

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ И.М.
СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РОССИЙСКОЙ
ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)

На правах рукописи

Власова Наталья Владимировна

**Реконструкция опорных тканей с использованием скаффолдов,
произведенных методом трехмерной печати
(экспериментальное исследование)**

14.01.17 - Хирургия

14.01.31 - Пластическая хирургия

Диссертация

на соискание учёной степени

кандидата медицинских наук

Научные руководители:

Академик РАН,
доктор медицинских наук, профессор
Решетов Игорь Владимирович

доктор медицинских наук
Зелянин Александр Сергеевич

Москва – 2020

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ	4
<i>Глава 1. Новые методы реконструкции опорно-двигательной системы после переломов, травм и остеопороза с применением аддитивных технологий (обзор научной литературы)</i>	12
1.1. Классификация дефектов	13
1.2. Прототипирование	14
1.2.1. Методики прототипирования	17
1.3. История становления тканевой инженерии	19
1.4. Свойства костно-замещающего материала	25
1.5. Виды костно-замещающих материалов	28
1.6. Применение костно-замещающих материалов	33
1.7. Факторы роста	38
Заключение	43
<i>Глава 2. Материалы и методы</i>	46
2.1. Изготовление скаффолдов на основе трикальцийфосфат	46
2.1.1. Исследование структуры скаффолдов	50
2.1.2. Основные свойства скаффолда на основе ТКФ	52
2.2 Биологические свойства скаффолда	54

2.2.1. Материалы, методы и результаты скрининга in vitro двух лабораторных партий образцов биокерамики	54
2.2.2. Оценка острой цитотоксичности и матриксных свойств поверхности образцов лабораторной партии биокерамики ТКФ	57
2.3. Описание модели и эксперимента. Хирургический метод исследования.	62
2.4. Этапы и особенности внедрения скаффолдов в экспериментальных животных (модели)	64
2.5. Статистический анализ	69
Заключение	69
Глава 3 Результаты исследования	71
3.1. Рентгенологическое исследование	71
3.2. Гистологическое исследование	79
Заключение	97
Глава 4 Обсуждения собственных результатов	99
Заключение	106
Выводы	109
Практические рекомендации	110
Список сокращений	111
Список литературы	112

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Одной из важнейших проблем хирургии и реконструктивно-пластической хирургии является лечение больных с последствиями и осложнениями заболеваний и травм, связанных с формированием костного дефекта различных областей. Наличие костного дефекта может стать причиной сложных, длительных, высокотехнологичных оперативных вмешательств, иногда требующих этапного лечения с длительной профессиональной и социально-бытовой адаптацией. Устранение костных дефектов имеет давнюю историю в хирургии и реконструктивной хирургии, связана с поиском костно-пластического материала (Kotsougiani D.,2017).

По прогнозам специалистов, эти цифры будут только расти по мере развития технологий в современном обществе. К сожалению, не всегда хирургическое лечение может решить все проблемы, связанные с переломами кости, когда костные дефекты невозможно восстановить без биологических трансплантатов, таких как: ауто трансплантаты кости, аллотрансплантаты и деминерализованные костные матриксы. При этом каждый из этих трансплантатов обладает своими преимуществами и недостатками (Guoming Sun,2011, Предеин Ю.А.,2016).

Аваскуляризированные костные губчатые ауто трансплантаты были признаны "золотым стандартом" в реконструктивной хирургии при устранении дефектов костной ткани небольшого объема. Они характеризуются возможностью достижения успешных результатов их применения (до 80 - 90%) и низкой частотой отторжения имплантов

(González-García M, Carlos M., 2018, Анастасиева, Е.А., 2017, Kotsougiani D.,2017). Недостатком аваскуляризованного костного трансплантата считают создание дефекта в донорской области: ограниченный объем забора костной ткани; увеличение времени хирургических операций (Берченко Г.Н., 2012, Бокерия Л.А., Демидова О.А., Аракелян В.С., Еремеева М.В., 2016, Бочков Н.П., Гавриленко А.В. 2012, Валетов В.А. ,2015).

Разработка методов формирования микрохирургического аутооттрансплантата в виде комплекса тканей позволило успешно применять васкуляризованные костные аутооттрансплантаты при устранении дефектов значительного объема, протяженных дефектов, в том числе при нарушении остеорепарации. Особенность применения микрохирургических комплексов тканей заключается в ограничении выбора потенциальных донорских зон, индивидуальных особенностей сосудистой и микрососудистой анатомии, длительности операции, в принципах защиты больного на этапах реконструкции, риски нарушения перфузии комплексов тканей в раннем послеоперационном периоде.

Применение аллотрансплантатов и деминерализованного костного матрикса позволило избежать донорского ущерба. Преимущества аллотрансплантатов и деминерализованного костного матрикса заключаются в том, что они легкодоступны в почти неограниченном количестве (Иванов А.Н., 2014, Гавриленко А.В. и др., 2012). Однако их применение связано с более высоким риском отторжения имплантатов, риск развития иммунной реакции реципиента (Костив Р.Е., Калиниченко С.Г., Матвеева Н.Ю.,2017, Jain A.P., Pundir S., Sharma A.,2013).

По статистическим данным, в России ежегодно фиксируется более 11 млн. переломов, полученных при несчастных случаях (Здравоохранение в России, 2017). По прогнозам специалистов, эти цифры будут только расти по мере развития технологий в современном обществе. По статистическим

данным в России злокачественные новообразования костной ткани составляет 4,2% от всех онкологических заболеваний (Здравоохранение в России, 2017).

Можно предположить, что несмотря на развитие высокотехнологических методов лечения, число больных, требующих устранения дефицита костных тканей с применением тех или иных костных трансплантатов и костно-замещающих материалов будет оставаться на том же уровне или увеличиваться.

