

ISSN 0039-1735 (Print)
ISSN 2309-5318 (Online)

СТОМАТОЛОГИЯ

Том 93



1'2014

Научно-практический журнал
Основан в 1922 г.



МедиаСфера

Сравнительная характеристика материалов на основе хитозана, альгината и фибрина в комплексе с β -трикальцийфосфатом для остеопластики (экспериментально-морфологическое исследование)

К.м.н. А.Н. ГУРИН^{1,2*}, д.т.н. В.С. КОМЛЕВ³, к.т.н. А.Ю. ФЕДОТОВ³, к.б.н. А.Л. БЕРКОВСКИЙ⁴, к.м.н. В.Е. МАМОНОВ⁴, д.м.н. А.С. ГРИГОРЬЯН¹

Comparative study of osteoplastic materials based on chitosan, alginate or fibrin with tricalcium phosphate

A.N. GURIN^{1,2}, V.S. KOMLEV³, A.YU. FEDOTOV³, A.L. BERKOVSKI⁴, V.E. MAMONOV⁴, A.S. GRIGORYAN¹

¹Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Минздрава РФ; ²Первый МГМУ им. Сеченова; ³ИМЕТ им. А.А. Байкова РАН; ⁴ФГБУ ГНЦ Минздрава РФ

Приведена сравнительная характеристика пористых композиционных материалов на основе хитозана, альгината и фибрина, содержащих β -трикальцийфосфат. Гистологическое исследование выявило различие биологического ответа. Наиболее перспективный материал — комплекс фибрин- β -трикальцийфосфат.

Ключевые слова: фибрин, фибриноген, хитозан, альгинат, трикальцийфосфат, костный дефект, регенерация костной ткани.

The study presents comparative analysis of porous composites made of chitosan, alginate, fibrin with beta-tricalcium phosphate. Histological findings on Wistar rat condyles showed that fibrin-beta-TCP-based composite had the most effective positive biological response.

Key words: fibrin, fibrinogen, chitosan, alginate, tricalcium phosphate, bone defect, bone regeneration.

Восстановление поврежденных тканей организма биосовместимыми материалами — актуальная проблема современной медицины. Перспективными материалами для остеопластики могут быть многофункциональные биополимерные матриксы на основе хитозана (ХТЗ), альгината (АЛГ) и фибрина в сочетании с кальций-фосфатной керамикой.

ХТЗ получают из хитина — второго по распространенности биополимера после целлюлозы — в реакциях деполимеризации и деацетилирования при щелочном гидролизе либо с помощью гидролитических ферментов хитиназы и деацетилазы из панциря ракообразных [1]. Хитин является биополимером, состоящим преимущественно из остатков N-ацетилглюкозамина и меньшего количества N-глюкозамина (рис. 1). В ХТЗ соотношение между количеством этих мономеров противоположное. ХТЗ нерастворим при нейтральном или щелочном значении pH и растворяется при подкислении, когда протонируются свободные аминогруппы. Его растворимость зависит и от соотношения между свободными аминогруппами ($R-NH_3^+$) и ацетамидными группами ($R-NHCOCH_3$). Скорость деградации ХТЗ и степень его деацетилирования обратно пропорциональны уровню его кристаллизации. У ХТЗ есть много дериватов с соединениями, имеющими анион-

ные группы, так как он легко вступает в химические реакции.

ХТЗ используют как биосовместимое, биорезорбируемое и биоадгезивное соединение [7, 21, 35] в медицинских и фармацевтических целях, в том числе в разных имплантационных и инъекционных системах, в ортопедических и пародонтальных композитах [37], при обработке ран, регенерации мягких и твердых тканей [22], как биоактивный гемостатический агент с антитромбогенными свойствами [21, 36, 37] и как стимулятор иммунной системы хозяина против вирусной и бактериальной инфекции

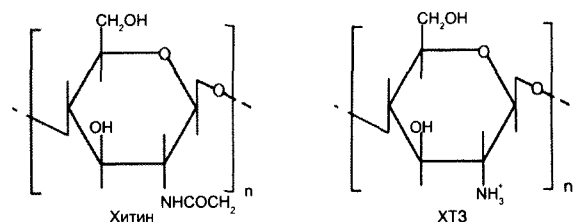


Рис. 1. Структура мономеров хитина (N-ацетилглюкозамин) и ХТЗ (глюкозамин) [6].

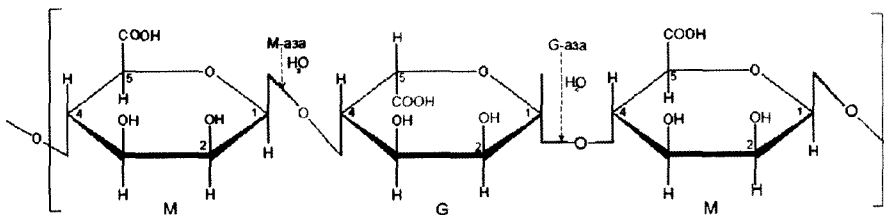


Рис. 2. Демонстрация полимерной структуры АЛГ при гидролизе $\beta(1\ 4)$ гликозидных связей между М-Г-мономерами — β -D-маннуроназой (М-азой) и α -L-(1 4) гликозидных связей между G-М-мономерами α -L-гулуранозой (G-азой) [7].

