***In vitro* оценка антимикробной активности модифицированных костных ксеноматериалов**

**М.В. Стогов¹, Д.В. Смоленцев², З.С. Науменко¹, Н.В. Годовых¹, М.В. Гурин³, Е.А. Киреева¹,
А.Е. Лукьянов⁴, О.В. Дюрягина¹, Н.В. Тушина¹**

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» им. академика Г.А. Илизарова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Курган, Россия;

²ООО «Мед-Инж-Био», г. Пенза, Россия;

³ООО «Кардиоплант», г. Пенза, Россия;

⁴Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
"Национальный исследовательский Томский политехнический университет", г. Томск, Россия

***In vitro* assessment of antimicrobial activity of modified bone xenomaterials**

**M.V. Stogov¹, D.V. Smolentsev², Z.S. Naumenko¹, N.V. Godovych¹, M.V. Gurin³, E.A. Kireeva¹,
A.E. Lukianov⁴, O.V. Diuriagina¹, N.V. Tushina¹**

¹Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and Orthopaedics, Kurgan, Russian Federation;

²Med-Inzh-Bio Ltd., Penza, Russian Federation;

³Cardioplant Ltd., Penza, Russian Federation;

⁴National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian Federation

Цель. Оценка антимикробных свойств оригинальных костных имплантационных ксеноматериалов, импрегнированных по разным технологиям ванкомицином. **Материалы и методы.** Костный ксеноматрикс модифицировали по двум технологиям: адсорбция ванкомицина на поверхности материала и абсорбция ванкомицина в объеме материала с использованием промежуточного носителя. При импрегнации антибиотика использовали метод сверхкритической флюидной экстракции диоксидом углерода. Изучена кинетика высвобождения антибиотика из модифицированного ксеноматериала. В исследовании *in vitro* изучена его антимикробная активность по отношению *S. aureus*. **Результаты.** Обнаружено, что выход ванкомицина из материала, выполненного по технологии адсорбции, после 24 часов инкубации составил более 98 % от исходного содержания в матриксе. Остаточное содержание антибиотика в среднем составляло 1,75 %. Использование промежуточного носителя (L/D изомер полилактида) позволяет получить материал с дозированным пролонгированным выходом ванкомицина. В частности показано, что основной выход (68,16 % от исходного содержания) ванкомицина шел равномерно в течение первых 14 дней. После 30 дней инкубации остаточное содержание препарата в костном блоке составило около 22 %. Обнаружено, что изделия, насыщенные антибиотиками по двум разным технологиям, проявляли выраженную антимикробную активность в отношении *S. aureus*. **Заключение.** Разработанные технологии импрегнации ванкомицина в ксеногенный костный матрикс позволяют получить новый модифицированный материал для костной пластики с выраженной антимикробной активностью.

Ключевые слова: костный ксеноматериал, биотехнология, антимикробная активность, кинетика высвобождения антибиотика

Objective To assess antimicrobial characteristics of original bone xenomaterial implants with vancomycin impregnated with different technologies. **Material and methods** Bone xenomatrix was modified with two technologies of vancomycin adsorbed on the surface of the material and vancomycin adsorbed in the volume of the material through intermediate carrier. Antibiotic was impregnated using supercritical fluid extraction with carbon dioxide. Antibiotic release from modified xenomaterial was evaluated and antimicrobial activity against *S. aureus* assessed *in vitro*. **Results** Elution of vancomycin over 24 hours from the material produced with absorption technology was 98 % of baseline content in the matrix. Residual content of antibiotic was 1.75 % on average. The use of intermediate carrier (L/D polylactide isomer) allows for obtaining material with gradual prolong vancomycin release. Major release (68.16 % from baseline content) of vancomycin occurred smoothly over the first 14 days. Bone block eluted 22 % of the residual antibiotic load by 30 days of incubation. The products impregnated with antibiotic using two different technologies exhibited evident antimicrobial activity against *S. aureus*. **Conclusion** Technologies developed to impregnate vancomycin in xenogenic bone matrix are practical to obtain new modified bone grafting material with evident antimicrobial activity.

