

УДК 57.086.83

©Коллектив авторов

РАЗРАБОТКА И ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ИЗОЛИРУЮЩЕЙ МЕМБРАНЫ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРА ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА-СО-3-ОКСИВАЛЕРАТА ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ КОСТНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ

**С.Ю. Иванов¹, А.П. Бонарцев^{2,3*}, Ю.В. Гажва¹, И.И. Жаркова²,
Р.Ф. Мухаметшин¹, Т.К. Махина³, В.Л. Мышкина³, Г.А. Бонарцева³,
В.В. Войнова², Н.В. Андреева³, Е.А. Акулина², Е.С. Харитонова⁴,
К.В. Шайтан², А.А. Мураев¹**

¹Нижегородская государственная медицинская академия (НижГМА), Нижний Новгород

²Биологический факультет Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова, 119234, Москва. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12,
тел.: 495-930-63-06; эл. почта ant_bonar@mail.ru;

³Институт биохимии имени А.Н. Баха РАН, Москва

⁴Физический факультет Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова, Москва

Поражения костных тканей занимают одно из первых мест среди причин временной нетрудоспособности и развития инвалидности. В настоящее время в хирургической практике применяются методики направленной костной регенерации с использованием различных остеопластических материалов и изолирующих мембран. Нами разработана методика получения пористых мембран из сополимера поли-3-оксибутирата с 3-оксивалератом (ПОБВ), продуцируемого штаммом *Azotobacter chroococcum* 7B, и проведены исследования данной подложки на биосовместимость как на клеточной культуре мезенхимальных стволовых клеток (МСК), так и на лабораторных животных. Результаты теста на цитотоксичность и гистологических исследований свидетельствуют о высокой биосовместимости данного материала и потенциальной возможности использования его в тканевой инженерии костной ткани.

Ключевые слова: поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат, изолирующая мембрана, пористый матрикс, направленная костная регенерация, костная ткань

DOI: 10.18097/PBMC20156106717

ВВЕДЕНИЕ

Поражения костных тканей в результате патологических заболеваний, травм и врождённых патологий занимают одно из первых мест среди причин смертности, временной нетрудоспособности и развития инвалидности. Широко распространённые в хирургии методики реконструкции костей лицевого скелета, основанные на ручном или инструментальном перемещении и фиксации костных фрагментов с помощью проволоочных швов и фиксаторов, не обеспечивают решения поставленной задачи. Различные заболевания, при которых поражается черепно-лицевая область, такие как врожденные дефекты, травматические поражения, инфекционные, гнойно-воспалительные заболевания, абсцессы и флегмоны головы и шеи, острые и хронические синуситы, доброкачественные и

злокачественные опухоли челюстно-лицевой области, как правило, ассоциируются и с изменениями в других органах и системах организма [1]. Наличие такой сочетанной патологии приводит к развитию значительного числа осложнений как во время операции, так и в послеоперационном периоде.

Развитие имплантируемых материалов медицинского назначения позволило разработать технологии, при которых повреждённые участки костной ткани замещают имплантатами из биологически инертных (металлы, пластмассы) или активных материалов (фосфатно-кальциевая керамика, биостекла, костные алло- и аутографты). Однако, такие подходы не всегда приводят к положительным результатам из-за возможного отторжения организмом инертных материалов, дегенерации здоровой костной ткани в месте контакта, механической несовместимости ткани

* - адресат для переписки

и имплантата, опасности иммунных реакций, необходимости вторичных хирургических операций. Особенно актуальна эта проблема для стоматологии и черепно-лицевой хирургии в связи с достаточно жесткими требованиями к архитектуре, микроструктуре, физико-механическим и биологическим свойствам медицинских изделий и обширным применением различных методов для этого направления в медицине. Всё это требует освоения и внедрения в клиническую практику новых, более эффективных и доступных методов восстановительного лечения больных [2, 3].

В настоящее время всё чаще в практике хирургической стоматологии и пародонтологии применяются методики направленной костной регенерации с использованием различных остеопластических материалов и изолирующих мембран. Разработано большое количество таких мембран, которые отличаются по происхождению (ксеногенные или синтетические), по способности подвергаться биодеструкции (резорбируемые и нерезорбируемые), по прочности (мягкие и каркасные). Основная роль мембран заключается в создании надежного механического и тканевого барьера между зоной костной регенерации и окружающими мягкими тканями.