Степень разработанности темы исследования

В последнее время наблюдается значительный интерес к разработке синтетических материалов, которые могут быть использованы для заполнения дефектов тканей и исключают потребность в ауто трансплантатах и аллотрансплантатах (Анастасиева, Е.А., 2017, Нефедова Н.А., Давыдова С.Ю., 2015). В настоящее время, активно исследуются биоразлагаемые скаффолды (искусственный заменитель кости, синтетический биоматериал в виде сетки или губки, с predetermined структурами и формами, которые используются для увеличения площади прикрепления клеток к импланту, пролиферации и формирования ткани) в сочетании с факторами роста и/или костные предшественники клеток в качестве жизнеспособной альтернативы традиционным трансплантатам (Семенов М.Г., Степанова Ю.В., Трощиева Д.О., 2016). Тканевая инженерия представляет собой сочетание биологических, химических и технических направлений на возмещение, восстановление и замену тканей с помощью клеток, каркасов и биологических факторов самостоятельно или в комбинации (Andrews S, 2019). Важным элементом в костной инженерии является остеоиндукция или стимуляция клеток - костных предвестников, а также их способность к дифференцировке в остеобласты, при которой часто используются факторы роста (Alfotawei R, 2014, Sean Gao, 2019). К факторам роста костной ткани

относятся белки, секретируемые клетками, которые обеспечивают необходимую функцию остеобластов, включая пролиферацию и дифференцировку. Механизмом работы факторов роста костной ткани считают взаимодействием с мембранными рецепторами на клетках-мишенях (Liu F, 2019). Это взаимодействие запускает внутриклеточный сигнальный каскад, который в конечном итоге индуцирует экспрессию ассоциированных костных генов в ядре и синтез белка в цитоплазме (Palombella S et al.,2019). В последние несколько десятилетий активно используют факторы роста в восстановлении и регенерации кости в преclinical исследованиях (Bose S, 2019).

Важным направлением повышения эффективности (TCP) скаффолда, является определенный и рациональный размер пор, что способствует стимулированию васкуляризации и содержанию кислорода для роста клеток ткани, в том числе сосудистой структуры (Berthiaume F,2011, Castilho M,2015, Jinkoo Kim, 2012, Wai-Ching Liu,2014). В Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт проблем лазерных и информационных технологий Российской академии наук разработан биокерамический образец скаффолда на основе трикальцийфосфата (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт проблем лазерных и информационных технологий Российской академии наук, 2016)

Таким образом, перспектива применения биоимплантов для реконструкции костных дефектов в первую очередь зависит от создания новых высокоэффективных костно-замещающих материалов, обладающих функцией восстановления формы дефекта критического размера.

Цель исследования

Разработка методов хирургической реконструкции опорных тканей скаффолдами, полученных с помощью трехмерной печати.

Задачи исследования:

1. Разработать экспериментальную модель костного дефекта лучевой кости критического размера у крыс без применения остеосинтеза.
2. Разработать технологии прототипирования трикальцийфосфатного (ТСР) скаффолда методом трехмерной печати
3. Проверить биобезопасность применения трикальцийфосфатного (ТСР) скаффолда *in vitro* по оценочной шкале.
4. Изучить регенерацию костной ткани в (ТСР) скаффолдах, обогащенных эритропоэтином *in vivo*.
5. Определить перспективы применения метода направленной регенераций на основе (ТСР) скаффолдов, полученных с помощью метода трехмерной печати в клинике.

Научная новизна

1. В результате проведенных исследований создана новая оригинальная модель формирования костного дефекта критического размера, которая позволяет повысить информативность и объективность экспериментальной оценки репаративных механизмов кости и их трансформацию при различных способах хирургического лечения.
2. Разработана новая технология создания ТСР скаффолдов методом трехмерной печати.
3. По новом показана возможность восстановления костных структур критического размера в эксперименте.

Теоретическая и практическая значимость исследования

В работе было выполнено углубленное доклиническое изучение восстановления костных структур критического размера на конечности на основе биоинженерной конструкции с добавлением факторов роста.

Полученные результаты повысят уровень знаний направленной регенерации костной ткани *in vivo* для дальнейшего использования их при реконструктивных операциях в различных направлениях хирургии.

Методология и методы исследования

В работе использованы следующие методы доказательной науки и медицины: клеточные технологии, морфология, аддитивные технологии, лучевая диагностика, биостатистика.

Основные положения, выносимые на защиту

Разработанный трехмерный скаффолд обладает необходимыми качествами: программируемая резорбция, пористость, прочность, биосовместимость, воспроизводимость методами трехмерной печати, что характеризует его, как надежную подложку для клеток.

Скаффолд, насыщенный вектором роста способствует лучшей гистоподобной регенерации костной ткани.

Степень достоверности и апробация работы

Достоверность результатов обусловлена достаточным количеством животных в эксперименте и подтверждена различными методами морфометрии и адекватна статистическому анализу.

Материалы исследований обсуждены и представлены на:

V Национальном конгрессе «Пластическая хирургия, эстетическая медицина и косметология», г. Москва, 1-3 декабря 2016 года;

VII Международном междисциплинарном конгрессе по заболеваниям органов головы и шеи, г. Москва, 30 мая - 01 июня 2019 года;

Евразийском ортопедическом форуме, г. Москва, 28-29 июня 2019 года.

Апробация диссертации состоялась на заседании сотрудников кафедры онкологии, радиотерапии и пластической хирургии Института клинической медицины им. Н.В. Склифосовского федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) 29 ноября 2019 года, протокол № 11.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, отражающих содержание диссертации, из них 1 статья опубликована в журнале базы Scopus, а также 4 статьи, включенных в перечень ведущих периодических изданий ВАК Минобрнауки РФ, 3 патента:

Пат. 2633084 Российской Федерации, G09B 23/28, G09B 23/36, G09B 37/00, Способ изучения костных заменителей / Зелянин А.С., Филиппов В.В., Харькова Н.В., Жидков И.Л., Красковский Ф.Я.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (RU). - № 2016101643; заявл. 20.01.2016; опубл. 11.10.2017 Бюл.№29

Пат. 2621947 Российской Федерации, G09B 23/28, A61B 17/56, Способ формирования модели костного дефекта / Зелянин А.С., Филиппов В.В., Харькова Н.В.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (RU). - № 2016101642; заявл. 20.01.2016; опубл. 08.06.2017 Бюл.№16

Пат. 2620018 Российской Федерации, G09B 23/28, A61B 17/56, Способ устранения костного дефекта костно-замещающим материалом / Зелянин А.С., Филиппов В.В., Харькова Н.В., Решетов И.В.; заявитель и патентообладатель ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского» (RU). - № 2016101645; заявл. 20.01.2016; опубл. 22.05.2017 Бюл.№15

Объем и структура диссертации

Диссертация состоит из введения, 4 глав: обзора научной литературы (глава I), материалы и методы (глава II), описание модели и эксперимента, результатов собственного исследования (глава III), обсуждения полученных результатов (глава IV), а также выводов, списка сокращений, списка литературы, включающего 200 источника, из которых 18 источников – отечественные, 182 – зарубежных авторов. Работа изложена на 139 страницах машинописного текста, иллюстрированного 9 таблицами и 62 рисунками.