Keywords: bone xenomaterial, biotechnology, antimicrobial activity, antibiotic release kinetics

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в травматологии и ортопедии используется большой спектр имплантационных материалов различного происхождения [1]. Однако разработка новых материалов для задач клинической практики продолжается [2, 3]. В этом плане значительное число текущих исследований принадлежит изучению возможностей применения в травматологии и ортопедии материалов естественного происхождения (ауто-, алло- и ксеногенного происхождения) в разнообразных модификациях, в том числе включающих гибридные

материалы, сочетающие нативную кость, модифицированную различными биологически активными веществами [4–9]. Среди этих направлений, по нашему мнению, недостаточно оценённым является применение материалов ксеногенного происхождения [10–13]. Хотя в настоящее время технологии получения таких материалов позволяют повысить качество за счет снижения его антигенной активности при повышении механической прочности, что, в целом, приближает такой материал по остеоиндуктивным характеристикам

к ауто- и алломатериалам [14, 15]. Дополнительным фактом является возможность повышения биоактивности костного ксеноматериала за счет импрегнации в его объем дополнительных веществ, стимулирующих остеогенез [16–18]. В этом плане пока недостаточно изучены возможности модификации ксеноматериала антибактериальными веществами, что позволит при

его применении наряду с замещением кости достигать купирования и/или предупреждения развития в зоне имплантации инфекционного процесса.

Цель исследования – *in vitro* оценка антимикробных свойств оригинальных костных имплантационных ксеноматериалов, импрегнированных по разным технологиям ванкомицином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Технология получения ксеноматериала. Костный ксеноматериал получали из костей быков, возрастом до 6 месяцев, с соблюдением требований ГОСТ Р ИСО 22442. Экспериментальные образцы изготавливались из губчатой кости, распиленной на блоки $20 \times 15 \times 5$ мм, очищенной от сухожилий ручным способом с помощью ножа. Блоки предварительно были промыты проточной водой 2–3 мин., обработаны в растворе 7 % NaCl 12 часов, ультразвуковой ванне в растворе 0,1 % перекиси водорода 48 часов. После каждой обработки блоки промывались проточной водой, затем были подсушены на фильтровальной бумаге перед экстракцией в течение трех часов в пластиковой таре. Финальную глубинную очистку проводили с помощью сверхкритической флюидной экстракции с помощью CO_2 . Экстракцию проводили с использованием следующих параметров: $P = 350$ атм, $t = 50$ °C, поток 20–22 scfh (ср. 16,9 жидкий CO_2 Г/мин.) и чередованием по времени циклов, состоящих из динамического режима (25 мин.) и статического (5 мин.). Экстракцию липидов из узла сбора регистрировали визуально и при регистрации выхода только газа выдерживали 25 минут поточного режима для достоверности, дополнительно взвешивали образцы, при отсутствии изменения массы считали очистку завершённой, а данный подход гарантией качества очистки. Изготовление остеопластического материала по данной методике описано в патенте на изобретение № 2609201 от 14.08.2015.

Далее опытные костные блоки насыщали раствором антибиотика ванкомицина по двум разным технологиям, обеспечивающим различную кинетику его высвобождения из костного материала. Блоки для контроля были сделаны по аналогичной методологии, но без импрегнации антибиотика.

Технология импрегнации ванкомицина – Т1. Импрегнацию антибиотика по данной технологии осуществляли путем заполнения имеющихся в материале пор из водного раствора лекарственного препарата (адсорбция антибиотика). Раствор антибиотика готовили на дистиллированной воде в концентрации 5 мг/мл в объеме 50 мл. Затем костные блоки размерами $20 \times 15 \times 5$ мм помещали в раствор, сосуд с раствором загружали в реактор установки для сверхкритической флюидной экстракции Waters (США). В камеру подавали углекислый газ и доводили параметры среды до $P = 250$ атм, $t = 25$ °C. Устанавливали статический режим и выдерживали блоки 3 часа. После костные блоки лиофилизировали в сушке VaCO-2 (Zirbus, Германия). Вышедшие блоки стерилизовали газовой стерилизацией в среде оксида этанола с последующим вакуумированием и аэрацией в течение 2 суток. Конечное содержание ванкомицина в среднем составило 35 мкг в костном блоке.

Технология импрегнации ванкомицина – Т2. Для получения костного блока с абсорбцией антибиотика в объеме материала, обеспечивающей замедленное

вымывание ванкомицина, в качестве промежуточного носителя лекарственной субстанции использовали L,D-полилактид, который, покрывая стенки пор, равномерно фиксировал препарат по всей поверхности костного матрикса. Использовали аморфный L,D-полилактид молекулярной массой 18 кД, приведенная вязкость которого составляла 0,2 дл/г.

