерилизовали в автоклаве при 121°C 15 мин и подавали в ферментер перистальтическим насосом непосредственно перед засевом. Растворы антибиотиков готовили, взвешивая нужную навеску и растворяя в стерильной воде; вносили в ферментер с помощью шприца.

Для подпитки готовили и стерилизовали в автоклаве растворы глюкозы (стерилизовали отдельно), пептона и дрожжевого экстракта, подавали в процессе ферментации с помощью перистальтического насоса.

Посевную культуру выращивали в течение ночи на термостатируемой качалке при скорости вращения 100 об./мин и температуре 37°C. Засевали в количестве 0,2% от объема среды. рН среды поддерживали автоматически, используя 10% раствор аммиака. Ферментацию проводили при параметрах:

Температура.....	37°C
рН среды.....	7,2 – 7,4
Начальное число оборотов мешалки.....	250 об./мин
Количество подаваемого воздуха.....	1 объем на объем среды в мин.

За процессом следили по показаниям датчиков, а также анализируя пробы, отбираемые каждый час. В пробах определяли ОП, рН, проводили контроль экспрессии белка после внесения ИПТГ с помощью метода электрофореза в полиакриламидном геле. Об окончании ферментации судили по возрастанию  $pO_2$ , рН, а также по замедлению накопления биомассы. Отделение биомассы осуществляли центрифугированием в течение 15 мин при скорости 6000 об./мин и использовали для дальнейшего выделения белка.

#### 2.2.4 Электрофорез белков в ПААГ-ДСН

Электрофорез белков проводили в денатурирующих условиях в полиакриламидном геле в присутствии ДСН (ДСН-ПААГ) по методу Лэммли (Laemmli, 1970). Разделяющий гель содержал от 10% до 15% акриламида, 0,8% N,N-метиленабисакриламида, 0,375 М Трис-НСl (рН 8,8), 0,1% ДСН, 0,2% N,N,N',N'-тетраметилэтилендиамин и 3,49 мМ аммоний персульфат. Разделение проводили в буфере для электрофореза в полиакриламидном геле. Перед нанесением на гель образцы растворяли в двукратном или однократном лизирующем буфере, после чего прогревали в течение 5-10 мин при 95°C. Образцы вносили в лунки концентрирующего геля, содержащего 5% акриламида и 3% N,N-метиленабисакриламида, 0,125 М Трис-НСl (рН 6,8),

расположенного поверх разделяющего геля. Электрофорез проводили при токе 20 мА, до достижения бромфеноловым синим нижней границы разделяющего геля. Гель окрашивали красителем Кумасси R-250, растворенным в концентрации 500 мг/мл в смеси, состоящей из 65% воды, 25% изопропанола и 10% уксусной кислоты в течение 15 минут, после чего гель отмывали водным раствором, содержащим 10% ледяной уксусной кислоты и 10% изопропанола. Белковые полосы, окрашенные в синий цвет Кумасси R-250, наблюдали в видимом свете.

### 2.2.5 Выделение и очистка димерной формы rhBMP-2

Выделение и предварительную очистку rhBMP-2 от примесей липополисахаридов, балластных белков, ДНК и РНК штаммов-продуцентов проводили по методике, описанной Шараповой и соавторами (Шарапова и др., 2010).

К биомассе клеток *E. coli* добавляли лизирующий буфер (50 мМ Трис-НСl, 50 мМ NaCl, 200 мкг/мл лизоцима, коктейль ингибиторов протеаз Sigma P8340) в соотношении 1:4 (w:v), гомогенизировали, инкубировали 20 минут при комнатной температуре, обрабатывали ультразвуком на льду двукратно в течение 2 мин с пульсацией по 5 сек. Полученную смесь центрифугировали 40 мин при 22000 g (+4°C).

После этого осадок дважды промывали посредством его гомогенизации в лизирующем буфере без лизоцима и осаждения центрифугированием в тех же условиях; отмывые тельца включения ресуспендировали в том же буфере и использовали для выделения rhBMP-2.

Для выделения белка из телец включения к ним добавляли буфер состава 4 М мочевины в 50 мМ Трис-НСl, рН 8,0, растворяли на качалке. Полученный раствор центрифугировали в течение 15 минут на скорости 13650 об./мин в центрифуге Eppendorf при температуре +4°C. Осадки отбрасывали, супернатанты собирали и объединяли.

Для увеличения соотношения долей димерной/мономерной формы белка проводили рефолдинг в присутствии L-аргинина. К раствору белка добавляли

двойной объем 1 М раствора L-аргинин–HCl, pH 8,9, инкубировали в течение ночи, затем диализовали против 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0.

### 2.2.6 Проверка биологической активности rhBMP-2 *in vitro*

При проверке активности белка на способность индуцировать синтез щелочной фосфатазы (ЩФ) использовали культуру эукариотических клеток C2C12 (мышцы конечности мыши линии С3Н) из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки засеивали в 48-луночный планшет в концентрации  $10^4$  клеток на лунку и культивировали с использованием среды DMEMF12 (Biofluids, США), содержащей 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США). Условия культивации – 24 часа при температуре 37°C во влажной камере с 5% CO<sub>2</sub> в воздухе. Далее клетки 3 суток инкубировали в 400 мл среды DMEMF12, содержащей 0,5% фетальной сыворотки КРС и рекомбинантный белок rhBMP-2 в 4 концентрациях – 0,05 мкг/мл, 0,5 мкг/мл, 5 мкг/мл, 50 мкг/мл. После инкубации клетки отмывали фосфатно-солевым буферным раствором, разрушали с помощью добавления 0,1% раствора Тритона-X 100 в фосфатном буфере, трехкратно проводили процедуру замораживания-оттаивания с целью разрушения клеточных мембран (Шарапова и др., 2010). Активность щелочной фосфатазы определяли с помощью колориметрического метода с использованием в качестве субстрата пара-нитрофенилфосфата (Яковлева, 2005).

При оценке влияния rhBMP-2 на пролиферацию и остеогенную дифференцировку мультипотентных стромальных клеток (МСК) использовали культуры клеток костного мозга и селезенки мышей. Культуры клеток костного мозга или селезенки мышей эксплантировали во флаконы с площадью дна 25 см<sup>2</sup> по  $5 \times 10^6$  (для костного мозга) и по  $10^7$  (для селезенки). Для культивирования клеток использовалась среда  $\alpha$ -MEM с 15% эмбриональной телячьей сыворотки (ПанЭко, Россия). rhBMP-2 добавляли в культуры однократно (через 10 минут после эксплантации клеток) или двукратно (на 1 и 7 день культивирования) в количестве 1-100 мкг/мл культуральной среды.



Культуры выращивали в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C. Фиксировали этанолом, окрашивали азур-эозином и подсчитывали колонии, содержащие не менее 50 фибробластов. О содержании МСК в клеточных взвесах судили по количеству колоний стромальных фибробластов, которые МСК образуют при эксплантации этих взвесей в монослойные культуры. По числу выросших колоний определяли ЭКО-МСК, то есть число колоний, образующееся при эксплантации 10<sup>5</sup> клеток. Количество макрофагов в культурах определяли, подсчитывая эти клетки в 10 полях зрения.

Об остеогенной активности МСК судили по активности щелочной фосфатазы, которую определяли по методу Гомори (Gomori, 1941).

### **2.2.7 Проверка остеопластических материалов на стерильность**

Стерилизацию опытных образцов материалов осуществляли методом радиационной стерилизации (поглощенная доза 15,0±0,5 кГр) в Федеральном государственном унитарном предприятии «Научно-Исследовательский Институт Приборов». Полученные остеопластические материалы проверяли на стерильность в соответствии с методиками, регламентированными действующим Государственным Стандартом (ГОСТ 28085-89 «Препараты биологические. Метод бактериологического контроля стерильности»).

### **2.2.8 Экспериментальные модели тестирования биологической активности остеоиндуктивных материалов *in vivo***

Перед проведением всех хирургических процедур животных выдерживали в течение 24 часов на голодной диете для облегчения перенесения наркоза. Для введения животных в общий наркоз использовали смесь анестетиков «Золетил 100» (Virbac С.А., Франция) в дозировке 15 мг/кг веса и «Рометар» (Bioveta, Чехия) в дозировке 6 мг/кг веса. Защиту роговицы глаза от иссушения осуществляли обильным нанесением препарата Normlgel (Mölnlycke Health Care AB, Швеция).

Все хирургические процедуры проводили в ламинарном боксе Lamsystems с соблюдением правил асептики и антисептики. Хирургическое

поле освобождали от шерсти, обрабатывали антисептиком «Велтосепт-2» (ООО «НПО «ВЕЛТ», Россия). Крыс фиксировали на хирургическом столике для лабораторных животных (Medax, Германия), оборудованном нагревательным элементом для обеспечения поддержания постоянной температуры тела во время операции (Rigalli et al., 2009).

По окончании операционного вмешательства для предупреждения развития бактериальной инфекции шов обрабатывали антибиотиком широкого спектра действия «Террамицин» (Pfizer Animal Health, США), после чего животных помещали в камеру реабилитации до полного выхода из наркоза и восстановления подвижности.

Животных наблюдали в течение всего времени эксперимента, по достижении ими конечной точки подвергали эвтаназии в CO<sub>2</sub>-камере (ООО «НПК Открытая Наука», Россия) и некропсии.

### **2.2.9 Компьютерно-томографическое исследование**

Томографические исследования проводились с помощью микрокомпьютерного томографа SkyScan 1178 (Bruker, США).

Животных под общим наркозом укладывали в «кровать» в положении лежа на животе, иммобилизовали тело и голову с помощью бумажного скотча во избежание микродвижений во время сканирования.

Сканирование осуществлялось в одном поле зрения камеры при следующих постоянных параметрах – алюминиевый фильтр толщиной 0,5 мм, напряжение 60 кВ, сила тока 575 мА, разрешение 90 мкм, время экспозиции камеры 240 мс, шаг 0,5°, угол поворота камеры 180°.

Для всех отсканированных образцов была проведена обработка в пакете программного обеспечения SkyScan и рассчитаны количественные показатели регенерации костной ткани в зоне дефекта: TV – объем всех тканей, BV – объем костной ткани, TS – площадь поверхности всех тканей, BS – площадь поверхности костной ткани.

### **2.2.10 Гистоморфологическое исследование**

После эвтаназии животных проводили биопсию участка имплантированного материала. Образцы фиксировали в 10% нейтральном забуференном формалине 7-10 дней, далее отмывали проточной водой в течение 1 часа. После отмывки, образцы помещали в декальцинирующую жидкость Рихмана-Гельфанда-Хилла на 70-72 часа при температуре 4°C, затем снова отмывали проточной водой в течение 30 минут и 70° спиртом в течение 4-5 дней. Обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации 80°-96°-100° и ксилоле в гистологическом процессоре Tissue-Tek, заливали в парафиновые блоки. На микротоме получали срезы 5 мкм, наклеивали на предметные стекла, высушивали при температуре 37°C.

Для окраски препаратов использовали гематоксилин Майера и эозин. Образцы последовательно обрабатывали: ксилолом (2 смены), спиртом (100°-96°-80°-70°), дистиллированной водой, гематоксилином, проточной водой, дистиллированной водой, эозином, спиртом (70°-96°-96°), карболом (2 смены), ксилолом (3 смены). Окрашенные препараты заключали в канадский бальзам.

Гистологическое исследование образцов осуществляли на аппаратно-программном комплексе NIS-Elements D (микроскоп Nikon Eclipse E200), оценку соединительнотканых структур проводили с помощью полуколичественного метода оценки по А.С. Григорьяну (Григорьян и др., 2007).

### **2.2.11 Конфокальная микроскопия**

После эвтаназии животных проводили некропсию участка имплантированного материала. Образцы фиксировали в 70° растворе этилового спирта, далее готовили шлифы пластинчатой кости. Анализ шлифов проводили на конфокальном лазерном сканирующем микроскопе Nikon DIGITAL ECLIPSE C1 plus с использованием лазера 488 нм.

Скорость аппозиции новообразованной костной ткани рассчитывали по формуле (1) (Цыган и др., 2007)

$$v_{\text{аппозиции}} = S/\tau, \quad (1)$$

где  $v_{\text{аппозиции}}$  – скорость аппозиции новообразованной костной ткани, мкм/сут;  
 $S$  – расстояние между флуоресцентными метками, мкм;  
 $\tau$  – время, сут.

### 2.2.12 Статистический анализ и представление данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием непараметрического критерия Манна-Уитни в программном пакете Statistica 6.0 (StatSoft, США).

Данные представляли в табличном и графическом виде. На графиках и диаграммах приведены средние значения показателей ( $X_{\text{ср}}$ ), в качестве планок погрешностей использованы стандартные ошибки среднего ( $SE_{X_{\text{ср}}}$ ), достоверность обозначена звездочкой («\*» –  $p < 0,05$ ; «\*\*» –  $p < 0,01$ ) и измерялась по отношению к контрольной группе животных.

### 3 РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

#### 3.1 Получение остеоиндуктивных материалов на коллагеновом носителе с добавлением rhBMP-2

Исходный материал для получения ДКМ имел ксеногенное происхождение и представлял собой бедренные кости КРС (ООО «Кросс», Россия). Технология получения остеопластических материалов в виде ДКМ включает в себя несколько этапов: фрагментацию кости с последующей очисткой, обезжиривание, деминерализацию, отмывку и высушивание материала, придание ДКМ формы материала для конечного применения, стерилизацию полученных материалов (Громов и др., 2012а; Громов и др., 2012b; Лунин и др., 2012).

На этапе фрагментации крупные бедренные кости КРС нарезали на пластины с помощью ленточной пилы C/E165 (La Minerva, Испания) для удобства и качественной обработки фрагментов. Пластины очищали от загрязнений, остатков мягких тканей организма, сгустков крови и т.д., после чего проводили первичное обезжиривание на протяжении 72 часов и вторичное обезжиривание в течение 48 часов смесью растворителей этанол-диэтиловый эфир в соотношении 1:2 до достижения остаточного содержания жира  $\leq 1\%$ . Остатки растворителя удаляли высушиванием в сушильном шкафу ED53 (Binder, Германия). На стадии деминерализации фрагменты костной ткани обрабатывались соляной кислотой в концентрации 0,6 М и времени экспозиции 1 час. Для нейтрализации соляной кислоты, оставшейся после деминерализации, образцы несколько раз промывали дистиллированной водой, после чего высушивали в сушильном шкафу в течение 14 часов при температуре 24°C до остаточного содержания влаги не более 3%.

В зависимости от вида хирургической операции, размера, типа и локализации костной патологии, предполагающей применение остеоиндуктивных материалов для усиления регенеративного потенциала пациента и скорейшего сращения переломов, целесообразно использовать ДКМ

в наиболее подходящем для каждого конкретного клинического случая форме исполнения.

Для заполнения небольших по размеру дефектов костной ткани можно использовать материал в виде крошки различного размера. Для заполнения мелких трещин костей можно использовать малоинвазивные формы остеопластических материалов, подразумевающие минимальное хирургическое вмешательство в организм в процессе их имплантации. Крупные объемы утраченной костной ткани необходимо заполнять ДКМ в виде блоков/клиньев, для обеспечения в первую очередь остеокондуктивной и механической функции, с введением в промежутки между блоками крошки.

### 3.1.1 Получение ДКМ в виде различных по размеру фракций костной крошки

Для получения ДКМ в виде фракций костной крошки различного диаметра отмытую крошку подвергали измельчению на мельнице с последующим фракционированием на приборе Грохот ВП-30Т («Вибротехник», Россия) через сита с диаметром отверстий 0,04–2,0 мм.

В результате разделения получается 5 фракций костной крошки: 40-125 мкм, 125-250 мкм, 250-500 мкм, 500-1000 мкм, 1-2 мм (рисунок 7).



Рисунок 7. Фотографии образцов различных фракций крошки из ДКМ разного диаметра. А – 40-125 мкм, Б – 125-250 мкм, В – 250-500 мкм, Г – 500-1000 мкм, Д – 1-2 мм.

При использовании во время операции можно комбинировать крошку с остеопластическими материалами в виде блоков для усиления их остеоиндуктивности. Для удобства имплантации, можно предварительно пропитать образцы крошки небольшим количеством стерильного физраствора

или собственной крови пациента до образования однородной массы, при этом следует ограничить миграцию крошки ДКМ из зоны имплантации.

### 3.1.2 Получение малоинвазивных остеопластических материалов

Малоинвазивные формы остеопластических материалов применяются в случаях, когда можно провести низкотравматичные виды оперативного вмешательства, например, в случае закрытого остеосинтеза. Препараты такого класса удобно применять в инъекционном виде, в шприцах.

В качестве носителя rhBMP-2 используется ДКМ, представляющий собой фракцию костной крошки размером  $<125$  мкм (рисунок 8).

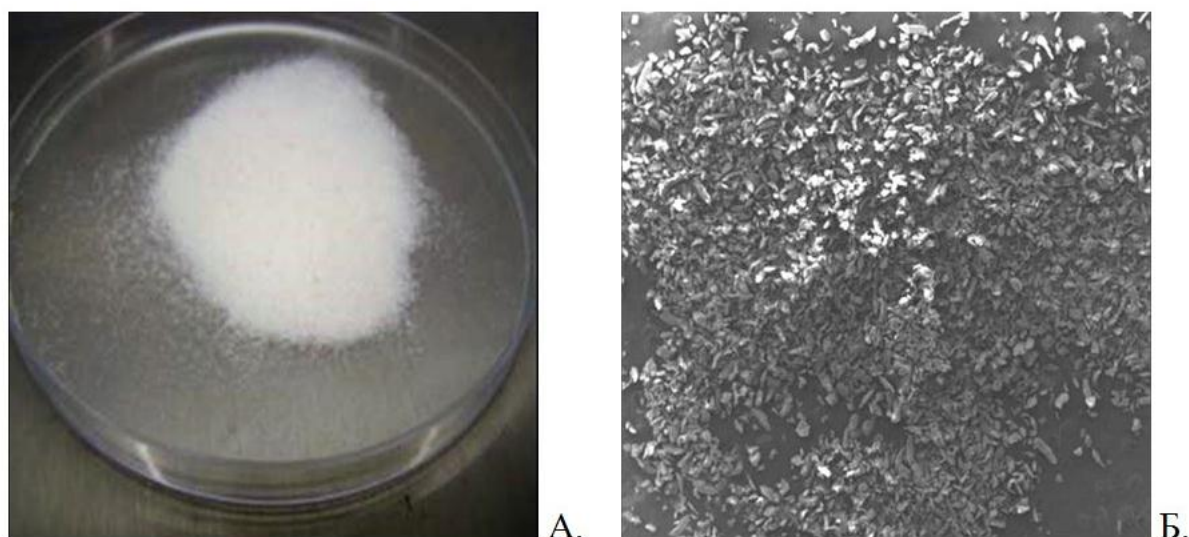


Рисунок 8. Фракция ДКМ размером  $<125$  мкм, используемая для приготовления образцов остеопластических материалов для малоинвазивного применения: А. Макрофотограмма образца в чашке Петри; Б. Фото образца, полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии, X25.

Небольшой диаметр частиц крошки обеспечивает хорошее прохождение через иглы размеров от 18G до 23G. Кроме того, за счет увеличения площади поверхности частиц крошки, увеличивается биодоступность остаточного нативного BMP-2 и внесенного рекомбинантного rhBMP-2, что повышает остеоиндуктивные качества материала. Для улучшения формообразующих свойств малоинвазивных остеопластических материалов мы ввели в их состав в качестве вспомогательного компонента гиалуроновую кислоту в количестве 10%.

### 3.1.3 Получение ДКМ в виде костных блоков

Для получения остеопластических материалов в виде блоков различного размера ДКМ подвергали распиливанию на ленточной пиле. Образцы полученных костных блоков представлены на рисунке 9.



Рисунок 9. Образцы остеопластических материалов в виде блоков различной формы (слева направо): призматической, параллелепipedной, кубической.

Блоки из ДКМ предназначены для восполнения значительных объемов утраченной костной ткани. Благодаря различной форме и размерам, легко изменяемым для каждого конкретного случая применения, ими можно заполнить дефекты практически любой сложности. Кроме того, блоки из ДКМ можно применять в сочетании с костной крошкой для более полного заполнения всего пространства дефекта и усиления регенеративного эффекта (Громов и др., 2011a; Громов и др., 2011b).

### 3.1.4 Иммобилизация rhBMP-2 на ДКМ

Для создания остеоиндуктивных материалов использовали белок rhBMP-2, синтезированный в лаборатории биологически активных наноструктур ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России (Шарапова и др., 2010). Для иммобилизации белка на носителе готовили буферный раствор состава 0,5 М NaCl, 50 мМ CaCl<sub>2</sub>, 25 мМ Трис-HCl pH 7,5 и использовали его во всех нижеописанных процедурах.



Концентрацию rhBMP-2 в растворе доводили до  $\leq 1$  мг/мл (оптимальное значение 0,6 мг/мл), после чего проводили диализ против буферного раствора в соотношении 1:500 при температуре +4°C в течение ночи при постоянном перемешивании буфера. Образцы ДКМ определенного вида исполнения уравнивали буфером, в случае присутствия взвеси над ними смесь декантировали. После промывания в буфере измеряли рН в надосадочной жидкости (оптимальное значение рН=7,5). Для достижения насыщения носителя белком к нему добавляли раствор rhBMP-2, диализованный против буфера, в соотношении 100 мг сухого носителя на 1,3-1,5 мл буфера, содержащего  $\leq 1$  мг/мл rhBMP-2. После этого носитель инкубировали на шейкере при постоянном слабом перемешивании (40-60 об./мин) при +4°C в течение от 1 до 3 суток.

### **3.2 Тестирование остеопластических материалов на основе rhBMP-2 на экспериментальных моделях *in vivo***

В рамках диссертационной работы проводилось исследование биологической активности разработанных остеопластических материалов на основе rhBMP-2 на различных экспериментальных моделях *in vivo*:

- На модели индукции эктопического остеогенеза при внутримышечной имплантации ДКМ в виде крошки;
- На модели индукции остеогенеза при применении малоинвазивной формы материалов в комбинации с металлоконструкциями, а именно пористыми титановыми имплантатами;
- На модели имплантации в краниальные дефекты критического размера материала в виде пористой губчатой мембраны.

#### **3.2.1 Проверка активности крошки ДКМ с rhBMP-2 на модели индукции эктопического остеогенеза**

На данной модели проводили тестирование материалов из ДКМ, представляющих собой фракцию костной крошки с размером частиц 1-2 мм, на способность индуцировать эктопический остеогенез.

Работа проводилась в рамках государственного контракта № 12411.0810200.13.В10 от 20.06.2012 г. «Расширенные экспериментально-морфологические и медицинские исследования композиционных остеопластических материалов для эффективной регенерации костной ткани».

Существенным отличием нашей модели от модели классической внутримышечной имплантации (Urist, 1965) является сочетанное применение тестируемого материала и обогащенной тромбоцитами плазмы крови (ОТП).

При добавлении к остеопластическому материалу смеси ОТП, тромбина и хлорида кальция становится возможным сформулировать из крошки плотный сгусток, что достигается за счет активации факторов свертывания и запуска каскада реакций тромбообразования. Благодаря этому, удается избежать распределения крошки по всему межмышечному пространству, что в дальнейшем облегчает анализ остеоиндуктивных свойств имплантированного материала.

Для проведения экспериментов использовали 10 половозрелых самцов лабораторных крыс стока Wistar весом  $350 \pm 50$  г. Животные были разделены на 2 группы по 5 голов в каждой. Для приготовления ОТП в пробирки с антикоагулянтом  $\text{Na}_2$ -ЭДТА отбирали цельную кровь из расчета конечной концентрации ЭДТА 1,5-2,2 мг/мл крови, центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 1500 об./мин, отделяли плазму. Каждую навеску остеопластического материала смешивали с 0,5 мл ОТП, добавляли 100 мкл хлорида кальция (концентрация 100 мг/мл) и 100 мкл бычьего тромбина (концентрация 100 мг/мл), формировали из смеси плотный сгусток.

После введения животного в общий наркоз и подготовки операционного поля осуществляли достаточный операционный доступ. Животным опытной группы в пространство между пучками икроножной мышцы каждой конечности имплантировали навеску крошки с иммобилизованным на ней rhBMP-2, в контрольной группе – навеску крошки без rhBMP-2. После имплантации рану послойно ушивали атрауматической саморассасывающейся нитью Викрил 4/0 (ETHICON, Бельгия).

По достижении животными конечной точки эксперимента (45 суток после операции) их подвергали эвтаназии, проводили necropsию имплантированных образцов и их морфологическое и гистологическое исследование.

На рисунке 10 представлены характерные фотографии образцов крошки контрольной (А) и опытной (Б) группы.

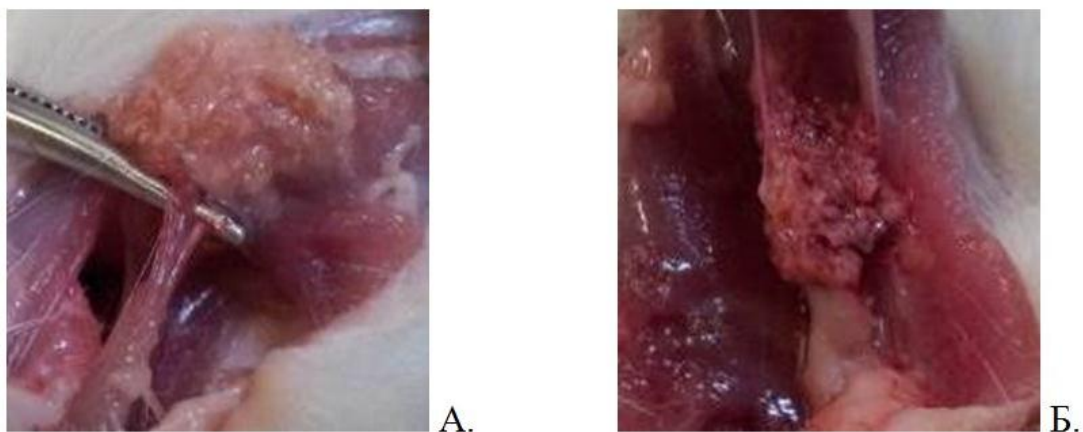


Рисунок 10. Изображение имплантированных образцов крошки ДКМ (А) и ДКМ + rhBMP-2 (Б) через 45 дней после имплантации.

По результатам морфологического исследования установлено, что все имплантируемые материалы интегрируются с мышечной тканью, покрываясь соединительнотканной оболочкой. В 20% образцов, полученных от животных контрольной группы, наблюдалась фрагментация введенного материала, которую можно объяснить индивидуально различающейся степенью двигательной активности крыс в послеоперационном периоде.

В образцах крошки, полученной от животных опытной группы, видно, что за время имплантации они подверглись активной васкуляризации, о чем свидетельствуют многочисленные сосуды, пронизывающие имплантат по всей толщине. Данное наблюдение коррелирует с литературными данными о том, что rhBMP-2 обладает ангиогенными свойствами (Deckers et al., 2002). В образцах контрольной группы васкуляризация также наблюдается, но менее выражено.

Гистологическое исследование имплантированных образцов было выполнено в сотрудничестве с научным сотрудником кафедры анатомии и

физиологии живых организмов Национального Исследовательского «Белгородского Государственного Университета» к.б.н., доцентом Надеждиным С. В.

При исследовании гистологических препаратов опытной и контрольной групп было установлено, что в обеих группах в зоне эктопического остеогенеза сформировались трабекулы костной ткани (рисунок 11).