Глава 1. Новые методы реконструкции опорно-двигательной системы после переломов, травм и остеопороза с применением аддитивных технологий (обзор литературы)

Развитие научно-технического прогресса дало возможность совершенствования реконструктивных операций в хирургии, реконструктивно-пластической и челюстно-лицевой хирургии, ортопедии и травматологии, онкологии с применением костных имплантатов (изделия из искусственного материала, используемые для внедрения и введения в организм человека, замещающие орган или часть органа). По статистическим данным, каждый год в клиниках мира выполняется более 2 млн. операций с применением костных трансплантатов (в Европе более 400 000 операций и около 600 000 в США) (Берченко Г.Н.,2008). Костный трансплант – это кость или часть кости, извлекаемая из одного участка тела пациента и перемещаемая в другой участок тела больного для замены поврежденного или отсутствующего органа. При больших размерах дефектов костных структур часто применяют *ауто трансплантаты* (органы и / или ткани, которые трансплантируются в теле одного и того же человека) или *аллотрансплантаты* (органы и / или ткани могут быть из живого или трупного источника, трансплантации которых были выполнены между двумя субъектами одного и того же вида.) (Chen FM et al., 2012, Filion TM et al., 2011, Такаока К et al., 1988). Однако при использовании алло- и ауто трансплантатов возникают проблемы: недостаточное количество материала, появление инфекции, формирование гематомы, боль в донорской области (Susmita Bose et al., 2012, Chen J-P et al., 2012, Wang AJ et al., 2006). Реконструкция опорных и функциональных структур является одной из важных задач в хирургии, реконструктивно-пластической хирургии,

ортопедии, травматологии, онкологии. Эта цель может быть достигнута при применении тканевой инженерии костных скаффолдов (Brown KV et al., 2011, Partridge L. et al., 2011, Carlos J. Sanchez Jr. et al., 2013, Torroni A. et al., 2009).

1.1.Классификация дефектов

Утрата костного вещества может быть следствием прямого воздействия травмирующего фактора, так называемые первичные дефекты или результатом оперативного вмешательства, или патологических изменений – вторичные дефекты.

Для различных сегментов конечностей в различной локализации величина критического дефекта, требующего устранения костной ткани, в значительности степени вариабельна, так например значимость величины одного и того же размера дефекта может быть оценена по разному: при последствиях травм и заболеваниях кисти и длинных сегментах конечности. Для определения истинного размера дефекта кости измеряется величина межотломкового пространства, а также величина образовавшегося анатомического укорочения поврежденного сегмента кости (Шаповалов В.М.,2013).

Дефекты костей классифицируют по следующим признакам: локализация; размер; вид (тотальный, краевой, циркулярный); форма, образовавшихся концов отломков; состояние околокостной ткани (Шаповалов В.М.,2013).

Дефекты каждого сегмента кости делятся на четыре типа, а затем подразделяются на три группы и подгруппы, генерирующие иерархическую организацию в триадах

А - Ограниченные дефекты (<20%) -занимают одну анатомическую область

A1 - Диафизарный

A2 - Метафизный

A3 - Эпифизиальный

B - фрагменты костей имеют контакт

B1 - Полный контакт с анатомическим укорачиванием

B2 - Ограниченный контакт без анатомического укорачивания

B3 - Ограниченный контакт с анатомическим укорачиванием

C - костные фрагменты, не имеющие контакта (сегментарные дефекты, "дефект-диастаза")

C1 - Сегментарные дефекты без укорочения

C2 - Сегментарные дефекты с укорочением

C3 - Субтотальный дефектов

D - полный суставной дефект

D1 -Эпифизарный

D2- Эпиметафизальный

D3- Эпиметадиафизарный

D4- Ампутация (Шаповалов В.М.,2013).

1.2. Прототипирование

Прототипирование (Rapid Prototyping), или чаще употребляемое понятие «трехмерная печать» (3D-printing, 3DP), – это трехмерное моделирование при создании сложных технологических объектов.

В восьмидесятих годах прошлого века началась широкая популяризация цифровых технологий в области проектирования, моделирования. Это способствовало стимуляции развития технологий быстрого прототипирования (Шумков А.А.,2015), что позволило приступить к разработке разнообразных продуктов, применяемых в различных областях промышленного производства. В медицине на основе технологии быстрого прототипирования появилась возможность создания трехмерных моделей для реконструкции органов или костных структур.

Технологии быстрого прототипирования теперь стали называть аддитивными технологиями. Термин «аддитивные технологии» означает класс процессов, которые автоматически создают сложные трехмерные физические объекты без инструментального их изготовления, путем преобразования данных, поступающих из системы компьютерного проектирования (Валетов В.А.,2015, Bluteau G, 2007).

Исключительные возможности воспроизведения сложнейших пространственных форм, объектов и механизмов были открыты благодаря цифровым 3D-технологиям. В современных условиях, методы быстрого прототипирования позволяют оперативно решать задачи по созданию копий компьютерных моделей при помощи компьютерного обеспечения для трехмерного проектирования (Шумков А.А.,2015).

Процесс прототипирования можно разделить на два этапа - виртуальный и физический. На первом этапе разрабатывается 3D модель в электронном виде, а затем следует ее воплощение в твердой копии с помощью трехмерного или 3D принтера - устройства вывода трехмерных данных (как правило, объемной геометрии). Изготовление деталей осуществляется путем наложения друг на друга тонких слоев.