Для создания комбинированного покрытия на поверхности костного матрикса в раствор этилового спирта 50 мл добавляли порошок полилактида (1,8 г полимера), затем в полученный раствор добавили ванкомицин из расчета 2 г в 50 мл. В полученный вязкий раствор помещали костные блоки. Для удаления остатков этилового спирта и пластификации полимера использовали метод сверхкритической флюидной экстракции диоксидов углерода. Для этого сосуд с раствором поместили в реактор установки сверхкритической флюидной экстракции фирмы «Waters», подали углекислый газ, доводили среду до $P = 25$ МПа, $T = 32$ °C, скорость потока 10 г/мин. в течение 5 минут (для отгонки этилового спирта), потом устанавливали статический режим при $P = 120$ МПа, $T = 32$ °C на 60 мин. (для пластификации и набухания полимера). После окончания сбрасывали давление до атмосферного, затем материал замораживали и лиофилизировали. Вышедшие блоки стерилизовали газовой стерилизацией в среде оксида этанола с последующим вакуумированием и аэрацией в течение 2 суток. Конечное содержание ванкомицина в среднем составило 100 мкг в костном блоке.

Для определения кинетики высвобождения антибиотика из костных блоков материал с фиксированным антибиотиком помещали в раствор фосфатного буфера (рН 7,4) на шейкер. Затем через 30, 60 минут, 2, 4, 6, 12, 24, 48 часов и далее через каждые трое суток осуществляли замену раствора, в котором измеряли оптическую плотность среды при 280 нм на спектрофотометре UVmini – 1240 (Shimadzu, Япония) [19]. Для построения калибровочной зависимости оптической плотности от концентрации ванкомицина использовали стандартные его растворы в буфере.

Методика оценки бактерицидной активности костного материала *in vitro*. С целью стандартизации тестирования антимикробной активности костного материала в лабораторных условиях нами был модифицирован диско-диффузионный метод оценки, применяемый при определении чувствительности бактерий к антибактериальным препаратам (Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам», версия 2018-03).

Тест-микроорганизмы. Для оценки антибактериальных свойств матрикса использовали стандартные микробные культуры. Для проверки антимикробных свойств матрикса с ванкомицином использовали штамм *S. aureus* ATCC 29213.

Условия культивирования тест-микроорганизмов. Тест-микроорганизмы культивировали на мясо-пептонном агаре при температуре 37 °С в течение 18–24 часов.

Контроль микробных культур. Культуру тест-микроорганизма подвергали контролю качества. Непосредственно перед использованием тест-культуры для исследовательских целей было необходимо убедиться в том, что штамм, выросший на питательной среде, не загрязнен посторонней микрофлорой. Для оценки чистоты роста микробных культур просматривали бактериологические посеы и учитывали характер и массивность роста, изменение цвета питательной среды. Проводили микроскопию мазка выросших культур, окрашенных по Граму.

Исследование и оценка результатов бактерицидной активности остеопластического матрикса проводились в соответствии Клиническим рекомендациям «Определение чувствительности микроорганизмов к анти-микробным препаратам» (версия 2018-03).

Параметры метода. Питательная среда: агар Мюллера-Хинтона. Инокулюм: для приготовления инокулята использовали метод прямого суспендирования в

стерильном изотоническом растворе колоний чистой 18–24-часовой культуры бактерий, выросшей на плотной неселективной питательной среде (МПА). Плотность суспензии – 0,5 по стандарту мутности МакФарланда. Инкубация: 35 ± 1 °С, 18 ± 2 ч. при обычной атмосфере.

Учет результатов. Бактерицидную активность матрикса с антибиотиком считали выраженной в том случае, если зона подавления роста тест-микроорганизмов вокруг матрикса с антибиотиком составляла не менее 25 × 30 мм. Учет проводится в отраженном свете. При измерении зоны подавления роста ориентировались на зону полного подавления видимого роста.

Всего выполнено три серии тестов *in vitro*. Тестировали контрольные образцы, не импрегнированные антибиотиком, и две серии опытных образцов с импрегнацией антибиотиков по технологии 1 (Т1) и технологии 2 (Т2). В каждой серии опытов тестировали по 6 костных блоков. Статистическое оценивание между тестами опытной и контрольной серий проводили с применением непараметрического критерия χ^2 . Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез в данном исследовании принимали равным 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Кинетика высвобождения ванкомицина из костных блоков. По результатам оценки вымывания антибиотика из костного матрикса обнаружено, что выход ванкомицина из материала, выполненного по технологии 1, после 24 часов инкубации составил более 98 % от исходного содержания в матриксе. Остаточное содержание антибиотика в среднем составляло 1,75 %. Таким образом, данная технология импрегнации позволяет получить костные блоки с «быстрым» высвобождением антибиотика.