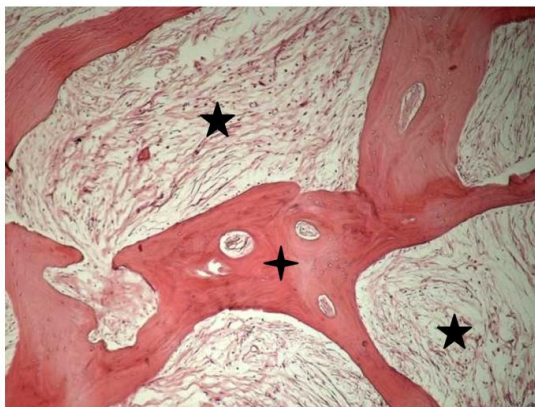


Рисунок 11. Гистологический препарат образца опытной группы. Видны трабекулы новообразованной костной ткани (четырёхугольная звездочка), окруженные соединительнотканными волокнами (пятиугольная звездочка), окраска гематоксилином и эозином. Окр. гематоксилином и эозином, X40.

В сравнении препаратов опытной и контрольной групп показано, что при имплантации образцов крошки с rhBMP-2 очаги новообразованной костной ткани более обширные, чем в случае материала без фактора роста (рисунок 12).

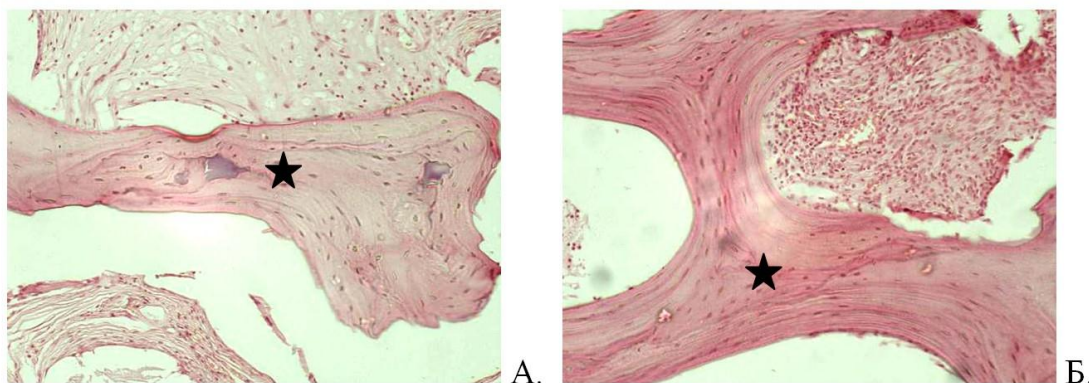


Рисунок 12. Гистологические препараты контрольной (А) и опытной групп (Б). Видны трабекулы костной ткани (звездочка) с компактизацией костного матрикса. Окр. гематоксилином и эозином, X40.

На рисунке 13 представлено сравнение гистоморфологических показателей качества новообразованной костной ткани в опытной и контрольной группах. Количество остеоцитов и остеонов подсчитывали в 5 полях зрения. Количество остеоцитов в образцах опытной группы более чем в 2 раза превысило их количество в контрольной и составило  $12,5 \pm 0,5$  шт. по сравнению с  $6,0 \pm 0,3$  шт. в контроле. Количество остеонов в образцах опытной группы оказалось в 3 раза больше, чем в контроле ( $6,5 \pm 0,4$  шт. против  $2,0 \pm 0,3$  шт.).

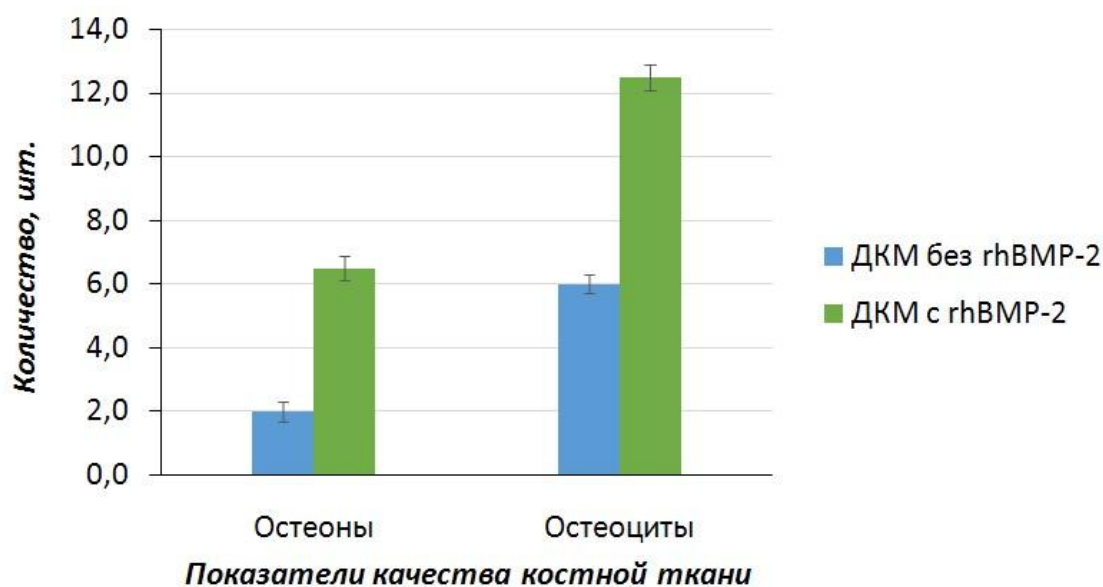


Рисунок 13. Сравнение гистоморфологических показателей качества новообразованной костной ткани в опытной и контрольной группах.

Таким образом, введение материала с фактором роста rhBMP-2 способствовало более интенсивному протеканию остеогенеза в мышечной ткани животных, о чем свидетельствует большая площадь трабекул и большее количество остеонов и зрелых клеток костной ткани в имплантатах.

### 3.2.2 Проверка активности малоинвазивных форм остеопластических материалов с rhBMP-2 в комбинации с титановыми имплантатами

Ранее было проведено исследование, показавшее перспективы применения rhBMP-2 в составе материала на основе гидроксиапатита для покрытия титановых имплантатов (Федорова и др., 2011). В настоящей работе проводилась оценка остеоиндуктивных качеств малоинвазивных форм

остеопластических материалов на основе ДКМ с добавлением фактора роста rhBMP-2, использованных для насыщения объема пористых титановых имплантатов.

Работа была выполнена в сотрудничестве с научным сотрудником ФГБУ «УНИИТО им. В.Д. Чаклина» Минздрава России к.б.н. Макаровой Э. Б. (Макарова и др., 2013а; Макарова, 2013b).

На данной модели исследована активность разработанных малоинвазивных форм материалов в зависимости от количества rhBMP-2, иммобилизованного на поверхности носителя, а также интенсивность протекания остеогенеза во внутреннем пространстве имплантатов и в области контакта имплантатов с костным ложем.

Для проведения экспериментов использовали 7 половозрелых кроликов обоих полов весом 3-4 кг. Каждому животному проводили 4 операции – по одной в большеберцовых и бедренных костях обеих задних конечностей. Для введения животных в общий наркоз использовали смесь анестетиков «Золетил 100» (Virbac С.А., Франция) в дозировке 10 мг/кг и «Ксилазин» (Bioveta, Чехия) в дозировке 4 мг/кг веса животного, в качестве местного анестетика использовали 0,25% раствор новокаина.

Операционное поле освобождали от шерсти, обрабатывали спиртом. С соблюдением правил асептики выполняли продольный разрез длиной 1,5 см по внутренней поверхности дистального метафиза бедренной кости и проксимального метафиза большеберцовой кости, выделяли костную площадку. Дефект костной ткани с проникновением в костномозговой канал создавали с помощью сверла диаметром 4,5 мм, далее отверстие расширялось с помощью сверла 5 мм. После введения в дефекты титановых пористых имплантатов диаметром 4,5 мм рану послойно ушивали и обрабатывали антибиотиком широкого спектра действия «Террамицин» (Pfizer Animal Health, США).

В качестве имплантата использовали пористую титановую матрицу с алмазоподобным покрытием (Макарова и др., 2011). Животным 3 опытных

групп в дефекты бедренных и большеберцовых костей имплантировали титановые матрицы, насыщенные малоинвазивной формой ДКМ с иммобилизованным на нем rhBMP-2 в концентрациях  $33,5 \pm 2,5$  мкг,  $65,5 \pm 2,5$  мкг и  $162,5 \pm 30,5$  мкг в пересчете на один имплантат. В качестве отрицательного контроля выступала группа животных с дефектами, в которые ничего не вводили. Положительным контролем служили кролики с дефектами, заполненными титановой матрицей, насыщенной прилипающей фракцией костного мозга, и имплантатами, насыщенными малоинвазивной формой ДКМ без rhBMP-2.

По достижении животными конечной точки эксперимента через 4 недели проводили эвтаназию с помощью передозировки наркоза, рентгенографию оперированных конечностей в 2-х проекциях (рисунок 14), некропсию имплантатов и их гистологическое исследование.



Рисунок 14. Рентгенограмма задних конечностей животных в прямой (проекция 1) и боковой (проекция 2) проекциях.

По результатам гистологического исследования области имплантации материалов через 4 недели после операции показано, что в имплантатах всех групп животных большая часть пор, сообщающихся с поверхностью, заполнена новообразованной костной тканью разной степени зрелости (рисунок 15).

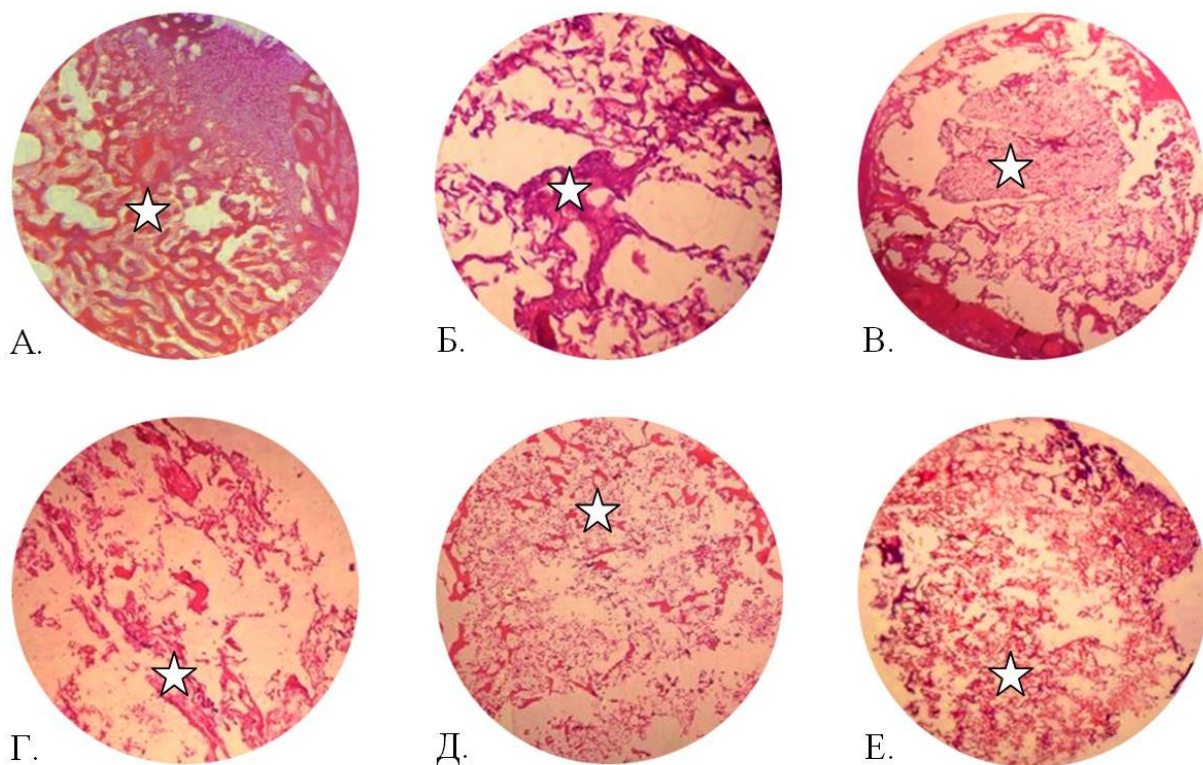


Рисунок 15. Гистологические срезы костной ткани, образованной в титановых имплантатах через 4 недели после имплантации: А – отрицательный контроль; Б – титановая матрица насыщена клетками костного мозга; В – титановая матрица насыщена ДКМ без rhBMP-2; Г – титановая матрица насыщена ДКМ с  $33,5 \pm 2,5$  мкг rhBMP-2; Д – титановая матрица насыщена ДКМ с  $65,5 \pm 2,5$  мкг rhBMP-2; Е – титановая матрица насыщена ДКМ с  $162,5 \pm 30,5$  мкг rhBMP-2. Белая звездочка – трабекулярная костная ткань. Окр. гематоксилином и эозином, X40.

При отсутствии заполнения смоделированного дефекта через 4 недели после хирургического вмешательства наблюдается периостальная реакция с очагами хрящевой ткани. Дефект начинает заполняться молодыми трабекулами костной ткани. Также наблюдаются единичные трабекулы со стороны костномозгового канала (рисунок 15А).

В группе образцов, где для насыщения использовали клетки костного мозга, установлено, что молодая трабекулярная костная ткань располагается на периферии имплантатов и в области смоделированного дефекта, где имеет арочную архитектуру. Межтрабекулярные пространства хорошо



васкуляризованы и содержат разные клеточные популяции. Отмечается неравномерное распределение зрелой трабекулярной костной ткани (рисунок 15Б).

При анализе образцов группы положительного контроля, в которой в титановые матрицы помещали малоинвазивную форму ДКМ без фактора роста, показано, что в конечной точке эксперимента материнское ложе хорошо сформировано, а отдельные зрелые трабекулы присутствуют как в центральной, так и поверхностной поровой зоне (рисунок 15В).

В группе образцов с минимальной из исследованных концентраций трабекулы зрелой костной ткани располагаются преимущественно в центральной области имплантата, а молодая костная ткань оттесняется к периферии (рисунок 15Г).

Во второй опытной группе образцов с концентрацией белка  $65,5 \pm 2,5$  мкг наблюдается максимальное количество зрелой трабекулярной костной ткани – она занимает всю периферию и треть внутреннего порового пространства титановой матрицы (рисунок 15Д).

В образцах с максимальной концентрацией фактора роста и регенерации rhBMP-2 наблюдается наименьшее содержание зрелой новообразованной костной ткани в центральной части имплантата и умеренное в периферических (рисунок 15Е) в сравнении с другими концентрациями белка.

Анализ площади зрелой новообразованной костной ткани в имплантатах показал, что наибольшей остеоиндуктивной активностью в данной модели обладали имплантаты, насыщенные ДКМ с содержанием rhBMP-2 на уровне  $65,5 \pm 2,5$  мкг (рисунок 16). Площадь зрелой костной ткани в них составила 51,5%, что превышает даже группу имплантатов с использованием клеток костного мозга.

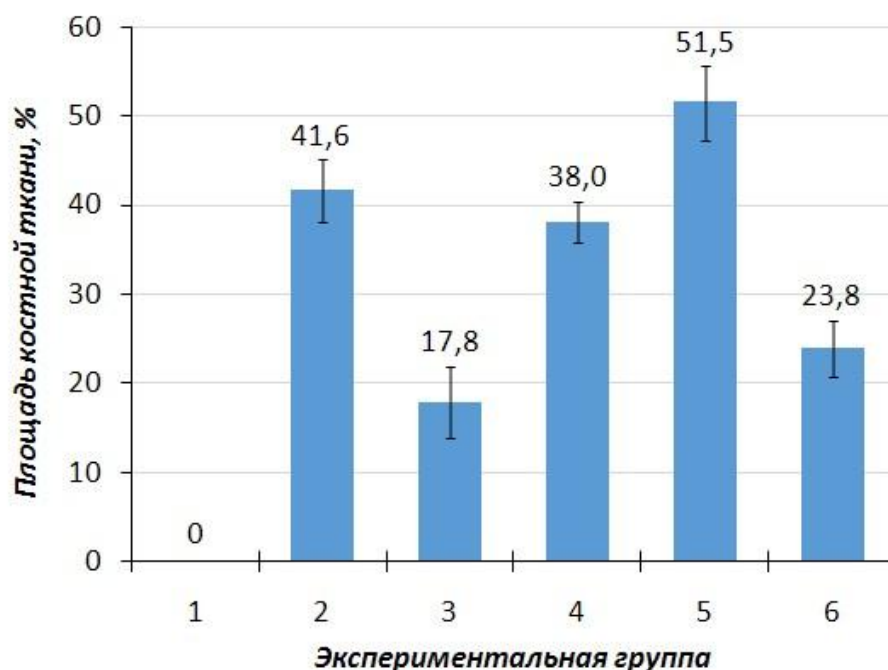


Рисунок 16. Площадь зрелой новообразованной костной ткани в разных экспериментальных группах. 1 – отрицательный контроль; 2 – титановая матрица насыщена клетками костного мозга; 3 – титановая матрица насыщена ДКМ без rhBMP-2; 4 – титановая матрица насыщена ДКМ с  $33,5 \pm 2,5$  мкг rhBMP-2; 5 – титановая матрица насыщена ДКМ с  $65,5 \pm 2,5$  мкг rhBMP-2; 6 – титановая матрица насыщена ДКМ с  $162,5 \pm 30,5$  мкг rhBMP-2.

Таким образом, среди трех исследованных концентраций белка наибольшую активность показала концентрация в  $65,5 \pm 2,5$  мкг, причем материал с данным содержанием rhBMP-2 продемонстрировал активность выше, чем препарат клеток костного мозга, по площади новообразованной костной ткани. Также установлено, что разное содержание белка в образцах остеопластических материалов оказывало эффект различной степени выраженности, при этом максимальная из исследованных концентраций белка привела к наименее выраженному остеогенезу. Вероятно, имело место более быстрое высвобождение иммобилизованного белка с поверхности коллагеновой крошки в первые дни после имплантации и снижение эффективной концентрации ( $65,5 \pm 2,5$  мкг на имплантат).

Кроме того, процесс остеогенеза в случае имплантатов со средней и максимальной концентрациями rhBMP-2, протекал от периферии (зоны

контакта с материнской костью) к центральной части имплантата, что свидетельствует о наличии остеоинтеграции и согласуется с данными литературных источников (Albrektsson et al., 1982). В группе с наименьшей из исследованных концентраций белка остеоинтеграция наименее выражена, что подтверждается данными гистологического анализа. Таким образом, оптимальной концентрацией rhBMP-2 при использовании материала на его основе в сочетании с пористыми титановыми имплантатами является  $65,5 \pm 2,5$  мкг на имплантат.

### **3.2.3 Проверка активности остеоиндуктивных материалов в виде мембраны на модели создания краниальных дефектов критического размера**

В попытках создания унифицированной приближенной к реальным условиям применения материалов экспериментальной модели разными исследователями было предложено большое количество вариантов создания дефектов критического размера (Burg et al., 2000; Hollinger et al., 1990; Jones et al., 2013; Rapp et al., 2012; Schmitz et al., 1986; Shand et al., 2010; Tanuma et al., 2013; Yu et al., 2012). В случае успешного завершения испытаний некоторые авторы считают стадию тестирования нового разработанного остеопластического материала на модели лечения дефекта критического размера завершающей перед началом клинических испытаний данного материала (Hollinger et al., 1990).

Использование модели создания краниальных дефектов критического размера обладает перед остальными моделями рядом существенных преимуществ. Кроме высокой стандартизованности и воспроизводимости операций отсутствует необходимость дополнительной фиксации тестируемого материала в дефекте за счет обеспечения твердой мозговой оболочкой достаточного поддерживающего действия. Кроме того, к костям черепа не прикрепляются массивные мышечные волокна, как в случае с костями конечностей, что минимизирует возможность миграции имплантированного материала за пределы дефекта. Все вышеперечисленные особенности делают

эту модель чрезвычайно удобной для оценки остеоиндуктивных качеств материалов.

Работа проводилась в сотрудничестве с научным сотрудником кафедры анатомии и физиологии живых организмов Национального Исследовательского «Белгородского Государственного Университета» к.б.н., доцентом Надеждиным С. В.

Для проведения экспериментов использовали 15 половозрелых самцов лабораторных крыс стока Wistar весом  $350 \pm 50$  г. После введения животного в общий наркоз и подготовки операционного поля осуществляли достаточный операционный доступ. В теменной области черепа скальпелем делали саггитальный линейный кожно-мышечный разрез длиной 1,0-1,5 см. Дефект критического размера создавали с помощью аппарата для хирургии и имплантологии Surgic AP (NSK Nakanishi Inc., Япония) трепаном №227С.204.070 (Komet, Германия) в режиме работы прибора: скорость вращения 800 об./мин, давление 10-15 Нсм. Трепанацию проводили при постоянном охлаждении физиологическим раствором места контакта трепана и кости. В месте сращения теменных костей формировали отверстие диаметром 8 мм, стараясь не повредить подлежащий венозный синус (рисунок 17).

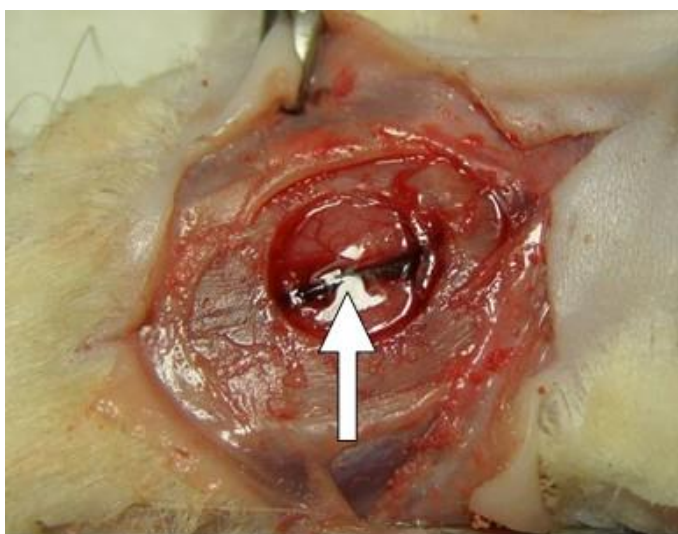


Рисунок 17. Изображение дефекта критического размера в теменных костях черепа, стрелкой отмечен венозный синус.

В опытной группе животных дефект заполняли мембраной из ДКМ с фактором роста rhBMP-2; в качестве положительного контроля выступала группа животных с дефектами, заполненными мембраной без белка, отрицательного – животные с незаполненным дефектом (таблица 2).

Таблица 2 – Распределение животных по группам в эксперименте.

<i>Группа</i>	<i>Количество животных</i>	<i>Наличие мембраны из ДКМ</i>	<i>Наличие rhBMP-2</i>
1	5	–	–
2	5	+	–
3	5	+	+

По окончании операции рану послойно ушивали атравматической саморассасывающейся нитью Викрил 4/0 (ETHICON, Бельгия).

Для изучения аппозиции образующейся *de novo* костной ткани крысам вводили флуоресцентные метки – тетрациклина гидрохлорид (25 мг/кг веса) однократно сразу после операции; ализарин красный S (35 мг/кг веса) двукратно, на 40 и 50 сутки (Van Gaalen et al., 2010).

На 60 сутки после имплантации материалов животных подвергали эвтаназии с некропсией фрагмента свода черепа с дефектом; далее проводили рентгенологический и томографический анализ образцов, а также гистоморфологическое исследование срезов и конфокальную микроскопию шлифов тканей.

Состояние соединительнотканых структур в зоне репаративной регенерации описывали с помощью полуколичественного метода оценки в баллах согласно следующим критериям (Григорьян и др., 2007):

*I. Оценка состояния соединительнотканной прослойки между имплантатом и костью:*

1. Очень широкая, с высокой клеточностью, в том числе с примесями лимфомакрофагальных элементов и ангиоматозом – «-5»;

2. Средней ширины с умеренным числом клеток, главным образом фибробластов, с умеренно развитыми фибриллярными структурами, коллагеновые волокна образуют пучки, есть участки разволокнения – «-4»;

3. Соединительнотканная прослойка средней ширины, имеет грубоволокнистое строение, клеточных элементов немного, это зрелые фибробласты – «-3»;

4. Узкая грубоволокнистая прослойка – «-2»;

5. Тяж из вытянутых соединительнотканых клеток – «-1»;

6. Соединительнотканной прослойки нет – «+1».

*II. Оценка состояния структуры материнской кости:*

1. Признаки некробиоза и некроза остеоцитов краевой зоны есть – «-1»;

2. Признаки некробиоза и некроза остеоцитов краевой зоны отсутствуют – «+1»;

3. Резко выраженная rareфикация материнской кости – «-3»;

4. Умеренно выраженная rareфикация материнской кости – «-2»;

5. Слабо выраженная rareфикация материнской кости – «-1»;

6. Отсутствие rareфикации материнской кости – «+3»;

*III. Оценка состояния структуры новообразованной кости:*

1. Новообразованной кости нет – «0»;

2. Преимущественное образование остеидной костной ткани – «+1»;

3. Преимущественное образование трабекулярной костной ткани с фиброзным матриксом – «+2»;

4. Интенсивное новообразование кости – «+3»;

5. Компактизация новообразованного костного вещества – «+4».

*Группа 1. Ничем не заполненный дефект критического размера.*

На рисунке 20 представлены изображения фрагмента свода черепа крысы контрольной группы. К конечной точке эксперимента дефект заполняется мягкой пленкой из соединительной ткани (рисунок 18А). Края дефекта твердые, неровные. Данные рентгенографии и томографии свидетельствуют о начале образования костной ткани в краевых областях (рисунок 18Б, В).

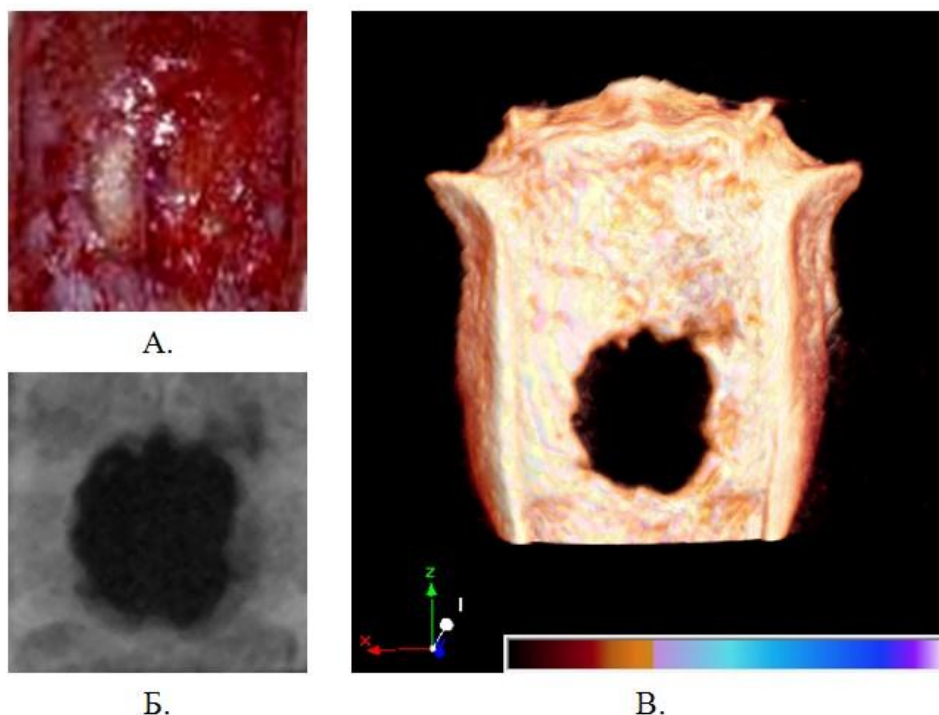


Рисунок 18. Фрагмент свода черепа крысы контрольной группы животных с дефектом, не заполненным остеопластическим материалом. Представлены макрофотограмма (А), рентгенограмма (Б), микрокомпьютерная томограмма (В), изображение лежит в горизонтальной плоскости.