Результатом его работы является физический объект (Cheng N et al., 2013, Maiborodin IV et al., 2012, S.N. Parikh et al., 2012, M. S. Taylor et al., 1994).

В системе прототипирования для изготовления различных деталей используются три типа материалов: твердая форма, жидкая форма или порошковая форма. Технологии быстрого прототипирования имеют возможность существенно повысить скорость, точность и свойства нужных деталей (Do Prado Ribeiro DC et al., 2012, Chris Hyunchul Jo et al., 2013, Miguel, B.S. et al., 2010, Sanan et al., 1997).

В реконструктивной хирургии, в том числе в челюстно-лицевой хирургии, нашли применение пластиковые модели для устранения врожденных и посттравматических дефектов, а также для изготовления имплантатов (Шумков А.А., 2015). В настоящее время в медицине выпускаются и используются имплантационные унифицированные системы, т. е. имплантаты могут обладать разными размерами, но иметь одинаковые формы, что является серьезным ограничением для применения имплантатов в сложных случаях (Тверской М.М. и др., 2012 Шумков А.А., 2015). В связи с подбором имплантата по месту реконструкции дефекта увеличивается время операции, что приводит к возникновению зон концентрации напряжений, а также к снижению прочности имплантата. Создание индивидуальных сложнопрофильных имплантатов, спроектированных и изготовленных с использованием современных технологий быстрого прототипирования позволит устранить возникшие препятствия в данной области. Проектирование и воспроизведение индивидуальных сложнопрофильных имплантатов при помощи современных технологий быстрого прототипирования позволит устранить возникшие препятствия в данной области (Абрамов С.С., Болдырев Н.Н., Евсеев А.А. и др. 1998, Шумков А.А., 2015,).

1.2.1. Методики протопирирования

Стереолитография:

Этот метод можно назвать «обособленным». Это обусловлено тем, что в качестве материала используются не порошки, а применяются фотополимеры, находящиеся в жидком состоянии. Процесс стереолитографии проводится следующим образом: в жидкий фотополимер помещают сетчатую платформу, на которой в дальнейшем происходит образование прототипа (Панченко В.Я.,2009).

Моделирование методом наплавления:

Технология была разработана S. Scott Crump в конце 80-х годов и коммерциализирована в 1990 году. В этом процессе пластичный или восковой материал прессуется материалом сопла, который проследивает часть поперечного сечения слоя геометрии за слоем (Bluteau G et al.,2007).

Впервые о стереолитографии было заявлено в начале 70-х годов прошлого века, когда японский исследователь доктор Хидео Кодама изобрел современный многослойный подход к стереолитографии использования ультрафиолетового света для изменения фоточувствительных полимеров. Сам термин стереолитография был придуман Чарльзом (Чаком) Хулл в., который запатентовал технологию в 1986 году и основал компанию 3D-системы для ее реализации (Fan W et al.,2010, Holtorf HL¹ et al., ,2005, Lu Z. and Zreiqat H. et al.,2010, Woodard, J.R. et al.,2007). Хулл описал метод создания трехмерных объектов путем последовательной “печати” слоев материала, при влиянии ультрафиолетовым светом, начиная от нижнего слоя до верхнего слоя. Позднее изобретение было исследовано на различных материалах, способных затвердеть или изменить свое физическое состояние (Hribar KC et al.,2013, Lederman R.J. et al.,2002 , Eduardo Gomes Machado et

al., 2015, Owens CM et al., 2013, P. B. Saadeh et al., 2000, Charles A. Vacanti J et al., 2006, Wang DS et al., 1997).

Основой лазерной стереолитографии (Stereolithography) является фотоиницированная полимеризация фотополимеризующейся композиции (ФПК) с помощью лазерного излучения (или излучения ртутных ламп) (J. M. Kanczler et al., 2008, Urbich C et al., 2004, Woodard J.R. et al., 2007). Данная технология позволяет проектировать на компьютере трехмерные объекты, которые воспроизводятся из жидкой ФПК последовательными тонкими (0,1—0,2 мм) слоями. Формирование их происходит на подвижной платформе, находящейся в емкости с ФПК под действием лазерного излучения (или излучения ртутных ламп).

Лазерная стереолитография интересна тем, что время затраченное на конструирование или дизайн идеи до воплощения в готовую сформированную модель минимальное (от нескольких часов до нескольких дней) (Панченко В.Я., 2009).

Выборочное лазерное спекание (SLS):

Метод селективного лазерного спекания (SLS) был разработан и запатентован доктором Карлом Декардом и его научным руководителем доктором Джо Бимэном в университете штата Техас в Остине в середине 1980 - х годов (Mironov V et al., 2003).

Выборочная машина лазера спекания состоит из лазера карбондиоксида, камеры порошка и камеры газа азота.

Тонкий порошок распространяется на платформе сборки с помощью ролика. Перед началом лазерного сканирования температура всей платформы повышается чуть ниже температуры плавления инфракрасным нагревателем для минимизации тепловых искажений. При запуске лазерного сканирования лазер режет ломтик слой за слоем с одновременной подачей порошка (Bluteau G et al., 2007).

Для того чтобы создать трехмерные модели используется трехмерное изображение на компьютере с помощью компьютерной томографии.

1.3. История становления тканевой инженерии

С древнейших времен до наших дней хирурги пытались восстановить утраченный или поврежденный орган путем реконструкции его или замены. Реконструкция с использованием золота в черепных дефектах датируется 2000 г. до н. э., а трансплантация тканей использовалась, по крайней мере, начиная с 1660 года (Gráinne M. Cunniffe et al., 2015, Li D et al., 2016, Ch. A. Vacanti, 2006).

Традиционная реконструкция органов или замена их подразумевает две формы: 1) пересадка тканей и трансплантация органов, 2) замена аллопластическими или синтетическими материалами (Jason A. Inzana et al., 2014, C. Kirker-Head et al., 2007, Ch. A. Vacanti, 2006)). Оба подхода, однако, имеют свои ограничения. Пересадка требует повторного хирургического вмешательства и ограничивается количеством материала, особенно для трансплантации органов. Синтетические материалы часто плохо интегрируются с тканями хозяина и с течением времени, вследствие износа, приводят к негативному ответу организма (Hod Lipson, 2005). Часто возникают осложнения при несоответствии органов и тканей для трансплантации (Cancedda R. et al., 2003, Lu Z. and Zreiqat H., 2010, Ren J et al., 2007, Ch. A. Vacanti, 2006)).

