

# Эффективность применения наноструктурных композитных биорезорбируемых барьерных мембран BIOKEEP в сравнении с существующими на рынке

Т. В. Добрынина, научный сотрудник<sup>1,2</sup>  
С. А. Овчар, к.х.н., научный руководитель<sup>2</sup>  
Д. В. Толкачев, ген. директор<sup>2</sup>

<sup>1</sup>ФГБУН «Институт биоорганической химии имени акад. М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова», г. Москва

<sup>2</sup>ООО «Фибрасофт», г. Москва

## *Efficiency of application of nanostructured composite bioresorbable barrier membranes BIOKEEP in comparison with existing products on the market*

T. V. Dobrynina, S. A. Ovchar, D. V. Tolkachev

Institute of Bioorganic Chemistry n. a. acad. M. M. Shemyakin and Yu. A. Ovchinnikov; Fibrasoft Co.; Moscow, Russia

### Резюме

Авторами данной работы рассмотрены аспекты развития и применения композитных биорезорбируемых барьерных мембран для направленной тканевой регенерации, в том числе костной, в различных областях клинической медицины. Приведены результаты сравнительного анализа композитной мембраны Biokeep с другими мембранами зарубежного производства, активно используемыми для направленной тканевой регенерации в России. В исследованиях сравнивались такие свойства мембран, как пролиферативная активность, динамика клеточных популяций культивированных фибробластов, период биодеградации, а также представлены результаты токсикологических испытаний.

Ключевые слова: композитные биодеградируемые барьерные мембраны, направленная тканевая регенерация, направленная костная регенерация, фиброин шелка, коллаген.

### Summary

The authors of this work consider the aspects of the development and application of composite bioresorbable barrier membranes for directed tissue regeneration, including bone regeneration, in various fields of clinical medicine. The results of the comparative analysis of the composite membrane «Biokeep» with other membranes of foreign production, actively used for directed tissue regeneration in Russia, are presented. The studies compared such properties of membranes as proliferative activity, dynamics of cell populations of cultured fibroblasts, the period of biodegradation, also the results of toxicological tests.

Key words: composite biodegradable barrier membranes, directed tissue regeneration, directed bone regeneration, silk fibroin, collagen.

Еще в середине 50-х годов прошлого века начались экспериментальные исследования и внедрение в клиническую практику материалов различного типа для улучшения процессов заживления тканей и направленной тканевой регенерации (НТР). Первые работы в данной сфере затрагивали реконструктивную хирургию и регенерацию нервных волокон при спондилодезах [1].

Для замещения врожденных или приобретенных дефектов костной ткани при реконструктивных операциях используются различные материалы как биологического, так и не биологического происхождения [2]. При этом одной из важнейших проблем является восстановление костной ткани в зоне замещения. Длительное время оптимальным материалом для замещения дефектов костной ткани не без основания считали аутокость. Однако использование ее сопряжено с рядом сложностей: ограниченностью донорских ресурсов, опасностью возникновения переломов в месте забора аутоотрансплантатов или инфицирования при их взятии. По данным некоторых авторов [3], частота различных осложнений после манипуляций с аутооткрянками достигает 20,6%. Альтернативой аутопластическому материалу могут стать биологические неаутогенные имплантаты, которые после помещения в область костных дефектов постепенно замещались бы собственными тканями реципиента, а процессы перестройки в них протекали бы в основном так же,

как в аутооткрянке [4]. До недавних пор основным аллогенным костным пластическим материалом в России были замороженные кортикальные аллоимплантаты, консервированные парами формалина [5]. Для своего времени их появление было настоящим прорывом в создании костных имплантатов с относительно низкими иммунными свойствами и длительным сроком хранения. Большое число больных были вылечены благодаря использованию замороженных аллоимплантатов. Однако за почти полувековую историю применения этого типа пластического материала выявились и его недостатки: длительный процесс формирования регенерата по типу «ползущего замещения», случаи нагноения, токсический эффект формалина, используемого при консервации имплантатов с одновременной стерилизацией. Не обладая остеоиндуктивными свойствами, эти имплантаты часто или резорбировались без образования регенерата, или длительное время оставались неизменными, лишь по периферии срастаясь с окружающими тканями.