В свою очередь, количественные показатели кинетики высвобождения ванкомицина из блока, выполненного по технологии 2, значительно отличались от образца первой серии (табл. 1).

Обнаружено, что использование промежуточного носителя (L/D изомер полилактида) по технологии 2 позволяет получить материал с дозированным пролонгированным выходом ванкомицина. В частности, выход препарата шел достаточно большими равномерными порциями в течение первых 14 дней (68,16 % от всего уровня импрегнированного антибиотика). После

30 дней инкубации остаточное содержание препарата в костном блоке составило около 22 %. Это может свидетельствовать о двухфазном выходе антибиотика: сначала из поверхностных пор при деградации полилактидной пленки, образовавшейся на поверхности костных блоков в процессе обработки и удерживающей препарат, а затем уже из глубоких пор непосредственно при биорезорбции материала.

Оценка антимикробной активности костного материала *in vitro*. Результаты оценки антимикробной активности костного материала, выполненного по технологиям 1 и 2, представлены в таблице 2. Как видно из полученных результатов, протестированные изделия, насыщенные антибиотиками по двум разным технологиям, проявили выраженный антимикробный эффект в отношении *S. aureus*. При этом стоит отметить, что зона ингибирования роста *S. aureus* для костного матрикса, выполненного по технологии 2, была статистически значимо больше, чем в аналогичном опыте с использованием блоков, выполненных по технологии 1.

Таблица 1

Кинетика высвобождения ванкомицина из материала, выполненного по технологии 2

Сутки инкубации	Средний выход ванкомицина в % от начального содержания
2	19,11
5	16,71
8	16,10
11	14,53
14	1,71
17	4,13
20	0,45
23	0,37
26	3,70
30	1,02
Остаточное содержание, %	22,00

Таблица 2

Бактерицидная активность костного матрикса, импрегнированного антибиотиком по технологиям 1 и 2, в отношении *Staphylococcus aureus*

Костный матрикс	Зона ингибирования роста, мм	Бактерицидный эффект (число блоков)
Блок с ванкомицином, T1	28 × 31	бактерицидный эффект выраженный (n = 6)*
Блок с ванкомицином, T2	28 × 35**	бактерицидный эффект выраженный (n = 6)*
Контроль – блок без антибиотика	0	бактерицидный эффект отсутствует (n = 6)

Примечание: * – достоверные отличия от блоков контрольной серии при $p < 0,001$. ** – достоверные отличия от блоков T1 при $p < 0,05$.

ОБСУЖДЕНИЕ

Для костной пластики ксеноматериалы представляются перспективной альтернативой ауто- и аллотрансплантатам [1, 4]. Совершенствование данного вида изделий связано не только с получением высокоочищенной ксеногенной кости, но с разработкой материала, содержащего в своей матрице биоактивные вещества, качественно улучшающие его биологические характеристики, в том числе и его антимикробные свойства [14].

Внедрение в костный матрикс биоактивных веществ без потери их активности является сложной задачей, которую можно решить способами, основанными на учёте их физико-химических свойств и особенностей структуры костного матрикса.

При разработке материала по технологии 1 мы исходили из того, что ксеногенная кость по своей структуре уже имеет необходимую природную пористость, которая достаточна для обеспечения заполнения пор (адсорбция) антибиотиком из водного раствора. Как показали наши исследования, данный метод импрегнации действительно дает возможность внедрить определенное количество антибиотика в костные блоки, которое, однако, очень быстро, в течение суток, будет выделено из кости в гидрофильную среду.

Понимая, что принцип такой импрегнации заключается в насыщении имеющихся природных пор кости антибиотиком, из которых он быстро вымывается, вопрос об увеличении скорости высвобождения веществ из кости и соответственно эффективности пролонгированного действия полученного изделия требовал дальнейшего решения.