Фундаментальный сдвиг в подходе к терапии многих заболеваний произошел в последнее десятилетие. Он связан с новыми достижениями в области регенеративной медицины. К ним обычно относят клеточную терапию, генную терапию и тканевую инженерию, которые направлены на

регенерацию пораженной ткани, а не на замену ее синтетическим материалом (Gráinne M. Cunniffe, 2015).

Концептуально тканевая инженерия может быть определена следующим образом: «Тканевая инженерия - это создание новых тканей для терапевтической реконструкции человеческого тела путем целенаправленной и контролируемой стимуляции выбранной клетки-мишени через систематическую комбинацию молекулярных и механических сигналов» (David F. Williams, 2008)

Тканевая инженерия считается сравнительно новой областью в науке, достижения которой в дальнейшем найдут применение не только в клинической практике, но и в фармакологии для изучения эффективности и токсичности препаратов, а также для фундаментальных исследований в разработке искусственных тканей и морфогенеза (Gelderblom M et al., 2018, M. Lovett et al., 2009, Masashi Nomi et al., 2002, Baiyan Sui et al., 2014, Ch. A. Vacanti, 2006)).

Среди первых структур тканевой инженерии была кожа. Один из разработанных методов роста эпидермиса кожи начинается с биопсии кожи, заготовленной от пациента. Кератиноциты, выделенные из биопсии, культивируются на питательный слой мезенхимальных клеток у мыши, таким образом расширяя зону роста клеток в течение нескольких недель. Это привело к первой разработке «матрицы для восстановления мягких тканей» на основе клеток, состоящей из листов аутологичных кератиноцитов, используемых для закрытия ран у пациентов, страдающих от тяжелых кожных ожогов, которые невозможно лечить традиционными методами аутотрансплантации. Однако структура матрицы, толщиной всего в несколько клеток, очень хрупкая и редко применяется (Cheng C et al., 2013, Cunha MR et al., 2008, Guelcher SA et al., 2011, Hing K.A. et al., 2004, Masashi

Miyazaki et al., 2015, Moon S et al., 2010, Johan van der Stok et al., 2013, Valmikinathan CM. et al., 2009, Ch. A. Vacanti, 2006, Wu C. et al., 2012).

В другом методе структура состоит из смеси коллагена бычьего типа I и хондроитина 6-сульфата акулы, которая сшита и превращена в пористую матрицу, управляемую сублимационной сушкой. Силиконовый лист используется для покрытия тяжелых ожоговых ран, когда повреждение распространяется глубоко в дерму. В этих условиях рана укрывается этой структурой без привлечения кожного лоскута. Матрица является биологической структурой и, предположительно, растворяется в первую очередь в фибробластах, эндотелиальных клетках и нервных клетках хозяина, мигрирует в них и может внести свою собственную внеклеточную матрицу (ECM). (Kenneth M. Dupont, 2009, Wei Zhu, 2014) В конечном счете, матрица исчезает и полностью заменяется собственными клетками пациента, таким образом способствуя регенерации кожных структур, предотвращая сокращение раны и улучшая внешний вид излеченной раны. В тот момент, когда силиконовую пленку удаляют, рана покрыта кожным лоскутом. Надо отметить, что разработанный учеными продукт не содержит живых клеток и его основной целью является стимулирование роста и регенерации клеток хозяина (Cancedda R. et al., 2003, Cheng C et al., 2013, Hing K.A. et al., 2004, Masashi Miyazaki et al., 2015, Moon S et al., 2010, Ch. A. Vacanti, 2006)).

Также на ранней стадии тканевой инженерии разработали композитный продукт кожи, воссоздавая как дерму, так и эпидермис. Дерма сначала создавалась путем посева на коллагеновый гель с фибробластами кожи, которые вызывают сокращение геля и образуют неодермис. Кератиноциты, погруженные в культуральную среду, выращивают на верхней части неодермиса, где в определенный момент образовывается ороговевший слой. Весь процесс занимает около 3 недель и в нем

используются аллогенные клетки, взятые у новорожденных. Аллогенные заменители кожи могут обеспечить только временное покрытие, в итоге кожа пациента отвергнет их. Данный метод используется для стимуляции заживления венозных язв ног и диабетических язв стопы (Cheng C et al., 2013, Hing K.A. et al., 2004, Masashi Miyazaki et al., 2015, Moon S et al., 2010, Thormann U et al., 2014, Ch. A. Vacanti, 2006, Woodard J.R. et al., 2007).

В начале 1970-х был проведен ряд экспериментов по генерированию новых хрящей. Сначала высеивали хондроциты на спикулы кости, а затем имплантировали их мышам. На основании данных экспериментов пришли к выводу, что с появлением инновационных биосовместимых материалов возможно генерировать новые ткани путем посева жизнеспособных клеток на соответствующие матрицы (Esther C. Novosel, 2011, Sarahrudi K et al., 2009, Charles A. Vacanti J, 2006, Wang DS et al., 1997).

Ключевым моментом в рождении нового направления в тканевой инженерии была разработка матрицы в середине 1980-х годов. В исследованиях по созданию эквивалентов функциональных тканей использовали разветвленную сеть синтетических биосовместимых и биоразлагаемых полимеров, сконфигурировав их как матрицы и высеивая на них жизнеспособные клетки (Cheng C et al., 2013, Hing K.A. et al., 2004, Masashi Miyazaki et al., 2015, Moon S et al., 2010, Megan E. Oest et al., 2007).