Направленная тканевая регенерация НТР (Guided Tissue Regeneration GTR) — методика восстановления костной ткани, разработанная изначально для пародонтологии. Сегодня ее применяют также в дентальной имплантологии. Данный метод основывается на задании требуемого объема восстановления костной ткани за счет установки барьера — мембраны между мягкими и твердыми тканями, что

способствует предотвращению врастания мягких тканей между гранулами аугментированного костного материала и, следовательно, негативного влияния на формирование костной ткани. Впервые методика НТР была применена в 1983 году группой исследователей под руководством Ньюмана. В 1988 году исследователи под руководством Данхила провели эксперимент на крысах с установкой имплантатов в заведомо недостаточный объем костной ткани с фиксацией нерезорбируемой мембраны из политетрафторэтилена. Эксперимент доказал возможность восстановления костной ткани при установке имплантатов. После чего нерезорбируемые мембраны начали активно применяться как при одновременной имплантации, так и для формирования объема костной ткани на подготовительном этапе. Именно Данхилл с коллегами предложил впервые термин «направленная костная регенерация» (Guided Bone Regeneration, GBR), однако широкого применения этот термин не получил.

Сегодня стоматологи для направленной тканевой регенерации предпочитают использовать главным образом биорезорбируемые мембраны, которые способны самостоятельно рассасываться в период от 2 до 6 месяцев, и не требуют дополнительного вмешательства по их удалению. Нерезорбируемые мембраны обладают самым главным недостатком: необходимость удаления в период от 6 до 9 месяцев — отсюда столь узкий спектр их применения.

В современной имплантологии можно выделить несколько уровней технологических разработок в изготовлении биопластических материалов, в данном случае костных алло- и ксеноимплантатов [6, 7].

*I уровень.* Не предполагает глубокой переработки донорских тканей. Ткани забираются в асептических условиях и консервируются низкими температурами либо очищаются, обезжириваются и обрабатываются химическими реагентами, достигая тем самым одновременной консервации и стерилизации [8].

*II уровень.* Ткани подвергают более серьезной обработке. Так, например, происходит процесс изготовления деминерализованных костных аллоимплантатов, где в костной ткани с помощью декальцификации кислотными растворами изменяют соотношение минерального и органического компонентов. Такой материал обладает не только остеокондуктивными, но и остеоиндуктивными свойствами. При этом деминерализация кости может быть поверхностной, частичной или полной. В зависимости от степени декальцинации материал имеет разные механические и пластические характеристики, что дает хирургу возможность комбинировать материал в зависимости от конкретной клинической ситуации [9].

*III уровень.* Создание биокомпозиционных материалов, содержащих как основные компоненты костной ткани, так и биоактивные субстанции. К последним относятся факторы роста, морфогенетические белки и другие компоненты костного матрикса. Биоактивным субстанциям отводят роль активаторов и регуляторов физиологической регенерации тканей. На стадии имплантации в состав таких материалов могут быть также включены трансплантируемые клетки-предшественники.

Хирурги широко используют преимущественно композитные биодegradуемые материалы для так называемой направленной тканевой регенерации, в том числе костной. В мире представлено большое количество полимерных композитных барьерных мембран. Материалы, используемые для мембран, можно разделить на две группы: нерезорбируемые, например, политетрафторэтилен (ePTFE), титановая сетка и резорбируемые (натуральный коллаген и хитозан; синтетические: полилактид PLLA, PGA и их сополимеры). Биоматериалы, претендующие на роль имплантатов, должны удовлетворять определенным требованиям, зависящим от структуры, состава и свойств костной ткани.

#### 1. Химические свойства:

- отсутствие токсичности и нежелательных химических реакций с тканями и межтканевыми жидкостями;
- отсутствие коррозии.