В ходе исследования гистологических препаратов 1 группы установлено, что в зоне дефекта регенерация идет по механизму непрямого остеогенеза.

Суммарная эффективность процесса регенерации по результатам исследования с использованием критериев, оценивающих состояние соединительнотканной прослойки между имплантатом и костью, состояние структуры материнской кости и состояние структуры новообразованной кости по балльной системе составила 2 балла (таблица 3).

Таблица 3 – Суммарная эффективность процесса регенерации.

Группа	Состояние соединительнотканной прослойки между имплантатом и костью, баллы	Состояние структуры материнской кости, баллы	Состояние структуры новообразованной кости, баллы	Суммарная эффективность процесса регенерации, баллы
1	-2	+3	+1	2
2	-1	+3	+2	4
3	+1	+3	+3	7

Область дефекта заполнена рыхлой и грубоволокнистой соединительными тканями, в регенерате повсеместно встречаются очаги хрящевой ткани, на границе с материнской костью определяется ретикулофиброзная костная ткань (Приложение А, рисунки 19-21). Васкуляризация соединительнотканного регенерата в области дефекта умеренная. Материнская кость без признаков rarefакции, отделена от соединительнотканного регенерата тонкой прослойкой плотной волокнистой соединительной ткани.

Исследование шлифов при помощи конфокальной микроскопии показало, что новообразованные костные трабекулы обладают слабой интенсивностью флуоресценции тетрациклина (зеленый цвет) по сравнению с материнской костью (Приложение А, рисунок 22). Введение тетрациклина позволило выявить низкую интенсивность процессов регенерации костной ткани. Тетрациклин постепенно связывается с кальцием, следовательно, интенсивность флуоресценции будет коррелировать со степенью минерализации костной ткани на ранних сроках эксперимента (Pautke et al., 2010). В зоне дефекта на ранних сроках образования трабекулярной кости (по данным тетрациклиновой метки) остаются обширные области со слабой минерализацией (5% от поля зрения). Флуоресценция ализаринового красного S на 60 сутки свидетельствует о появлении минерализованной костной ткани в зоне дефекта с общей площадью минерализации матрикса 30% от поля зрения (Приложение А, рисунок 23).

В таблице 4 представлены количественные показатели регенерации костной ткани в зоне дефекта.

Таблица 4 – Показатели регенерации в зоне дефекта в контрольной группе.

Номер крысы	Показатель регенерации			
	<i>TV, мм<sup>3</sup></i>	<i>BV, мм<sup>3</sup></i>	<i>TS, мм<sup>2</sup></i>	<i>BS, мм<sup>2</sup></i>
1	22,501	8,055	88,774	60,704



продолжение Таблицы 4.

Номер крысы	Показатель регенерации			
	$TV, \text{мм}^3$	$BV, \text{мм}^3$	$TS, \text{мм}^2$	$BS, \text{мм}^2$
2	38,598	12,084	98,616	73,593
3	35,379	10,602	96,647	79,943
4	35,379	7,302	96,647	51,529
5	28,940	10,637	92,710	65,640
$X_{\text{ср.}}$	32,159	9,736	94,679	66,282
$SE_{\text{ср.}}$	2,880	0,889	1,761	4,946

$TV$  – объем всех тканей,  $BV$  – объем костной ткани,  $TS$  – площадь поверхности всех тканей,  $BS$  – площадь поверхности костной ткани,  $X_{\text{ср.}}$  – среднее значение показателя регенерации в группе,  $SE_{\text{ср.}}$  – стандартная ошибка среднего в группе.

Группа 2. Дефект критического размера, заполненный мембраной из ДКМ без rhBMP-2

На рисунке 24 представлены изображения фрагмента свода черепа крысы опытной группы, в которой дефект после создания заполняли мембраной из ДКМ без использования факторов роста. К конечной точке эксперимента в дефекте обнаруживается имплантированный материал, (рисунок 24А), рентгенологические данные свидетельствуют о начале остеогенеза, причем очаги регенерации можно обнаружить даже в центральной зоне дефекта, не связанной с материнской костью (рисунок 24Б, стрелка).

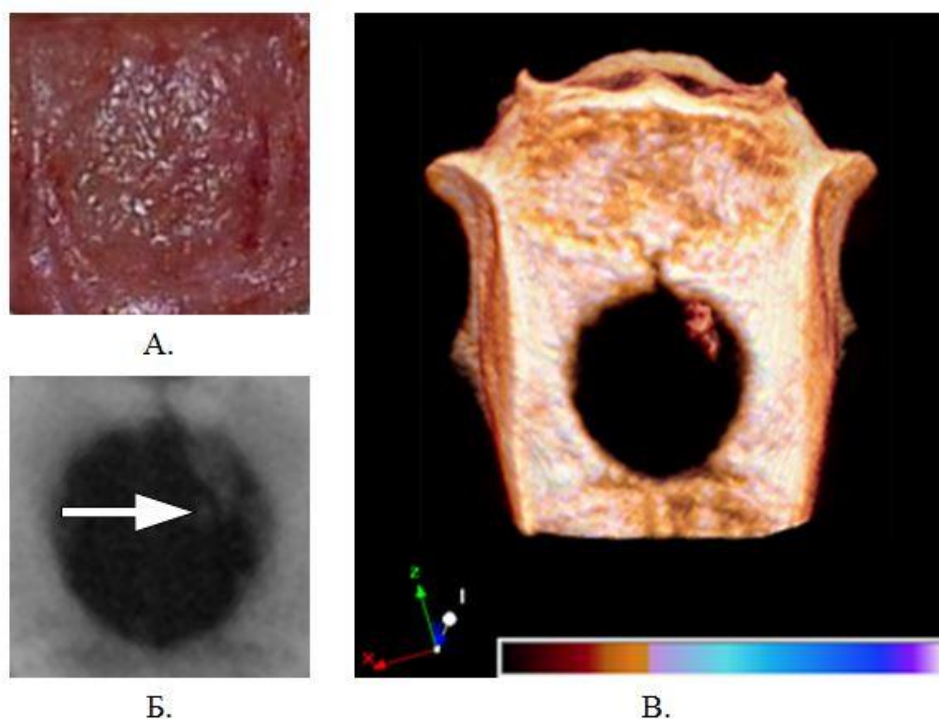


Рисунок 24. Фрагмент свода черепа крысы опытной группы животных с дефектом, заполненным мембраной из ДКМ без rhBMP-2. Представлены макрофотограмма (А), рентгенограмма (Б), микрокомпьютерная томограмма (В), изображение лежит в горизонтальной плоскости.

Анализ гистологических препаратов 2 группы показал, что спустя 60 суток после имплантации в зоне дефекта в неизменном виде присутствует значительное количество материала (Приложение А, рисунок 25), что коррелирует с данными макроскопических наблюдений. Повсеместно встречаются остеогенные клетки, расположенные преимущественно по периферии имплантированной мембраны (Приложение А, рисунки 25-28).

Суммарная эффективность процесса регенерации по результатам исследования с использованием критериев, оценивающих состояние соединительнотканной прослойки между имплантатом и костью, структуры материнской кости и структуры новообразованной кости по балльной системе составила 4 балла (таблица 3). Присутствия фиброзной капсулы не обнаружено, отмечаются отдельные тяжи рыхлой волокнистой соединительной ткани. Материнская кость, окружающая область дефекта, не имеет признаков

рарефикации. Васкуляризация в области дефекта умеренная (Приложение А, рисунок 29). По периферии имплантированного материала выявлено образование трабекулярной костной ткани с фиброзным матриксом.

В ходе исследования шлифов тканей при помощи конфокальной микроскопии отмечается увеличение интенсивности флуоресценции новообразованных костных трабекул, маркированных тетрациклином, на ранних сроках регенерации костной ткани, общая площадь минерализованного матрикса составила 25% от поля зрения. К 60 суткам площадь минерализованного костного матрикса увеличивается и составляет до 50% от поля зрения (Приложение А, рисунки 30, 31).

В таблице 5 представлены количественные показатели регенерации костной ткани в зоне дефекта.

Таблица 5 – Показатели регенерации в зоне дефекта в группе 2.

Номер крысы	Показатель регенерации			
	$TV, мм^3$	$BV, мм^3$	$TS, мм^2$	$BS, мм^2$
1	28,939	8,687	93,982	101,423
2	67,573	14,673	116,331	80,653
3	70,793	23,014	118,725	128,122
4	48,257	12,750	104,521	87,063
5	45,037	22,135	102,553	132,481
$X_{cp.}$	52,120	16,252	107,222	105,949
$SE_{X_{cp.}}$	7,713	2,760	4,581	10,518

$TV$  – объем всех тканей,  $BV$  – объем костной ткани,  $TS$  – площадь поверхности всех тканей,  $BS$  – площадь поверхности костной ткани,  $X_{cp.}$  – среднее значение показателя регенерации в группе,  $SE_{X_{cp.}}$  – стандартная ошибка среднего в группе.

Группа 3. Дефект критического размера, заполненный мембраной из ДКМ с rhBMP-2.

На рисунке 32 представлены изображения фрагмента свода черепа крысы опытной группы, в которой дефект после создания заполняли мембраной из ДКМ с иммобилизованным на нем фактором роста rhBMP-2. К конечной точке эксперимента дефект заполняется плотной тканью с фрагментами костной ткани (рисунок 32А). По результатам рентгенологического и томографического исследований видно, что очаги регенерации преимущественно находятся в центральной зоне дефекта (рисунок 32Б).

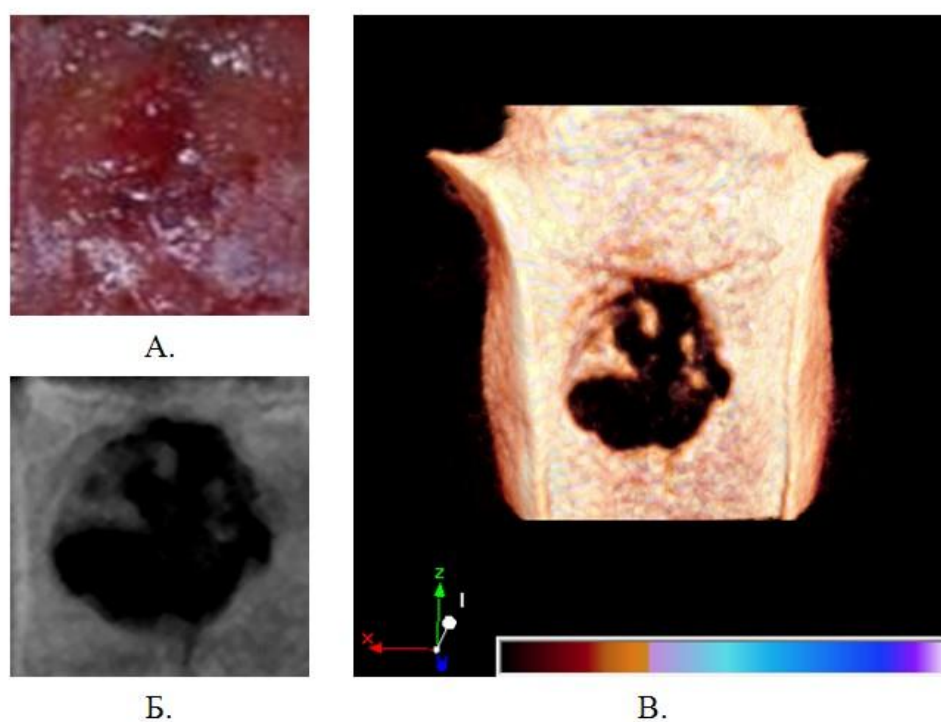


Рисунок 32. Фрагмент свода черепа крысы опытной группы животных с дефектом, заполненным мембраной из ДКМ с rhBMP-2. Представлены макрофотограмма (А), рентгенограмма (Б), микрокомпьютерная томограмма (В), изображение лежит в горизонтальной плоскости.

По результатам гистологического анализа препаратов 3 группы выявлено более интенсивное протекание регенераторных процессов по сравнению с другими исследованными группами. В зоне дефекта обнаруживаются лишь отдельные фрагменты имплантированного материала (Приложение А, рисунки 33, 34). Суммарная эффективность процесса регенерации по результатам исследования с использованием критериев, оценивающих состояние соединительнотканной прослойки между имплантатом и костью, структуры

материнской кости и структуры новообразованной кости по балльной системе составила 7 баллов (таблица 3).

Вокруг депозитов имплантированного материала соединительнотканной прослойки не обнаружено. Окружающая область дефекта материнская кость признаков rarefакции не имеет (Приложение А, рисунок 35). В зоне дефекта процесс регенерации костной ткани идет интенсивно, о чем свидетельствует большое количество остеогенных клеток-предшественников (Приложение А, рисунок 36). Отмечается повсеместное образование трабекулярной костной ткани и васкуляризация регенерата.

В таблице 6 представлены количественные показатели регенерации костной ткани в зоне дефекта.

Таблица 6 – Показатели регенерации в зоне дефекта в группе 3.

Номер крысы	Показатель регенерации			
	$TV, мм^3$	$TV, мм^3$	$TV, мм^3$	$TV, мм^3$
1	45,037	19,041	102,553	113,807
2	45,037	24,244	102,553	104,880
3	64,354	35,075	115,213	140,555
4	70,793	26,496	120,426	135,219
$X_{ср.}$	56,305	26,214	110,186	123,615
$SE_{ср.}$	6,637	3,341	4,534	8,509

$TV$  – объем всех тканей,  $BV$  – объем костной ткани,  $TS$  – площадь поверхности всех тканей,  $BS$  – площадь поверхности костной ткани,  $X_{ср.}$  – среднее значение показателя регенерации в группе,  $SE_{ср.}$  – стандартная ошибка среднего в группе.

По данным конфокальной микроскопии на ранних сроках остеогенеза минерализация костного матрикса в группе животных с дефектами, заполненными мембраной из ДКМ с rhBMP-2 протекает более эффективно, чем в других опытных группах. Выявлено увеличение общей площади минерализованного матрикса до 40% от поля зрения. На 60 сутки в зоне

дефекта площадь минерализованного костного матрикса составляет до 70% от поля зрения (Приложение А, рисунки 37,38).

В таблице 7 представлены значения площади минерализованного костного матрикса и скорости аппозиции новообразованной костной ткани во всех исследованных группах.

Таблица 7 – Количественные показатели остеоиндуктивности материалов, имплантированных в дефекты свода черепа критического размера.

<i>Группа животных</i>	<i>Площадь минерализованного костного матрикса, % от поля зрения</i>	<i>Скорость аппозиции новообразованной костной ткани, мкм/день</i>
1	30	0,5±0,2
2	50	0,8±0,4
3	70	1,2±0,1

Скорость аппозиции новообразованной костной ткани в группе с использованием остеопластического материала с фактором роста и регенерации в ~2 раза превышает таковую в контрольной группе.

На рисунках 39 и 40 представлены суммарные данные количественного анализа значений показателей регенерации костной ткани в зоне дефектов.

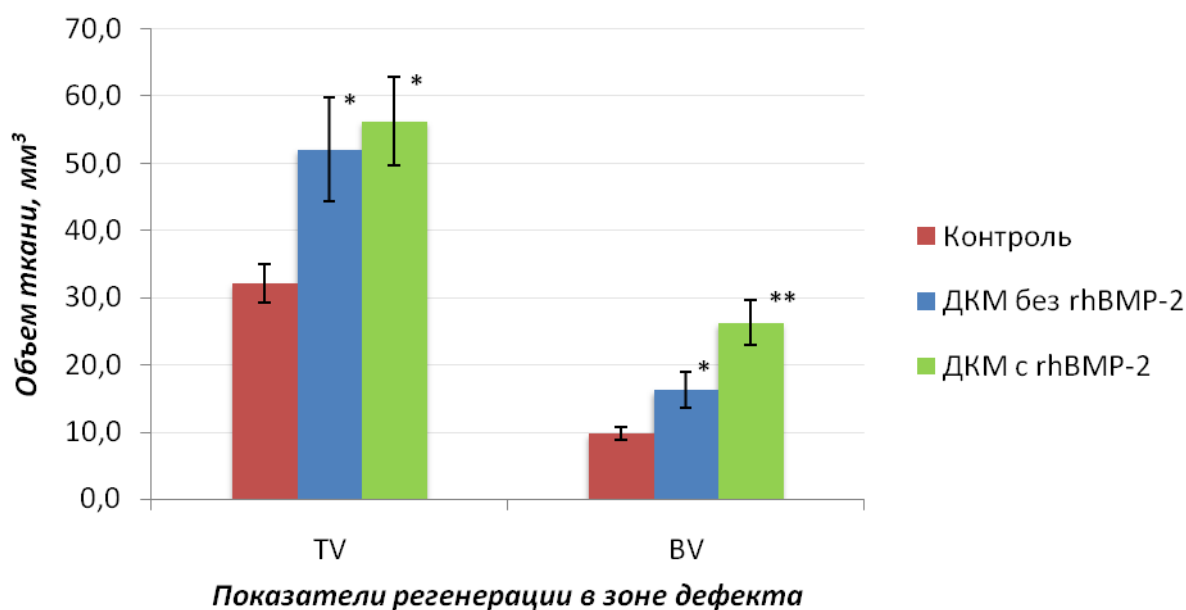


Рисунок 39. Показатели регенерации в зоне дефекта критического размера в опытных и контрольной группе. TV – объем всех тканей в области

интереса; BV – объем костной ткани в области интереса; \* –  $p<0,05$ ; \*\* –  $p<0,01$ .

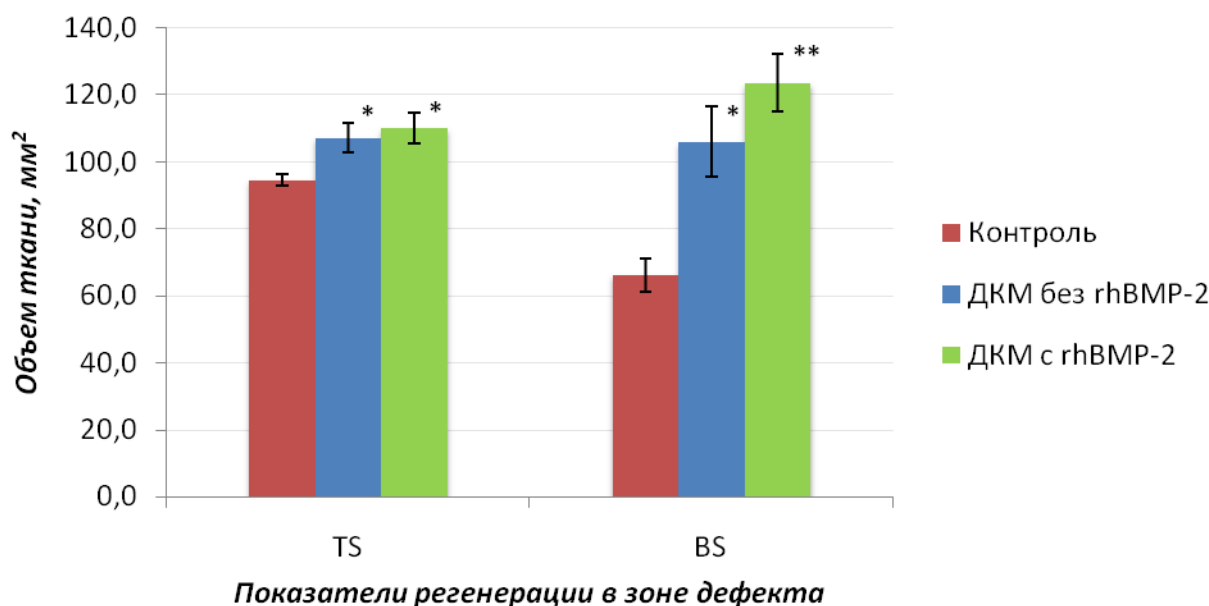


Рисунок 40. Показатели регенерации в зоне дефекта критического размера в опытных и контрольной группе. TS – площадь всех тканей в области интереса; BS – площадь костной ткани в области интереса; \* –  $p<0,05$ ; \*\* –  $p<0,01$ .

Показано, что значения объемов и площадей костной ткани, а также всех тканей в исследованной области интереса во всех опытных группах, достоверно выше, чем в контрольной группе. В случае применения материала без rhBMP-2 значения BV и BS составляют  $16,252\pm 2,760$  мм<sup>3</sup> и  $105,949\pm 10,518$  мм<sup>2</sup>, соответственно. При использовании мембраны из ДКМ с rhBMP-2, показатели BV и BS равны  $26,214\pm 3,341$  мм<sup>3</sup> и  $123,615\pm 8,509$  мм<sup>2</sup>, что значительно превышает значения, полученные для контрольной группы (BV= $10,637\pm 9,736$  мм<sup>3</sup>, BS= $66,282\pm 4,946$  мм<sup>2</sup>).

Таким образом, с помощью рентгенологического, томографического, гистоморфологического и конфокального методов исследования подтверждено, что наиболее эффективно по сравнению с другими экспериментальными группами процессы регенерации костной ткани в зоне дефекта свода черепа критического размера протекают при имплантации мембраны, содержащей rhBMP-2. Приведенные выше данные экспериментов *in vivo* свидетельствуют о

высокой остеоиндуктивной и ангиогенной активности фактора роста и регенерации rhBMP-2, полученного с помощью микробиологического синтеза, и о хороших остеоинтегративных свойствах разработанного остеоиндуктивного материала.

### **3.3 Создание штамма-продуцента химерного белка BMPRIA-CBD**

Описанные в предыдущих разделах остеопластические материалы включают в себя рекомбинантный фактор роста и регенерации костной ткани человека rhBMP-2, полученный по методике, включающей хроматографическую очистку на стандартных сорбентах. Данный препарат обладает достаточно высокой степенью очистки и специфической активностью *in vitro* и *in vivo*. Однако имеется проблема, связанная с тем, что при микробиологическом синтезе в клетках *E. coli* с последующей очисткой по ранее разработанной методике (Шарапова и др., 2010) препарат, помимо функционально-активной димерной формы, включает в себя целый ряд других форм – мономерную, тетрамерную и др. С целью разработки подхода для обогащения препарата белка биологически активной димерной формой в нативной конформации в диссертационной работе был отработан метод очистки с использованием аффинного сорбента на основе рекомбинантного химерного белка – рецептора BMP-2, соединенного с целлюлозосвязывающим доменом (Шарапова и др., 2013). Данный подход может быть использован для разработки новых, более эффективных схем очистки препаратов rhBMP-2.

#### **3.3.1 Создание генно-инженерной конструкции**

Генно-инженерные работы проводились в сотрудничестве с с.н.с. лаборатории биологически активных наноструктур ФГБУ «НИИ Эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи» Минздрава России к.б.н. Сергиенко О.В.

Фрагмент гена, кодирующий эктодомен рецептора BMPRIA, получали синтетически. Для этого участок нуклеотидной последовательности гена BMPRIA, кодирующий эктодомен рецептора BMPRIA, разбивали на 8



олигонуклеотидов. Олигонуклеотиды спланированы таким образом, что при гибридизации они образуют двухцепочечный фрагмент ДНК, содержащий липкие концы, соответствующие сайтам гидролиза рестриктаз NcoI (CCATGG) и BglII (AGATCT). При синтезе олигонуклеотиды были фосфорилированы по 5'-концу. Для получения двухцепочечного фрагмента ДНК смесь олигонуклеотидов в эквимольном количестве (по 20 пкМ) прогревали при 95°C (10 мин) и в течение 4 часов охлаждали до 25°C.

Затем плазмидный вектор ptt10, содержащий участок, кодирующий глицин-сериновый спейсер – целлюлозосвязывающий домен CBD, гидролизовали эндонуклеазами рестрикции NcoII и BamHI при 37°C в буфере, содержащем 66 mM Трис-ацетата (pH 7,9 при 37°C), 20 mM ацетата магния, 132 mM ацетата калия и 0,2 мг/мл БСА в течение 1,5 ч.

Полученную смесь, содержащую двухцепочечные фрагменты гена эктодомена рецептора BMPRIA размером 255 п.н., объединяли с фрагментом плазмиды ptt10 (4153 п.н.), гидролизованной эндонуклеазами рестрикции NcoI и BamHI. Лигирование проводили с помощью ДНК-лигазы фага T4 в буфере, содержащем 40 mM Трис-HCl (pH 7,8 при 25°C), 10 mM хлористого магния, 10 mM ДТТ и 5 mM АТФ. Лигированную смесь ДНК использовали для трансформации клеток *E. coli* M15 [pREP4] методом электропорации.

На рисунке 41 представлена схема сконструированной плазмиды pBMPRIA-CBD.

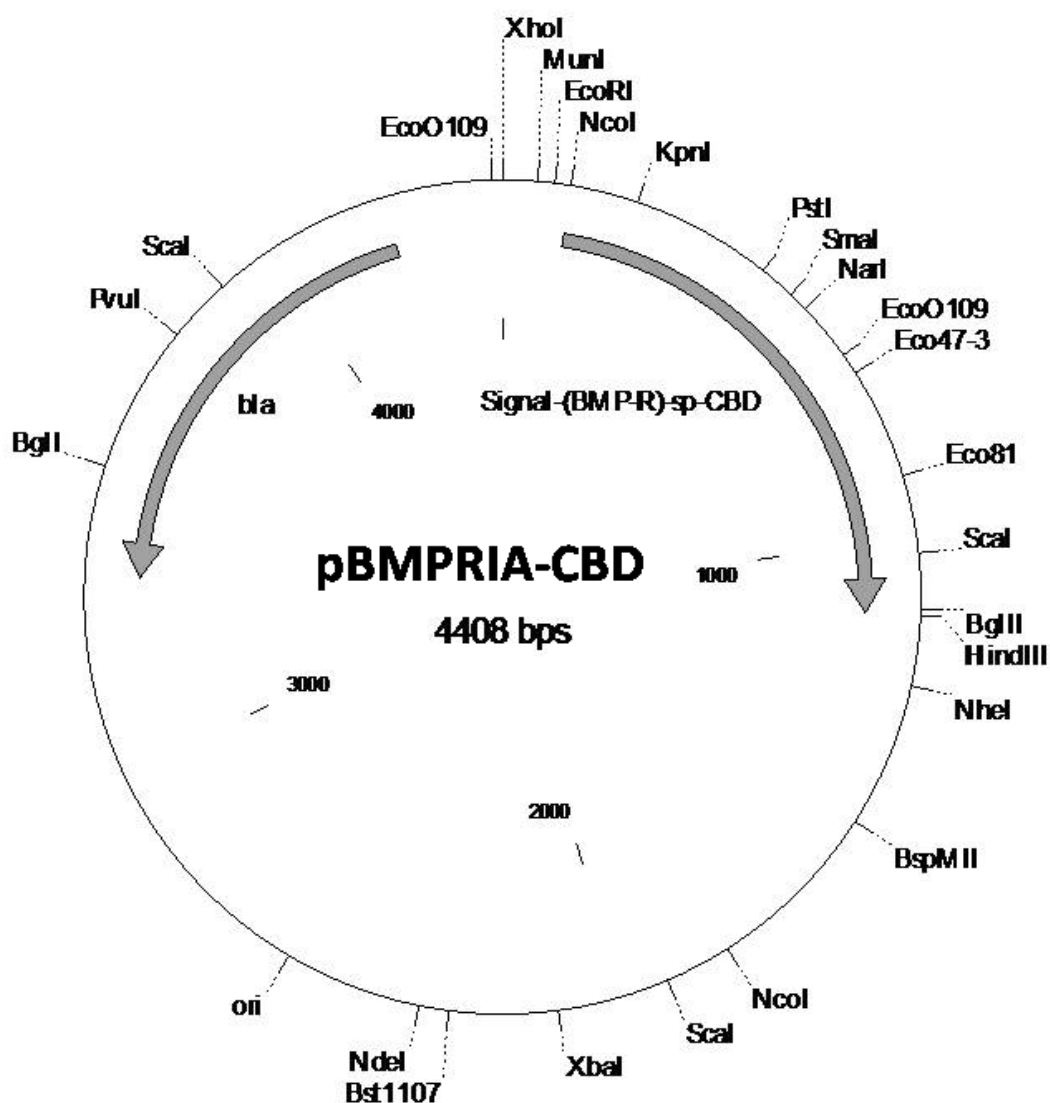


Рисунок 41. Схема плазмиды pBMPRIA-CBD.