В связи с высокой востребованностью в использовании изолирующих (барьерных) мембран в хирургической стоматологии, способствующих созданию оптимальных условий для формирования костной ткани при реконструктивных операциях на челюстях, вопрос о поиске новых материалов для изготовления изолирующих мембран остаётся актуальным, своевременным к наблюдениям [3].

Большой интерес в качестве синтетического биосовместимого материала представляет поли-3-оксибутират (ПОБ) и его сополимеры, которые являются биосовместимыми и обладают регулируемыми сроками резорбции (это позволит избежать повторных операций по извлечению мембраны) без образования токсичных продуктов. Ранее было показано, что биоматериалы на основе ПОБ и его сополимеров могут быть использованы для регенерации костной ткани в регенеративной ортопедии и челюстно-лицевой хирургии [4, 5]. Мембраны из ПОБ использовались в качестве “барьерных заплат” для закрытия дефектов в желудочно-кишечном тракте и сердечно-сосудистой системе. Продемонстрирована полная биodeградация барьерных мембран из ПОБ *in vitro* и *in vivo*, слабовыраженная воспалительная реакция в ответ на имплантацию биополимерных мембран. В состав изделий из данного материала могут быть включены в свой состав лекарственные препараты [2, 6]. В данной работе использован сополимер ПОБ поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат (ПОБВ), как более пластичный материал, обладающий хорошей биосовместимостью [7, 8].

Целью данной работы являлась разработка новой биосовместимой пористой мембраны из ПОБВ для направленной костной регенерации.

Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи:

- 1) Разработка метода получения мембраны на основе сополимера ПОБ и исследование её физико-химических свойств;
- 2) Исследование разработанной мембраны на биосовместимость *in vitro* и *in vivo*;
- 3) Изучение барьерных свойств разработанной мембраны при регенерации костных дефектов в эксперименте на животных.

МЕТОДИКА

Материалы

Для получения полимерных мембран в работе использовали поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат (ПОБВ) молекулярной массы 140 кДа. Для синтеза сополимера использовали штамм-продуцент *Azotobacter chroococcum* 7Б, способный к сверхсинтезу ПОБВ (до 80% биополимера от сухого веса клеток). Для биосинтеза ПОБВ в клетках культуру азотобактера выращивали при 30°C на среде Берка в условиях избыточного содержания источника углерода в среде (г/л): $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,4; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,01; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ – 0,006; цитрат Na – 0,5; $CaCl_2$ – 0,1; $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ – 1,05; KH_2PO_4 – 0,2; сахара – 40; валерат натрия – 20. С целью снижения молекулярной массы в культуральную среду был добавлен ацетат натрия в концентрации 12 г/л.

Процесс выделения и очистки сополимера из биомассы *A. chroococcum* включал следующие стадии: 1) выделение ПОБВ из бактериальной массы экстракцией хлороформом при встряхивании на качалке в течение 12 ч при 37°C; 2) отделение раствора ПОБВ от клеточных остатков фильтрованием; 3) выделение ПОБВ из раствора хлороформа осаждением изопропиловым спиртом; 4) последующее многократное растворение в хлороформе и осаждение изопропанолом; 5) высушивание при 60°C [9, 10].

Получение плёнок и пористых мембран из ПОБВ

Плёночные структуры были использованы в качестве контроля; их готовили из 3% раствора полимера в хлороформе методом литья на стеклянной подложке. Для получения пористых полимерных мембран необходимой формы и внутренней геометрии мы использовали метод порообразования с применением газообразователя, в качестве которого использовался карбонат аммония (“Химмед”, Россия). Карбонат аммония массой 0,1 г измельчали и помещали в чашку Петри (d=50 мм), затем заливали 4 мл 3% раствора ПОБВ в хлороформе (масса/объём), тщательно перемешивали и дожидались полного испарения растворителя. Затем чашку Петри помещали в стакан с горячей (~80°C) дистиллированной водой и дожидались полного прекращения газообразования. После чего полученную пористую мембрану промывали 5 раз дистиллированной водой и лиофилизировали (“Martin Christ”, Германия).