[1]. В результате биодegradации ХТЗ высвобождаются аминокислоты, которые могут включаться в обменные превращения гликозаминогликанов и гликопротеинов и затем экскретироваться [13]. ХТЗ может выполнять специфические клеточные функции, индуцируя цитокины, благоприятно влияющие на гистоархитектонику соединительной ткани, улучшать остеогенез, ангиогенную активность, состояние тканей суставных хрящей [28, 34], кожных регенератов. Матрицы из ХТЗ (губки) с наполнителями из гидроксиапатита (ГА) могут применяться для регенерации костной ткани [2, 3]. Один из недостатков ХТЗ — присутствие в его составе некоторого количества недеацетилированного хитина, что снижает его остеопластические свойства и повышает долю соединительнотканной компоненты.

АЛГ — безазотистые полисахариды; с молекулярной точки зрения они представляют собой семейство неразветвленных бинарных сополимеров, состоящих из связанных [1—4]-гликозидными связями остатков бета-D-мануровой (М) кислоты или ее C-5-эпимера альфа-L-гулурановой кислоты (G), образующих длинные цепи (рис. 2). При низкой температуре АЛГ плохо растворим, а при высокой температуре способен образовывать гели [7].

Коммерческие АЛГ производятся в основном из водорослей *Laminaria hyperborea*, *Macrocystis pyrifera* и *Ascophyllum nodosum*. Наиболее высокое содержание α -D-гулурановой кислоты обычно характерно для АЛГ, изготовленных из полосок старых растений *L. hyperborea*. АЛГ из *A. nodosum* и *L. japonica* отличаются низким содержанием G-блоков и невысокой прочностью геля. Альгинат из *M. pyrifera*, чаще всего используемый для иммобилизации, образует гели меньшей прочности и стабильности, чем АЛГ, изготавливаемый из полосок *L. hyperborea*. Бактериальный АЛГ, имеющий более сложный состав, можно выделить из *Azotobacter vinelandii*, который, в отличие от вида *Pseudomonas*, образует полимеры, содержащие G-блоки. АЛГ с высоким содержанием гулурановой кислоты можно также получить из некоторых водорослевых тканей путем химического фракционирования *in vitro* с использованием маннуроновой C-5-эпимеразы из *A. vinelandii*. Коммерческого использования таких модифицированных видов полимеров мы не выявили.

АЛГ используется как материал для получения зубных слепков [4, 6]. Он обладает биосовместимостью, неиммуногенностью и гидрофильностью [32]. Химически модифицированный АЛГ применяется в клинике в качестве матрикса для доставки лекарственных веществ и клеток в поврежденные участки [10, 11]. К недостаткам этого материала можно отнести то, что он не резорбируется естественным образом под действием ферментов, так как

не имеет лиганд для клеточной адгезии, и поэтому клетки не склонны естественным образом АЛГ связываться с АЛГ [33]. При модификации АЛГ RGD-пептидами к нему могут прикрепляться клетки типа миобластов. Меняя концентрацию RGD-пептидов и состав АЛГ, т.е. соотношение М/G, можно управлять фенотипом миобластов [30]. АЛГ с ионной перекрестной связью растворяются при нейтральном pH, утратив 2-валентные катионы перекрестной связи, что приводит к неконтролируемому и медленному распаду *in vivo* [10, 11].

Фибрин существенно отличается от полисахаридов по происхождению и составу. Он представляет собой последний этап коагуляционного каскада за счет активации фибриногена тромбином. В результате от фибриногена отщепляются 2 пептида А и 2 пептида Б (рис. 3, а, б) [8]. После отщепления пептидов, получивших название «фибрин-пептидов», фибриноген превращается в хорошо растворимый в плазме крови фибрин-мономер, который при участии факторов XIII, XIIIa и Ca^{2+} переходит в фибрин-полимер (см. рис. 3, б). В результате разрыва концевых связей фибрин-мономера формируются фибрин-димеры, которые растут латерально в виде протофибрилл. Поперечные связи протофибрилл инициируются тромбином с конверсией фактора XIII в транслугуминазу (фактор XIIIa), способную связывать стороны цепей лизина и глутамина изопептидными связями. В формировании фибрин-полимера участвует фибронектин, который при участии фактора XIIIa усиливает модуль эластичности жесткого кровяного сгустка за счет альфа-поперечных связей альфа-протофибрилл (см. рис. 3, б).

Фибрин может связываться с биологическими тканями посредством ковалентных водородных или электростатических связей либо путем механического прикрепления [31]. Он образует ковалентные связи с фибронектином и коллагеном с помощью фактора XIIIa, а также может связываться с тромбоцитами, мегакриоцитами и фибробластами через комплекс рецептора GPIIb/IIIa, прикрепляясь таким образом сгустком к коллагену. Продукты распада фибрина, образующиеся в результате протеолитического расщепления, стимулируют миграцию моноцитов, которые далее трансформируются в макрофаги, удаляя разложившийся фибрин посредством фагоцитоза. Стимулированные фибробласты, мигрирующие в фибриновую сеть, депонируют коллаген и выделяют активаторы плазминогена, способствуя лизису фибрина и тем самым активируя ревазуляризацию тканей. В настоящее время существуют 2 формы практического применения фибрина в тканевой инженерии. Это — адгезивный фибрин-силант (герметик) и непористый фибрин-гидрогель, который обычно используется для стимуляции клеточного