В этом направлении нами разработана технология получения ксеноматериала, насыщенного антибиотиком с помощью метода сверхкритической импрегнации в атмосфере сверхкритического диоксида углерода, обеспечивающего абсорбцию антибиотика во всём

объеме материала. Основной проблемой, возникающей при импрегнации биологически активных веществ по данной технологии, являлась низкая растворимость в среде полярных соединений, к которым и относятся водные растворы антибиотиков. Возможным решением в данной ситуации для создания медленного выделения препарата являлся отказ от водных растворов и использование промежуточного носителя лекарственной субстанции нами был выбран L,D-полилактид.

Наши результаты показали, что благодаря использованию промежуточного носителя, в данном случае L/D изомера полилактида, цель получения материала с дозированным пролонгированным выходом ванкомицина была достигнута.

При тестировании материала *in vitro* нами было показано, что особенности кинетики высвобождения ванкомицина из материала (98 % высвобождения антибиотика для T1 и около 19 % для T2 в течение первых суток), выполненного по технологиям 1 и 2, способствовали тому, что оба ксеноматериала эффективно подавляли рост *S. aureus*. Однако более длительное высвобождение антибиотика и достаточно высокое его остаточное содержание (22 % от исходного) для образца, выполненного по технологии 2, делает его предпочтительнее для задач клинической практики. Тем не менее, материал, выполненный по технологии 1, также может иметь место для применения в случаях, когда необходимо достаточно быстро создать высокую концентрацию антибиотика в месте имплантации, например при заполнении инфицированных дефектов.

Очевидно, что окончательная оценка биосовместимости и антимикробной активности полученного предложенными способами модифицированного ксеноматериала требует дальнейшей экспериментальной проверки в исследованиях *in vivo*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанные технологии импрегнации ванкомицина в ксеногенный костный матрикс позволяют получать новый модифицированный материал для костной пластики с выраженной антимикробной активностью. При этом различия кинетики высво-

бождения антибиотика из материала приводят к необходимости дифференцировать показания к их практическому применению, что, как ожидается, позволит повысить клиническую эффективность изделия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions / A. Oryan, S. Alidadi, A. Moshiri, N. Maffulli // J. Orthop. Surg. Res. 2014. Vol. 9, No 1. P. 18. DOI: 10.1186/1749-799X-9-18.
2. Blokhuis T.J., Arts J.J. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths // Injury. 2011. Vol. 42, No Suppl. 2. P. S26-S29. DOI: 10.1016/j.injury.2011.06.010.
3. Yunus Basha R., Sampath Kumar T.S., Doble M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration // Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl. 2015. Vol. 57. P. 452-463. DOI: 10.1016/j.msec.2015.07.016.
4. Костнопластические остеоиндуктивные материалы в травматологии и ортопедии / М.В. Лекишвили, Е.Д. Скляничук, В.С. Акатов, А.А. Очкурченко, В.В. Гурьев, И.С. Рагинов, С.Н. Бугров, А.Ю. Рябов, И.С. Фадеева, Ю.Б. Юрасова, А.С. Чеканов // Гений ортопедии. 2015. № 4. С. 61-67.