Морфология и пористость мембран

Первичное изучение геометрии поверхности полученных структур проводилось с помощью световой микроскопии (микроскоп Биомед 1 Вар.2 (“Биомед”, Россия) с цифровым окуляром MYscope 300M (“Webbers”, Тайвань).

Микрофотографии получены методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на микроскопе JSM-6380LA (“JEOL”, Япония) с ускоряющим напряжением 20 кВ и максимальным разрешением 10 нм. Предварительно образцы были подготовлены согласно стандартной процедуре с использованием углеродного напыления.

Пористость мембран рассчитывали по формуле [11]:

$$P = 1 - \left(\frac{m_{\text{мембр}}}{V_{\text{мембр}} \cdot \rho_{\text{ПОБ}}} \right) \times 100,$$

где $m_{\text{мембр}}$ – масса мембраны после высушивания, $V_{\text{мембр}}$ – объём мембраны, измеренный с помощью штангенциркуля (“KRINO”, Италия), $\rho_{\text{ПОБ}}$ – средняя плотность полимера, равная 1,26 г/см³. Размер пор определяли по данным СЭМ, а также по данным световой микроскопии с помощью программного обеспечения “Cool Ruler”.

Исследование биосовместимости in vitro

Для оценки биосовместимости полимерных матриксов использовали метод культивирования клеток на поверхности матриксов. Для оценки биосовместимости матриксов были использованы мезенхимальные стволовые клетки (МСК) из жировой ткани человека (“Биолот”, Россия), как наиболее часто применяемые в тканевой инженерии. Клетки культивировали в среде DMEM (“Invitrogen”, США), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (“Invitrogen”). Клетки инкубировали при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂; среду меняли каждые три дня. По шесть образцов плёнок и пористых подложек соответственно, размером 5×5 мм помещали в лунки 96-луночного планшета и клеточную суспензию наносили сверху на каждый образец из расчёта 4000 клеток на образец. Планшеты инкубировали 1, 2, 4 суток. Биосовместимость полимерных систем оценивали с помощью стандартного теста на выживаемость клеток ХТТ (ХТТ Cell Proliferation Kit, “Biological Industries”, Израиль). Количество живых клеток определяли по стандартной калибровочной кривой для теста ХТТ.

Статистическую обработку данных производили с использованием пакета программ SPSS/PC+ Statistics™ 12.1 (SPSS). После подтверждения нормального распределения полученных данных, использовали непараметрический тест Крускала-Уоллиса для оценки достоверности отличий данных по росту клеток на исследуемых образцах полимерных матриксов от роста клеток на контрольном образце пленки ПОБВ. На диаграммах представлены среднее значение ± стандартное отклонение (n=6). Различия считали значимыми при $p < 0,05$.

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

Исследование теплофизических характеристик мембран (измерение температур плавления и кристаллизации, теплоты плавления и кристаллизации, вычисление степени кристалличности) проводили с помощью дифференциального сканирующего калориметра DSC204F1 Phoenix (“Netzsch”, Германия).

Исследование барьерных свойств мембраны in vivo

Исследование включало 2 этапа. Первый этап проводили на 10 половозрелых кроликах породы Шиншилла массой 2-3 кг. Животных, содержавшихся в виварии ЦНИЛ НижГМА при 15-часовом световом дне и температуре +22°C, наркотизировали внутримышечной инъекцией препарата Золетил-100 (“Vibac”, Франция) 4 мл). После этого производили разрез в области бедра, скелетировали наружный край и наружную поверхность гребня подвздошной кости, формировали цилиндрический дефект диаметром 5 мм и закрывали его исследуемой мембраной. Рану послойно ушивали. Через 2 недели животных выводили из эксперимента, выделяли фрагмент костной ткани, с исследуемой областью, фиксировали в 10% растворе формалина и направляли на гистологическое исследование.