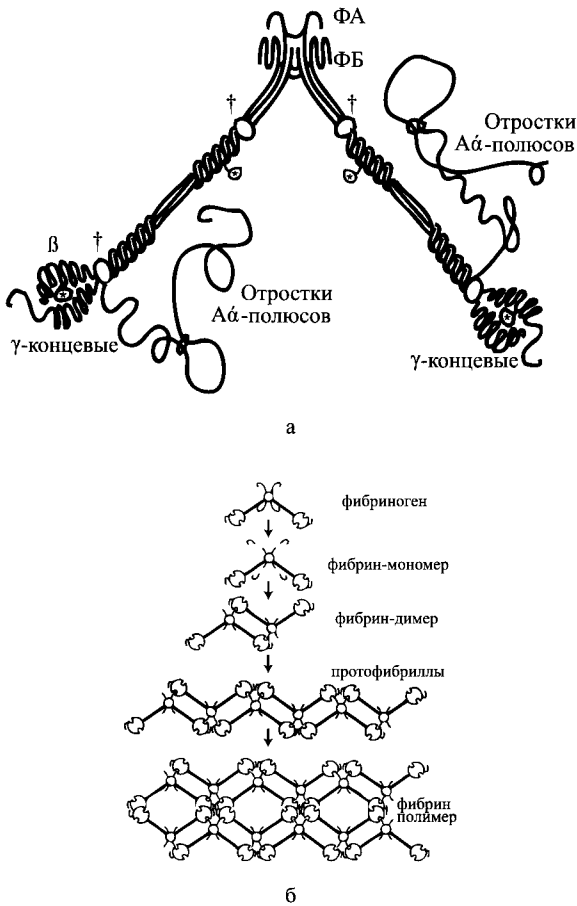


Рис. 3. а — схема фибриногеновой молекулы.

Базисная структура состоит из 3 пар полипептидных цепей α , β и γ , соотносящихся как зеркальное отражение; ФА- и ФБ-фибринопептиды А и Б; * — карбонатгидратные кластеры; + — дисульфидные кольца [24];

б — схема полимеризации фибрина.

Тромбин удаляет терминальные пептиды, оставляя α - и β -возвышения, которые подходят соответственно в углубления латеральных доменов; модифицированный фибриноген переходит в фибрин-мономер, который связывается с другим мономером, формируя димер; латеральный рост ведет к формированию протофибрилл; антипараллельные поперечные связи в дальнейшем приводят к сетчатой структуре фибрин-полимера [14].

роста поврежденных хрящей [12, 27] и кости [16, 20]. Фибриновые силанты (герметики или фибриновый тканевый клей) нашли широкое применение при хирургических операциях в стоматологии [5, 16] для склеивания тканей, как кровоостанавливающие вещества и герметизирующие матрицы роста [9, 15, 19, 23, 25, 26, 29]. L. Le Guehennec и соавт. (2004) приводят данные о положительном и отрицательном влиянии взаимодействия фибринового силанта с кальций-фосфатной керамикой на процессы формирования костной ткани.

В данной работе проведено сравнительное экспериментально-морфологическое исследование биополимеров ХТЗ, АЛГ и фибрина в комплексе с кальций-фосфатной керамикой β -трикальцийфосфата (β -ТКФ). Разработана единая методика получения полимерных матриц, содержащих гранулы β -ТКФ. Проведена оценка остеопластических свойств при замещении дефектов костной ткани *in vivo*.

Материал и методы

Полимерные матрицы, армированные гранулами β -ТКФ

Для получения композиционных материалов использовали технологию вспенивания с последующей сублимационной сушкой. Данная технология позволяет получить материал с высокой пористостью (до 98%) и взаимосвязанными порами. В качестве биополимеров использовали высокомолекулярный (500 кДа) ХТЗ, АЛГ натрия и фибриноген. Готовили 2% водную суспензию полимера. В суспензию вводили гранулы β -ТКФ в количестве до 20 масс.% и подвергали интенсивному перемешиванию. Гранулы β -ТКФ получали методом, описанным в работе V. Komlev и соавт. [17]. Размер гранул — 200–800 мкм. Вспенивание осуществляли при 2000 об/мин, используя приводную мешалку. Пену помещали в полиэтиленовую квадратную форму (10/10/4 мм) и фиксировали структуру (замораживали). Заморозку продолжали до образования кристаллов льда по всему объему материала при температуре -18°C . Затем проводили сублимационную сушку материалов. Полученные матрицы отмывали и полимеризовали. Образцы сушили при температуре 50°C до полного удаления жидкой фазы.

Материалы изучали на микроскопе Tescan Vega II (Чехословакия) при напряжении 10–15 кВ. Фазовый состав керамики контролировали с использованием рентгенофазового дифрактометра Shimadzu (Япония).

Остеопластические свойства полученных матриц оценивали с помощью модели костного дефекта эпифиза бедренной кости крыс линии Вистар массой 230–250 г. Тестированию подвергали 3 материала. В экспериментальных исследованиях было сформировано 4 группы по 3 животных в каждой: 1-я (контрольная); дефект заживал под кровяным сгустком; во 2-й группе использовали матрицы из ХТЗ с наполнителем β -ТКФ; в 3-й — матрицы из АЛГ с наполнителем β -ТКФ; в 4-й — матрицы из фибрина с наполнителем β -ТКФ.