Проект "мышь-ухо" начался в 1989 году, когда удалось вырастить часть человеческого хряща на биоразлагаемой матрице. Каркас был из синтетического материала (99% полигликолевой кислоты и 1% молочной кислоты), используемый в растворении хирургических швов. В теле каркас разлагается на углекислый газ и воду. Волокна этого материала были вплетены в рыхлую сеть, которая состояла из воздуха (97%), оставляя много места для роста клеток. В 1991 году этот метод был применен у 12-летнего мальчика, родившегося с синдромом Поланда. У него не было абсолютно

никаких костей или хряща на левой стороне груди. Его сердце и легкие были защищены только кожей. Ученые использовали собственные хрящевые клетки мальчика, чтобы вырастить "в груди тарелку", размером с компакт-диск по форме груди, на основе синтетического биоразлагаемого полимера. Они имплантировали клетки хряща в грудь, и мальчик вырос с этой структурой (Cheng C et al., 2013, Hing K.A. et al., 2004, Masashi Miyazaki et al., 2015, Moon S et al., 2010).

В 90-х – 2000-х годах в России и за рубежом, проводятся экспериментальные, а затем и клинических исследования по изучению эффективности и безопасности использования генно-инженерных рекомбинантных конструкций с факторами роста эндотелия сосудов и ангиогенина для лечения больных с хроническими ишемическими поражениями тканей (хроническая ишемия нижних конечностей, ишемическая болезнь сердца и т.д.). Российский научный центр хирургии РАМН совместно с Институтом молекулярной генетики РАН и НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи МЗ РФ проводили исследования по возможности применения данных технологий. Был разработан метод индукции ангиогенеза, основанный на использовании самоэкспрессирующихся генно-инженерных конструкций с генами, кодирующими синтез белков-факторов ангиогенеза (фактора роста эндотелия сосудов, ангиогенина, фактора роста фибробластов и др.). Введение таких конструкций в ишемизированные ткани обеспечивает длительный синтез ростовых факторов и способствует развитию дополнительной сосудистой сети в ишемизированной зоне, а, следовательно, увеличению перфузии ткани и снижению степени ишемии (Бокерия Л.А., Демидова О.А., Аракелян В.С., Еремеева М.В. , 2006; Бочков Н.П., Константинов Б.А., Гавриленко А.В. и др. , 2006, Lederman R.J., 2002, Makinen K., 2002, Rajagopalan S., 2003, Sanan, 1997, Terheyden HD, 2001).

Ученые из Массачусетского госпиталя в Бостоне сформировали из стерильной биоразлагаемой сетки точную форму уха 3-летнего ребенка. Первой задачей исследователей было высеять на ушковидную матрицу хрящевые клетки, взятые из колена коровы (в данном случае у «мышь-ухо» не было абсолютно никаких человеческих клеток хряща) (Thomas M., 2013).

Ученые использовали «голую мышь», получившая свое название благодаря случайной мутации в 1960, она была оставлена без волос и практически без иммунной системы, отсутствие волос не имеет никакого отношения к проекту, но отсутствие иммунной системы имеет решающее значение. Это означало, что мышь не будет отвергать хрящевые клетки, взятые у коров. Единственная цель использования мыши в этом проекте - питание хрящевых клеток и их рост. Хрящевое ухо имплантировали под кожу мыши. За три с небольшим месяца вокруг хряща выросли дополнительные кровеносные сосуды, которые питали хрящевые клетки коровы и проникли в биоразлагаемую матрицу (формой человеческого уха). Когда матрица растворилась, хрящ имел структурную целостность, способную поддерживать себя. Эта сформированная хрящевая структура была похожа на человеческое ухо, но ее никогда не пересаживали на человека, потому что она была полна коровьих клеток и могла быть отвергнута иммунной системой человека (Cheng C et al., 2013, Hing K.A. et al., 2004, Masashi Miyazaki et al., 2015, Moon S et al., 2010).

В 1998 году аналогичный подход был использован для реконструкции дистальной фаланги после ампутации большого пальца. Имплантат, состоящий из матрицы пористого коралла и клеток, полученных при биопсии костной ткани, был помещен над проксимальной фалангой большого пальца поврежденной руки, в результате оперативного вмешательства фаланга пальца была сохранена и сенсорно-моторная функции частично восстановлены и данный метод имел положительный результат (Cheng C et

al., 2013, Hing K.A. et al.,2004, Masashi Miyazaki et al., 2015, Moon S et al., 2010).

Начиная с 1996 года, появляются статьи в области медицины по созданию костей с помощью 3d printing (Cheng C et al., 2013, Hing K.A. et al.,2004, Masashi Miyazaki et al., 2015, Moon S et al., 2010).

Впервые 3D печать была описана в 1986 году Чарльзом У. Халл, названная «sterolithography». Тонкие слои материала соединяются с помощью ультрафиолетового света, печатаются послойно и последовательно с образованием твердой 3D структуры. Этот процесс был впоследствии применен для формирования 3D-каркасов из биологических материалов. Развитие растворителей на водной основе позволило создать прямую печать биологических материалов в 3D-каркасах с последующим использованием для трансплантации без посеянных клеток. Появление 3D bioprinting как формы тканевой инженерии стало возможным благодаря последним достижениям в технологии 3D печати, биологии и материаловедения клеток (Cheng C, 2013 et al., Hing K.A. et al.,2004, Masashi Miyazaki et al., 2015, Moon S et al., 2010, Subramanian A et al.,2009).

1.4. Свойства костно-замещающего материала

Основной целью научных разработок тканевой инженерии является создание материалов и тканевых структур, пригодных для имплантации в тело человека для восстановления повреждений или замены дисфункциональных органов. Для создания подобных биоконструкций используют живые клетки, биосовместимые материалы с подходящими биохимическими и физическими факторами (Cheng C et al., 2013, Hing K.A. et al.,2004, Masashi Miyazaki et al., 2015, Moon S et al., 2010, Solaiman Tarafder et al.,2013).

Революцией в реконструктивной костной хирургии можно считать разработку принципиально нового метода, названного «инженерией костной ткани» (bone tissue engineering) (Cunha MR et al., 2008, Guelcher SA et al., 2011, Hod Lipson et al., 2005, Benay Sager et al., 2003, Jianglin Wang et al., 2014). Согласно этому методу организм сам может восстанавливать поврежденную ткань, если для этого созданы надлежащие условия: матрикс соответствующей архитектуры, необходимые стимулы для остеогенеза.