Второй этап проводили на 15 половозрелых карликовых свиньях (мини-пигах) породы Визенау, содержавшихся в виварии Научного центра биомедицинских технологий (ФГБУН НЦБМТ ФМБА РФ) при 15 часовом световом дне и температуре +22°C. Животным под внутривенным наркозом (Золетил 5 мг/кг) и местной анестезией проводили скелетирование тела нижней челюсти справа и слева, трепаном формировали критические костные дефекты размером 10×10×5 мм (4 дефекта). Животным первой, опытной группы (n=15), костный дефект закрывали исследуемой мембраной из ПОБ. Животным второй, контрольной группы (n=15), костный дефект закрывали мембраной Остеопласт (“Витаформ”, Россия). Рану послойно ушивали. Процесс регенерации костных дефектов наблюдали через 1,3 и 6 месяцев. Выделенные фрагменты кости фиксировали в 10% растворе формалина и исследовали гистологически.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ*Характеристика мембраны*

Сополимер ПОБВ был синтезирован путём микробиологического биосинтеза. Выход содержащей полимер биомассы штамма-продуцента *A. chroococcum* 7Б составил 3,4±0,4 г/л, содержание ПОБВ в расчёте на сухую бактериальную массу – 67,3±3,2%, молекулярная масса полимера – 1,34×10⁵ Да, молярное содержание мономеров 3-оксибутирата в цепи сополимера – 4,7 мол%. В результате работы из продуцированного биополимера ПОБВ были получены пористые мембраны с размером пор 170±30 мкм и пористостью 89±4% (рис. 1).

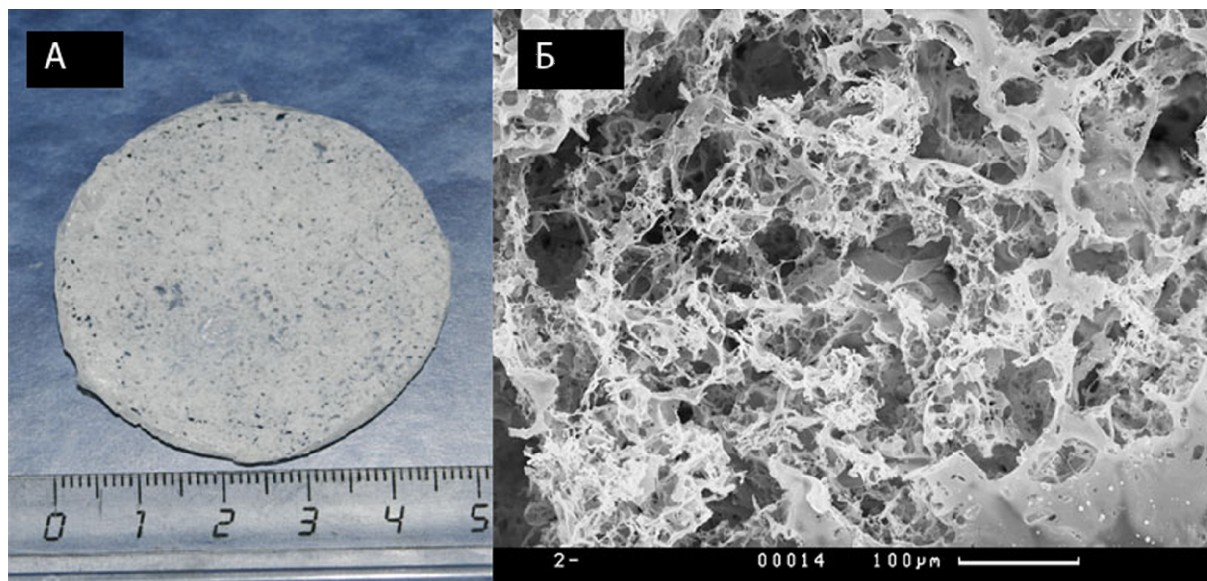


Рисунок 1. Внешний вид полимерной пористой мембраны из ПОБВ (А) и её микроструктура (Б) (СЭМ).

На фотографии, полученной методом сканирующей электронной микроскопии (рис. 1Б), видно, что поверхность мембран имеет множественные поры, соединённые между собой. Придание имплантату пористой поверхности и внутренней структуры очень важно как для стимуляции прикрепления и роста клеток *in vitro*, так и для заместительной регенерации костной ткани *in vivo* [2, 6].

Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК)

Как следует из данных, полученных на основании анализа термограммы ДСК (рис. 2), начальная температура плавления ($T_{m\text{нач}}$) мембраны была 152°C , температура пика плавления ($T_{m\text{пик}}$) – 175°C . Рассчитанная степень кристалличности (X_c) составила 57% (рис. 2). Эти данные соответствуют термо-физическим характеристикам, полученным ранее для плёнок ПОБВ [13], что может свидетельствовать о незначительном влиянии метода порообразования с использованием газообразователя на физико-химические свойства полимера. Следовательно, биосовместимость самого полимерного материала ПОБВ не подверглась значительным изменениям в ходе изготовления полимерной мембраны.

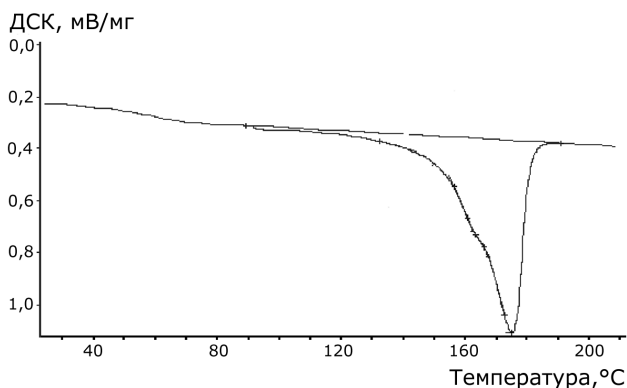


Рисунок 2. ДСК термограмма мембраны из ПОБВ.

Исследование биосовместимости *in vitro* и *in vivo*

Полученные пористые мембраны были проанализированы на биосовместимость *in vitro* с использованием культуры мезенхимальных стволовых клеток человека [2, 6]. По результатам теста на жизнеспособность (рис. 3А) можно с уверенностью утверждать, что данный препарат обладает хорошими адгезивными свойствами и способствует быстрому росту и пролиферации клеток. Видно, что максимальное количество клеток, растущих на поверхности мембраны, было получено уже на 4 сутки культивирования, что говорит о хороших биологических свойствах материала и данной конструкции в целом. Наглядное изображение прикрепленной культуры представлено на фотографиях, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа (рис. 3Б). По-видимому, прикреплению и росту клеток на пористой поверхности мембраны способствует как высокая биосовместимость полимерного материала ПОБВ [13], так и высокопористая поверхность мембраны с размером пор 150-200 мкм, как было показано ранее [15]. Прямая зависимость интенсивности роста клеток от пористости поверхности на полимерных плёнках из ПОБ было показано нами ранее [12].

При исследовании регенерации костного дефекта гребня подвздошной кости кроликов через 14 суток после имплантации мембраны ПОБ было выявлено, что поверхность мембраны окружена рыхлой соединительной тканью, толщиной до 100 мкм, вмещающей в себя четыре слоя фибробластов. Соединительная ткань построена из рыхлых пучков коллагеновых волокон, в которых обнаруживались редкие лимфо- и плазмциты. Кровеносные сосуды с обычным кровенаполнением. Материал имеет начальные признаки резорбции гигантскими клетками инородных тел. Мембрана не вызывает выраженных процессов воспаления, за исключением типичных