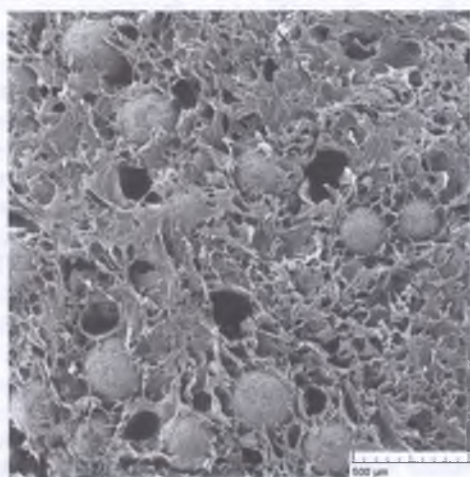
Оперативные вмешательства выполнены в области латерального мышечка бедренной кости в зоне эпифиза. Под гексеналовым наркозом моделировали дырчатый дефект диаметром около 2,5 мм и длиной около 4 мм, в который вводили исследуемый материал. Операционную рану ушивали послойно. Срок эксперимента составлял 30 сут. После выведения животных из эксперимента выделяли макропрепараты. Образцы фиксировали в 10% нейтральном формалине, декальцинировали в ЭДТА, промывали, обезжовивали, заливали в парафин и готовили серийные срезы. Окраску производили гематоксилином и эозином. Гистологические препараты изучали на микроскопе Motic (Италия). Статистическая обработка данных выполнялась с использованием апостериорного сравнения по критерию Тьюки.

Результаты и обсуждение

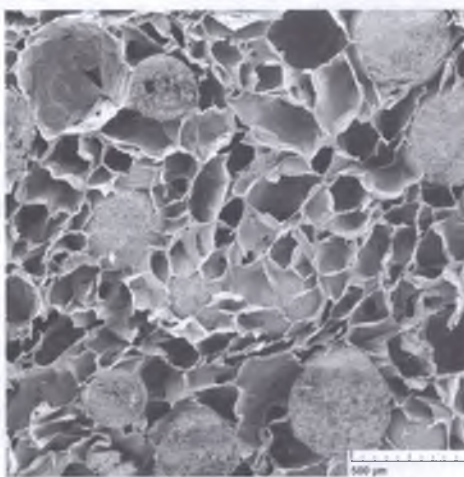
Сканирующая электронная микроскопия (СЭМ)

Полимерный композит ХТЗ: β -ТКФ

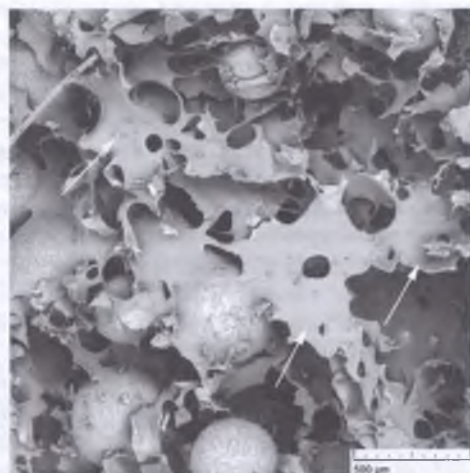
Поверхность хитозанового композиционного материала была представлена губчатой, пористой структурой, содержащей гранулы β -ТКФ. Хитозановые волокна плотно соединены с фосфатами кальция (рис. 4, а). На попе-



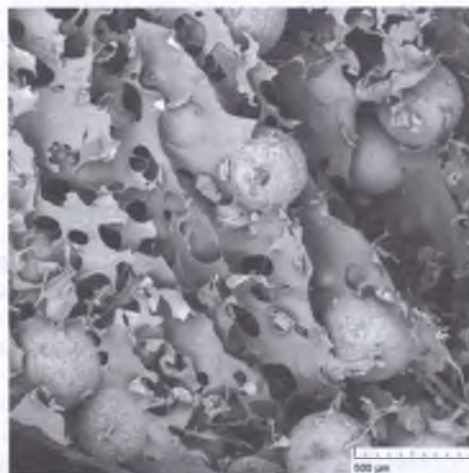
а



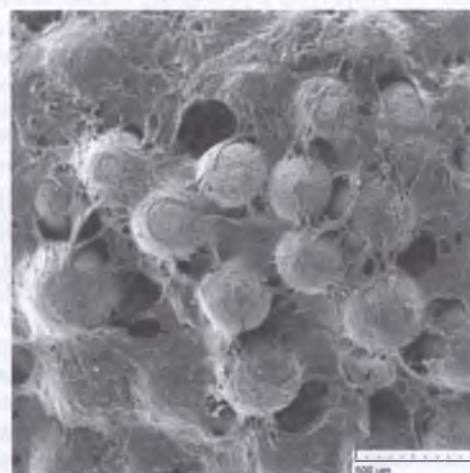
б



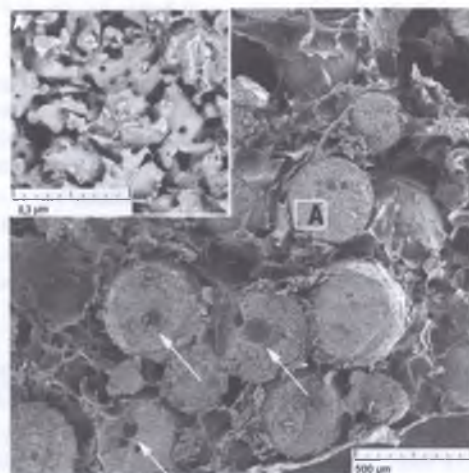
в



г



д



е

Рис. 4. СЭМ композиционных материалов.