В состав плазмиды входят:

1. Искусственный бактериальный оперон химерных белков, включающий в себя промоторную область раннего промотора бактериофага T5 (7-87 п.н.), обеспечивающую эффективную транскрипцию контролируемой мРНК; рекомбинантный ген, обеспечивающий экспрессию целевого химерного белка (117-1124 п.н.); нетранслируемую область терминации транскрипции бактериального оперона, обеспечивающую эффективное окончание транскрипции (1164-1258 п.н.).

2. Бактериальный оперон bla (3343-4203 п.н. комплементарной цепи), кодирующий белок бета-лактамазу (селективный маркер для отбора клонов-трансформантов *E. coli* методом селекции на ампициллине).

3. Бактериальный участок инициации репликации типа ColE1, обеспечивающий репликацию плазмиды в штаммах *E. coli* (1630 п.н.).

Строение целевого химерного рекомбинантного белка BMPRIA-CBD было спланировано таким образом, чтобы в его структуре присутствовали аминокислотные последовательности сигнала L-аспарагиназы *E. coli* (28 а.к.), рецептора BMPRIA человека (86 а.к.), глицин-серинового спейсера (11 а.к.) и целлюлозосвязывающего домена CBD (181 а.к.).

Наличие сигнального пептида L-аспарагиназы обеспечивает секрецию белка в периплазматическое пространство клетки *E. coli*, где он переводится в растворимое состояние. За счет эктодомена рецептора BMPRIA человека обеспечивается аффинное связывание только димерной молекулы rhBMP-2, что позволяет использовать химерный белок для эффективной финальной очистки биологически активной димерной формы белка. Присутствие домена CBD в структуре белка обеспечивает его иммобилизацию на целлюлозосодержащем сорбенте, а спейсер из остатков глицина и серина между функциональными доменами BMPRIA и CBD сохраняет возможность каждого домена связываться со своим лигандом.

Таким образом, благодаря своему структурному составу, целевой белок одновременно обладает способностью BMPRIA связываться со своим лигандом rhBMP-2 в форме димера и способностью CBD взаимодействовать с целлюлозосодержащим сорбентом.

### **3.3.2 Трансформация штамма и индукция экспрессии белка**

Для получения штамма *E. coli* - продуцента рекомбинантного белка BMPRIA-CBD, клетки штамма *E. coli* M15 [pREP4] ( $\text{Nal}^s$ ,  $\text{Str}^s$ ,  $\text{rif}^s$ ,  $\text{lac}^-$ ,  $\text{ara}^-$ ,  $\text{gal}^-$ ,  $\text{mtl}^-$ ,  $\text{F}^-$ ,  $\text{recA}^+$ ,  $\text{uvr}^+$ ) трансформировали сконструированной ранее плазмидой pBMPRIA-CBD. Трансформацию плазмиды осуществляли методом электропорации. Трансформированные клетки выращивали в колбах с 500 мл

среды LB при 37°C до оптической плотности, соответствующей 1 ед. поглощения при длине волны 600 нм, после чего индуцировали синтез рекомбинантного белка VMPRIA-CBD путем добавления в среду 150 мкл 0,1 М раствора ИПТГ. Затем культуру выращивали в течение 4 часов.

Для подтверждения экспрессии целевого белка анализировали уровень его продукции с помощью электрофореза в 15% полиакриламидном геле в присутствии ДСН по методу Лэммли в денатурирующих условиях, экспрессия в трансформированных клонах составила около 15-20% от общего белка клетки.

### **3.4 Оптимизация экспрессии VMPRIA-CBD в штамме-продуценте и условий его культивирования в ферментере**

Оптимизацию условий культивирования штамма-продуцента химерного белка VMPRIA-CBD проводили по следующим параметрам:

1. Время внесения и концентрация индуктора;
2. Среда для выращивания – компоненты среды и их соотношение;
3. Условия выращивания – температура, аэрация.

Изучение времени выращивания культуры до внесения индуктора (ИПТГ), а также времени выращивания индуцированной культуры проводили на среде LB в колбах. Индуктор вносили в начале, середине и конце логарифмической фазы роста, т.е. через 1,5, 3,0 и 4,5 часа, контролируя время его внесения по показателю ОП. Уровень экспрессии гена, кодирующего VMPRIA-CBD, при внесении ИПТГ в середине и конце фазы логарифмического роста составлял 15-20% от суммарного белка клетки.

Время экспрессии белка после внесения ИПТГ определяли в ферментере. С этой целью после внесения ИПТГ отбирали пробы через 1, 2, 3 и 4 часа и определяли уровень экспрессии целевого белка. Синтез белка начинался сразу после внесения индуктора, через час синтезировалось уже до 60% от тотального белка, а после 2-х часов роста дальнейшего прирастания количества синтезированного белка не происходило. Таким образом, в ферментере

достаточно 2-х часов после индукции для наработки максимального количества белка.

В этих же условиях изучали необходимое количество внесенного индуктора. Концентрацию ИПТГ в среде варьировали от 0,1 мМ до 1,0 мМ.

После внесения в культуру ИПТГ в концентрации 0,1 мМ и выращивания ее на протяжении двух часов уровень экспрессии белка был ниже, чем при добавлении ИПТГ в диапазоне концентраций от 0,2 до 1,0 мМ. При этом увеличение концентрации индуктора в этом диапазоне не приводило к увеличению количества наработанного белка, поэтому в дальнейшем использовали ИПТГ в оптимальной концентрации 0,2 мМ.

Подбор параметров среды для наращивания биомассы проводили в колбах в несколько этапов. На первом этапе в среде LB с антибиотиками изменяли концентрацию таких компонентов, как дрожжевой экстракт и триптон. Дрожжевой экстракт заменяли на более доступный и дешевый сухой дрожжевой автолизат, а триптон на бактопептон, дрожжевой пептон и гидролизат казеина (ГК) СМ7. Также сумму дрожжевого экстракта и триптона заменяли сухим дрожжевым автолизатом. Экспрессия белков во всех указанных случаях сохранялась на том же уровне, что и в исходной среде LB, однако конечный объем биомассы, и, как следствие, накопление белка снижалось на 20-30%, что согласуется с исследованиями, проведенными ранее для других рекомбинантных белков с использованием штамма *E. coli* M15 (Семихин, 2010). Следует отметить, однако, что при замене триптона на гидролизат казеина продукция целевого белка по сравнению с контрольной средой LB не изменилась. Следовательно, ГК СМ7 может быть использован в составе среды наряду с триптоном. Увеличение концентрации триптона и ГК в среде до 2% приводило к увеличению накопления биомассы, однако дальнейшее увеличение концентрации до 3% уже не давало прироста биомассы (таблица 8). Очевидно, здесь сказывается лимитирование роста другими факторами, вероятнее всего, кислородом.

Таблица 8 – Конечные параметры процесса культивирования штамма *E. coli* M15 в колбах на средах с различным составом.

Дополнительные компоненты среды LB	ОП <sub>600нм</sub> , опт.ед.	pH		Вес, г	
		исходный	конечный	биомассы	телец включения
–	1,7	7,50	6,78	1,8	0,44
Глюкоза	2,1	7,50	5,80	2,4	0,58
Фосфаты	1,7	7,50	7,30	1,9	0,46
глюкоза + фосфаты	2,3	7,50	6,97	2,6	0,61
2% триптон	2,2	7,50	6,90	2,4	0,63
3% триптон	2,3	7,50	6,89	2,3	0,56
1% гидролизат казеина	1,7	7,50	6,90	1,8	0,35
2% гидролизат казеина	2,1	7,50	6,94	2,3	0,64
3% гидролизат казеина	2,2	7,50	6,98	2,3	0,59

Конечный выход белка связан только с накоплением биомассы в процессе культивирования, чему способствует внесение различных добавок.

Так, обогащение среды глюкозой, используемой в качестве источника углерода, увеличивает выход рекомбинантных белков (Lee, 1996). Однако при культивировании в среде LB с глюкозой наблюдается снижение pH за счет накопления уксусной кислоты (El-Mansi et al., 1989; Kleman et al., 1994; Luli et al., 1990). Уксусная кислота образуется культурой в процессе роста при недостатке кислорода или при избытке источника углеводов. Высокая концентрация ацетата (более 5 г/л при pH 7,0) снижает скорость роста и выход биомассы. Кроме того, ацетат оказывает более сильное ингибирующее воздействие на рекомбинантные штаммы по сравнению с нерекомбинантными (Koh et al., 1992). Накопление ацетата тем выше, чем выше скорость роста культуры, кроме того, его накопление зависит от состава среды. С целью предотвращения изменения кислотности во время культивирования в ферментере обычно ведется pH-статирование. Такая возможность не всегда

имеется (например, при выращивании в колбах), поэтому в состав среды наряду с глюкозой мы вносили гидро- и дигидрофосфаты калия, которые создавали буферность среды. Благодаря этому, при внесении глюкозы в исходную среду до 0,3% от общего объема удалось повысить уровень накопления биомассы в среднем в полтора раза.

На втором этапе оптимизации параметров выращивания штаммов-продуцентов исследовали влияние температуры. Известно, что температура является важным фактором контроля клеточного метаболизма (Lee, 1996). При снижении температуры культивирования с 37°C до 26-30°C, уменьшается скорость потребления питательных веществ и кислорода, и, следовательно, замедляется темп роста биомассы. Таким образом, можно избежать накопления побочных токсичных метаболитов, а также избыточного теплообразования во время ферментации, однако следует учитывать, что при этом уменьшается скорость образования телец включения. В некоторых случаях это необходимо для дальнейшего упрощения выделения белка.

Нами были проведены эксперименты, в которых после внесения ИПТГ мы снижали температуру до 25°C, при этом время после индукции увеличивалось до 12 ч. Однако на уровне экспрессии белков это не отразилось. Поскольку снижение температуры увеличивает время культивирования, в дальнейшем мы проводили выращивание культуры при температуре 37°C.

При соблюдении подобранных оптимальных условий (обогащение среды LB глюкозой, увеличение содержания триптона, внесение гидро- и дигидрофосфатов калия, температура выращивания 37°C, время выращивания 2 часа после индукции, концентрация ИПТГ 0,2 мМ) при выращивании культуры в колбах удалось увеличить выход белка с 1,8 до 2,6 г, т.е. приблизительно в полтора раза.

Кислород часто становится лимитирующим фактором для достижения высоких плотностей культуры (Bunch, 1994; Glazygina et al., 2010). Кроме того, при недостатке кислорода происходит снижение значения рН культуральной жидкости, поэтому оценка влияния аэрации на накопление белка и выход

биомассы является существенным моментом в процессе оптимизации условий культивирования. Потребление кислорода увеличивается по мере роста культуры, и это также необходимо учитывать. Увеличить количество растворенного кислорода в культуральной жидкости при росте культуры можно путем увеличения аэрации. В колбах это достигается либо увеличением оборотов качалки, либо уменьшением объема среды в колбах.

В наших экспериментах изменение аэрации в колбах достигалось путем варьирования количества среды в диапазоне от 50 до 250 мл. Результаты эксперимента представлены в таблице 9.

Таблица 9 – Накопление биомассы штаммом-продуцентом *E. coli* M15 в зависимости от объема среды в колбе.

<i>Объем среды в колбе, мл</i>	<i>Накопление влажной биомассы, г/л</i>	<i>Объем среды в колбе, мл</i>	<i>Накопление влажной биомассы, г/л</i>
50	4,3	200	3,6
100	4,8	250	2,7
150	4,1		

С увеличением аэрации сначала наблюдается увеличение количества накопленной биомассы (снижение объема среды в колбах с 250 мл до 100), а затем стабилизация или даже падение количества биомассы. Данные результаты были подтверждены в процессе культивирования штамма-продуцента *E. coli* M15 в ферментере при различных оборотах мешалки. Так, при скорости перемешивания 250 об./мин накопление биомассы в ферментере на среде LB составило 28 г, тогда как при 500 об./мин наблюдался двухкратный прирост биомассы – до 60 г.

Все эти результаты были учтены при выращивании культуры в ферментере (рисунок 42). В среде LB увеличили содержание триптона и дрожжевого экстракта в 1,5 раза, внесли фосфаты калия и глюкозу.



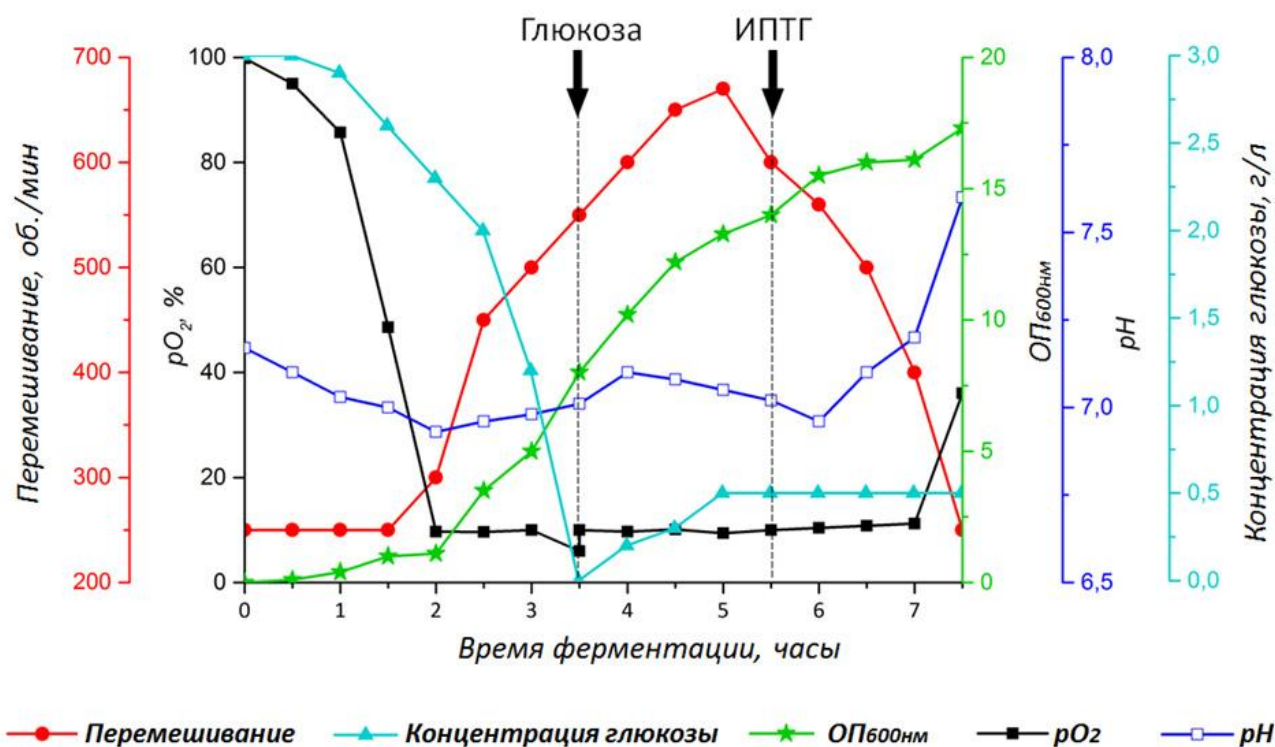


Рисунок 42. Изменение показателей в процессе культивирования с подпиткой глюкозой.

После засева культура начала расти, о чем судили по увеличению оптической плотности при 600 нм, количество растворенного кислорода и глюкозы снижалось. В целях предотвращения лимита по кислороду значения  $pO_2$  поддерживали на уровне 10% за счет увеличения оборотов мешалки. Через 3,5 часа роста наблюдался резкий подъем  $pO_2$ , что свидетельствовало об исчерпании глюкозы в среде (ОП = 8,2 ОЕ). После этого начали подавать подпитку, представляющую собой 10% раствор глюкозы, со скоростью 1,5 мл/мин. Подпитку подавали еще 2 часа до ОП=14, а затем добавляли ИППГ. Ферментацию продолжали еще 2 часа, пока накопление биомассы не остановилось (ОП 18,2). Таким образом, показано, что ведение процесса с подпиткой глюкозой дает возможность получить большее количество биомассы, а, следовательно, и белка.

На рисунке 43 представлен электрофорез в полиакриламидном геле, на котором показана индукция BMPRIA-CBD при культивировании клона *E. coli* M15 в ферментере.

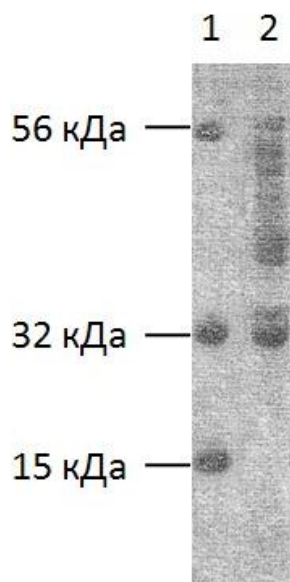


Рисунок 43. Окрашенный Кумасси R250 полиакриламидный гель после электрофореза по Лэммли белков биомассы продуцента BMR1A-CBD, растворенных в буфере для лизиса клеток. Дорожки: 1 – маркеры молекулярного веса; 2 – препарат белков биомассы через 2 часа после индукции синтеза белка в ферментере.

Проведенная оптимизация условий культивирования штаммов в колбах и ферментере, а именно, обогащение среды LB глюкозой, увеличение содержания в ней триптона, внесение гидро- и дигидрофосфатов калия, автоматическое поддержание значения pH среды (7,2-7,4), поддержание значения  $pO_2$  на уровне 10%, выращивание при температуре 37°C, ферментация в течение 2 часов после индукции экспрессии ИПТГ (0,2 мМ), позволила увеличить суммарный выход BMR1A-CBD до уровня 30% от всех белков штамма.

Из наработанной в процессе культивирования биомассы проводилось выделение белка BMR1A-CBD с целью получения на его основе целлюлозосодержащего сорбента и использования полученного сорбента для обогащения препаратов rhBMP-2 димерной формой в нативной конформации.

### **3.5 Разработка метода очистки димерной формы rhBMP-2 с помощью аффинного сорбента на основе BMPRIA-CBD**

#### **3.5.1 Выделение BMPRIA-CBD и получение целлюлозосодержащего сорбента на его основе**

При получении аффинного сорбента на основе рекомбинантного химерного белка - рецептора rhBMP-2, соединенного с целлюлозосвязывающим доменом, было использовано свойство целлюлозосвязывающего домена из *Caldicellulosiruptor bescii* (ранее – *Anaerocellum thermophilum*) с очень высокой константой связывания связываться с целлюлозосодержащим сорбентом (Velikodvorskaya et al., 2010). Полученные на основе данного целлюлозосвязывающего домена аффинные сорбенты стабильны в условиях широкого диапазона температур и pH и не требуют дополнительной ковалентной пришивки аффинного компонента к целлюлозной матрице.

Процесс получения целлюлозосодержащего сорбента с иммобилизованным на нем BMPRIA-CBD состоит из нескольких этапов: разрушение биомассы клеток, центрифугирование клеточного лизата, отделение супернатанта BMPRIA-CBD, инкубирование с суспензией целлюлозосодержащего сорбента, отмывка сорбента от несвязавшегося белка.

Наработанную в результате ферментирования культуры биомассу клеток (1,5 г) суспендировали в 50 мл буфера (1% тритона X-100, 100 мМ NaCl, 25 мМ Трис-HCl, pH 8,0), инкубировали в течение 15-30 минут смесь с лизоцимом в концентрации 10 мкг/мл, и разрушали бактериальные клетки под действием ультразвука с амплитудой 45% дважды по 1,5 мин с перерывом в 10 мин. После этого лизат осветляли центрифугированием при 13000 g в течение 30 минут, отделяли осадок фрагментов клеточных мембран и субклеточных фракций и получали супернатант, содержащий растворимый рекомбинантный белок BMPRIA-CBD. Раствор BMPRIA-CBD инкубировали с суспензией целлюлозосодержащего сорбента (perloza MT 200, Iontosorb, Чехия) в течение 4-18 часов. Затем сорбент тщательно и многократно отмывали от

несвязавшегося белка раствором, содержащим 1% тритона X-100, 100 мМ NaCl, 25 мМ Трис-HCl, pH 8,0, путем суспендирования сорбента в буфере и последующего центрифугирования. Полученный таким образом сорбент содержал в качестве аффинного лиганда иммобилизованный BMPRIA-CBD в количестве ~1 мг белка на 1 мл сорбента.

### **3.5.2 Сорбция димерной формы rhBMP-2 на целлюлозосодержащем сорбенте с BMPRIA-CBD**

Выделение и предварительную очистку rhBMP-2 от примесей липополисахаридов, балластных белков, ДНК и РНК штаммов-продуцентов проводили в соответствии с методикой, описанной Шараповой и соавторами (Шарапова и др., 2010).

Как известно, белок rhBMP-2 в клетках *E. coli* синтезируется в тельцах включения. Для выделения белка тельца включения переводили в растворимое состояние в растворе мочевины с конечной концентрацией 4 М в 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0 с последующим осаждением центрифугированием и отделением нерастворившегося осадка. Для увеличения соотношения долей димерной/мономерной формы rhBMP-2 проводили рефолдинг белка в присутствии L-аргинина. К раствору белка добавляли двойной объем 1 М раствора L-аргинин-HCl, pH 8,9, инкубировали в течение ночи, диализовали против 50 мМ Трис-HCl, pH 8,0. На рисунке 44 представлены фракции до (дорожки 2, 3) и после (дорожки 4, 5) инкубации с L-аргинином: видно увеличение содержания димера.

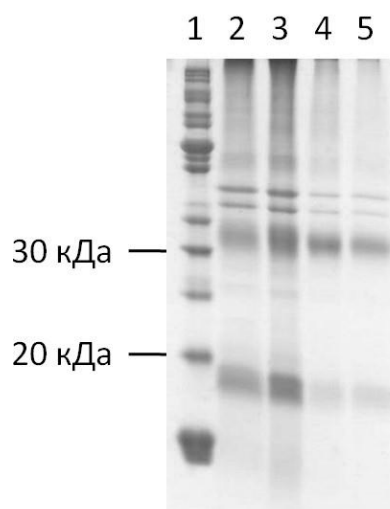


Рисунок 44. Электрофореграмма rhBMP-2 до и после рефолдинга: 1 – маркер молекулярной массы; 2, 3 – препараты до рефолдинга; 4, 5 – препараты после рефолдинга.

На финальном этапе очистки димерной формы rhBMP-2 из смеси его мономеров, димеров и олигомеров использовали свойство его специфического взаимодействия со своим клеточным рецептором BMPRIA, домен которого входит в состав синтезированного химерного белка BMPRIA-CBD.

Хроматографическую колонку заполняли подготовленным ранее целлюлозосодержащим сорбентом с BMPRIA-CBD (5 мл раствора) и уравнивали, пропуская через колонку десятикратный объем буферного раствора (100 mM NaCl, 25 mM Трис-HCl, pH 8,0).

Раствор rhBMP-2, содержащий мономерные, димерные и олигомерные формы белка, пропускали через подготовленную колонку со скоростью 1 мл/мин (рисунок 45, дорожка 1). Димерная форма rhBMP-2 связывалась с иммобилизованным на сорбенте белком BMPRIA-CBD (рисунок 45, дорожка 2), образуя лиганд-рецепторный комплекс (рисунок 45, дорожка 3). Колонку со связавшимся димером rhBMP-2 промывали пятикратным объемом буфера, содержащего 100 mM NaCl, 25 mM трис-HCl, pH 8,0. Далее через колонку пропускали 20 мл элюирующего буферного раствора (1,5 M NaCl в 25 mM Трис-HCl, pH 8,0) со скоростью 1 мл/мин (рисунок 45, дорожка 4). Анализ

собранных фракций rhBMP-2 проводили методом электрофореза в ПААГ в неденатурирующих условиях по Лэмбли.

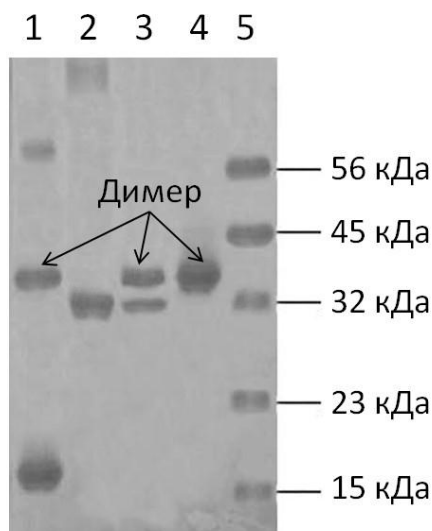


Рисунок 45. Электрофореграмма анализа собранных фракций белка rhBMP-2 методом электрофореза в ПААГ в неденатурирующих условиях по Лэмбли: 1 – препарат rhBMP-2 до очистки; 2 – рекомбинантный химерный белок BMPRIA-CBD; 3 – сорбированный белок rhBMP-2 в комплексе с BMPRIA-CBD и целлюлозосодержащим сорбентом; 4 – препарат димерной формы rhBMP-2 после элюирования с сорбента; 5 – маркер молекулярной массы.

Как видно из данных, приведенных на электрофореграмме (рисунок 45), в результате хроматографии на сорбенте с иммобилизированным рецептором rhBMP-2 весь элюированный с сорбента белок находится в димерной форме. Концентрация полученного препарата белка составляет 1,5 мг/мл.

### 3.6 Проверка биологической активности выделенного rhBMP-2 *in vitro*

Проверку биологической активности rhBMP-2, очищенного с использованием аффинного сорбента на основе рецептора BMP-2, оценивали в два этапа. На первом этапе оценивали его способность индуцировать синтез щелочной фосфатазы в культуре эукариотических клеток C2C12 в сравнении с rhBMP-2, очищенным по ранее разработанной методике и содержащим ~80% димерной формы белка (Шарапова и др., 2010). На данной модели тестировали

выделения белков в четырех концентрациях: 0,05, 0,5, 5,0 и 50 мкг/мл (рисунок 46). В качестве контроля использовали физиологический раствор.

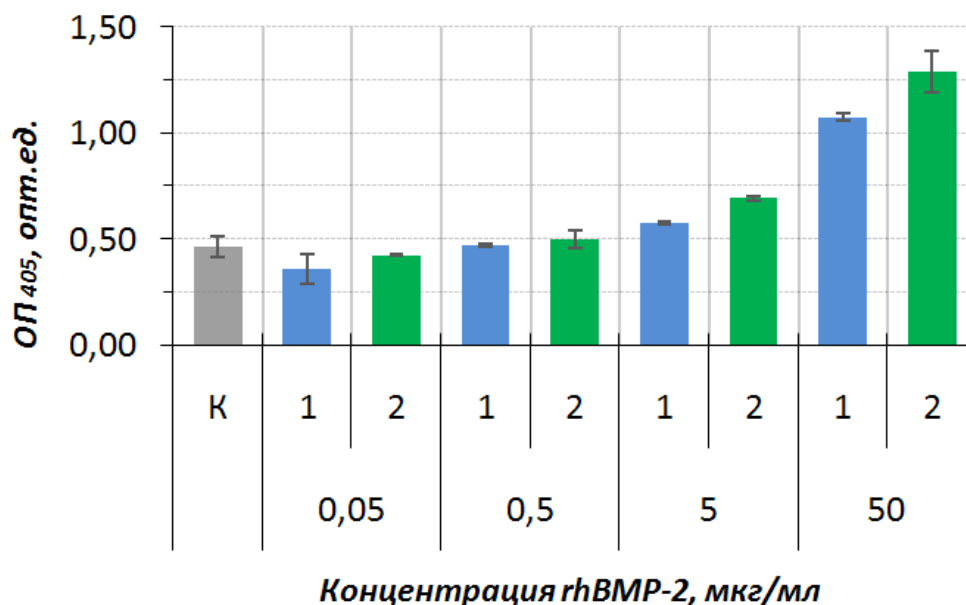


Рисунок 46. График зависимости индукции синтеза щелочной фосфатазы в культуре клеток C2C12 от концентрации белка rhBMP-2. К – контроль; 1 – препарат rhBMP-2, очищенный по ранее разработанной методике; 2 – препарат rhBMP-2, очищенный с помощью разработанного нами подхода.