Метод биоинженерии костной ткани состоит в культивировании стволовых клеток и/или определенных биоактивных веществ биологически совместимых с организмом. Затем такой имплантат помещается в дефект кости. В результате пролиферации и дифференцировки стволовых клеток происходит формирование новой костной ткани в порах матрикса в соответствии с заложенной генетической информацией (Ayoub AF et al., 2002, Boyan BD et al., 1999, Saracino GaA et al., 2012, E. Volkmer et al., 2008).

В настоящее время, несмотря на активный поиск, не найден «идеальный» материал для основы биоинженерных конструкций. “Идеальный” материал должен отвечать требованиям биосовместимости и быть биологически активным (Шаповалов В.М., 2013, Шумков А.А., 2015, Cancedda R. et al., 2003, Petit I et al., 2007, Shikinami Y et al., 1999) а также замещаться костной тканью. Кроме того, имплантат должен сохранять свои функциональные качества в течение определенного периода времени, не изменяя существенно свою структуру и механические свойства (Валетов В.А., 2015, Alfotawei R et al., 2014, Bartold PM et al., 2006, Boyan BD et al., 1996, Gráinne M. et al., 2015, Jordan D. Skelly et al., 2014).

Биосовместимость - одно из основных требований к любому костнозамещающему материалу, который поддерживает нормальную клеточную активность, в том числе молекулярных сигнальных систем без каких-либо местных и систематических токсических воздействий на ткани

организма (Ozbolat IT et al., 2013) Идеальный костнозамещающий материал должен обладать остеокондуктивными свойствами; позволять костным клеткам «прилипнуть», размножаться, создавать форму внеклеточного матрикса на поверхности и заполнять поры, индуцировать формирование новой костной ткани с помощью биомолекулярных сигналов и подбирать прогениторные клетки со свойством остеоиндуктивности. Кроме того, он в течение нескольких недель должен активно поддерживать транспортировку питательных веществ, кислород и выведение отходов (Kevin W. et al., 2012, Toshitaka Yoshii, 2012).

Механические свойства идеального костнозамещающего материала должны соответствовать свойствам костной ткани и правильному распределению нагрузки. Механические свойства костной ткани широко варьируют от губчатой до кортикальной кости. Модуль упругости кортикальной кости от 15 до 20 ГПа и от 0,1 до 2 ГПа у губчатой кости. Предел прочности колеблется между 100 и 200 МПа для кортикальной кости, и между 2 и 20 МПа для губчатой кости (Kevin W. et al., 2012).

Размер пор должен позволять формироваться микросоудистому руслу и быть не менее 100 микрон в диаметре для успешной диффузии питательных веществ и кислорода (Lewandrowski KU et al., 2000, Yufeng Zhang et al., 2012). Размеры пор в диапазоне 200-350 микрон являются оптимальными для врастания костной ткани (Alfotawei R et al., 2014). Кроме того, недавние исследования показали, что разномасштабность пористых материалов с участием микро- и макропор могут выполнять лучше свои задачи, чем только макропористые каркасы (Partridge L. et al., 2011, Haiying Yu et al., 2009). К сожалению, пористость ведет к снижению механических свойств, таких как прочность, и возникает сложность воспроизведения скаффолдов. Были изучены пористые каркасы с использованием полимеров, керамики, композитов и металлов. Прочность плотных биокерамических

материалов близка к прочности кортикальной кости, однако керамико-полимерные композиционные скаффолды слабее, чем у кости. Пористые металлические каркасы соответствуют механическим требованиям кости, но не в состоянии обеспечить интеграцию ткани и добавляют проблемы, связанные с выщелачиванием ионов металла (Hench LL et al., 2015, Wilson SM et al., 2012).

Биорезорбирование является решающим фактором для остеозамещающих материалов в регенерации костной ткани (Ozbolat IT et al., 2013, Stark GB et al., 1998). «Идеальный» материал должен не только обладать похожими механическими свойствами кости, но и деградировать с течением времени *in vivo*, согласно запрограммированной степени резорбции и, в конечном итоге, создавая пространство для роста новой костной ткани. Деградация скаффолдов должна различаться в зависимости от места расположения скаффолда (Hettrich C et al., 2010, Kevin W. et al., 2012).

К создаваемому каркасу ставится задача увеличения остеоиндуктивных свойств. Для достижения этой цели на поверхность импланта наносят различные биоактивные материалы или активные агенты. Главным образом, рост клеток стимулируется протеинами, пептидами и факторами роста, которые могут добавляться для изменения окружающей микросреды скаффолда, стимуляции роста и формирования костной ткани. (Asakawa N, et al. 2010, Bartolo P J et al, 2011, J. M. Kanczler et al., 2008, M. S. Taylor et al., 1994).

1.5. Виды костно-замещающих материалов

До недавнего времени, преобладало традиционное мнение, что существует три основных типа материалов: металлический, основанный на металлической связи, керамический, основанный на ионных связях, и полимерный, основанный на ковалентных связях. Кроме того, существуют гибриды, которые могут быть либо полностью синтетическими, обычно

называемыми композитами, представляющие комбинации керамики и полимеров, или естественными эквивалентами этих композитов, включая кости, древесину и слоновую кость. (David F. Williams, 2009)

Самым распространенным материалом для создания костнозамещающих материалов является **кальцийфосфат**. Керамика на основе кальцияфосфата обладает различным химическим составом и формами (гидроксиапатит, трикальцийфосфат, бифазный кальцийфосфат) (Hettich C. et al, 2010) Фосфаты кальция являются превосходными материалами для тканевой инженерии костной ткани из-за химического и кристаллического сходства с костным минералом. Они не только биосовместимы, но также обладают остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами и могут связываться непосредственно с костью при определенных условиях (Liu F et al, 2019, Vahabi S. et al, 2012). Свойства фосфата кальция включают в себя стабильность, степень разложения (зависимая от типа кальция фосфата). Фосфаты кальция имеют хорошую биологическую активность, а остеобласты могут легко образовывать группы клеток на поверхности фосфатов кальция в пробирке и в естественных условиях (Hench LL et al., 2015, Patel, Z.S. et al., 2008, Jianglin Wang et al., 2014). Многочисленные исследования, проводимые *in vivo* и *in vitro*, установили, что фосфаты кальция, независимо от формы (основание, покрытие, порошок или пористая структура), всегда поддерживают дифференциацию и пролиферацию соответствующих клеток (например, остеобластов и мезенхимных клеток) (Hench LL et al, 2015, Guo C et al, 2007, A W Yasko et al, 1992).