а — поверхность хитозанового матрикса представлена пористой губчатой структурой, в которой хитозановые волокна плотно связаны с гранулами β -ТКФ; б — на поперечном срезе хорошо виден ячеистый характер матрикса; в — неравномерный, пластинчатый, пористый вид альгинатного комплекса (одинарные стрелки); г — на поперечном срезе определяется равномерное распределение гранул ТКФ; отмечается высокая пористость матрикса; д — фибрин плотно покрывает выступающие над поверхностью гранулы β -ТКФ; е — поперечный срез композита, видны гранулы, имеющие большие внутренние полостные образования (одиночные стрелки); при большем увеличении (участок А) они представлены характерными для данного материала зернами овальной или кубической формы (одинарная стрелка), плотно прилегающими друг к другу; между зернами видны мелкие поры размером около 0,1–0,2 мкм (стрелки углом).

К статье *А.Н. Гурина и соавт.* «Сравнительная характеристика материалов на основе хитозана, альгината и фибрина в комплексе с β -трикальцийфосфатом для остеопластики (экспериментально-морфологическое исследование)»

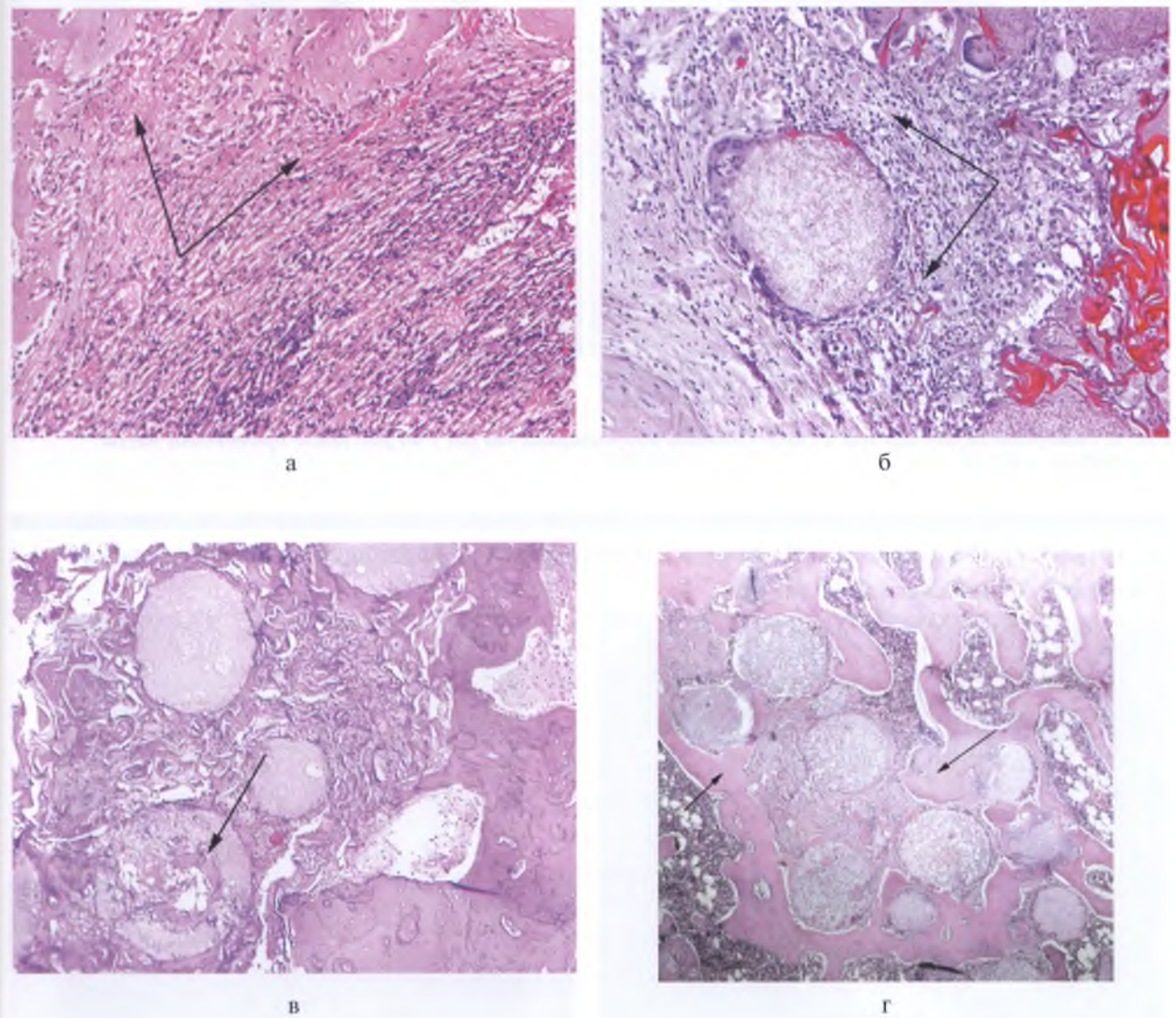


Рис. 5. Гистомикрофотограмма исследуемых образцов.