#### 2. Механические характеристики биоматериалов должны быть близкими к таковым для кости (например, различие в упругости может привести к утрате имплантата вследствие резорбции находящегося с ним в контакте костного вещества).

#### 3. Биологические свойства:

- отсутствие реакций со стороны иммунной системы;
- отсутствие сращения с костной тканью;
- стимулирование процесса образования костной ткани (остеосинтеза).

**Целью исследования** является сравнение характеристик композитных биорезорбируемых мембран Biokeeper (Россия) и широко распространенных на российском рынке коллагеновых мембран BioGide (Швейцария) для обоснования выбора оптимальных остеопластических материалов в клинической дентальной имплантологии.

#### Материалы и методы

В экспериментальных исследованиях использовались следующие образцы мембран:

- Коллагеновая мембрана Biokeeper пластина 25×25×0,5 мм (коллаген 50%, фиброин шелка 25%, полилактид 25%);
- Бесколлагеновая мембрана Biokeeper пластина 25×25×0,5 мм (фиброин шелка 50%, полилактид 50%);
- Коллагеновая мембрана Bio-Gide пластина 25×25×0,5 мм.

#### Состав и структура мембран Biokeeper

Фиброин шелка, играющего роль универсального каркасного компонента.

Фиброин шелка — специфический фибриллярный белок, получаемый из коконов тутового шелкопряда *Bombyx mori*. Он характеризуется наличием большого числа повторов в своей первичной структуре. В свою очередь, это обуславливает однородность вторичной структуры данного белка, представляющей из себя антипараллельные β-слои, между которыми имеют место водородные связи. Третичная структура фиброина состоит из двух цепей, соединенных дисульфидными мостиками: тяжелая (молекулярная масса 390 кДа) и легкая (26 кДа) в соотношении 1 : 1. Именно из-

менения в  $\beta$ -слоях обуславливают различные механические свойства биоматериалов и скорость биодеградации [14, 15]. В тканевой инженерии, когда необходимо длительное время для миграции, пролиферации и дифференцировки клеток в имплантате, наличие невысокой скорости биодеградации может быть значительным преимуществом [16, 18]. Наличие большого числа свободных химических групп в структуре фиброина определяет широкие возможности модификации его структуры, включая конъюгацию с другими соединениями, а также создание биокомпозитных материалов с улучшенными свойствами [17, 18].

Следовательно, из фиброина можно формировать различные материалы: покрытия, пленки, пористые матрицы, трубки и гели. Также его можно использовать самостоятельно или в составе композитов для направленной тканевой регенерации.

В состав биодеградируемых (биорезорбируемых) композитных материалов входят, помимо вышеупомянутого фиброинового каркаса, еще ряд высокомолекулярных соединений, обеспечивающих оптимальные механические, физико-химические и клинико-терапевтические свойства. Одним из таких компонентов является полилактид — полимер на основе молочной кислоты, получаемый из кукурузы или сахарного тростника. Он характеризуется термопластичностью, способен разлагаться в окружающем его клеточно-тканевом окружении, прекрасно совместим с костной тканью. Полилактид — экологически чистый биоматериал, отвечающий так называемой концепции устойчивого развития, так как он вырабатывается из натуральных возобновляемых ресурсов. Его широко применяют в производстве хирургических нитей, штифтов, перевязочных средств, средств личной гигиены. Для целей направленной костной регенерации в стоматологии полилактид вводят в состав биопленок из фиброина шелка. Именно полилактид придает им высокую эластичность и определяет хорошую биосовместимость с тканью костной альвеолы.

Другим активным компонентом композитных биорезорбируемых мембран является нативный коллаген, получаемый путем экстракции из животных тканей (бычье ахиллово сухожилие, крысиный хвост и пр.). В современных изделиях преобладает преимущественно коллаген I типа. Оптимальным считается его доля в структуре материала на уровне не менее 50%. Именно в этом случае он определяет высокие параметры биологической совместимости, так как является самым распространенным белком межклеточного матрикса соединительных тканей. Меньшая доля коллагена в составе мембран на основе фиброина, как правило, существенно не улучшает прочности и эластичности. Кроме того, коллаген имеет в своей структуре RGD-последовательность, к которой аффинны рецепторы всех разновидностей фибробластов, включая и остеобласты [18].