5. Producing 3D Biomimetic Nanomaterials for Musculoskeletal System Regeneration / I. Casanellas, A. García-Lizarriar, A. Lagunas, J. Samitier // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2018. Vol. 6. P. 128. DOI: 10.3389/fbioe.2018.00128.
6. Holt D.J., Grainger D.W. Demineralized bone matrix as a vehicle for delivering endogenous and exogenous therapeutics in bone repair // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012. Vol. 64, No 12. P. 1123-1128. DOI: 10.1016/j.addr.2012.04.002.
7. Biomimetic Materials and Fabrication Approaches for Bone Tissue Engineering / H.D. Kim, S. Amirthalingam, S.L. Kim, S.S. Lee, J. Rangasamy, N.S. Hwang // *Adv. Healthc. Mater.* 2017. Vol. 6, No 23. DOI: 10.1002/adhm.201700612.
8. Clinoptilolite/PCL-PEG-PCL composite scaffolds for bone tissue engineering applications / E. Pazarçeviren, Ö. Erdemli, D. Keskin, A. Tezcaner // *J. Biomater. Appl.* 2017. Vol. 31, No 8. P. 1148-1168. DOI: 10.1177/0885528216680152.
9. Reddy R., Reddy N. Biomimetic approaches for tissue engineering // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2018. Vol. 29, No 14. P. 1667-1685. DOI: 10.1080/09205063.2018.1500084.
10. Xenogenic demineralized bone matrix and fresh autogenous cortical bone effects on experimental bone healing: radiological, histopathological and biomechanical evaluation / A.S. Bigham, S.N. Dehghani, Z. Shafiei, S. Torabi Nezhad // *J. Orthop. Traumatol.* 2008. Vol. 9, No 2. P. 73-80. DOI: 10.1007/s10195-008-0006-6.
11. Comparative Effectiveness of Bone Grafting Using Xenograft Freeze-Dried Cortical Bovine, Allograft Freeze-Dried Cortical New Zealand White Rabbit, Xenograft Hydroxyapatite Bovine, and Xenograft Demineralized Bone Matrix Bovine in Bone Defect of Femoral Diaphysis of White Rabbit: Experimental Study In Vivo / F. Mahyudin, D.N. Utomo, H. Suroto, T.W. Martanto, M. Edward, I.L. Gaol // *Int. J. Biomater.* 2017. Vol. 2017. P. 7571523. DOI: 10.1155/2017/7571523.
12. Histopathological and biomechanical evaluation of bone healing properties of DBM and DBM-G90 in a rabbit model / A. Meimandi Parizi, A. Oryan, S. Haddadi, A. Bigham Sadegh // *Acta Orthop. Traumatol. Turc.* 2015. Vol. 49, No 6. P. 683-689. DOI: 10.3944/AOTT.2015.15.0129.
13. Ozdemir M.T., Kir M.Ç. Repair of long bone defects with demineralized bone matrix and autogenous bone composite // *Indian J. Orthop.* 2011. Vol. 45, No 3. P. 226-230. DOI: 10.4103/0019-5413.80040.
14. Разработка остеопластических материалов с высоким потенциалом биоинтеграции для ускоренной регенерации костной ткани / А.С. Сенотов, И.С. Фадеева, П.О. Кирсанова, Р.С. Фадеев, А.А. Просвирин, Н.И. Фесенко, М.В. Лекишвили, В.С. Акатов // *Медицинский академический журнал.* 2016. Т. 16, № 4. С. 35-36.
15. Экстракционная очистка ксеногенного костного матрикса в среде сверхкритического диоксида углерода и оценка свойств полученного материала / Д.В. Смоленцев, М.В. Гурин, А.А. Венедиктов, С.В. Евдокимов, Р.А. Фадеев // *Сверхкритические флюиды: теория и практика.* 2017. Т. 12, № 2. С. 60-67.
16. Effect of platelet-rich plasma combined with demineralised bone matrix on bone healing in rabbit ulnar defects / V. Galanis, A. Fiska, S. Kapetanakis, K. Kazakos, T. Demetriou // *Singapore Med. J.* 2017. Vol. 58, No 9. P. 551-556. DOI: 10.11622/smedj.2016095.
17. Bone Healing Evaluation in Critical-Size Defects Treated With Xenogenous Bone Plus Porcine Collagen / J. Maciel, G.A. Momesso, G. Ramalho-Ferreira, R.B. Consolaro, P.S. Perri de Carvalho, L.P. Faverani, A.P. Farnezi Bassi // *Implant. Dent.* 2017. Vol. 26, No 2. P. 296-302. DOI: 10.1097/ID.0000000000000572.
18. Bone augmentation using a synthetic hydroxyapatite/silica oxide-based and a xenogenic hydroxyapatite-based bone substitute materials with and without recombinant human bone morphogenetic protein-2 / D.S. Thoma, A. Kruse, C. Ghayor, R.E. Jung, F.E. Weber // *Clin. Oral Implants Res.* 2015. Vol. 26, No 5. P. 592-598. DOI: 10.1111/clr.12469.
19. Определение концентрации ванкомицина в витреальной полости для оптимизации лечения острых бактериальных послеоперационных эндофтальмитов / В.Н. Казайкин, В.О. Пономарев, А.С. Вохминцев, И.А. Вайнштейн // *Практическая медицина.* 2016. Т. 1, № 2. С. 85-89.