Из диаграммы видно, что при увеличении концентрации rhBMP-2 наблюдается дозозависимое увеличение его биологической активности. В максимальной из исследованных концентраций (50 мкг/мл) удельная активность rhBMP-2, очищенного с помощью аффинного сорбента на основе рецептора BMP-2, и состоящего полностью из димерной формы, превысила активность препарата белка, очищенного по ранее разработанной методике на 19,8%.

На втором этапе работы оценивали влияние rhBMP-2 на пролиферацию и остеогенную дифференцировку мультипотентных стромальных клеток (МСК) костного мозга и селезенки мышей. Работа проводилась в сотрудничестве со старшим научным сотрудником лаборатории регуляции иммунитета ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, д.б.н. Горской Ю.Ф. (Горская и др., 2013).

Культуры костного мозга и селезенки на 9-10 день культивирования состояли из колоний стромальных фибробластов с макрофагами, расположенными внутри колоний МСК и между ними. Культуры клеток также содержали небольшое количество кроветворных и лимфоидных клеток. Нами было установлено, что при внесении в культуральную среду rhBMP-2 количество колоний и численность в них фибробластов увеличивается (таблицы 10, 11).

Таблица 10 – Численность МСК-колоний и макрофагов в культурах костного мозга мышей линии СВА в присутствии rhBMP-2 в культуральной среде.

<i>Оцениваемый параметр</i>	<i>Концентрация rhBMP-2, мкг/мл</i>		
	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>10</i>
Число МСК колоний	72±2	113±13	100±21
Число фосфатазоположительных колоний МСК, шт.	9±1	23±3	20±5
Доля фосфатазоположительных колоний, %	12,5	20,4	20
Эффективность клонирования МСК (ЭКО-МСК) ( $\times 10^5$ )	1,4±0,1	2,3±0,2	2,0±0,4
Увеличение ЭКО-МСК, разы	–	1,6	1,4
Число макрофагов в 10 полях зрения, шт.	89±14	35±6	25±5
Снижение числа макрофагов, разы	–	2,5	3,6

Таблица 11 – Численность МСК-колоний и макрофагов в культурах селезенки мышей линии СВА в присутствии rhBMP-2 в культуральной среде.

<i>Оцениваемый параметр</i>	<i>Концентрация rhBMP-2, мкг/мл</i>			
	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>10</i>	<i>100</i>
Число МСК колоний	14±2	30±5	39±9	46±6
Число фосфатазоположительных колоний МСК	0	3±1	4±1	6±1
Доля фосфатазоположительных колоний, %	0	10,0	10,2	13,0
ЭКО-МСК ( $\times 10^5$ )	0,14±0,02	0,30±0,06	0,38±0,09	0,46±0,06



продолжение Таблицы 11.

Оцениваемый параметр	Концентрация rhBMP-2, мкг/мл			
	0	1	10	100
Увеличение ЭКО-МСК, разы	–	2,1	2,7	3,3
Число макрофагов в 10 полях зрения	192±9	75±5	52±10	32±8
Снижение числа макрофагов, разы	–	2,6	3,7	6,4

При внесении rhBMP-2 в культуру клеток костного мозга эффективность клонирования стромальных клеток-предшественников увеличивалась уже при минимальной концентрации белка 1 мкг/мл в 1,6 раза. При этом стоит отметить, что при дальнейшем увеличении концентрации белка до 10 мкг/мл эффективность клонирования МСК сохранилась на том же уровне, но в 3,6 раза снизилось количество макрофагов (Таблица 10).

Добавление rhBMP-2 в культуру клеток селезенки мышей в концентрации 1, 10 и 100 мкг/мл значительно увеличивало количество стромальных фибробластов в колониях (размер колоний возрастал более чем вдвое), а также увеличивало ЭКО-МСК в 2,1, 2,7 и 3,3 раза, соответственно (Таблица 11). В нормальных условиях в клетках селезенки не наблюдается остеогенной дифференцировки, однако при появлении индуктора (например, rhBMP-2) примерно 10% колоний способны к ее осуществлению. При увеличении концентрации белка было установлено, что происходит индукция остеогенной дифференцировки не только клеток, способных к остеогенезу, но и тех, которые этой способностью, видимо, не обладали. Это следует из увеличения количества фосфатазоположительных колоний с 10 до 13% при доведении концентрации rhBMP-2 до 100 мкг/мл.

Также было установлено дозозависимое ингибирующее действие белка rhBMP-2 на макрофаги: при повышении содержания фактора роста в культуре клеток и костного мозга, и селезенки, наблюдалось снижение количества макрофагов от 2,5 до 6,4 раз в зависимости от концентрации белка.

Таким образом, при тестировании *in vitro* димерной формы белка, нами было показано, что он обладает выраженной биологической активностью и перспективен для создания остеоиндуктивных материалов на его основе.

## 4 ВЫВОДЫ

1. Разработан способ получения остеоиндуктивных остеопластических материалов на основе деминерализованного костного матрикса, в том числе, содержащих иммобилизованный рекомбинантный костный морфогенетический белок 2 человека (rhBMP-2).

2. На адаптированных моделях оценки регенеративного потенциала *in vivo* на лабораторных животных (крысы, кролики) экспериментально доказаны остеоиндуктивные, остеointегративные и ангиогенные свойства разработанных материалов при применении их как в самостоятельном виде (модель индукции эктопического остеогенеза, модель регенерации краниальных дефектов критического размера), так и в сочетании с металлоконструкциями из титана. Показано, что максимально выраженными свойствами обладают материалы с добавлением rhBMP-2.

3. Получен новый штамм *E. coli* M15 [pREP4, pBMPRIA-CBD], обеспечивающий продукцию рекомбинантного химерного белка BMPRIA-CBD, состоящего из рецептора BMPRIA фактора роста костной ткани BMP-2, соединенного с целлюлозосвязывающим доменом из *Caldicellulosiruptor bescii*. Оптимизация условий культивирования штамма-продуцента позволила обеспечить синтез BMPRIA-CBD на уровне 30% от всех белков штамма.

4. Разработан подход для обогащения препаратов rhBMP-2 димерной формой белка с помощью аффинной хроматографии на целлюлозном сорбенте с иммобилизованным рекомбинантным белком BMPRIA-CBD.

5. Подтверждена биологическая активность и установлено позитивное дозозависимое влияние очищенных препаратов rhBMP-2 в димерной форме на синтез щелочной фосфатазы в культуре эукариотических клеток C2C12, пролиферацию и остеогенную дифференцировку МСК костного мозга и селезенки мышей, а также супрессирующее действие на макрофаги, выражающееся в снижении их числа от 2,5 до 6,4 раз в зависимости от концентрации белка.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АТФ – аденозинтрифосфат,  
БСА – бычий сывороточный альбумин,  
ГАП – гидроксиапатит,  
ГК – гидролизат казеина,  
ДКМ – деминерализованный костный матрикс,  
ДСН – додецилсульфат натрия,  
ДТТ – дитиотреитол,  
ДФК – двухфазный фосфат кальция,  
ИМН – изделие медицинского назначения,  
ИПТГ – изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозид,  
КРС – крупный рогатый скот,  
мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота,  
МСК – мультипотентные стромальные клетки,  
ОЕ – оптические единицы,  
ОП – оптическая плотность,  
ОТП – обогащенная тромбоцитами плазма,  
п.н. – пар нуклеотидов,  
ТКФ – трикальций фосфат,  
ЩФ – щелочная фосфатаза,  
ЭКО-МСК – эффективность клонирования МСК.  
ВМА – bone marrow aspirate – аспират костного мозга,  
ВМР – bone morphogenetic protein – костный морфогенетический белок,  
ВМР1А – Bone Morphogenetic Protein Receptor 1A – рецептор костного морфогенетического белка 1А,  
BS – bone surface – площадь поверхности костной ткани в области интереса.  
BV – bone volume – объем костной ткани в области интереса,  
CBD – cellulose binding domain – целлюлозосвязывающий домен,  
СНО – Chinese hamster ovary – яичники китайского хомячка,

Co-Smad (Smad4) – общий партнер Smad,  
CrhBMP-2 – rhBMP-2, полученный в культуре клеток CHO,  
ErhBMP-2 – rhBMP-2, полученный в культуре клеток *Escherichia coli*,  
I-Smads – inhibitory Smads – ингибиторные Smads,  
LB – среда Luria-Bertani,  
rhBMP-2 – recombinant human bone morphogenetic protein 2 –  
рекомбинантный человеческий костный морфогенетический белок 2,  
R-Smads – рецептор-активируемые Smads,  
TGF- $\beta$  – трансформирующий фактор роста-бета,  
TS – tissue surface – площадь поверхности всех тканей в области интереса,  
TV – tissue volume – объем всех тканей в области интереса.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андреева, Т. М. Травматизм в Российской Федерации на основе данных статистики [Электронный ресурс] / Т. М. Андреева // Социальные аспекты здоровья населения. – 2010. – №4. – Режим доступа: <http://vestnik.mednet.ru/content/view/234/30/lang,ru/>
2. Бартов, М.С. Остеопластические препараты нового поколения «Гамалант», содержащие факторы роста и регенерации костной ткани / М.С. Бартов, А.С. Карягина, А.В. Громов и др. // Кафедра травматологии и ортопедии. – 2012. – №2. – С.21–25.
3. Горская, Ю. Ф. Влияние BMP-2 на численность и остеогенные свойства мультипотентных стромальных клеток и экспрессию генов цитокинов в первичных культурах клеток костного мозга и селезенки мышей СВА, иммунизированных бактериальными антигенами / Ю. Ф. Горская, Т. А. Данилова, М. В. Мезенцева, И. М. Шаповал, Т. М. Грунина, М. С. Бартов, А. С. Карягина, В. Г. Лунин, Р. К. Чайлахян, А. И. Куралесова, Ю. В. Герасимов, В. Г. Нестеренко // Бюллетень Экспериментальной Биологии И Медицины. – 2013. – Т.155. – №5. – С.602–606.
4. ГОСТ 28085-89 «Препараты биологические. Метод бактериологического контроля стерильности». – М.: Стандартинформ, 2007. – 8 с.
5. Григорьян, А. С. Проблемы интеграции имплантатов в костную ткань (теоретические аспекты) / А. С. Григорьян, А. К. Топоркова // М.: Техносфера, 2007. – 128 с.
6. Громов, А. В. Разработка методики получения деминерализованного костного матрикса с максимальным остаточным содержанием нативных факторов роста костной ткани / К. Е. Никитин, Т. А. Карпова, М. С. Бартов, Д. М. Мишина, М. Е. Субботина, Н. В. Шевлягина, М. А. Сергиенков, Л. А. Соболева, А. П. Котнова, Н. Е. Шарапова, А. С. Семихин, Л. В. Диденко, А.С. Карягина, В. Г. Лунин // Биотехнология. – 2012а. – №5. – С. 66–75.

7. Громов, А.В. Остеопластические материалы нового поколения / А.В. Громов, М.С. Бартов, Л.А. Соболева и др. // Фармацевтические и медицинские биотехнологии: Сб. тезисов научно-практ. конф. г. Москва, 2012b. – С.226.

8. Громов, А.В. Остеопластические материалы нового поколения на основе ксеногенного деминерализованного костного матрикса с добавлением рекомбинантных костных морфогенетических белков человека rhBMP-2 и rhBMP-7 / А.В. Громов, М.С. Бартов, К.Е. Никитин и др. // Чаклинские чтения: мат. научно-практ. конф, г. Екатеринбург, 2011a. – С.159-160.

9. Громов, А. В. Разработка биокompозитов нового поколения на основе ксеногенного деминерализованного костного матрикса с добавлением рекомбинантных костных морфогенетических белков человека rhBMP-2 и rhBMP-7 / А. В. Громов, М. С. Бартов, К. Е. Никитин и др. // Илизаровские чтения: мат. научно-практ. конф., г. Курган, 2011b. – С.474-475.

10. Зайцев, В. В. Костные морфогенетические белки (BMP): общая характеристика, перспективы клинического применения в травматологии и ортопедии / В. В. Зайцев, А. С. Карягина, В. Г. Лунин // Вестник травматологии и ортопедии им Н. Н. Приорова. – 2009. – №4. – С. 79–84.

11. Лунин В.Г., Громов А.В., Карягина-Жулина А.С., Ершова А.С., Лаврова Н.В., Семихин А.С., Соболева Л.А., Овечкина Т.А., Субботина М.Е., Грунина Т.М., Мишина Д.М., Котнова А.П., Никитин К.Е., Бартов М.С., Гинцбург А.Л., Шарапова Н.Е. Способ получения деминерализованного костного матрикса в виде крошки. Заявка на патент РФ №2011108938 от 10.03.2011 г. Патент РФ №2456003 от 20 июля 2012 года. Опубликовано 20.07.2012. Бюл. №20.

12. Лунин В.Г., Миргазизов Р.М., Ткачук А.П., Карягина-Жулина А.С., Гинцбург А.Л., Бартов М.С., Шарапова Н.Е., Миргазизов А.М., Миргазизов М.З., Хафизов Р.Г., Котнова А.П. Способ адресной доставки остеопластических материалов, содержащих факторы роста и регенерации костной ткани, в область дефекта альвеолярной кости. Заявка на патент РФ №2011121880 от

31.05.2011 г. Патент на изобретение №2469676. Опубликовано: 20.12.2012. Бюл. №35.

13. Макарова, Э. Б. Интеграция костной ткани в пористые титановые имплантаты с алмазоподобными нанопокровками / Э. Б. Макарова, Ю. М. Захаров, А. П. Рубштейн, А. И. Исайкин // Гений ортопедии. – 2011. – №4. – С. 111–116.

14. Макарова, Э. Б. Экспериментальное обоснование использования биокompозитных имплантатов из пористого титана, модифицированных алмазоподобными покрытиями, для замещения костной ткани / Э. Б. Макарова, Ю. М. Захаров, А. П. Рубштейн, А. В. Громов, М. С. Бартов, А. С. Карягина-Жулина, В. Г. Лунин // Технологии оптимизации процесса репаративной регенерации в травматологии, ортопедии и нейрохирургии: мат. Всероссийской научно-практ. конф., г. Саратов, 2013а. – С. 25–27.

15. Макарова, Э. Б. Создание и обоснование применения биоимплантатов с использованием нанотехнологий Э.Б. Макарова, И. Л. Шлыков, Д. Г. Блинец, З. И. Горбунова, А. П. Рубштейн, И. Ш. Трахтенберг, А. В. Громов, М. С. Бартов, А. С. Карягина // мат. научно-практ. конф., г. Харьков, 2013б. – С. 39-40.

16. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук // Пер. с англ. – М.: Мир, 1984. – С. 480.

17. Мардарьев, А. Н. Костные морфогенетические белки и их роль в канцерогенезе кожи / А. Н. Мардарьев, А. А. Шаров, А. Ю. Барышников // Российский Биотерапевтический Журнал. – 2007. – №3 Том 6. – С. 43–50.

18. Семихин, А. С. Получение компонентов иммунобиологических препаратов на основе микробиологического синтеза и технологии аффинных доменов : дис. ... канд. биол. наук : 03.02.03, 03.01.06 / Семихин Александр Сергеевич. – М., 2010. – 171 с.

19. Федорова, М.З. Экспериментальная оценка композиционного материала на основе белково-минеральных компонентов и рекомбинантного



костного морфогенетического белка-2 в качестве покрытия титановых имплантатов / М. З. Федорова, С. В. Надеждин, А. С. Семихин, М. А. Лазебная, Г. В. Храмов, Ю. Р. Колобов, А. В. Громов, М. С. Бартов, В. Г. Лунин, А. С. Карягина, Д. В. Гундеров // Травматология и ортопедия России. – 2011. – №2 (60). – С.101–106.

20. Цыган, Е. Н. Морфофункциональные основы остеопороза / Е. Н. Цыган, Р. В. Деев. – СПб: ВМедА, 2007. – 120 с.

21. Шарапова, Н. Е. Получение рекомбинантного костного морфогенетического белка 2 человека в клетках *Escherichia coli* и тестирование его биологической активности *in vitro* и *in vivo* / Н. Е. Шарапова, А. П. Котнова, З. М. Галушкина, Н. В. Лаврова, Н. Н. Полетаева, А. Э. Тухватуллин, А. С. Семихин, А. В. Громов, Л. А. Соболева, А. С. Ершова, В. В. Зайцев, О. В. Сергеенко, В. Г. Лунин, А. С. Карягина // Молекулярная биология. – 2010. – №44(5). – С. 1036–1044.

22. Шарапова Н. Е., Котнова А. П., Сергиенко О. В. и др. Рекомбинантная плаزمид, рекомбинантный штамм, рекомбинантный белок BMP-2 и способ выделения рекомбинантного белка в димерной форме. Патент RU 2499048 С1 МПК С12N 15/63 (2006.01) Заявка 2012140616/10, 24.09.2012. Опубликовано: 20.11.2013. Бюл. №32.

23. Яковлева, Г. Е. Ферменты в клинической биохимии / Г. Е. Яковлева // Новосибирск: «Вектор-Бест», 2005. – 44 с.

24. Albrektsson, T. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration / T. Albrektsson, C. Johansson // Eur Spine J. – 2001. – №10 Suppl 2. – S96-101.

25. Albrektsson, T. Ultrastructural analysis of the interface zone of titanium and gold implants / T. Albrektsson, P.-I. Brånemark, H.-A. Hansson, B. Ivarsson, U. Jönsson // Advances in Biomat. – 1982. – №4. – PP. 167–177.

26. Alt, V. An economic analysis of using rhBMP-2 for lumbar fusion in Germany, France and UK from a societal perspective / V. Alt, A. Chhabra, J. Franke, M. Cuche, R. Schnettler, J.C. Le Huec // Eur Spine J. – 2009. – №18(6). – PP. 800–806.

27. An, Y. H. Animal models of bone defect repair. In: *Animals Models in Orthopaedic Research* / Y. H. An, R. J. Friedman // CRC Press LLC. – 1999. – PP. 241–260.
28. Anderson, J. The cellular cascades of wound healing / J. Anderson // In: *Bone Engineering*, Toronto. – 2000. – PP. 81–93.
29. Arnold, F. H. Engineered Metal-binding Proteins: Purification to Protein Folding / F. H. Arnold, B. L. Haymore // *Science*. – 1991. – №252. – PP. 1796–1797.
30. Atilgan, S. An experimental comparison of the effects of calcium sulphate particles and b-tricalcium phosphate/hydroxyapatite granules on osteogenesis in internal bone cavities / S. Atilgan, F. Yaman, U. Yilmaz, B. Gorguen, G. Unlu // *Biotechnol.* – 2007. – №2(21). – PP. 205–210.
31. Barneveld, A. Cancellous bone grafting in the treatment of bovine septic physisitis / A. Barneveld. // *Vet Q.* – 1994. – №16. – S104–107.
32. Barr, T. Comparison of the osteoinductivity of bioimplants containing recombinant human bone morphogenetic proteins 2 (Infuse) and 7 (OP-1) / T. Barr, A. J. McNamara, G. K. Sándor, C. M. Clokie, S. A. Peel // *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* – 2010. – №109(4). – PP. 531–540.
33. Barradas, A. M. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms / A. M. Barradas, H. Yuan, C. A. van Blitterswijk, P. Habibovic // *Eur Cell Mater.* – 2011. – №21. – PP. 407–429.
34. Beaman, F. D. Bone graft materials and synthetic substitutes / F. D. Beaman, L. W. Bancroft, J. J. Peterson, M. J. Kransdorf // *Radiol Clin North Am.* – 2006. – №44(3). – PP. 451–461.
35. Bessa, P. C. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts) / P. C. Bessa, M. Casal, R. L. Reis // *J Tissue Eng Regen Med.* – 2008. – №2. – PP. 1–13.
36. Bessho, K. Bone induction by Escherichia coli-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 compared with Chinese hamster ovary cell-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 / K. Bessho, Y. Konishi,

S. Kaihara, K. Fujimura, Y. Okubo, T. Iizuka // *Br J Oral Maxillofac Surg.* – 2000. – №38(6), PP. 645–649.

37. Bhatt, R. A. Bone graft substitutes / R. A. Bhatt, T. D. Rozental // *Hand Clin.* – 2012. – №28(4), PP. 457–468.

38. Bien, M. Mitochondrial disulfide bond formation is driven by intersubunit electron transfer in Erv1 and proofread by glutathione / M. Bien, S. Longen, N. Wagener, I. Chwalla, J. M. Herrmann, J. Riemer // *Mol Cell.* – 2010. – №37(4). – PP. 516–528.

39. Bilic, R. Osteogenic protein-1 (BMP-7) accelerates healing of scaphoid non-union with proximal pole sclerosis / R. Bilic, P. Simic, M. Jelic, R. Stern-Padovan, D. Dodig, H. P. van Meerdervoort, S. Martinovic, D. Ivankovic, M. Pecina, S. R. Vukicevic // *Int Orthop.* – 2006. – №30(2). – PP. 128–134.

40. Blom, A. Impaction bone grafting of the acetabulum at hip revision using a mix of bone chips and a biphasic porous ceramic bone graft substitute / A. W. Blom, V. Wylde, C. Livesey, et al // *Acta Orthop.* – 2009. – №80(2). – PP. 150–154.

41. Böhner, M. Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements / M. Böhner // *Injury.* – 2000. – №31 Suppl 4:37-47.

42. Bong, M. R. Osteogenic protein-1 (bone morphogenic protein-7) combined with various adjuncts in the treatment of humeral diaphyseal non-unions / M. R. Bong, E. L. Capla, K. A. Egol, A. T. Sorkin, M. Distefano, R. Buckle, R. W. Chandler, K. J. Koval // *Bull Hosp Jt Dis.* – 2005. – №63. – PP. 20–23.

43. Borelli, J. Treatment of nonunions and osseous defects with bone graft and calcium sulfate / J. Borelli, W. D. Prickett, W. M. Ricci // *Clin Orthop Relat Res.* – 2003. – №411. – PP. 245–254.

44. Boudrieau, R. J. Mandibular reconstruction of a partial hemimandibulectomy in a dog with severe malocclusion / R. J. Boudrieau, S. L. Mitchell, H. Seeherman // *Vet Surg.* – 2004. – №33. – PP. 119–130.

45. Brydone, A.S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering / A.S. Brydone, D. Meek, S. Maclaine // *Proc Inst Mech Eng H.* – 2010. – №224(12). – PP. 1329–1343.

46. Bunch, A.W. High cell density growth of microorganisms / A.W. Bunch // *Biotechnol Genet Eng Rev.* – 1994. – №12. – P.535–562
47. Burg, K. J. Biomaterial developments for bone tissue engineering / K. J. Burg, S. Porter, J. F. Kellam // *Biomaterials.* – 2000. – №21(23). – PP. 2347–2359.
48. Callis, T.E. Bone morphogenetic protein signaling modulates myocardium transactivation of cardiac genes / T.E. Callis, D. Cao, D.Z. Wang // *Circ Res.* – 2005. – 97(10). – PP. 992–1000.
49. Cassidy, C. Norian SRS cement compared with conventional fixation in distal radial fractures. A randomized study / C. Cassidy, J. B. Jupiter, M. Cohen, M. Delli-Santi, C. Fennell, C. Leinberry, J. Husband, A. Ladd, W. R. Seitz, B. Constanz // *J Bone Joint Surg Am.* – 2003. – №85-A(11). – PP. 2127–2137.
50. Chen, H. BMP-10 is essential for maintaining cardiac growth during murine cardiogenesis / H. Chen, S. Shi, L. Acosta, W. Li, J. Lu, S. Bao, Z. Chen, Z. Yang, M. D. Schneider, K. R. Chien, S. J. Conway, M. C. Yoder, L. S. Haneline, D. Franco, W. Shou // *Development.* – 2004. – 131(9). – PP. 2219–2231.
51. Cheung, R. C. Immobilized metal ion affinity chromatography: a review on its applications / R. C. Cheung, J. H. Wong, T. B. Ng // *Appl Microbiol Biotechnol.* – 2012. – №96(6). – P. 1411–1420.
52. Cook S. D. Effect of recombinant human osteogenic protein-1 on healing of segmental defects in non-human primates / S. D. Cook, M. W. Wolfe, S. L. Salkeld, D. C. Rueger // *J. Bone Jt. Surg. (Am.).* – 1995. – №77A. – PP. 734–750.
53. Creighton, T. E. Detection of folding intermediates using urea-gradient electrophoresis / T. E. Creighton // *Methods Enzymol.* – 1986. – №131. – PP. 156–172.
54. Cricchio, G. Donor site morbidity in two different approaches to anterior iliac crest bone harvesting / G. Cricchio, S. Lundgren // *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* – 2003. – №5. – P. 61–69.
55. Deckers, M. M. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A / M. M. Deckers, R.

L. van Bezooijen, G. van der Horst, J. Hoogendam, C. van Der Bent, S. E. Papapoulos, C. W. Löwik // *Endocrinology*. – 2002. – 143(4). – PP. 1545–1553.

56. Depuydt, M. How proteins form disulfide bonds / M. Depuydt, J. Messens, J. F. Collet // *Antioxid Redox Signal*. – 2011. – №15(1). PP. 49–66.

57. Dick, H. M. Infection of massive bone allografts / H. M. Dick, R. J. Strauch // *Clin Orthop Relat Res*. – 1994. – №306. – PP. 46–53.

58. Dimitriou, R. Injury Complications following autologous bone graft harvesting from the iliac crest and using the RIA: a systematic review / R. Dimitriou, G. I. Mataliotakis, A. G. Angoules, N. K. Kanakaris, P. V. Giannoudis // *Injury*. – 2011. – №42 Suppl 2. – S3–15.

59. Ducheyne, P. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. I. Dissolution / P. Ducheyne, S. Radin, L. King // *J Biomed Mater Res*. – 1993. – №27(1). – PP. 25–34.

60. Ebendal, T. Bone morphogenetic proteins and their receptors: Potential functions in the brain / T. Ebendal, H. Bengtsson, S. Soderstrom // *J. Neurosci. Res*. – 1998. – №51. – PP. 139–146.

61. Egermann, M. Animal models for fracture treatment in osteoporosis / M. Egermann, J. Goldhahn, E. Schneider // *Osteoporos Int*. – 2005. – №16 Suppl 2. – S129–S138.

62. El-Mansi, E. M. T. Control of Carbon Flux to Acetate Excretion During Growth of *Escherichia coli* in Batch and Continuous Cultures / E. M. T. El-Mansi, W. H. Holms // *J Gen Microbiol*. – 1989. – №135. – PP. 2875–2883.

63. Epstein, N. E. Beta tricalcium phosphate: observation of use in 100 posterolateral lumbar instrumented fusions / N. E. Epstein // *Spine J*. – 2009. – №9(8). – PP. 630–638.

64. Even, J. Bone morphogenetic protein in spine surgery: current and future uses / J. Even, M. Eskander, J. Kang // *J Am Acad Orthop Surg*. – 2012. – №20(9). – PP. 547–552.

65. Finkemeier, C. G. Bone-grafting and bone-graft substitutes / C. G. Finkemeier // *J Bone Joint Surg Am*. – 2002. – №84-A(3). – PP. 454–464.