а — контрольная группа, заживление костного дефекта под кровяным сгустком, формирование в дефекте кости полей молодой и грубоволокнистой соединительной ткани, по краям дефекта видны костно-хрящевые несовершенные структуры (стрелки углом). Ув. 100; б — группа с имплантацией материала ХТЗ+ β -ТКФ, включения имплантационного материала окружены полями грануляционной ткани (стрелки углом), справа — пучок хитиновых волокон; здесь часто обнаруживались гигантские многоядерные клетки типа гигантских многоядерных остеокластов; последние располагались преимущественно у гранул β -ТКФ. Ув. 100; в — группа АЛГ+ β -ТКФ; новообразование костных структур вокруг гранул β -ТКФ; иногда костные балки появлялись внутри гранул β -ТКФ (одинарная стрелка). Ув. 100; г — группа фибрин+ β -ТКФ; интенсивное новообразование костного вещества вокруг гранул β -ТКФ сопровождалось активным клазированием их вещества гигантскими многоядерными клетками; значительные территории межгранулярных пространств и местами — внутри гранул β -ТКФ занимали новообразованные костные структуры, частью подвергающиеся созреванию (одинарные стрелки). Ув. 100.

речном срезе хорошо определяется ячеистый характер матрикса с тонкими стенками (см. рис. 4, б).

Полимерный композит АЛГ: β-ТКФ

Поверхность альгинатного композита выглядит как пористый матрикс, который неравномерно покрывает гранулы β-ТКФ (см. рис. 4, в). Изучение его в разных плоскостях показало, что гранулы частично покрыты АЛГ. Поперечные срезы представлены на рис. 4, г.

Полимерный композит фибрин: β-ТКФ

Поверхность фибрин-матрикса представлена тонкой фибриновой пленкой, покрывающей гранулы (см. рис. 4, д). Она достаточно однородна, с большими порами. Фибриновые волокна плотно входят в контакт с пористой, рыхлой структурой гранул, на поперечных срезах которых можно наблюдать большие полостные образования (см. рис. 4, е).

Гранулы β-ТКФ состоят из зерен овальной или кубической формы с четко различимыми границами, между которыми можно наблюдать небольшие поры размером около 1 мкм (см. рис. 4, е, участок А). Гранулы равномерно распределены в полимерных матриксах.

Гистологическое исследование

Группа 1 (контрольная). Заживление костного дефекта под кровяным сгустком

Через 30 дней в костном дефекте сохранялись обширные области, занятые грубоволокнистой соединительной тканью. В то же время по краям костного дефекта отмечалось формирование новой трабекулярной костной ткани с фиброзным матриксом. Местами по краям регенерата имелись участки образований хондроподобной ткани, а также образования вновь формирующегося костного вещества с образованием костно-хрящевых структур (рис. 5, а, см. на цв. вклейке).

Группа 2. Заживление костных дефектов при имплантации в него ХТЗ: β-ТКФ

В гистологических препаратах в костном дефекте определялись депозиты имплантированного материала, содержащего скопления гранул β-ТКФ с оксифильно окрашенным матриксом и «волоконками» хитина. Последние выглядели как ветвистые образования из плотного оксифильного вещества. Хитиновые образования в матриксе распределялись неравномерно. У входа в костный дефект в матриксе ХТЗ их количество было незначительным, в глубоких отделах возрастало (см. рис. 5, б на цв. вклейке).

Хитозановый матрикс на всем протяжении замещался клеточно-волоконистой соединительной тканью, так что ячеисто-губчатый характер исчезал. Окружала имплантированный материал соединительнотканная капсула, прилежащая снаружи к костной ткани дефекта (см. рис. 5, б). Наличие капсулы и хитозановых волокон существенно препятствует формированию костных структур, что находит отражение в слабой капиллярной сети. Процессы резорбции гранул и образование костного матрикса слабо выражены, что снижает возможность его использования как остеопластического материала при заживлении костных дефектов.

В предыдущих исследованиях композита ХТЗ — карбонат ГА (ХТЗ:КГА) при заживлении костных дефектов

процесс резорбции гранул КГА и формирование трабекулярной кости происходило более активно, чем при использовании β-ТКФ [2]. Отмечалось присутствие достаточно большого количества хитиновых образований и соединительнотканной компоненты вокруг них, что тормозило образование костных структур. Эти данные согласуются с результатами настоящего исследования. Как отмечает автор, со временем небольшие чешуйки хитина постепенно поглощаются новообразованной костной тканью и практически не подвергаются резорбции. Тем не менее несмотря на эти отрицательные свойства, ХТЗ используется при получении биорезорбируемых мембран для направленной тканевой регенерации [18].

Группа 3. Замещение костного дефекта при имплантации АЛГ: β-ТКФ

У входа в костный дефект определяется альгинатный композит, содержащий гранулы β-ТКФ; он имеет оксифильный пористый вид и окружен соединительнотканной капсулой, по периферии прилежащей к костному матриксу. Ближе к центральным отделам дефекта губчатый характер альгинатного матрикса сохраняется, его ячейки инфильтрованы клетками фибробластического ряда. В некоторых гранулах происходит инвазия клеточных элементов, но образование остеοидной ткани вокруг них идет крайне медленно. Это затрагивает и альгинатный матрикс, который со временем минерализуется. В других местах можно наблюдать плотные, мелкопористые структуры с небольшим количеством клеточных элементов (см. рис. 5, в на цв. вклейке) типа фибробластов. Капиллярная сеть выражена слабо, активной резорбции альгинатного матрикса не происходит, он сохраняет ячеистый характер. Возможно, это связано с тем, что АЛГ не имеет рецепторов для клеточной адгезии в отличие от фибрина и ХТЗ. Плотные мелкопористые образования в альгинатном матриксе — это участки, у которых не сформировалась ячеистой структуры в результате отсутствия гранул, что приводит к их постепенной минерализации. Это можно наблюдать на поверхности альгинатного композита (см. рис. 5, в).