Композитные биодеградируемые мембраны получают несколькими методами. Одним из основных является метод электроспиннинга. Данный метод основан на формировании волокон субмикронного диаметра при распылении раствора полимера в электрическом поле. В процессе электроспиннинга волокна осаждаются на од-

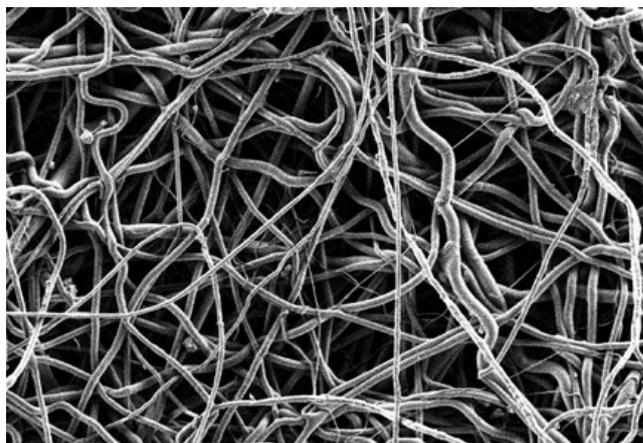


Рисунок 1. Структура мембраны — композитные нановолокна.

ном из электродов, формируя пленку. Полученные таким способом пленки имеют оптимальную структуру для взаимодействия с клеточными тканями. Шероховатость пленок чаще всего варьирует от 100 до 500 нм, что соответствует диаметру образующих ее волокон, в таком же диапазоне находятся и поры, образуемые нановолокнами [19] (рис. 1). Изделия, полученные методом электроспиннинга, обладают высоким отношением поверхности к объему, значительной пористостью и улучшенными физико-механическими свойствами. Примерами таких изделий могут служить искусственные сухожилия [20], имплантаты сосудов и костной ткани [21].

Получаемые методом электроспиннинга барьерные биодеградируемые мембраны, в состав которых входят фиброин, полилактид и (или) коллаген I типа, характеризуются на сегодняшний день одними из самых высоких показателей эластичности, прочности на разрыв, биосовместимости и адгезивности. Кроме того, для них свойственна избирательная проницаемость для низкомолекулярных биологически активных веществ, столь необходимых для направленной миграции, пролиферации и дифференцировки клеток регенерата. Такие композитные барьерные биодеградируемые мембраны находят широкое применение в пародонтологии и имплантологии для направленной костной регенерации. Ряд исследований продемонстрировали позитивное влияние подобных барьерных мембран на процесс восстановления костных дефектов. Показано, что новообразованный костный регенерат характеризовался достаточным уровнем васкуляризации, обладающим высокими остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами [22, 23].

В исследовании также изучались процессы адгезии и пролиферации фибробластов, полученных из 10–12-дневных куриных эмбрионов, которые культивировали в среде, содержащей 10% сыворотки крупного рогатого скота. Было показано, что фибробласты активно закреплялись на волокнах мембран и впоследствии активно делились и развивались (рис. 2), что подтверждает факт хорошей биосовместимости.

Изучение острой токсичности проводили в условиях внутрибрюшинного введения вытяжек из коллагеновой и бесколлагеновой мембран белым мышам.