66. Friedlaende, G. E. Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions / G. E. Friedlaende, C. R. Perry, J. D. Cole, S. D. Cook, G. Cierny, G. F. Muschler, G. A. Zych, J. H. Calhoun, A. J. LaForte, S. Yin // *J. Bone Joint Surg. Am.* – 2001. – №83A (S1(Pt 2)). – S151–S158.
67. Friedmann, A. Ridge augmentation and maxillary sinus grafting with a biphasic calcium phosphate: histologic and histomorphometric observations / A. Friedmann, M. Dard, B. M. Kleber, et al // *Clin. Oral Implants Res.* – 2009. – №20(7). – PP. 708–714.
68. Fujibayashi, S. Lumbar posterolateral fusion with biphasic calcium phosphate ceramic / S. Fujibayashi, J. Shikata, C. Tanaka, et al // *J. Spinal Disord.* – 2001. – №14. – №214–221.
69. Galuppo, L. Emergency First Aid and Stabilization Techniques / L. Galuppo // *The Horse Report.* – 2011. – №29. – PP. 1–14.
70. Garrison, K. R. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of bone morphogenetic proteins in the non-healing of fractures and spinal fusion: a systematic review / K. R. Garrison, S. Donell, J. Ryder, I. Shemilt, M. Mugford, I. Harvey, F. Song // *Health Technol Assess.* – 2007. – №11(30). – PP. 1–150.
71. Giannoudis, P. V. Clinical applications of BMP-7: the UK perspective / P. V. Giannoudis, C. Tzioupis // *Injury.* – 2005. – №36 (S3). – S47–S50.
72. Gitelis, S. Functional outcome of bone graft substitutes for benign bone lesions / S. Gitelis, W. Virkus, D. Anderson, et al // *Orthopedics.* – 2004. – №27(1). – S141–144.
73. Glazyrina, J. High cell density cultivation and recombinant protein production with *Escherichia coli* in a rocking-motion-type bioreactor / J. Glazyrina, E.M. Materne, T. Dreher, D. Storm, S. Junne, T. Adams, G. Greller, P. Neubauer // *Microb Cell Fact.* – 2010. – №9. – P. 2.
74. Gomori, G. The distribution of phosphatase in normal organs and tissues / G. Gomori // *J. Cell. Comp. Physiol.* – 1941. – №17. – PP. 71–83.
75. Gottesman, S. Proteases and their targets in *Escherichia coli* / S. Gottesman // *Annu Rev Genet.* – 1996. – №30. – PP. 465–506.

76. Govender, S. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients / S. Govender, C. Csimma, H. K. Genant, et al // *J. Bone Joint Surg. Am.* – 2002. – №84A. – PP. 2123–2134.
77. Gruskin, E. Demineralized bone matrix in bone repair: history and use / E. Gruskin, B. A. Doll, F. W. Futrell, J. P. Schmitz, J. O. Hollinger // *Adv Drug Deliv Rev.* – 2012. – №64(12). – PP. 1063–1077.
78. Habibovic, P. Comparative in vivo study of six hydroxyapatite-based bone graft substitutes / P. Habibovic, M. C. Kruyt, M. V. Juhl, S. Clyens, R. Martinetti, L. Dolcini, N. Theilgaard, C. A. van Blitterswijk // *J Orthop Res.* – 2008. – №26(10). – PP. 1363–1370.
79. Habibovic, P. Osteoinduction by biomaterials – physicochemical and structural influences / P. Habibovic, T. M. Sees, M. A. van den Doel, C. A. van Blitterswijk, K. de Groot // *J Biomed Mater Res A.* – 2006. – №77(4). – PP. 747–762.
80. Habibovic, P. Relevance of osteoinductive biomaterials in critical-sized orthotopic defect / P. Habibovic, H. Yuan, M. van den Doel, T. M. Sees, C. A. van Blitterswijk, K. de Groot // *J Orthop Res.* – 2006. – №24(5). – PP. 867–876.
81. Harada, Y. Effect of Escherichia coli-produced recombinant human bone morphogenetic protein 2 on the regeneration of canine segmental ulnar defects / Y. Harada, T. Itoi, S. Wakitani, H. Irie, M. Sakamoto, D. Zhao, Y. Nezu, T. Yogo, Y. Hara, M. Tagawa // *J Bone Miner Metab.* – 2012. – №30(4). – PP. 388–399.
82. Heinecke, K. Receptor oligomerization and beyond: a case study in bone morphogenetic proteins / K. Heinecke, A. Seher, W. Schmitz, T. D. Mueller, W. Sebald, J. Nickel // *BMC Biol.* – 2009. – №7. – P. 59.
83. Helgeson, M. D. Antibiotic-impregnated calcium sulfate use in combat-related open fractures / M. D. Helgeson, B. K. Potter, C. J. Tucker, et al // *Orthopedics.* – 2009. – №32(5). – P. 323.

84. Hellwig, S. Plant cell cultures for the production of recombinant proteins / S. Hellwig, J. Drossard, R.M. Twyman, R. Fischer // *Nat Biotechnol.* – 2004. – №22(11). – PP. 1415–1422.
85. Hench, L. L. Bonding mechanisms at the interface of ceramic prosthetic materials / L. L. Hench, R. J. Splinter, W. C. Allen, T. K. Greenlee // *J Biomed Mater Res Symp.* – 1971. – №334. – PP. 117–141.
86. Herford, A.S. Reconstruction of mandibular continuity defects with bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) / A.S. Herford, P.J. Boyne // *J Oral Maxillofac Surg.* – 2008. – №66(4). – PP. 616–624.
87. Hino, J. Bone morphogenetic protein-3 family members and their biological functions / J. Hino, K. Kangawa, H. Matsuo, et al // *Front Biosci.* – 2004. – №9. – PP. 1520–1529.
88. Hirata, M. Use of purified beta-tricalcium phosphate for filling defects after curettage of benign bone tumours / M. Hirata, H. Murata, H. Takeshita, T. Sakabe, Y. Tsuji, T. Kubo // *Int Orthop.* – 2006. – №30(6). – PP. 510–513.
89. Hogan, B. L. M. Bone morphogenetic proteins: multifunctional regulators of vertebrate development / B. L. M. Hogan // *Genes Dev.* – 1996. – №10. – PP. 1580-1594.
90. Hollinger, J. O. The critical size defect as an experimental model to test bone repair materials / J. O. Hollinger, J. C. Kleinschmidt // *J Craniofac Surg.* – 1990. – №1(1). – PP. 60–68.
91. Holmes, R. E. Porous hydroxyapatite as a bone-graft substitute in metaphyseal defects. A histometric study / R. E. Holmes, R. W. Bucholz, V. Mooney // *J Bone Joint Surg Am.* – 1986. – №68(6). – PP. 904–911.
92. Holmgren, A. Thioredoxin and glutaredoxin systems / A. Holmgren // *J Biol Chem.* – 1989. – №264. – PP. 13963–13966.
93. Hong, H. Ulnar radial nonunion fracture treated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a dog / Hong H. // *J Vet Clin (Seoul).* – 2001. – №18. – PP. 156–159.



94. Hwang, C. J. Evaluation of the efficacy of Escherichia coli-derived recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a mini-pig spinal anterior interbody fusion model / C. J. Hwang, J. H. Lee, H. R. Baek, B.S. Chang, C. K. Lee // *Bone Joint J.* – 2013. – №95-B(2). – PP. 217–223.
95. Hyun, S.J. Effect of recombinant human bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 on bone formation in rat calvarial defects / S. J. Hyun, D.K. Han, S.H. Choi, J.K. Chai, K.S. Cho, C.K. Kim, C.S. Kim // *J Periodontol.* – 2005. – №76(10). – PP. 1667–1674.
96. Innes, J. F. Demineralised bone matrix in veterinary orthopaedics: A review / J. F. Innes, P. Myint // *Vet Comp Orthop Traumatol.* – 2010. – №23. – PP. 393–399.
97. Israel, D.I. Expression and characterization of bone morphogenetic protein-2 in Chinese hamster ovary cells / D.I. Israel, J. Nove, K.M. Kerns, I.K. Moutsatsos, R.J. Kaufman // *Growth Factors.* – 1992. – №7(2). – PP.139–150.
98. Itoh, T. Femoral nonunion fracture treated with recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a dog / T. Itoh, M. Mochizuki, K. Fuda, et al // *J Vet Med Sci.* – 1998. – №60. – PP. 535–538.
99. Jarcho, M. Calcium phosphate ceramics as hard tissue prosthetics / M. Jarcho // *Clin Orthop Relat Res.* – 1981. – №157. – PP. 259–278.
100. Jones, C. B. Improved healing efficacy in canine ulnar segmental defects with increasing recombinant human bone morphogenetic protein-2/allograft ratios / C. B. Jones, C. T. Sabatino, J. M. Badura, D. L. Sietsema, J. S. Marotta // *J Orthop Trauma.* – 2008. – №22(8). – PP. 550–559.
101. Jones, J. R. Review of bioactive glass: From Hench to hybrids / J. R. Jones // *Acta Biomater.* – 2013. – №9(1). – PP. 4457–4486.
102. Kasai, Y. Mixture ratios of local bone to artificial bone in lumbar posterolateral fusion / Y. Kasai, K. Takegami, A. Uchida // *J. Spinal Disord. Tech.* – 2003. – №16, PP. 31–37.

103. Kasari, T. R. Use of autogenous cancellous bone graft for treatment of osteolytic defects in the phalanges of three cattle / T. R. Kasari, T. S. Taylor, A. N. Baird, E. L. Morris // *J Am Vet Med Assoc.* – 1992. – №201(7). – PP. 1053–1057.

104. Keller, S. Molecular recognition of BMP-2 and BMP receptor IA / S. Keller, J. Nickel, J. L. Zhang, W. Sebald, T. D. Mueller // *Nat Struct Mol Biol.* – 2004. – №11. – PP. 481–488.

105. Kim, I. S. Promising efficacy of Escherichia coli recombinant human bone morphogenetic protein-2 in collagen sponge for ectopic and orthotopic bone formation and comparison with mammalian cell recombinant human bone morphogenetic protein-2 / I. S. Kim, E. N. Lee, T. H. Cho, Y. M. Song, S. J. Hwang, J. H. Oh, E. K. Park, T. Y. Koo, Y. K. Seo // *Tissue Eng Part A.* – 2011. – №17(3-4). – PP. 337–348.

106. Kirker-Head, C. A. Use of bone morphogenetic proteins for augmentation of bone regeneration / C. A. Kirker-Head, R. J. Boudrieau, K. H. Kraus // *J Am Vet Med Assoc.* – 2007. – №231(7). – PP. 1039–1055.

107. Kirsch, T. Isolation of recombinant BMP receptor IA ectodomain and its 2:1 complex with BMP-2 / T. Kirsch, J. Nickel, W. Sebald // *FEBS Letters.* – 2000a, №468. – PP. 215–219.

108. Kirsch, T. BMP-2 antagonists emerge from alterations in the low-affinity binding epitope for receptor BMPR-II / T. Kirsch, J. Nickel, W. Sebald // *Embo J.* – 2000b. – №19. – PP. 3314–3324.

109. Kishigami, S. BMP signaling and early embryonic patterning / S. Kishigami, Y. Mishina // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2005. – 16(3). – PP. 265–278.

110. Kleman, G. L. Acetate metabolism by Escherichia coli in high-cell-density fermentation / G. L. Kleman, W. R. Strohl // *Appl Environ Microbiol.* – 1994. – №60 (11). – PP. 3952–3958.

111. Knight, P. G. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development / P.G. Knight, C. Glister // *Reproduction.* – 2006. – №132(2). – PP. 191–206.

112. Koh, B. T. Comparison of acetate inhibition on growth of host and recombinant *Escherichia coli* K12 strains / B. T. Koh, U. Nakashimada, M. Pfeiffer, , M.G.S. Yap // *Biotechnol. Lett.* – 1992. – №14. – PP. 1115—1118.
113. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 / U. K. Laemmli // *Nature.* – 1970. – №227. – P. 680–682.
114. Leader, B. Protein therapeutics: a summary and pharmacological classification / B. Leader, Q. J. Baca, D. E. Golan // *Nat Rev Drug Discov.* – 2008. – №7. – PP. 21–35.
115. Lee, G. H. Adverse reactions to OsteoSet bone graft substitute, the incidence in a consecutive series / G. H. Lee, J. G. Khoury, J. E. Bell, et al // *Iowa Orthop J.* – 2002. – №22. – PP. 35–38.
116. Lee, J. Comparative Study of Chinese Hamster Ovary-cell versus *Escherichia coli* Derived Bone Morphogenetic Protein-2 Using the Critical-size Supraalveolar Peri-Implant Defect Model / J. Lee, E. Lee, J. Yoon, S. M. Chung, H. Prasad, C. Susin, U. M. Wikesjö // *J Periodontol.* – 2013. – №84(3). – PP. 415–422.
117. Lee, S. Y. High cell-density culture of *Escherichia coli* / S. Y. Lee // *Trends Biotechnol.* – 1996. – №14 (3). – PP. 98–105.
118. LeGeros, R. Z. Biodegradation and bioresorption of calcium phosphate ceramics / R. Z. LeGeros // *Clin Mater.* – 1993. – №14(1). – №65-88.
119. Lewis, J. R. Mandibular reconstruction after gunshot trauma in a dog by use of recombinant human bone morphogenetic protein-2 / J. R. Lewis, R. J. Boudrieau, A. M. Reiter, H. J. Seeherman, R. S. Gilley // *J Am Vet Med Assoc.* – 2008. – №233(10). – PP. 1598–1604.
120. Lippold, B. S. The use of nonglycosylated recombinant human bone morphogenic protein 2 (rhBMP-2) released from a fibrin matrix to promote arthrodesis in an equine pastern joint / B. S. Lippold, H. G. Schmoekel, F. E. Weber, J. C. Schense, J. A. Hubbell, G. Ueltschi, W. Brehm // *Pferdeheilkunde* 20. – 2004. – №5. – PP. 442-446.

121. Long, S. Expression, purification, and renaturation of bone morphogenetic protein-2 from *Escherichia coli* / S. Long, L. Truong, K. Bennett, A. Phillips, F. Wong-Staal, H. Ma // *Protein Expr Purif.* – 2006. – №46(2). – PP. 374–348.
122. Luli, G. W. Comparison of growth, acetate production, and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations / G. W. Luli, W. R. Strohl // *Appl Environ Microbiol.* – 1990. – №56 (4). – PP. 1004–1011.
123. Luvizuto, E. R. Osteoconductive properties of  $\beta$ -tricalcium phosphate matrix, polylactic and polyglycolic acid gel, and calcium phosphate cement in bone defects / E. R. Luvizuto, T. P. Queiroz, R. Margonar, S. R. Panzarini, E. Hochuli-Vieira, T. Okamoto, R. Okamoto // *J Craniofac Surg.* – 2012. – №23(5). – e430–433.
124. Massagué, J. TGF-beta signal transduction / J. Massagué // *Annu Rev Biochem.* – 1998. – №67. – PP. 753–791.
125. Matsumine, A. Calcium hydroxyapatite ceramic implants in bone tumour surgery. A long-term follow-up study / A. Matsumine, A. Myoui, K. Kusuzaki, N. Araki, M. Seto, H. Yoshikawa, A. Uchida // *J Bone Joint Surg Br.* – 2004. – №86(5). – PP. 719–725.
126. Mauffrey, C. Bone graft substitutes for articular support and metaphyseal comminution: what are the options? / C. Mauffrey, D. Seligson, P. Lichte, H. C. Pape, M. Al-Rayyan // *Injury.* – 2011. – №42 Suppl 2. – S35–39.
127. McKay, W. F. A comprehensive clinical review of recombinant human bone morphogenetic protein-2 (INFUSE® Bone Graft) / W. F. McKay, S. M. Peckham, J. M. Badura // *Int Orthop.* – 2007. – №31(6). – PP. 729–734.
128. Mendenhall Associates Inc. Bone grafts and substitutes / *Ortho Net News.* – 2008. – №19(4). – PP.18–21.
129. Meretoja, V. V. Ectopic bone formation in and soft-tissue response to P(CL/DLLA)/bioactive glass composite scaffolds / V. V. Meretoja, T. Tirri, M. Malin, J. V. Seppälä, T. O. Närhi // *Clin Oral Implants Res.* – 2012. – PP. 1–7.
130. Mergulhao, F. J. M. Design of bacterial vector systems for the production of recombinant proteins in *Escherichia coli* / F. J. M. Mergulhao, G. A.

Monteiro, J. M. S. Cabral, M. A. Taipa // *J Microb Biotechnol.* – 2004. – №14. – PP. 1–14.

131. Mik, G. Results of a minimally invasive technique for treatment of unicameral bone cysts / G. Mik, A. Arkader, A. Manteghi, et al // *Clin Orthop Rel Res.* – 2009. – №467. – PP. 2949–2954.

132. Milovancev, M. Clinical application of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in 4 dogs / M. Milovancev, P. Muir, P.A. Manley, H.J. Seeherman, S. Schaefer // *Vet Surg.* – 2007. – №36(2). – PP. 132–140.

133. Missiakas, D. J. Protein folding in the bacterial periplasm / D. Missiakas, S. Raina // *Bacteriol.* – 1997. – №179(8). – PP. 2465–2471.

134. Miyazono, K. Divergence and convergence of TGF-beta/BMP signaling / K. Miyazono, K. Kusanagi, H. Inoue // *J Cell Physiol.* – 2001. – №187. – PP. 265–276.

135. Moro-Barrero, L. Radiographic analysis of fusion mass using fresh autologous bone marrow with ceramic composites as an alternative to autologous bone graft / L. Moro-Barrero, G. Acebal-Cortina, M. Suarez-Suarez, et al // *J. Spinal Disord. Tech.* – 2007. – №20(6). – PP. 409–415.

136. Mulon, P.-Y. Management of long bone fractures in cattle / P.-Y. Mulon // *In Practice 2013.* – №35. – PP. 265–271.

137. Myeroff, C. Autogenous bone graft: donor sites and techniques / C. Myeroff, M. J. Archdeacon // *Bone Joint Surg Am.* – 2011. – №93(23). – PP. 2227–2236.

138. Nandi, S. K. Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review/ S. K. Nandi, S. Roy, P. Mukherjee, B. Kundu, D. K. De, D. Basu // *Indian J Med Res.* – 2010. – №132. – PP. 15–30.

139. Nunamaker, D. M. On Bone and Fracture Treatment in the Horse / D. M. Nunamaker // *Proceedings of the Annual Convention of the AAEP.* – 2002. – №48. – PP. 153–162.

140. Ogose, A. Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors / A. Ogose, T. Hotta, H.

Kawashima, N. Kondo, W. Gu, T. Kamura, N. Endo // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* – 2005. – №72(1). – PP. 94–101.

141. Ong, K. L. Off-label use of bone morphogenetic proteins in the United States using administrative data / K. L. Ong, M. L. Villarraga, E. Lau, L. Y. Carreon, S. M. Kurtz, S. D. Glassman // *Spine (Phila Pa 1976).* –2010. – №35(19). – PP. 1794–1800.

142. Oonishi, H. Quantitative comparison of bone growth behavior in granules of Bioglass, A-W glass-ceramic, and hydroxyapatite / H. Oonishi, L. L. Hench, J. Wilson, F. Sugihara, E. Tsuji, M. Matsuura, et al // *J Biomed Mater Res.* – 2000. –№51. – PP. 37–46.

143. Oshaben, K. M. The native GCN4 leucine-zipper domain does not uniquely specify a dimeric oligomerization state / K. M. Oshaben, R. Salari, D. R. McCaslin, L. T. Chong, W. S. Horne // *Biochemistry.* – 2012. – №51(47). – PP. 9581–9591.

144. Ozkaynak, E. OP-1 cDNA encodes an osteogenic protein in the TGF-beta family / E Ozkaynak, DC Rueger, EA Drier, C Corbett, RJ Ridge, TK Sampath, H Oppermann // *EMBO J.* – 1990. – №9. – PP. 2085–2093.

145. Ozkaynak, E. Osteogenic protein-2: A new member of the transforming growth factor-beta superfamily expressed early in embryogenesis / E. Ozkaynak, P. N. J. Schnegelsberg, D. F. Jin, G. M. Clifford, F. D. Warren, E. A. Drier, H. Oppermann // *J. Biol. Chem.* – 1992. – №267. – PP. 25220–25227.

146. Paatsama, S. The use of bone morphogenetic proteins in delayed fracture healing, pseudoarthrosis and in ulna osteotomy carried out because of elbow joint diseases / S. Paatsama, S. Lindholm, J. Oksanen et al. // *Tierarztl Prax.* – 1996. – №24. – PP. 164–168.

147. Papanna, M. C. The use of bone morphogenetic protein-7 (OP-1) in the management of resistant non-unions in the upper and lower limb / M. C. Papanna, N. Al-Hadithy, B. V. Somanchi, M. D. Sewell, P. M. Robinson, S. A. Khan, R. A. Wilkes // *Injury.* – 2012. – №43(7). – PP. 1135–1140.

148. Park, J. C. Novel analysis model for implant osseointegration using ectopic bone formation via the recombinant human bone morphogenetic protein-2/macroporous biphasic calcium phosphate block system in rats: a proof-of-concept study / J. C. Park, J. B. Lee, G. Daculsi, S. Y. Oh, K. S. Cho, G. I. Im, B. S. Kim, C. S. Kim // *J Periodontal Implant Sci.* – 2012. – №42(4). – PP. 136–143.

149. Pautke, C. Characterization of eight different tetracyclines: advances in fluorescence bone labeling / C. Pautke, S. Vogt, K. Kreutzer, C. Haczek, G. Wexel, A. Kolk, A.B. Imhoff, H. Zitzelsberger, S. Milz, T. Tischer // *J Anat.* – 2010. – №217(1). – PP. 76–82.

150. Pearce, A. I. Animal models for implant biomaterial research in bone: a review / A. I. Pearce, R. G. Richards, S. Milz, E. Schneider, S. G. Pearce // *Eur Cell Mater.* – 2007. – №13. – PP. 1–10.

151. Pietrzak, W. S. Assay of bone morphogenetic protein-2, -4, and -7 in human demineralized bone matrix / W. S. Pietrzak, J. Woodell-May, N. McDonald // *J Craniofac Surg.* – 2006. – №17(1). – PP. 84–90.

152. Pinel, C. B. Clinical application of recombinant human bone morphogenetic protein in cats and dogs: a review of 13 cases / C. B. Pinel, G. E. Pluhar // *Can Vet J.* – 2012. – №53(7). – PP. 767–774.

153. Pizzoferrato, A. Cell culture methods for testing biocompatibility / A. Pizzoferrato, G. Ciapetti, S. Stea, E. Cenni, C. R. Arciola, D. Granchi, L. Savarino // *Clin Mater.* – 1994. – №15. – PP. 173–190.

154. Pluhar, G. E. A comparison of two biomaterial carriers for osteogenic protein-1 (BMP-7) in an ovine critical defect model / G. E. Pluhar, A. S. Turner, A. R. Pierce, C. A. Toth, D. L. Wheeler // *J Bone Joint Surg Br.* – 2006. – №88(7). – PP. 960-966.

155. Rader, R. A. Expression Systems for Process and Product Improvement BioProcess: A Perspective on Opportunities for Innovator and Follow-On Product Developers / Rader R. A. // *BioProcess Int.* – 2008. – №6. – PP. 4–8.

156. Rapp, S. J. Repairing critical-sized rat calvarial defects with progenitor cell-seeded acellular periosteum: a novel biomimetic scaffold / S. J. Rapp, D. C. Jones, P. Gerety, J. A. Taylor // *Surgery*. – 2012. – №152(4). – PP. 595–605.
157. Rigalli, A. Experimental surgical models in the laboratory rat / A. Rigalli, V. E. Di Loreto. – CRC Press. – 2009. – P.274.
158. Russel, T. A. Making sense of bone graft alternatives – calcium phosphate cements and calcium sulfates / AAOS annual meeting ICL, New Orleans, LA, March 9–13, 2010.
159. Sanfilippo, J. A. BMP-2 causes increased post-operative radiculitis following TLIF / J. A. Sanfilippo, L. J. Johnson, J. A. Rihn, T. J. Albert, A. S. Hilibrand // *J Spine*. – 2007. – №7. – P. 5S–6S.
160. Scheufler, C. Crystal structure of human bone morphogenetic protein-2 at 2.7Å resolution / C. Scheufler, W. Sebald, M. Hülsmeier // *Journal of Molecular Biology*. – 1999. – №287, Issue 1. – PP. 103–115.
161. Schmitz, J. P. The critical size defect as an experimental model for craniomandibulofacial nonunions / J. P. Schmitz, J. O. Hollinger // *Clin Orthop Relat Res*. – 1986. – №205. – PP. 299–308.
162. Shand, J. M. Repair of critical size defects in the rabbit calvarium with the use of a novel scaffold material / J. M. Shand, A. A. Heggie, J. Portnof // *Ann R Australas Coll Dent Surg*. – 2010. – №20. – PP. 71–74.
163. Shimasaki, S. The bone morphogenetic protein system in mammalian reproduction / S. Shimasaki, R. K. Moore, F. Otsuka, et al // *Endocr Rev*. – 2004. – №25. – PP. 72–101.
164. Simic, P. Bone morphogenetic proteins in development and homeostasis of kidney / P. Simic, S. Vukicevic // *Cytokine Growth Factor Rev*. – 2005. – №16. – PP. 299–308.
165. Simic, P. Bone morphogenetic proteins: from developmental signals to tissue regeneration / P. Simic, S. Vukicevic // *Conference on bone morphogenetic proteins EMBO Reports*. – 2007. – №8. – PP. 327–331.



166. Strocchi, R. Bone regeneration with calcium sulfate: evidence for increased angiogenesis in rabbits / R. Strocchi, G. Orsini, G. Iezzi, A. Scarano, C. Rubini, G. Pecora, A. Piattelli // *J Oral Implantol.* – 2002. – №28(6). – PP. 273–278.

167. Sykaras, N. Bone morphogenetic proteins (BMPs): how do they function and what can they offer the clinician? / N. Sykaras, L. A. Opperman // *Journal of Oral Science.* – №45. – 2003. – PP. 57-73.

168. Talmadge, K. Cellular location affects protein stability in *Escherichia coli* / K. Talmadge, W. Gilbert // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1982. – №79. – PP. 1830–1833.

169. Tanuma, Y. Comparison of bone regeneration between octacalcium phosphate/collagen composite and  $\beta$ -tricalcium phosphate in canine calvarial defect / Y. Tanuma, K. Matsui, T. Kawai, A. Matsui, O. Suzuki, S. Kamakura, S. Echigo // *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* – 2013. – №115(1). – PP. 9–17.

170. ten Dijke, P. Identification of type I receptors for osteogenic protein-1 and bone morphogenetic protein-4 / P. ten Dijke, H. Yamashita, T. K. Sampath, A. H. Reddi, M. Estevez, D. L. Riddle, H. Ichijo, C. H. Heldin, K. Miyazono // *J Biol Chem.* – 1994. – №269. – PP. 16985–16988.

171. Tomme, P. Characterization and affinity applications of cellulose-binding domains / P. Tomme, A. Boraston, B. McLean, J. Kormos, A. L. Creagh, K. Sturch, N. R. Gilkes, C. A. Haynes, R. A. Warren, D. G. Kilburn // *J Chromatogr B Biomed Sci Appl.* – 1998. – №715. – PP. 283–296.

172. Tsou I. Y. Y. The Bone and Joint Decade 2000-2010: For Prevention and Treatment of Musculoskeletal Disease / I. Y. Y. Tsou, H. H. Chng // *Ann Acad Med Singapore.* – 2002. – №31. – PP. 69–70.