Группа 4. Заживление костного дефекта при имплантации фибрина: β-ТКФ

В этот срок наблюдения гранулы β-ТКФ окружает фибриновый матрикс, представленный полями соединительной ткани с обилием капилляров (см. рис. 5, г на цв. вклейке). У некоторых видны отложения оксифильного остеοидного вещества. Матрикс гранул β-ТКФ разрежен и подвергается резорбции; в них можно наблюдать прорастание клеточных элементов, преимущественно макрофагов. В центральных отделах дефекта соединительнотканная компонента фибрина уменьшалась, начинали преобладать костные структуры, поглощающие гранулы β-ТКФ. Костный матрикс формировался не только вокруг гранул β-ТКФ, но и в них самих; на месте резорбируемого материала образовывалась остеοидная ткань. Активизация остеобластических процессов сопровождалась обилием капилляров и присутствием гигантских многоядерных клеток.

Полученные нами результаты согласуются с данными С. Weinand и соавт. [39]. Авторы использовали гидрогели из фибрина и АЛГ, содержащие пористые блоки β-ТКФ, которые помещали в среду, содержащую мезенхимальные

воловые клетки. Через 4 нед на образцах из фибрина обзавывались костные структуры, что подтверждалось спрессией генов белка кости, сравнимой с таковой в навной кости. АЛГ незначительно поддерживал образование костной ткани после 6 нед, а также демонстрировал изкий уровень транскрипции генов. Однако образцы с ЛГ характеризовались более высокими показателями сопротивления биомеханическому сжатию, чем у фибрина, о, возможно, связано с большой длительностью распада ЛГ [38].

Таким образом, изучение композиционных материалов с помощью СЭМ показало, что происхождение материала и его состав существенно влияют на микроструктуру.

Композиционные материалы на основе ХТЗ и АЛГ обладают биосовместимостью, биорезорбцией и могут стимулировать остеопластические процессы. Однако они резорбируются не до конца, а с сохранением характерных для них фрагментов. У ХТЗ — это хитин, который обнаруживается на гистопрепаратах, а у АЛГ — полифенолы и другие примеси. Хитозановый матрикс замещается в основном соединительной тканью со слабой резорбцией

гранул β -ТКФ, слабовыраженными остеопластическими процессами и капиллярной сетью, но с большим количеством хитиновых волокон, которые и задерживают эти процессы.

Фибрин лишен указанных недостатков, так как является составной частью метаболизма ткани. При его резорбции продукты распада стимулируют образование макрофагов, фибробластов, капиллярной сети. Находясь в центре дефекта, гранулы β -ТКФ постепенно замещаются новообразованной костной тканью, т.е. наблюдаются преимущественно костные структуры и в меньшей степени — соединительнотканые.

Итак, согласно результатам исследования, композит фибрин: β -ТКФ является более перспективным материалом для целей остеопластики, чем композиты из ХТЗ и АЛГ, и в дальнейшем может быть рекомендован к широкому применению в челюстно-лицевой хирургии.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант РФФИ 12-03-33074 мол_а_вед).