REFERENCES

1. Oryan A., Alidadi S., Moshiri A., Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J. Orthop. Surg. Res.*, 2014, vol. 9, no. 1, pp. 18. DOI: 10.1186/1749-799X-9-18.
2. Blokhuis T.J., Arts J.J. Bioactive and osteoinductive bone graft substitutes: definitions, facts and myths. *Injury*, 2011, vol. 42, no. Suppl. 2, pp. S26-S29. DOI: 10.1016/j.injury.2011.06.010.
3. Yunus Basha R., Sampath Kumar T.S., Doble M. Design of biocomposite materials for bone tissue regeneration. *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.*, 2015, vol. 57, pp. 452-463. DOI: 10.1016/j.msec.2015.07.016.
4. Lekishvili M.V., Sklianchuk E.D., Akatov V.S., Ochkurenko A.A., Gurev V.V., Raginov I.S., Bugrov S.N., Riabov A.Iu., Fadeeva I.S., Iurasova Iu.B., Chekanov A.S. Kostnoplásticoskie osteoinduktivnye materialy v travmatologii i ortopedii [Osteoplastic osteoinductive materials in traumatology and orthopaedics]. *Genij Ortopedii*, 2015, no. 4, pp. 61-67. (in Russian)
5. Casanellas I., García-Lizarriar A., Lagunas A., Samitier J. Producing 3D Biomimetic Nanomaterials for Musculoskeletal System Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.*, 2018, vol. 6, pp. 128. DOI: 10.3389/fbioe.2018.00128.
6. Holt D.J., Grainger D.W. Demineralized bone matrix as a vehicle for delivering endogenous and exogenous therapeutics in bone repair. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 2012, vol. 64, no. 12, pp. 1123-1128. DOI: 10.1016/j.addr.2012.04.002.
7. Kim H.D., Amirthalingam S., Kim S.L., Lee S.S., Rangasamy J., Hwang N.S. Biomimetic Materials and Fabrication Approaches for Bone Tissue Engineering. *Adv. Healthc. Mater.*, 2017, vol. 6, no. 23. DOI: 10.1002/adhm.201700612.
8. Pazarçeviren E., Erdemli Ö., Keskin D., Tezcaner A. Clinoptilolite/PCL-PEG-PCL composite scaffolds for bone tissue engineering applications. *J. Biomater. Appl.*, 2017, vol. 31, no. 8, pp. 1148-1168. DOI: 10.1177/0885528216680152.
9. Reddy R., Reddy N. Biomimetic approaches for tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, 2018, vol. 29, no. 14, pp. 1667-1685. DOI: 10.1080/09205063.2018.1500084.
10. Bigham A.S., Dehghani S.N., Shafiei Z., Torabi Nezhad S. Xenogenic demineralized bone matrix and fresh autogenous cortical bone effects on experimental bone healing: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *J. Orthop. Traumatol.*, 2008, vol. 9, no. 2, pp. 73-80. DOI: 10.1007/s10195-008-0006-6.
11. Mahyudin F., Utomo D.N., Suroto H., Martanto T.W., Edward M., Gaol I.L. Comparative Effectiveness of Bone Grafting Using Xenograft Freeze-Dried Cortical Bovine, Allograft Freeze-Dried Cortical New Zealand White Rabbit, Xenograft Hydroxyapatite Bovine, and Xenograft Demineralized Bone Matrix Bovine in Bone Defect of Femoral Diaphysis of White Rabbit: Experimental Study In Vivo. *Int. J. Biomater.*, 2017, vol. 2017, p. 7571523. DOI: 10.1155/2017/7571523.
12. Meimandi Parizi A., Oryan A., Haddadi S., Bigham Sadegh A. Histopathological and biomechanical evaluation of bone healing properties of DBM and DBM-G90 in a rabbit model. *Acta Orthop. Traumatol. Turc.*, 2015, vol. 49, no. 6, pp. 683-689. DOI: 10.3944/AOTT.2015.15.0129.
13. Ozdemir M.T., Kir M.Ç. Repair of long bone defects with demineralized bone matrix and autogenous bone composite. *Indian J. Orthop.*, 2011, vol. 45, no. 3, pp. 226-230. DOI: 10.4103/0019-5413.80040.
14. Senotov A.S., Fadeeva I.S., Kirsanova P.O., Fadeev R.S., Prosvirin A.A., Fesenko N.I., Lekishvili M.V., Akatov V.S. Razrabotka osteoplasticheskikh materialov s vysokim potentsialom biointegratsii dlia uskorennoi regeneratsii kostnoi tkani [Development of osteoplastic materials with high biointegration potential for accelerated bone tissue regeneration]. *Meditsinskii Akademicheskii Zhurnal*, 2016, vol. 16, no. 4, pp. 35-36. (in Russian)
15. Smolentsev D.V., Gurin M.V., Venediktov A.A., Evdokimov S.V., Fadeev R.A. Ekstraktsionnaya ochistka ksenogennogo kostnogo matriksa v srede sverkhkriticheskogo dioksida ugleroda i otsenka svoystv poluchennogo materiala [Extraction purification of xenogenic bone matrix in the environment of supercritical carbon dioxide and evaluation of the properties of the material obtained]. *Sverkhkriticheskie fluiidy: teoriia i praktika*, 2017, vol. 12, no. 2, pp. 60-67. (in Russian)
16. Galanis V., Fiska A., Kapetanakis S., Kazakos K., Demetriou T. Effect of platelet-rich plasma combined with demineralised bone matrix on bone healing in rabbit ulnar defects. *Singapore Med. J.*, 2017, vol. 58, no. 9, pp. 551-556. DOI: 10.11622/smedj.2016095.
17. Maciel J., Momesso G.A., Ramalho-Ferreira G., Consolaro R.B., Perri de Carvalho P.S., Faverani L.P., Farnezi Bassi A.P. Bone Healing Evaluation