173. Tsumaki N. The role of bone morphogenetic proteins in endochondral bone formation / N. Tsumaki, H. Yoshikawa // *Cytokine Growth Factor Rev.* – 2005. – 16(3). – PP. 279–285.

174. Urist, M. R. Bone morphogenetic protein / M. R. Urist, B. S. Strates // *J Dent Res.* – 1971. – №50(6). – PP. 1392–1406.

175. Urist, M. R. Bone: Formation by autoinduction / M. R. Urist // *Science*. – 1965. – №150 (3698). – PP. 893–899.

176. Urist, M.R. Human bone morphogenetic protein (hBMP) / M. R. Urist, K. Sato, A. G. Brownell, et al // *Proc Soc Exp Biol Med*. – 1983. – №173. – PP. 194–199.

177. Urist, M.R. Solubilized and insolubilized bone morphogenetic protein / M.R. Urist, A. Mikulski, A. Lietze // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 1979. – №76. – PP. 1828–1832.

178. Vaccaro, A. R. Comparison of OP-1 Putty (rhBMP-7) to iliac crest autograft for posterolateral lumbar arthrodesis: a minimum 2-year follow-up pilot study / A. R. Vaccaro, D. G. Anderson, T. Patel, J. Fischgrund, E. Truumees, H. N. Herkowitz, F. Phillips, A. Hilibrand, T. J. Albert, T. Wetzel, J. A. McCulloch // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2005. – №30(24). – PP. 2709–2716.

179. Van Gaalen, S. M. Use of fluorochrome labels in in vivo bone tissue engineering research / S. M. van Gaalen, M. C. Kruyt, R. E. Geuze, J. D. de Bruijn, J. Alblas, W. J. Dhert // *Tissue Eng Part B*. – 2010. – №16(2). – PP. 209–217.

180. Van Houwelingen, A. Treatment of osteopenic humeral shaft nonunion with compression plating, humeral cortical allograft struts and bone grafting / A. Van Houwelingen, M. D. McKee // *J Orthop Trauma*. – 2005. – №19. – PP. 36–41.

181. Velikodvorskaya, G. A. Chimeric lactase capable of spontaneous and strong immobilization on cellulose and development of a continuous-flow system for lactose hydrolysis at high temperatures / G. A. Velikodvorskaya, T. V. Tikhonova, I. D. Gurvits, A. S. Karyagina, N. V. Lavrova, O. V. Sergienko, V. N. Tashlitskii, N. A. Lunina, V. G. Lunin // *Appl Environ Microbiol*. – 2010. – №76(24). – PP. 8071–8075.

182. Verdonschot, N. Time-dependent mechanical properties of HA/TCP particles in relation to morsellized bone grafts for use in impaction grafting / N. Verdonschot, C. T. van Hal, B. W. Schreurs, P. Buma, R. Huiskes, T. J. Slooff // *J Biomed Mater Res*. – 2001. – №58(5). – PP. 599–604.

183. Vertenten, G. Enhancing bone healing and regeneration: present and future perspectives in veterinary orthopaedics / G. Vertenten, F. Gasthuys, M. Cornelissen, E. Schacht, L. Vlamincx // *Vet Comp Orthop Traumatol.* – 2010. – №23(3). – PP. 153–162.
184. Wang, E.A. Purification and characterization of other distinct bone-inducing factors / E.A. Wang, V. Rosen, P. Cordes et al // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1988. – №85. – PP. 9484–9488.
185. Wang, E.A. Recombinant human bone morphogenetic protein induces bone formation / E.A. Wang, V. Rosen, J.S. D'Alessandro, M. Bauduy, P. Cordes, T. Harada, D.I. Israel, R.M. Hewick, K.M. Kerns, P. LaPan, et al // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1990. – №87. – PP. 2220–2224.
186. Wang, J. C. A comparison of commercially available demineralized bone matrix for spinal fusion / J. C. Wang, A. Alanay, D. Mark, L. E. Kanim, P. A. Campbell, E. G. Dawson, J. R. Lieberman // *Eur Spine J.* – 2007. – №16(8). – PP. 1233–1240.
187. White, P.M. Neural crest stem cells undergo cell-intrinsic developmental changes in sensitivity to instructive differentiation signals / P.M. White, S.J. Morrison, K. Orimoto et al // *Neuron.* – 2001. – 29(1) – PP. 57–71.
188. Williams, R. J. P. The symbiosis of metal and protein functions / R. J. P. Williams // *European Journal of Biochemistry.* – 1985. – №150. – PP. 231–248.
189. Wilson-Hench, J. Osteoinduction / J. Wilson-Hench – In: «Progress in Biomedical Engineering: Definitions in Biomaterials» – 1987. – P. 29.
190. Wozney, J. M. Growth factors influencing bone development / J. M. Wozney, V. Rosen, M. Byrne, A. J. Celeste, I. Moutsatsos, E. A. Wang // *J. of Cell. Science Supplement.* – 1990. – №13. – PP. 149–156.
191. Wozney, J. M. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair / J.M. Wozney, V. Rosen // *Clin Orthop Relat Res.* – 1998. – №346. – PP. 26–37.

192. Wozney, J. M. Novel regulators of bone formation: Molecular clones and activities / J.M. Wozney, V. Rosen, A.J. Celeste et al // *Science*. – 1988. – №242(4885), – PP. 1528–1534.

193. Yamamoto, Y. Regulation of bone morphogenetic proteins in early embryonic development / Y. Yamamoto, M. Oelgeschlager // *Naturwissenschaften*. – 2004. – №91. – PP. 519–534.

194. Yamashita, H. Bone Morphogenetic Protein Receptors / H. Yamashita, P. Ten Dijke, C. Heldin, K. Miyazono // *Bone*. – 1996. – №19. – PP. 569–574.

195. Yang, Z. Osteogenesis in extraskeletally implanted porous calcium phosphate ceramics: Variability among different kinds of animals / Z. Yang, H. Yuan, W. Tong, P. Zou, W. Chen, X. Zhang // *Biomaterials*. – 1996. – №17. – PP. 2131–2137.

196. Yu, Y. Y. Creating rigidly stabilized fractures for assessing intramembranous ossification, distraction osteogenesis, or healing of critical sized defects / Y. Y. Yu, C. Bahney, D. Hu, R. S. Marcucio, T. Miclau III // *J Vis Exp*. – 2012. – №62. – P. 3552.

197. Zapun, A. Structural and Functional Characterization of DsbC, a Protein Involved in Disulfide Bond Formation in *Escherichia coli* / A. Zapun, D. Missiakas, S. Raina, T. E. Creighton // *Biochemistry*. – 1995. – №34(15). – PP. 5075–5089.

198. Zhao, G. Q. The gene encoding bone morphogenetic protein 8B is required for the initiation and maintenance of spermatogenesis in the mouse / G.Q. Zhao, K. Deng, P.A. Labosky // *Genes Dev*. – 1996. – №10(13). – PP. 1657–1669.

199. Zhou, A. J. Enhancing production of recombinant BMP-2 in mammalian cell culture systems by inhibition of pro-protein cleavage using 9DR peptides: a thesis for the degree of Master of Science / A. J. Zhou. – Toronto, 2008. – PP. 232.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

(обязательное)

### Список иллюстративного материала

- Рисунок 1. Классификация членов семейства BMP по сходству аминокислотных последовательностей. Адаптировано из работы Urist, 1965.....с.13
- Рисунок 2. Общая схема процессинга BMP-2. ЭР – эндоплазматический ретикулум, АГ – аппарат Гольджи. Адаптировано из работы Zhou, 2008.....с.14
- Рисунок 3. Схематическое изображение «цистеинового узла». Римскими цифрами обозначены остатки цистеина, вертикальными линиями – дисульфидные связи, стрелками –  $\beta$ -тяжи, буквами – С- и N-концевые участки. Адаптировано из работы Zhou, 2008.....с.15
- Рисунок 4. 3D-структура молекулы BMP-2 человека.  $\alpha$ -спирали представлены спиралями,  $\beta$ -тяжи – стрелками, S-S связи – зелеными мостиками. Синим и оранжевым цветами показаны мономеры BMP-2 (по Scheufler et al., 1999). .....с.15
- Рисунок 5. Схема сигнального пути BMPs. Адаптировано из работы Yamashita et al., 1996.....с.16
- Рисунок 6. Архитектура взаимодействия BMP-2 и BMPRIA. Молекула BMP-2 показана синим и желтым цветами, BMPRIA – зеленым. Адаптировано из работы Keller et al., 2004.....с.24
- Таблица 1 – Некоторые коммерчески доступные заместители костной ткани на основе различных компонентов.....с.35
- Рисунок 7. Фотографии образцов различных фракций крошки из ДКМ разного диаметра. А – 40-125 мкм, Б – 125-250 мкм, В – 250-500 мкм, Г – 500-1000 мкм, Д – 1-2 мм.....с.54
- Рисунок 8. Фракция ДКМ размером <125 мкм, используемая для приготовления образцов остеопластических материалов для малоинвазивного

применения: А. Макрофотограмма образца в чашке Петри; Б. Фото образца, полученное с помощью сканирующей электронной микроскопии, X25.....с.55

Рисунок 9. Образцы остеопластических материалов в виде блоков различной формы (слева направо): призматической, параллелепipedной, кубической.....с.56

Рисунок 10. Изображение имплантированных образцов крошки ДКМ (А) и ДКМ + rhBMP-2 (Б) через 45 дней после имплантации.....с.59

Рисунок 11. Гистологический препарат образца опытной группы. Видны трабекулы новообразованной костной ткани (четырёхугольная звездочка), окруженные соединительнотканными волокнами (пятиугольная звездочка), окраска гематоксилином и эозином. Окр. гематоксилином и эозином, X40...с.60

Рисунок 12. Гистологические препараты контрольной (А) и опытной групп (Б). Видны трабекулы костной ткани (звездочка) с компактизацией костного матрикса. Окр. гематоксилином и эозином, X40.....с.60

Рисунок 13. Сравнение гистоморфологических показателей качества новообразованной костной ткани в опытной и контрольной группах.....с.61

Рисунок 14. Рентгенограмма задних конечностей животных в прямой (проекция 1) и боковой (проекция 2) проекциях .....с.63

Рисунок 15. Гистологические срезы костной ткани, образованной в титановых имплантатах через 4 недели после имплантации: А – отрицательный контроль; Б – титановая матрица насыщена клетками костного мозга; В – титановая матрица насыщена ДКМ без rhBMP-2; Г – титановая матрица насыщена ДКМ с  $33,5 \pm 2,5$  мкг rhBMP-2; Д – титановая матрица насыщена ДКМ с  $65,5 \pm 2,5$  мкг rhBMP-2; Е – титановая матрица насыщена ДКМ с  $162,5 \pm 30,5$  мкг rhBMP-2. Белая звездочка – трабекулярная костная ткань. Окр. гематоксилином и эозином, X40.....с.64

Рисунок 16. Площадь зрелой новообразованной костной ткани в разных экспериментальных группах. 1 – отрицательный контроль; 2 – титановая матрица насыщена клетками костного мозга; 3 – титановая матрица насыщена ДКМ без rhBMP-2; 4 – титановая матрица насыщена ДКМ с  $33,5 \pm 2,5$  мкг

rhBMP-2; 5 – титановая матрица насыщена ДКМ с  $65,5 \pm 2,5$  мкг rhBMP-2; 6 – титановая матрица насыщена ДКМ с  $162,5 \pm 30,5$  мкг rhBMP-2.....с.66

Рисунок 17. Изображение дефекта критического размера в теменных костях черепа, стрелкой отмечен венозный синус.....с.68

Таблица 2 – Распределение животных по группам в эксперименте.....с.69

Рисунок 18. Фрагмент свода черепа крысы контрольной группы животных с дефектом, не заполненным остеопластическим материалом. Представлены макрофотограмма (А), рентгенограмма (Б), микрокомпьютерная томограмма (В), изображение лежит в горизонтальной плоскости.....с.71

Таблица 3 – Суммарная эффективность процесса регенерации.....с.71

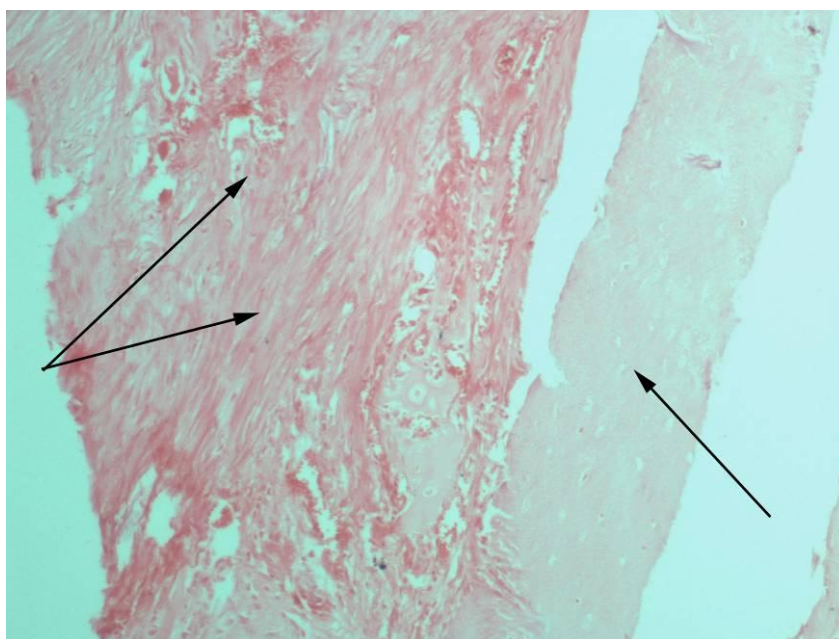


Рисунок 19. Фрагмент соединительнотканного регенерата в зоне дефекта в группе 1. Одинарная стрелка – часть трабекулы материнской кости, угловая стрелка – грубоволокнистая соединительная ткань. Окр. гематоксилином и эозином, X10.

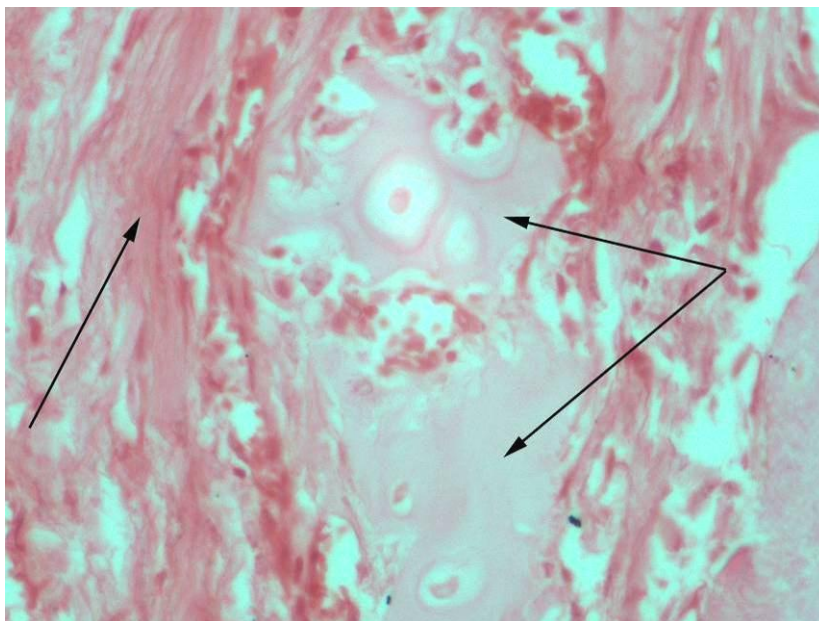


Рисунок 20. Фрагмент регенерата в зоне дефекта в группе 1. Угловая стрелка – участок хрящевой ткани, окруженный волокнами грубой волокнистой соединительной ткани (одинарная стрелка). Окр. гематоксилином и эозином, Х40.

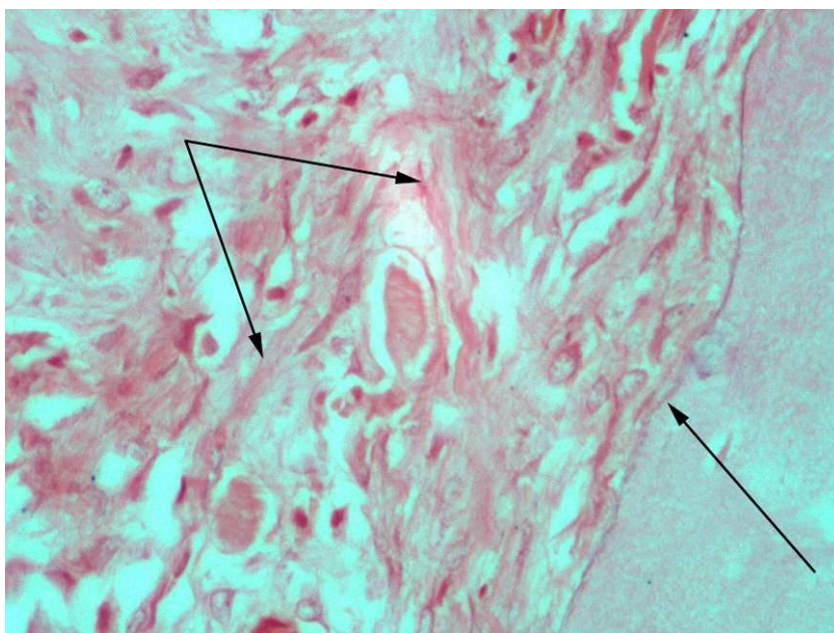


Рисунок 21. Соединительные ткани регенерационной зоны в группе 1. Угловая стрелка – грубоволокнистая соединительная ткань, ограниченная от материнской кости плотной волокнистой соединительной тканью (одинарная стрелка). Окр. гематоксилином и эозином, Х40.



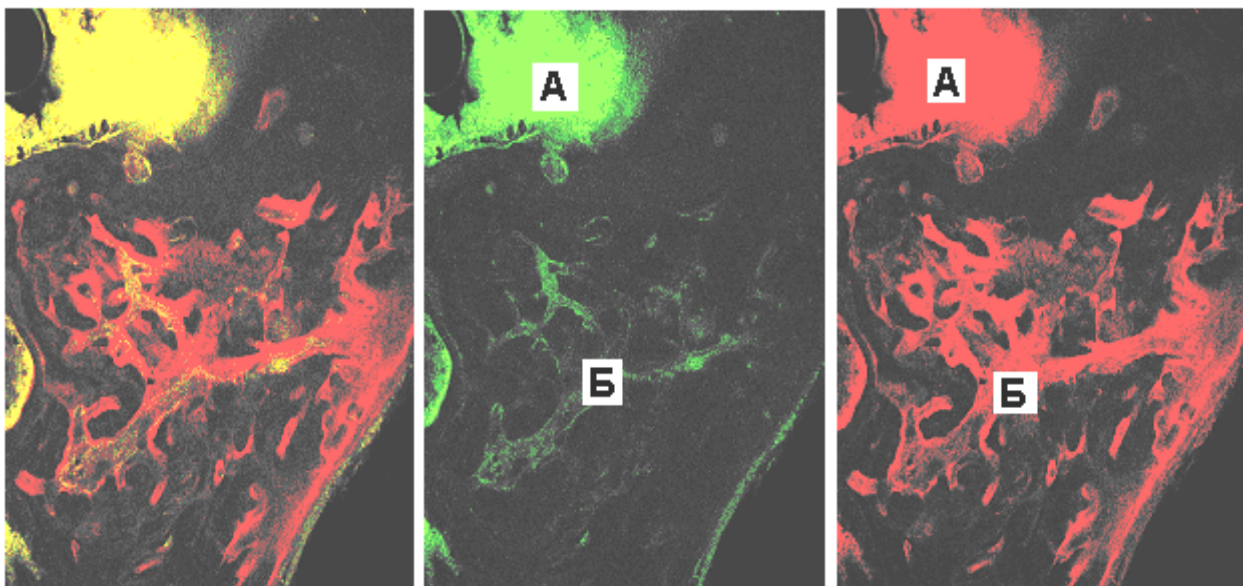


Рисунок 22. Флуоресценция костной ткани области дефекта в группе 1: материнская кость – А и новообразованная костная ткань – Б. Слева направо: совмещенное изображение двух каналов (зеленого и красного), зеленая флуоресценция – тетрациклин, красная флуоресценция – ализариновый красный S; X150.

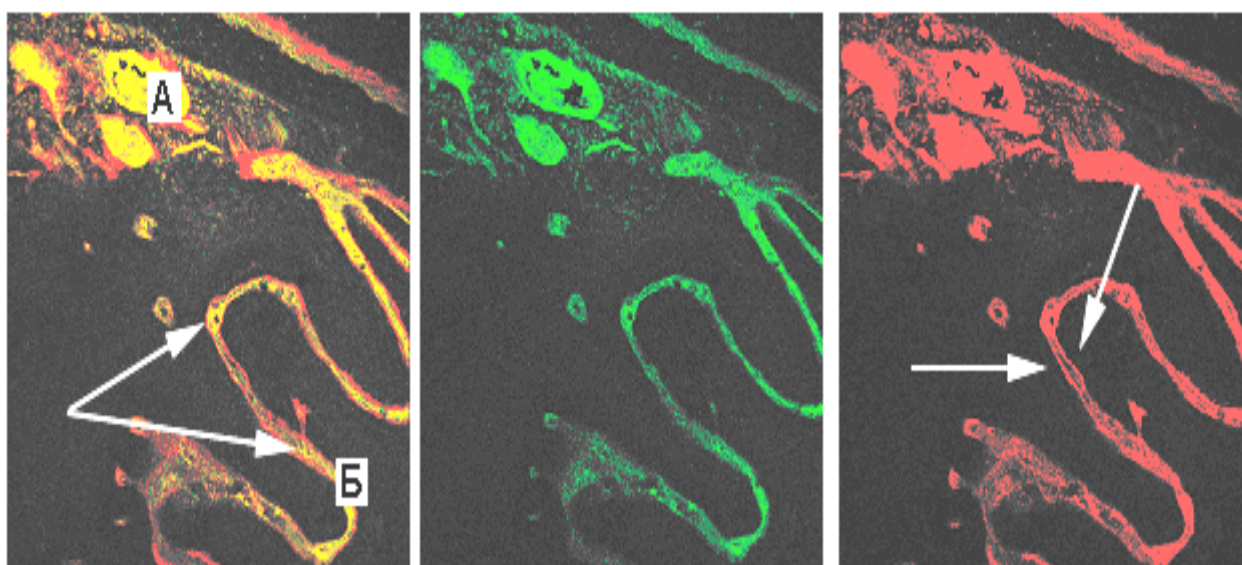


Рисунок 23. Флуоресценция костной ткани области дефекта в группе 1: материнская кость (А) и новообразованная костная ткань (Б). Слева направо: совмещенное изображение двух каналов (зеленого и красного), зеленая флуоресценция – тетрациклин, красная флуоресценция – ализариновый красный S. Угловые стрелки – накопление тетрациклина в трабекуле кости,

одинарные стрелки – участки аппозиции в зоне связывания ализаринового красного S; X150.

Таблица 4 – Показатели регенерации в зоне дефекта в контрольной группе..... с.72-73

Рисунок 24. Фрагмент свода черепа крысы опытной группы животных с дефектом, заполненным мембраной из ДКМ без rhBMP-2. Представлены макрофотограмма (А), рентгенограмма (Б), микрокомпьютерная томограмма (В), изображение лежит в горизонтальной плоскости.....с.74

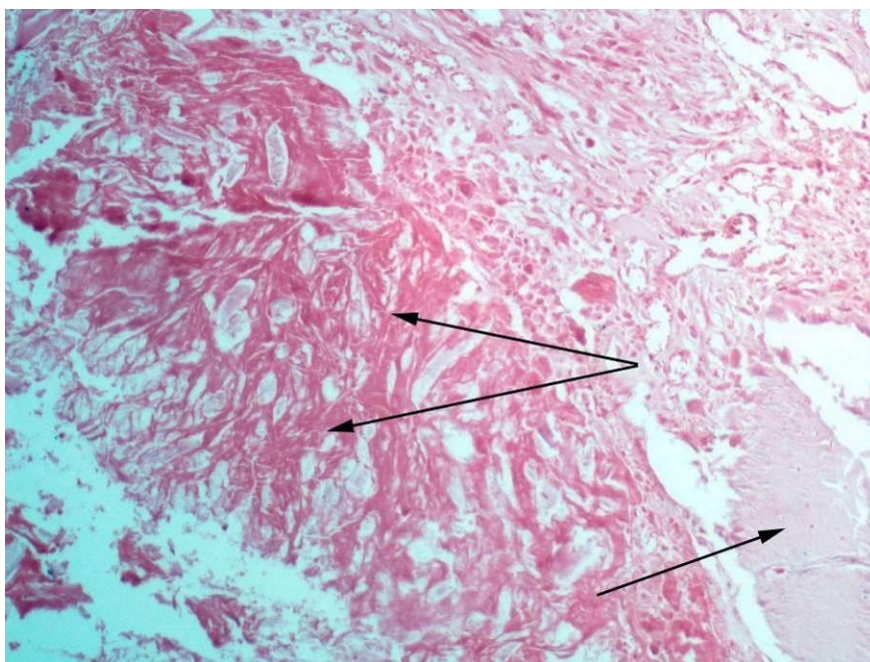


Рисунок 25. Область дефекта в группе 2. Угловая стрелка – фрагменты ДКМ, простая стрелка – фрагмент материнской кости. Окр. гематоксилином и эозином, X10.

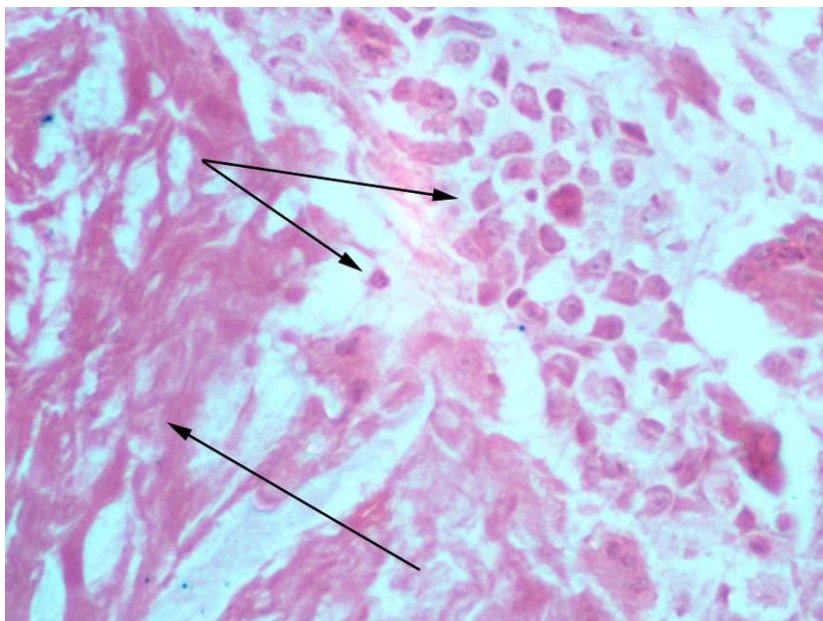


Рисунок 26. Участок мембраны в группе 2, непосредственно контактирующий с новообразованными соединительнотканными и клеточными элементами. Угловая стрелка – остеогенные клетки-предшественники, одинарная стрелка – волокна мембраны. Окр. гематоксилином и эозином, X40

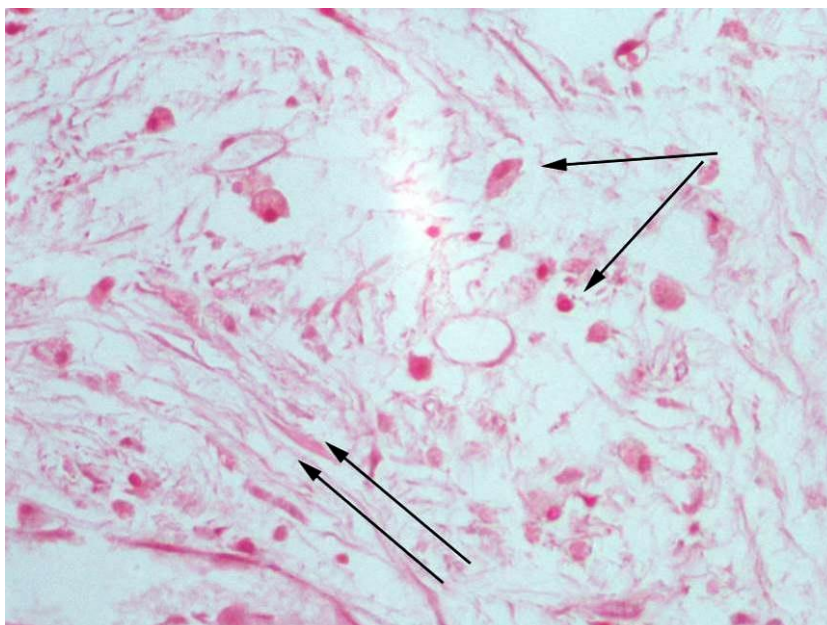


Рисунок 27. Угловая стрелка – остеогенные клетки предшественники и лейкоциты в просветах между волокнами мембраны в группе 2, двойная стрелка – соединительнотканные волокна. Окр. гематоксилином и эозином, X40.