ЛИТЕРАТУРА

1. Байтукалов Т.А., Богословская О.А., Ольховская И.Н. и др. Регенеративная активность и антибактериальный эффект низкомолекулярного хитозана. Известия Российской академии наук. Серия биол 2005; 6: 659—663.
2. Гурин А.Н. Сравнительная оценка влияния различных остеопластических материалов на основе фосфатов кальция на заживление костных дефектов: Автореф. дис. ... канд. мед. наук 2009; 123.
3. Гурин А.Н., Комлев В.С., Федотов А.Ю., Фадеева И.В., Смирнов В.В., Баринов С.М. Влияние хитозанового матрикса, содержащего гранулы карбонгидроксипалатита, на заживление костных дефектов в эксперименте. Перспективные материалы. Приложение: Материалы I Международной конференции «Функциональные наноматериалы и высококачественные вещества» 2008; 1—6.
4. Желудев С.Е. Адгезивные средства в ортопедической стоматологии. М: Стоматология 2007; 108.
5. Майбородит И.В., Колесников И.С., Шевелева А.И. и др. Влияние фибринового сгустка при повреждении кости нижней челюсти в эксперименте. Стоматология 2011; 4: 9—12.
6. Пестов А., Бондарь Ю., Мирсаев Т. Стоматологические материалы из хитозана и карбоксиэтилхитозана. Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана. Материалы VIII Международной конференции. М: ВНИРО 2006: 233—236.
7. Петрович Ю.А., Гурин А.Н., Гурин Н.А., Киченко С.М. Перспективы применения в стоматологии полифункциональных биополимеров хитозана и альгината. Рос стомат журн 2008; 2: 67—73.
8. Стуров В.Г., Чупрова А.В., Антонов А.Р. и др. Конечный этап свертывания крови в норме и патологии. Тромбоз, гемостаз и реология 2006; 3: 13—19.
9. Aving B.M., Weinstein M.J., Finlayson J.S. et al. Fibrin sealant: Summary of a conference on characteristics and clinical uses. Transfusion 1995; 35: 783—790.
10. Andersen Th. Alginates as biomaterials in tissue engineering. Carbohydr Chem 2012; 37: 227—258.
11. Augst A., Kong H., Mooney D. Alginate hydrogels as biomaterials. Macromol Biosci 2006; 6: 623—633.
12. Beck E., Duckert F., Ernst M. The influence of fibrin stabilizing factor on the growth of fibroblasts in vitro and wound healing. Thromb Diath Haemorrh 1961; 6: 485—491.
13. Chatelet C., Damour O., Domard A. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. Biomaterials 2001; 22: 261—268.
14. Fuss C., Palmaz J.C., Sprague E.A. Fibrinogen: structure, function, and surface interactions. J Vasc Interv Radiol 2001; 12: 677—682.
15. Janmey P.A., Winer J.P., Weisel J.W. Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. Journal of the Royal Society Interface 2009; 6: 1—10.
16. Ito K., Yamada Y., Naiki T. et al. Simultaneous implant placement and bone regeneration around dental implants using tissue-engineered bone with fibrin glue, mesenchymal stem cells and platelet-rich plasma. Clin Oral Implants Res 2006; 17: 579—586.
17. Komlev V.S., Barinov S.M., Koplik E.V. A method to fabricate porous spherical hydroxyapatite granules intended for time-controlled drug release. Biomaterials 2002; 23: 3449—3454.
18. Kuo S.M., Niu G.C., Lan C.W. et al. Guided tissue regeneration with use of CaSO₄-Chitosan composite membrane. Journal of Medical and Biological Engineering 2009; 29: 304—310.
19. Le Guehennec L., Layrolle P., Daculsi G. A review of bioceramics and fibrin sealant. Eur Cell Mater 2004; 8: 1—11.
20. Le Nihouannen D., Guehennec L.L., Rouillon T. Micro-architecture of calcium phosphate granules and fibrin glue composites for bone tissue engineering. Biomaterials 2006; 27: 2716—2722.
21. Li X.Y., Jin L.J., McAllister T.A. et al. Chitosan-alginate microcapsules for oral delivery of egg yolk immunoglobulin (IgY). J of Agric Food Chem 2007; 55: 2911—2917.
22. Ma L., Gao C., Mao Z. et al. Collagen-chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. Biomaterials 2003; 24: 4833—4841.
23. Marchac D., Renier D. Fibrin glue in craniofacial surgery. J Craniofac Surg 1990; 1: 57—60.
24. Marder V.J., Francis C.W., Doolittle R.F. Fibrinogen structure and physiology. Hemostasis and Thrombosis: Basic Principles and Clinical Practice. R. W. Colman, J. Hirsh, V.J. Marder, and E.W. Salzman, editors. J.B. Lippincott Company, Philadelphia 1982; 163.
25. Martinowitz U., Ozer Y., Varon D. et al. Fibrin sealing in nerve repair. Thromb Haemost 1993; 69: 1287.
26. Martinowitz U., Schulman S. Fibrin sealant in surgery of patients with a hemorrhagic diathesis. Thromb Haemost 1995; 74: 486—492.
27. Mosher D.F. Cross-linking of fibronectin to collagenous proteins. Mol Cell Biochem 1984; 58: 63—68.
28. Pasparakis G., Bouropoulos N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. Int J of Pharmaceutics 2006; 323: 34—42.

29. *Radosevich M., Goubran H.I., Burnouf T.* Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. *Vox Sang* 1997; 72: 133–143.
30. *Rowley J.A., Mooney D.J.* Alginate type and RGD density control myoblast phenotype. *J Biomed Mater Res* 2002; 60: 217–223.
31. *Sierra D.H.* Fibrin sealant adhesive systems: A review of their chemistry, material properties and clinical applications. *J Biomater Appl* 1993; 7: 309–352.
32. *Shapiro L., Cohen S.* Novel alginate sponges for cell culture and transplantation. *Biomaterials* 1997; 18: 583–590.
33. *Smetana K. Jr.* Cell biology of hydrogels. *Biomaterials* 1993; 14: 1046–1050.
34. *Suh I.K.F., Matthew H.* Application of chitosan- based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* 2000; 21: 2589–2598.
35. *Tarsi R., Muzzarelli R., Guzman C. et al.* Inhibition of *Streptococcus mutans*. Adsorption of hydroxyapatite by low-molecular weight chitosans. *J Dent Research* 1997; 76: 2: 665–672.
36. *Tonnesen H.H., Karlsen J.* Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev Bid Pharm* 2002; 28: 621–630.
37. *Wang L., Khor E., Lim L.-Y.* Chitosan-alginate-CaCl system for membrane coat application. *J Pharma Sciences* 2001; 90: 8: 1134–1142.
38. *Wang L., Shelton R.M., Cooper P.R. et al.* Evaluation of sodium alginate for bone marrow cell tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24: 3475–3481.
39. *Weinand C., Pomerantseva I., Neville C.M. et al.* Hydrogel- β -TCP scaffolds and stem cells for tissue engineering bone. *Bone* 2006; 38: 555–563.