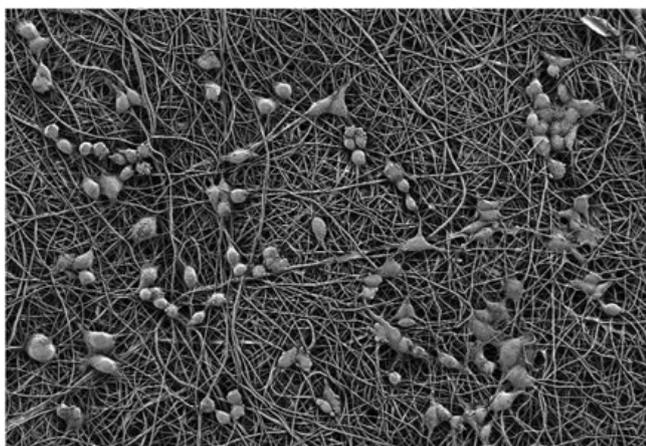


Рисунок 2. Деление клеток фибробластов на поверхности мембраны.

В токсикологическом эксперименте с использованием предварительной внутрикожной сенсибилизации, многократных эпикутанных аппликаций и провокационной внутрикожной пробы установлено, что коллагеновая и бесколлагеновая мембраны не обладают сенсибилизирующим действием, о наличии которого судили по реакции специфического лизиса лейкоцитов (РСЛЛ), соотношению ОСП (органосоматические показатели) иммунокомпетентных органов и раздражающему действию на кожу. Клинических признаков общей интоксикации у животных не наблюдалось.

При подкожной имплантации образцов коллагеновой и бесколлагеновой мембран подопытным животным макроскопическими исследованиями установлено, что образцы не вызывают реакции отторжения, воспаления или нагноений, не обладают местнораздражающим действием при сравнении с контрольным образцом (отрицательный контроль). Признаки патологических изменений или значительного воспаления в окружающих имплантат тканях отсутствовали.

Таким образом, исследование подтвердило полную безопасность мембран.

Экспериментальное определение периода биодеградации было проведено на 40 белых крысах штамма Wistar (возраст 0,5–3,0 месяца, вес 20–350 г). Животные были разделены на пять групп (2, 4, 8, 16 и 24 недели) по восемь крыс в каждой группе. Мембраны вшивались под кожу на спине вдоль позвоночного столба в зону размером 4 × 8 см. Группы животных выводились из эксперимента через заданные промежутки времени, остатки мембран удаляли с окружающей соединительной тканью и фиксировали в 10-процентном формалине для дальнейшего изучения. В результате исследования были получены данные, позволяющие рекомендовать в практике хирургов-стоматологов, парадонтологов и имплантологов применение двух- и трех-компонентных биорезорбируемых барьерных мембран, состоящих из фиброина шелка, полилактида и (или) коллагена для замещения костных дефектов челюстей. Такие мембраны обладают не только оптимальным набором механических и физико-химических свойств, но и обеспечивают клинически верифицируемые показатели остеорегенерации.