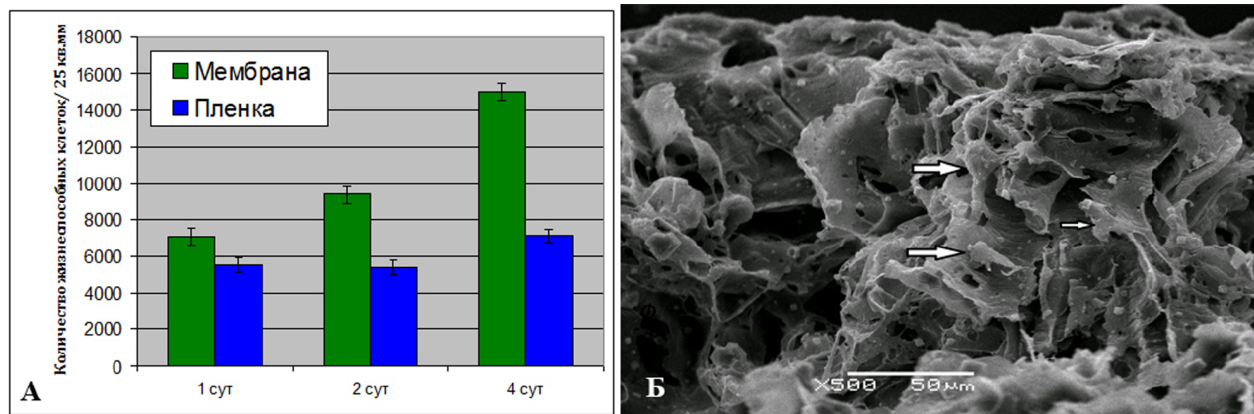


Рисунок 3. Рост мезенхимальных стволовых клеток (МСК) на полимерных системах: данные теста ХТТ (А) и СЭМ (Б).

реакций макроорганизма на инородное тело, не способствует фиброзу, резорбируется клетками макрофагального ряда.

При исследовании образцов костной ткани минипигов на 30, 90 и 180 сутки при моделировании костной раны диаметром 1 см и закрытии костного дефекта по поверхности кортикального слоя мембраной из ПОБ обнаружено, что регенерация костной ткани идет с материнской кости от периферии к центру регенерата, причем центр регенерата на 30 сутки уже заполнен грубоволокнистой соединительной тканью, которая с продвижением фронта костной регенерации постепенно вытесняется кнаружи костного дефекта (рис. 4). На поверхности костных балок большое количество остеобластов, практически все активные. На границе фиброзной и костной ткани очаги ретикулофиброзной костной ткани. На 90 сутки в поверхностных слоях обнаруживается заполняющийся молодой костной тканью (NB) костный дефект, в центре которого расположена фиброзная ткань (FT), оттесняемая костным регенератом кнаружи. Среди волокон фиброзной ткани остаточная инфильтрация плазматическими клетками (рис. 5).

На 180 сутки эксперимента образование кортикальной пластинки с закрытием дефекта практически завершено (рис. 6).

Исследование образцов костной ткани на 30, 90 и 180 сутки при моделировании костной раны диаметром 1 см и закрытии костного дефекта по поверхности кортикального слоя мембраной Остеопласт показало, что регенерация костной ткани на 30 и 90 сутки идет аналогично, как и при закрытии костного дефекта мембраной из ПОБ. На 180 сутки эксперимента кортикальная пластинка имеет грибовидное выпячивание (гиперостоз), состоящий из костных балок с большим количеством активных остеобластов.

Таким образом, сравнительный анализ результатов, полученных при закрытии костных дефектов мембраной из ПОБ и мембраны Остеопласт, выявил ряд принципиальных различий на срок наблюдения 180 дней. Во всех случаях регенеративный процесс в костной ране начинался со дна

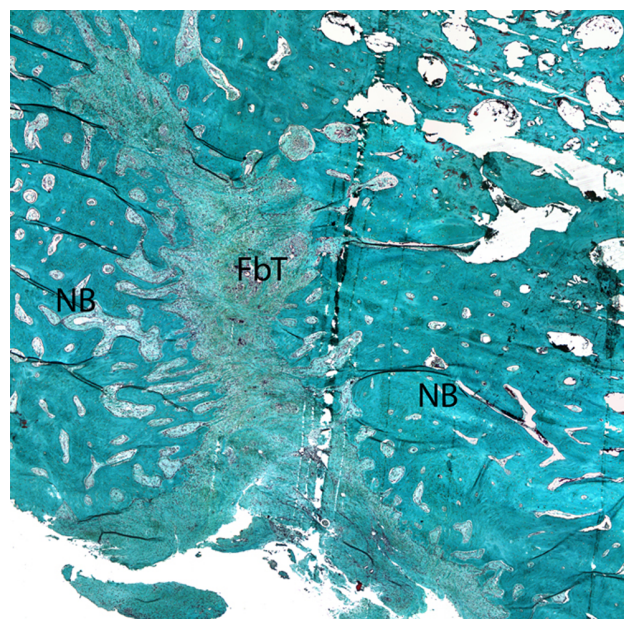


Рисунок 4. Гистологическое строение костного регенерата через 30 дней после операции. Область костного дефекта заполняется ретикуло-фиброзной костной тканью (NB). $\times 32$.