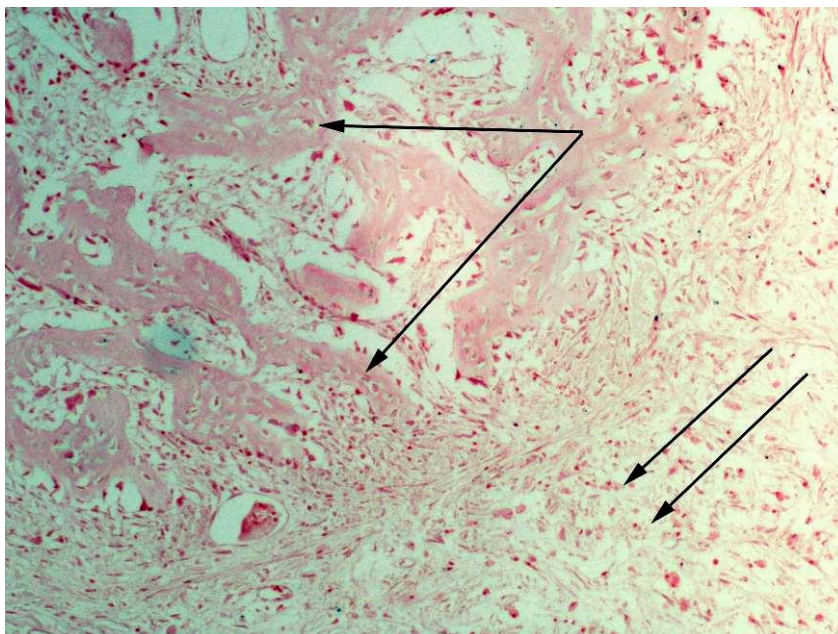


Рисунок 28. Фрагмент участка края мембраны в группе 2, замещающийся волокнами рыхлой соединительной ткани (двойная стрелка) и новообразованными костными трабекулами (угловая стрелка). Окр. гематоксилином и эозином, X20.

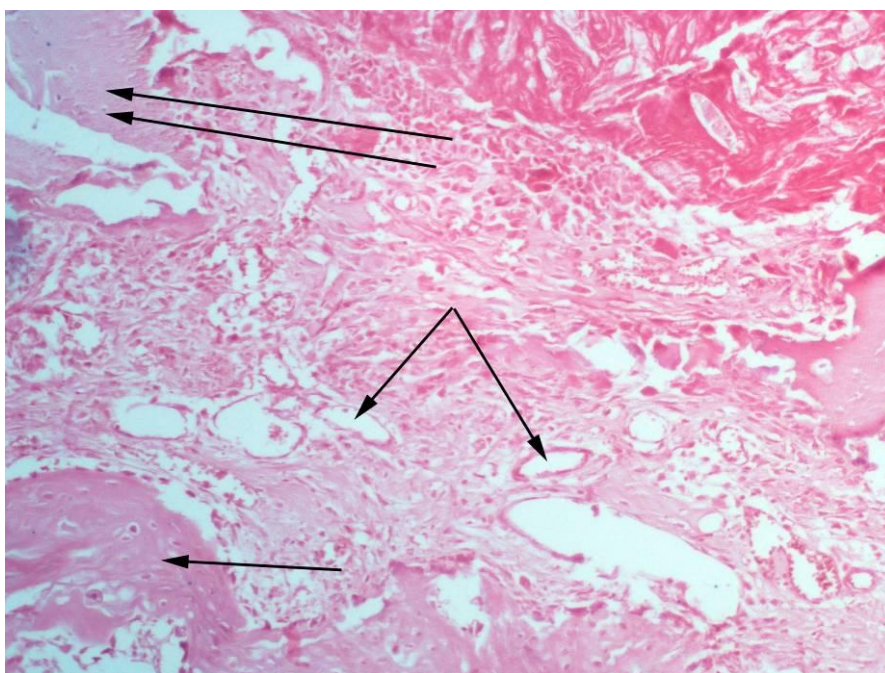


Рисунок 29. Фрагмент участка края мембраны в группе 2, окруженной новообразованной костной тканью. Двойная стрелка – материнская кость, угловая стрелка – кровеносные сосуды, простая стрелка – трабекулы костной ткани. Окр. гематоксилином и эозином, X20.

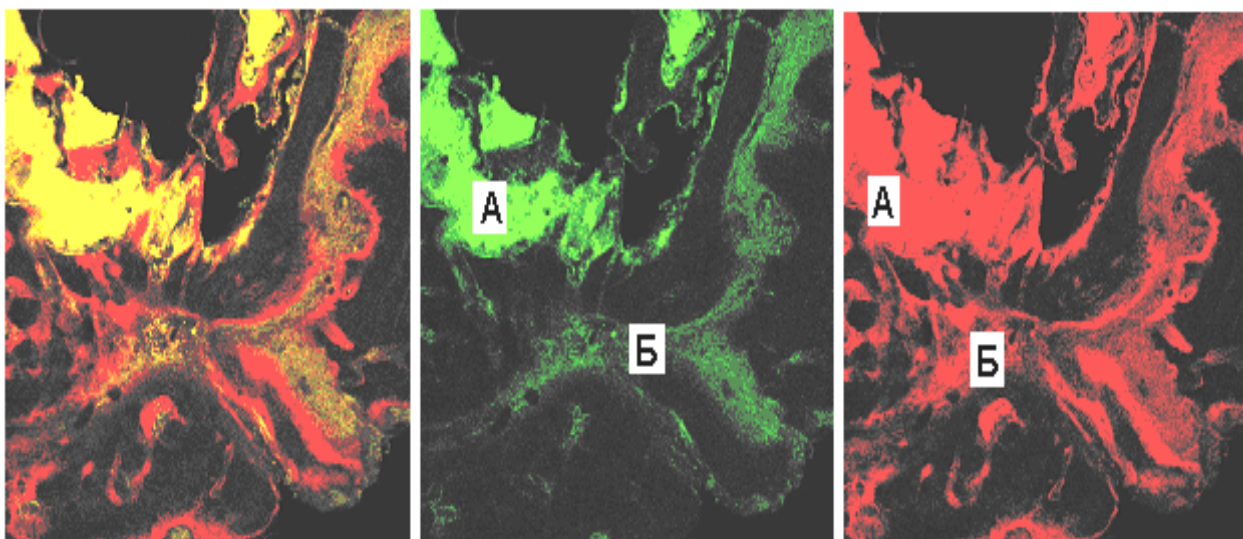


Рисунок 30. Флуоресценция костной ткани области дефекта в группе 2: материнская кость (А), новообразованная костная ткань (Б). Слева направо: совмещенное изображение двух каналов (зеленого и красного), зеленая флуоресценция – тетрациклин, красная флуоресценция – ализариновый красный S; X150.

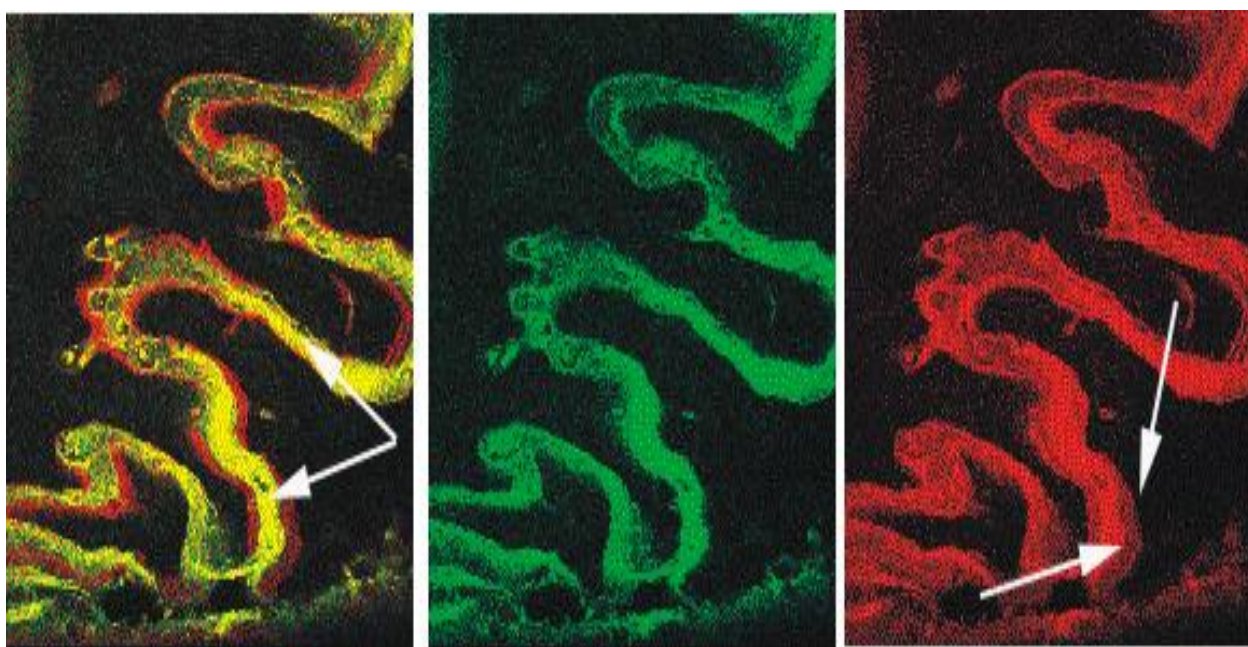


Рисунок 31. Флуоресценция трабекул костной ткани области дефекта в группе 2. Слева направо: совмещенное изображение двух каналов (зеленого и красного), зеленая флуоресценция – тетрациклин, красная флуоресценция – ализариновый красный S. Угловая стрелка – накопление тетрациклина в

трабекуле кости, одинарные стрелки – участки аппозиции в локусе связывания ализаринового красного S; X150.

Таблица 5 – Показатели регенерации в зоне дефекта в группе 2.....с.75

Рисунок 32. Фрагмент свода черепа крысы опытной группы животных с дефектом, заполненным мембраной из ДКМ с rhBMP-2. Представлены макрофотограмма (А), рентгенограмма (Б), микрокомпьютерная томограмма (В), изображение лежит в горизонтальной плоскости.....с.76

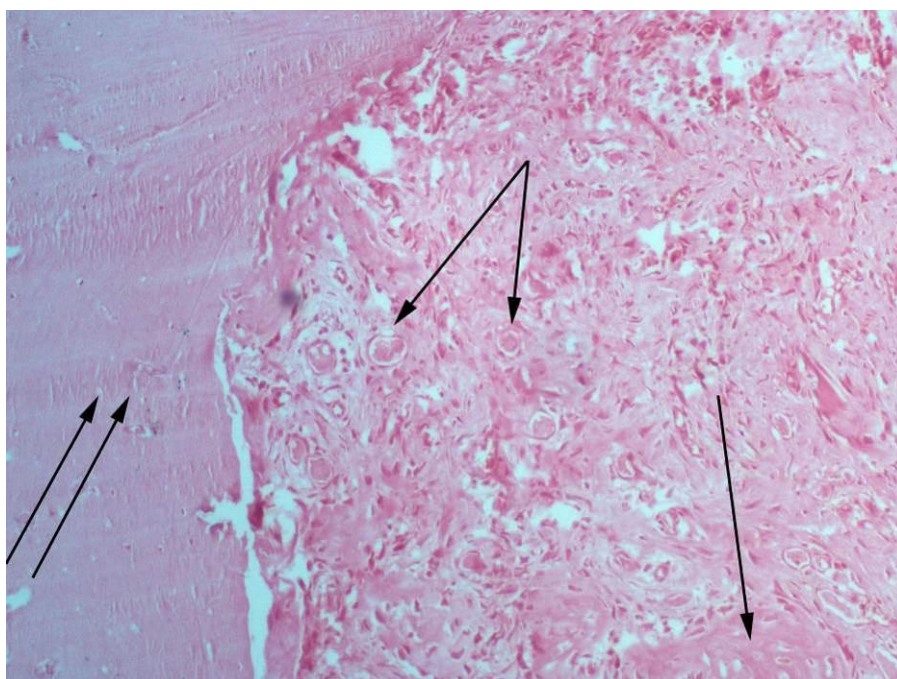


Рисунок 33. Фрагмент участка края мембраны в группе 3, замещающийся ретикулофиброзной костной тканью. Двойная стрелка – материнская кость, угловая стрелка – депозиты материала, простая одинарная стрелка – новообразованная трабекулярная кость. Окр. гематоксилином и эозином, X10.

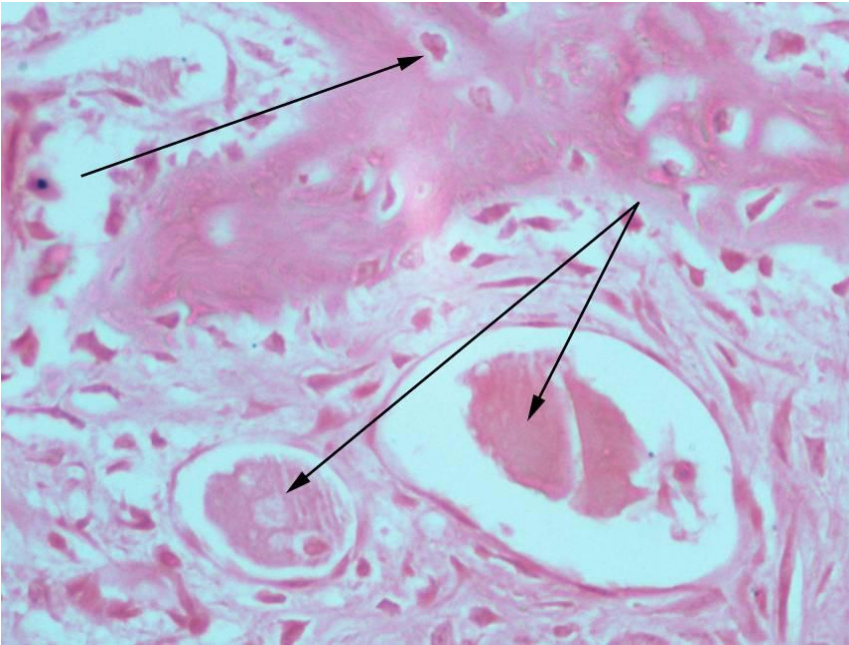


Рисунок 34. Фрагмент мембраны в группе 3. Угловая стрелка – остатки компонентов мембраны, окруженные новообразованной трабекулярной костной тканью с фиброзным матриксом, одинарная стрелка – остеоцит. Окр. гематоксилином и эозином, X40.

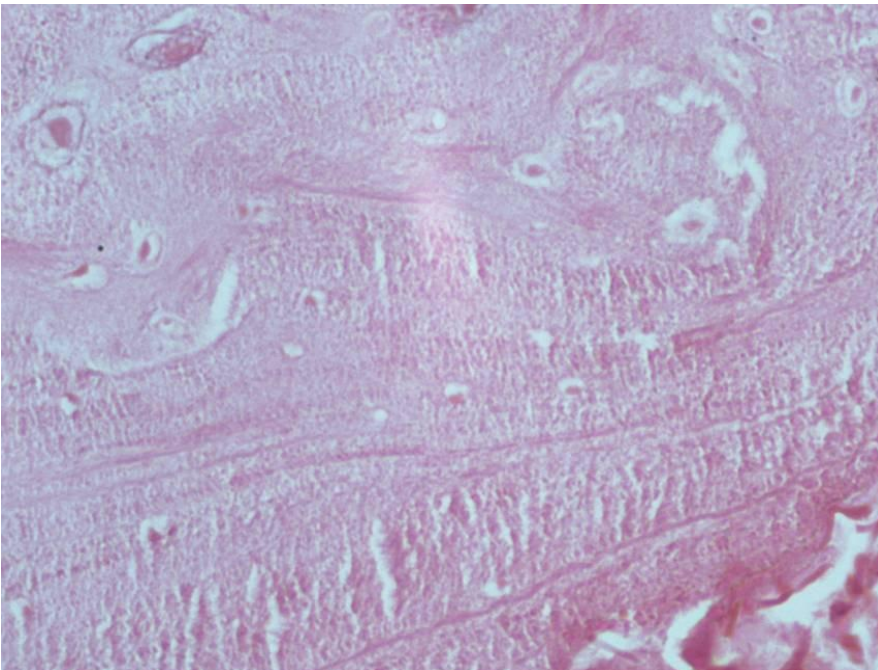


Рисунок 35. Фрагмент материнской кости в группе 3 с сохранившимися остеоцитами в лакунах. Окр. гематоксилином и эозином, X40.

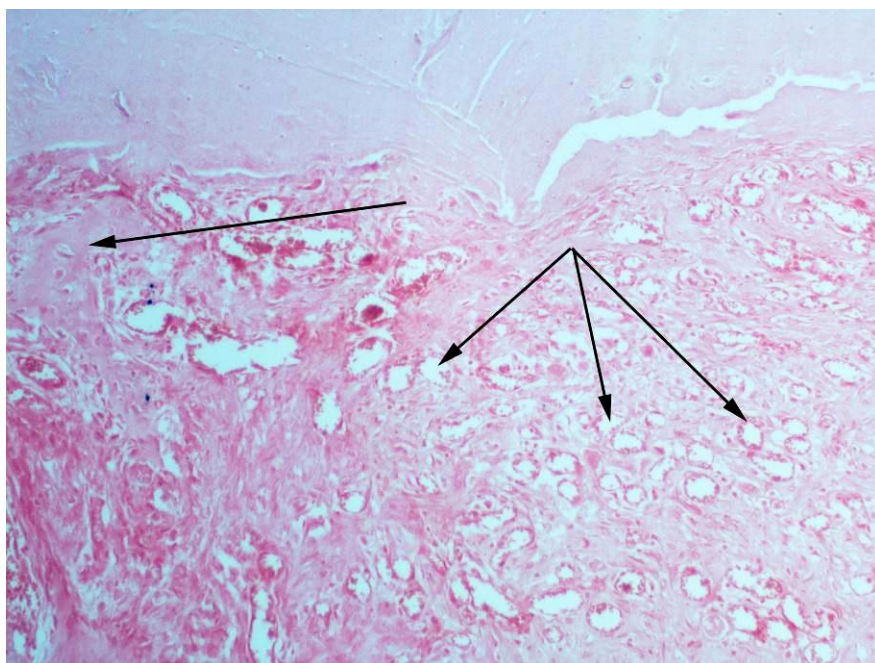


Рисунок 36. Фрагмент соединительнотканного регенерата зоны дефекта в группе 3. Тройная стрелка – кровеносные капилляры, одинарная стрелка – ретикулофиброзная костная ткань. Окр. гематоксилином и эозином, X10.

Таблица 6 – Показатели регенерации в зоне дефекта в группе 3.....с.77

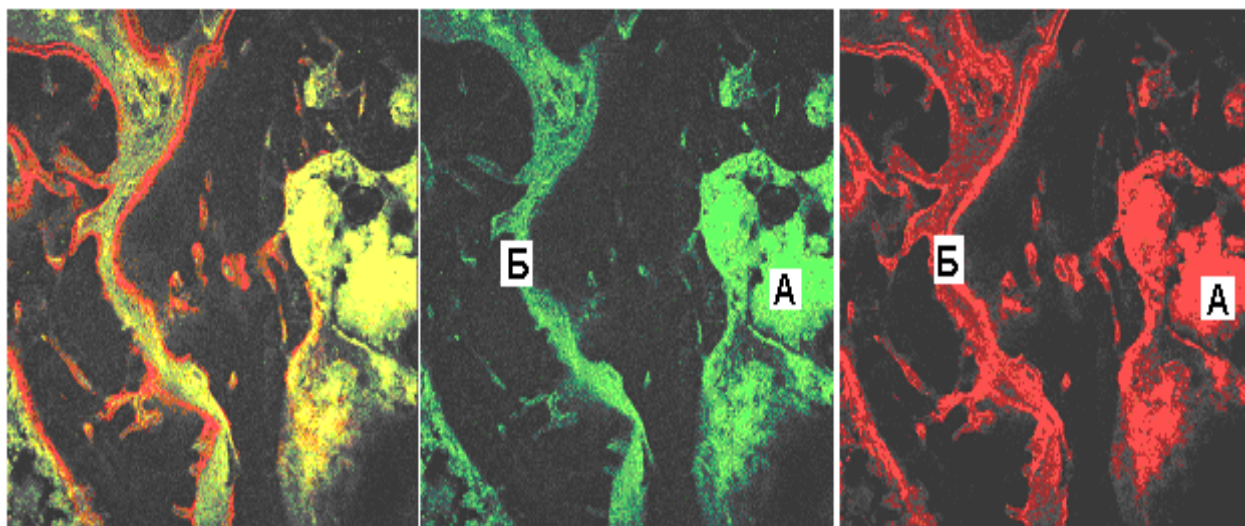


Рисунок 37. Флуоресценция костной ткани области дефекта: материнская кость – А и новообразованная костная ткань – Б. Слева направо: совмещенное изображение двух каналов (зеленого и красного), зеленая флуоресценция – тетрациклин, красная флуоресценция – ализариновый красный S; X150.



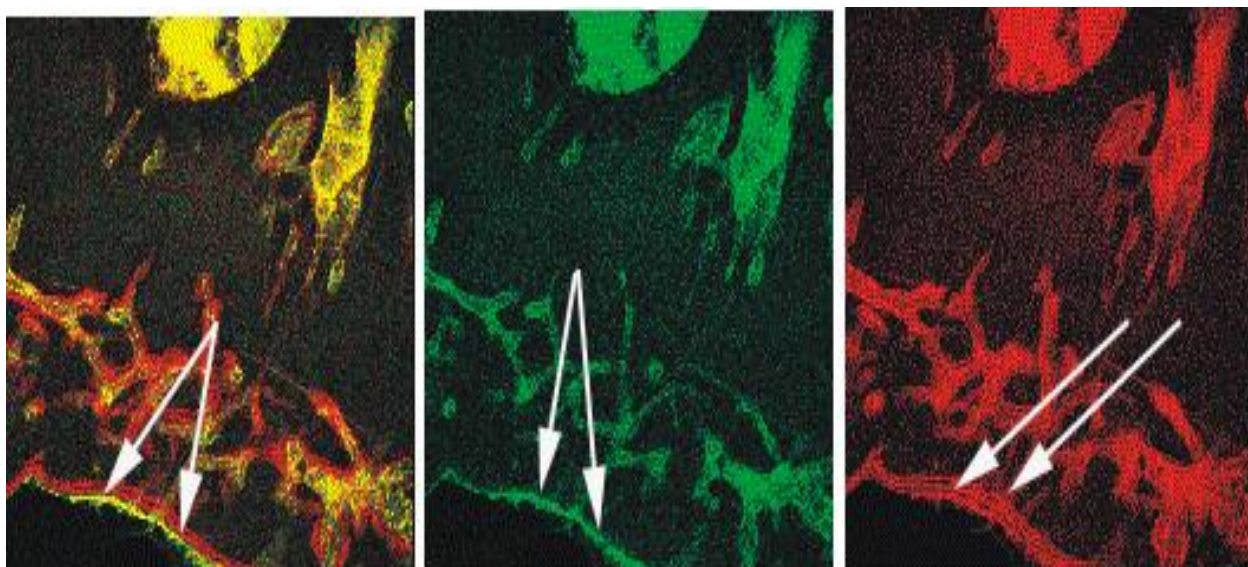


Рисунок 38. Флуоресценция трабекул костной ткани области дефекта. Слева направо: совмещенное изображение двух каналов (зеленого и красного), зеленая флуоресценция – тетрациклин, красная флуоресценция – ализариновый красный S. Стрелки углом демонстрируют накопление тетрациклина в трабекуле кости, одинарные стрелки показывают метки ализаринового красного S – участка аппозиции; X150.

Таблица 7 – Количественные показатели остеоиндуктивности материалов, имплантированных в дефекты свода черепа критического размера .....с.78

Рисунок 39. Показатели регенерации в зоне дефекта критического размера в опытных и контрольной группе. TV – объем всех тканей в области интереса; BV – объем костной ткани в области интереса; \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ . .....с.78

Рисунок 40. Показатели регенерации в зоне дефекта критического размера в опытных и контрольной группе. TS – площадь всех тканей в области интереса; BS – площадь костной ткани в области интереса; \* –  $p < 0,05$ ; \*\* –  $p < 0,01$ . .....с.79

Рисунок 41. Схема плазмиды pBMPRIA-CBD.....с.82

Таблица 8 – Конечные параметры процесса культивирования штамма *E. coli* M15 в колбах на средах с различным составом.....с.86

Таблица 9 – Накопление биомассы штаммом-продуцентом *E. coli* M15 в зависимости от объема среды в колбе.....с.88

Рисунок 42. Изменение показателей в процессе культивирования с подпиткой глюкозой.....с.89

Рисунок 43. Окрашенный Кумасси R250 полиакриламидный гель после электрофореза по Лэммли белков биомассы продуцента BMPRIA-CBD, растворенных в буфере для лизиса клеток. Дорожки: 1 – маркеры молекулярного веса; 2 – препарат белков биомассы через 2 часа после индукции синтеза белка в ферментере.....с.90

Рисунок 44. Электрофореграмма rhBMP-2 до и после рефолдинга: 1 – маркер молекулярной массы; 2, 3 – препараты до рефолдинга; 4, 5 – препараты после рефолдинга.....с.93

Рисунок 45. Электрофореграмма анализа собранных фракций белка rhBMP-2 методом электрофореза в ПААГ в неденатурирующих условиях по Лэммли: 1 – препарат rhBMP-2 до очистки; 2 – рекомбинантный химерный белок BMPRIA-CBD; 3 – сорбированный белок rhBMP-2 в комплексе с BMPRIA-CBD и целлюлозосодержащим сорбентом; 4 – препарат димерной формы rhBMP-2 после элюирования с сорбента; 5 – маркер молекулярной массы.....с.94

Рисунок 46. График зависимости индукции синтеза щелочной фосфатазы в культуре клеток C2C12 от концентрации белка rhBMP-2. К – контроль; 1 – препарат rhBMP-2, очищенный по ранее разработанной методике; 2 – препарат rhBMP-2, очищенный с помощью разработанного нами подхода.....с.95

Таблица 10 – Численность МСК-колоний и макрофагов в культурах костного мозга мышей линии СВА в присутствии rhBMP-2 в культуральной среде.....с.96

Таблица 11 – Численность МСК-колоний и макрофагов в культурах селезенки мышей линии СВА в присутствии rhBMP-2 в культуральной среде.....с.96-97