#### Список литературы:

1. Павлова Л. А., Павлова Т. В., Нестеров А. В. Современное представление об остеоиндуктивных механизмах регенерации костной ткани. Обзор состояния проблемы. Научные ведомости БелГУ Серия Медицина. Фармация. 2010 № 10, С. 5–12.
2. Лекишвили, М. В. Технологии изготовления костного пластического материала для применения в восстановительной хирургии. Автореф. дисс. на соискание степени докт. мед. наук.—М., 2005. С. 52
3. Лихачев С. П., Сидорович Р. С., Шемелев А. Г. Актуальные вопросы реконструктивной хирургии дефектов черепа. Наука и инновации, 2009. Т. 8. С. 96–102.
4. Снетков А. И., Лекишвили М. В., Касымов И. А. Использование пластического материала «Перфоост» в клинике детской костной патологии. Вестник травматологии и ортопедии им. Н. Н. Приорова, 2003. № 4. С. 19–25.
5. Rozalia Dimitriou, George Mataliotakis et al. The role of barrier membranes for guided bone regeneration and restoration of large bone defects: current experimental and clinical evidence BMC Medicine 2012. № 10. С. 81–96.
6. Arts JJ, Verdonschoot N, Buma P, Schreurs BW. Larger bone graft size and washing of bone grafts prior to impaction enhances the initial stability of cemented cups: experiments using a synthetic acetabular model. Acta Orthop. 2006.77(2). Pp. 227–33.
7. Baas J, Lamberg A, Jensen TB, Elmengaard B, Soballe K. The bovine bone protein lyophilisate Colloss improves fixation of allografted implants — an experimental study in dogs. Acta Orthop. 2006. 77(5). P. 79.
8. Salai M., Brosh T., Keller N. et al. The effects of prolonged cryopreservation on the biomechanical properties of bone allografts. A microbiological, histological and mechanical study. Cell and Tissue Banking. 2000. Vol.1. Pp. 69–73.
9. Кириллова, И. А. Деминерализованный костный трансплантат как стимулятор остеогенеза. Хирургия позвоночника, 2004, Т. 3. С. 105–110.
10. Берченко, Г. Н. Биоконпозиционный наноструктурированный препарат Колапан в инжиниринге костной ткани. Искусственные материалы в травматологии и ортопедии. Сборник работ V научно-практического семинара. Москва. 2009. С. 7–13.
11. Васильев, А. И. Снетков, В. Е. Цуканов и др. Теоретическое обоснование использования биоконпозиционного материала («Остеоматрикс») в лечении детей и подростков с костной патологией. Детская хирургия, 2006. Т. 2. С. 44–49.
12. Венедиктов А. А. Разработка биоматериалов для реконструктивной хирургии на основе ксеноперикардальной ткани. Автореф. дисс. на соискание степени канд. биол. наук.—М., 2014. С. 124.
13. Долгалев А. А., Зеленский В. А., Базиков И. А. Сравнительный анализ биодинамических характеристик резорбируемых коллагеновых мембран на клеточных культурах. Пародонтология. 2016. № 4. С. 71–79.
14. He Y.-H., Zhang N.-N. et al. N-terminal domain of Bombyx mori fibroin mediates the assembly of silk in response to PH decrease. J Mol Biol 2012.418(3–4). Pp. 197–200.
15. Kasoju N., Bora U. Silk fibroin based biomimetic artificial extracellular matrix for hepatic tissue engineering applications. Biomed mater 2012. № 4. P. 45–47.
16. Bonatsev A., Yakovlev S. et al. The terpolymer produced by Azotobacter chroococcum 7B: effect of surface properties on cell attachment. PLoS One. 2013. 8(2). Pp 28–32.
17. Agapov I., Moisevich M., Druzhinina T. Biocomposed scaffolds containing fibroin and nanohydroxyapatite for guided bone regeneration. Biochem. Biophys. 2011. P. 228–230.
18. Safonova L., Bobrova M., Agapova O. et al. Biological properties of regenerated silk fibroin films. CTM 2015. 7(3). P. 54–57.
19. Hu Z., Ma Z., Peng M., He X., Zhang H., Li Y., Qiu J. Composite Im polarizer based on the oriented assembly of electrospun nanobers. Nanotechnology. 2016. 27(13). P. 52–57 <http://dx.doi.org/10.1088/0957-4484/27/13/135301>.
20. Orr S. B., Chainani A., Hippensteel K. J., Kishan A., Gilchrist C., Garrigues N. W., Ruch D. S., Guilk F., Little D. Aligned multilayered electrospun scaffolds for rotator cuff tendon tissue engineering. Acta Biomater. 2015. 24. P. 117–126. <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2015.06.010>.
21. Zhou J., Cao C., Ma X., Lin J. Electrospinning of silk fibroin and collagen for vascular tissue engineering. Int J Biol Macromol. 2010. 47(4). P. 514–519. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.07.010>
22. Grudyanov A. Osteoplastic materials in surgery of periodontitis. Parodontology, 1998, № 1, P. 11–13.
23. Vedyayeva A. P., Ivanov P. V., Bulkina N. V., Nikishin D. V. Effectiveness of bioresorbable collagen membrane in combination with chitosan for bone tissue restoration (experimental study). Science news of Volga Region. Medicine. 2015. № 3. P. 50–61.