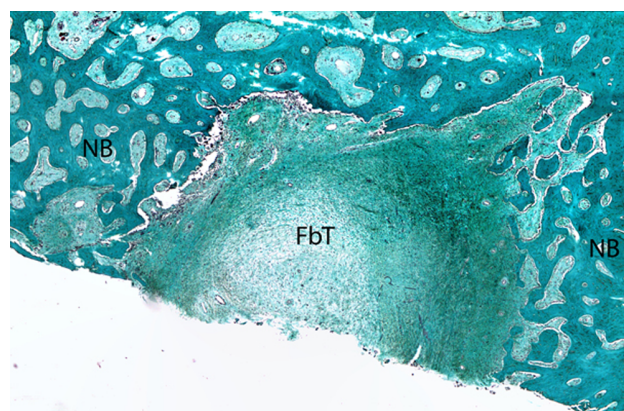


Рисунок 5. Гистологическое строение костного регенерата через 90 дней после операции. Область костного дефекта в наружном отделе заполнена фиброзной тканью (FT). С краёв происходит заполнение дефекта молодой костной тканью (NB). $\times 32$. Окраска по Массон-Голднер.

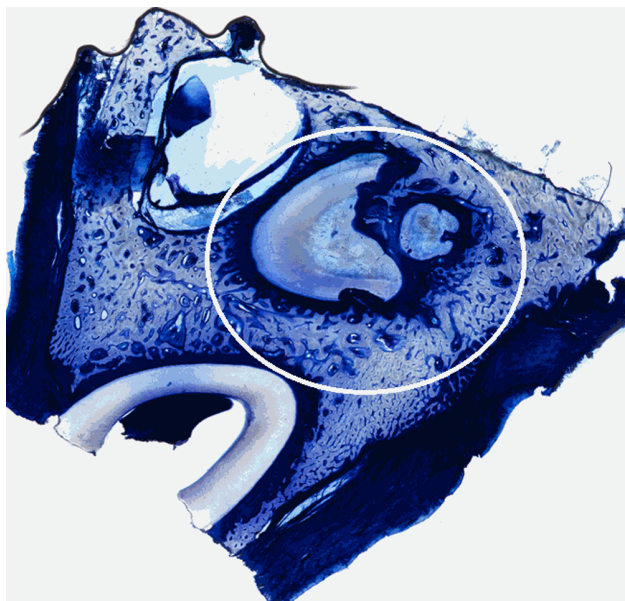


Рисунок 6. Формирование кортикальной пластинки через 180 дней после операции. Область нанесения повреждения обозначена овалом. $\times 32$. Окраска ализияновым синим.

и стенок материнской кости и проникал сквозь сформированную грубоволокнистую соединительную ткань. Во всех случаях на поверхности костных балок ретикулофиброзной костной ткани обнаруживалось значительное количество активных остеокластов, активно образующих остеоид. В свою очередь процессы остеогенеза сопровождались резорбцией корней зубов, с последующим замещением костной тканью. Однако некоторые особенности заживления костной ткани в исследуемых группах всё же обнаруживались. Так при использовании мембраны ПОБ не происходило избыточного образования костной ткани – гиперостоза, в отличие от мембран Остеопласт, где в связи с наличием выраженных остеопротективных свойств мембраны обнаруживался гиперостоз.

Таким образом, разработанную мембрану на основе сополимеров ПОБ можно использовать для закрытия костных дефектов; она сочетает в себе барьерные и регенераторные функции, что доказано экспериментально.

Работа была финансово поддержана грантом РФФИ офи-м, проект № 15-29-04856.