- in Critical-Size Defects Treated With Xenogenous Bone Plus Porcine Collagen. *Implant. Dent.*, 2017, vol. 26, no. 2, pp. 296-302. DOI: 10.1097/ID.0000000000000572.
18. Thoma D.S., Kruse A., Ghayor C., Jung R.E., Weber F.E. Bone augmentation using a synthetic hydroxyapatite/silica oxide-based and a xenogenic hydroxyapatite-based bone substitute materials with and without recombinant human bone morphogenetic protein-2. *Clin. Oral Implants Res.*, 2015, vol. 26, no. 5, pp. 592-598. DOI: 10.1111/clr.12469.
 19. Kazaikin V.N., Ponomarev V.O., Vokhmintsev A.S., Vainshtein I.A. Opredelenie kontsentratsii vankomitsina v vitrealnoi polosti dlia optimizatsii lecheniia ostrykh bakterialnykh posleoperatsionnykh endoftalmitov [Determining Vancomycin concentration in the vitreal cavity in order to optimize treatment of acute bacterial postoperative endophthalmitis]. *Prakticheskaya Meditsina*, 2016, vol. 1, no. 2, pp. 85-89. (in Russian)

Рукопись поступила 24.12.2018

Сведения об авторах:

1. Стогов Максим Валерьевич, д. б. н.,
ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава
России, г. Курган, Россия,
Email: stogo_off@list.ru
2. Смоленцев Дмитрий Владимирович,
ООО «Мед-Инж-Био», г. Пенза, Россия
3. Наumenko Зинаида Степановна, к. б. н.,
ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава
России, г. Курган, Россия
4. Годовых Наталья Викторовна,
ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава
России, г. Курган, Россия
5. Гурин Максим Вячеславович,
ООО «Кардиоплант», г. Пенза, Россия
6. Киреева Елена Анатольевна, к. б. н.,
ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава
России, г. Курган, Россия
7. Лукьянов Александр Евгеньевич,
ФГАОУ ВО "Национальный исследовательский Томский
политехнический университет", г. Томск, Россия
8. Дюрягина Ольга Владимировна, к. в. н.,
ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава
России, г. Курган, Россия
9. Тушина Наталья Владимировна, к. б. н.,
ФГБУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» Минздрава
России, г. Курган, Россия

Information about the authors:

1. Maksim V. Stogov, Ph.D. of Biological Sciences,
Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and
Orthopaedics, Kurgan, Russian Federation,
Email: stogo_off@list.ru
2. Dmitry V. Smolentsev,
Med-Inzh-Bio Ltd., Penza, Russian Federation
3. Zinaida S. Naumenko, Ph.D. of Biological Sciences,
Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and
Orthopaedics, Kurgan, Russian Federation
4. Natalia V. Godovykh,
Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and
Orthopaedics, Kurgan, Russian Federation
5. Maksim V. Gurin,
Cardioplant Ltd., Penza, Russian Federation
6. Elena A. Kireeva, Ph.D. of Biological Sciences,
Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and
Orthopaedics, Kurgan, Russian Federation
7. Alexander E. Lukyanov,
National Research Tomsk Polytechnic University, Tomsk, Russian
Federation
8. Olga V. Dyuryagina, Ph.D. of Veterinary Sciences,
Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and
Orthopaedics, Kurgan, Russian Federation
9. Natalia V. Tushina, Ph.D. of Biological Sciences,
Russian Ilizarov Scientific Center for Restorative Traumatology and
Orthopaedics, Kurgan, Russian Federation