ЛИТЕРАТУРА

1. Робустова Т.Г. (2003) Хирургическая стоматология, Медицина, Москва.
2. Дженкинс М. (ред.) (2010) Полимеры в биологии и медицине (пер. с англ.), Научный мир, Москва.
3. Иванов С.Ю., Гажва Ю.В., Мураев А.А., Бонарцев А.П. (2012) Современные проблемы науки и образования (медицинские науки), **3**, 74.
4. Freier T., Kunze C., Nischan C., Kramer S., Sternberg K., Sass M., Hopt U.T., Schmitz K.P. (2002) *Biomaterials*, **23**(13), 2649-2657.
5. Kunze C., Edgar Bernd H., Androsch R., Nischan C., Freier T., Kramer S., Kramp B., Schmitz K.P. (2006) *Biomaterials*, **27**(2), 192-201.
6. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. (2011) Биомед. химия, **57**, 374-391.
7. Köse G.T., Ber S., Korkusuz F., Hasirci V. (2003) *J. Material Science: Materials in Medicine*, **14**, 121-126.
8. El-Hadi A., Schnabel R., Straube E., Muller G., Henning S. (2002) *Polym. Test*, **21**, 665.
9. Мышкина В.Л., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. (2008) Прикл. биохим. микробиол., **44**(5), 533-538.
10. Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Николаева Д.А., Махина Т.К., Бонарцев А.П., Филатова Е.В., Ружицкий А.О., Бонарцева Г.А. (2010) Прикл. биохим. микробиол., **46**(3), 1-8.
11. Mehrabian M., Nasr-Esfahani M. (2011) *Int. J. Nanomed.*, **6**, 1651-1659.
12. Жаркова И.И., Бонарцев А.П., Босхонджиев А.П., Ефремов Ю.М., Багров Д.В., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Воинова В.В., Яковлев С.Г., Зернов А.Л., Филатова Е.В., Андреева Н.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. (2012) Биомед. химия, **58**, 579-591.
13. Бонарцев А.П., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Багров Д.В., Филатова Е.В., Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А. (2009) Биомед. химия, **55**, 625-635.
14. Bonartsev A.P., Yakovlev S.G., Boskhomdzhiyev A.P., Zharkova I.I., Bagrov D.V., Myshkina V.L., Mahina T.K., Charitonova E.P., Samsonova O.V., Zernov A.L., Zhuikov V.A., Efremov Yu.M., Voinova V.V., Bonartseva G.A., Shaitan K.V. (2013) *PLoS ONE*, **8**(2), e57200.
15. Kim S.S., Park M.S., Jeon O., Cha Yong Choi C.Y., Byung-Soo Kim B.S. (2006) *Biomaterials*, **27**, 1399-1409.

Поступила: 27. 07. 2015.

DEVELOPMENT AND PRECLINICAL STUDIES OF INSULATING MEMBRANES
BASED ON POLY-3-HYDROXYBUTYRATE-CO-3-HYDROXYVALERATE
FOR GUIDED BONE REGENERATION

*S.Yu. Ivanov¹, A.P. Bonartsev^{2,3}, Yu.V. Gazhva¹, I.I. Zharkova², R.F. Mukhametshin¹, T.K. Mahina³,
V.L. Myshkina³, G.A. Bonartseva³, V.V. Voinova², N.V. Andreeva³, E.A. Akulina², E.S. Kharitonova⁴,
K.V. Shaitan², A.A. Muraev¹*

¹Nizhny Novgorod State Medical Academy, Nizhny Novgorod, Russia

²Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University,

1, Bld. 12 Leninskie gory, Moscow, 119992 Russia; tel.: (495) 930-63-06; e-mail: ant_bonar@mail.ru

³Bach Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

⁴Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

Bone tissue damages are one of the dominant causes of temporary disability and developmental disability. Currently, there are some methods of guided bone regeneration employing different osteoplastic materials and insulation membranes used in surgery. In this study, we have developed a method of preparation of porous membranes from the biopolymer poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate (PHBV), produced by a strain of *Azotobacter chroococcum* 7B. The biocompatibility of the porous membranes was investigated *in vitro* using mesenchymal stem cells (MSCs) and *in vivo* on laboratory animals. The cytotoxicity test showed the possibility of cell attachment on membrane and histological studies confirmed good insulating properties the material. The data obtained demonstrate the high biocompatibility and the potential application of insulating membranes based on PHBV in bone tissue engineering.

Key words: poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), isolating membrane, porous scaffold, guided bone regeneration, bone tissue