Оксид кремния (SiO_2 0,5%) и оксид цинка (ZnO 0.25%), добавленные в В-трикальцийфосфат (В-ТСР) могут увеличить в 2,5 раза прочность костнозамещающего материала и до 11 дней (до 92%) жизнеспособность клеток (Sungsoo S. 2013). Цинк и кремний в В-трикальцийфосфате (В-

ТСР) увеличивают количество коллагена I типа (COL1), экспрессию генов и секрецию внеклеточной сигнал-регулируемой киназы (ERK), что положительно сказывается на ангиогенезе, дифференциации, морфогенезе и пролиферации остеобластов (Alfotawei R., 2014, Hettrich C. et al,2010).

Металлы (титан, тантан и др.) являются биологически инертными, то есть не токсичными и устойчивыми к биохимическим воздействиям организма материалами. Обладают высокой прочностью и биосовместимостью, относительно недороги. Для изготовления имплантов и матриц для биологически активных агентов используют коррозионно-стойкие металлы (титан и его сплавы, нержавеющая сталь и др.). Пористые металлические скаффолды преимущественно выполняются из титана и тантала (Johan van der Stok, 2013). Основным недостатком металлов является небiorазлагаемость и неэластичность. В отличие от керамики или полимерных скаффолдов биомолекулы не могут быть интегрированы в скаффолды на основе металлов. Однако, несмотря на недостатки металлов, в последние годы ведутся работы над новыми биорезорбируемыми материалами, базирующимися на соединениях магния. (Hettrich C. et al,2010).

Биоактивное стекло (Bioglass) - открыто в начале 70-х годов. Это были первые разработанные искусственные материалы, которые образуют связь с костной тканью. С тех пор созданы различные виды биоактивных стекол и стеклокерамики. Некоторые стекла в системе $\text{Na}_2\text{O} - \text{CaO} - \text{SiO}_2 - \text{P}_2\text{O}_5$ при имплантации в костный дефект не капсулируются, а находятся в прямом контакте с костной тканью (Bruder SP et al, 1998, Liah, 2018).

Основным условием для связывания стекол и стеклокерамики с костной тканью является образование апатитового слоя на их поверхности в биологической среде. Апатитовый слой формируется в результате химической реакции стекол и стеклокерамики с окружающей биологической жидкостью, в которой ионы кальция выделяются и образуются

гидратированный слой SiO_2 . Все биостекла показывают значительное увеличение площади поверхности при выдержке в физиологическом растворе. Формирование обогащенного SiO_2 - геля на поверхности биостекла приводит к ультрапористой структуре. (Do Prado Ribeiro DC et al, 2012, M. E. Gomes et al, 2003, Jinkoo Kim et al , 2012, Yang S et al, 2001)

Биостекла обладают более высокой механической прочностью по сравнению с фосфатами кальция. Рассасывающиеся биоактивные стекла представлены разными композициями, исследованными в течение многих лет (Hod Lipson et al., 2005). При испытании *in vivo* 3D bioglass скаффолд с 70% пористостью и размером пор 300-400 микрон был покрыт сверху оксикарбонатом апатита (НСА), что значительно усилило активность остеобластов. НСА слой также адсорбирует белок и факторы роста, что способствует формированию новой костной ткани *in vivo* (Huang Y-C et al., 2006). Использование кобальта (Co) в составе биоактивных стекол приводит к увеличению пролиферации, дифференциации стволовых клеток костного мозга (BMSC), секреции фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) (Marcacci M et al, 2007, Williams, D.F. et al, 2008).

Полимеры являются одними из перспективных материалов для изготовления скаффолдов. Основными натуральными полимерами для костной тканевой инженерии является коллаген, фибрин, алгинат, шелк, гиалуроновая кислота и хитозан(. A. Inzana,2014) Синтетические полимеры, такие как полимолочная кислота (PLA), полигликолевая кислота (PGA), поликарполактон (PCL) и их композиты (Hettlich C. et al.,2010). Некоторые полимеры, такие как полипропилен фумарат (PPF), обладают высокой прочностью, что сопоставимо с кортикальной костью, а деградацию этого вещества можно регулировать в широком диапазоне (Penn-Barwell JG et al., 2012). Вместе с тем деградация некоторых полимеров (PLA, PGA) создает

локальную кислую среду, что вызывает неблагоприятный ответ окружающих тканей (Li G, 2017).

Композитные материалы могут быть изготовлены из двух и более совершенно разных материалов, например, таких как керамика и полимеры. . (Brighton CT et al, 1992, Castilho M et al, 2015, Jin L et al, 2012, Lee JY, 2013). Разработаны взаимосвязанные кальцийфосфатные-полимерные скаффолды, включающие в себя механические и физиологические свойства тканей макроорганизма. Полимер в кальцийфосфатном скаффолде увеличивает твердость и прочность конструкции и становится похожим на кость (Thomas M., 2013). Аналогично этому примеру механическая целостность и биологическая активность полимеров может быть достигнута при добавлении Са-Р (PGA/b-TCP (полигликолевая кислота/В-трикальцийфосфат) (1:3 по весу) 3D-пористые композитные скаффолды с $88.4 \pm 0.7\%$ пористостью, имеющие размер пор $483.3 - 113.6$ мкм, могут деградировать до $96,2 \pm 3.3\%$ через 90 дней с момента имплантации в Sprague-Dawley крысам-самцам (Cheng C et al., 2013). Гидроксиапатит HA/poly(ester-urethane- эстер-уретановый) (PU) может адсорбировать большее количество бычьего сывороточного альбумина (BSA), бычьего фибриногена и фетальной телячьей сыворотки (FCS) *in vitro* по сравнению с PU скаффолдом (Guo C et al., 2007). Никаких существенных различий в ангиогенезе у HA/PU(гидроксиапатит/ эстер-уретановый) и PU скаффолдов не было. Пористый скаффолд HA/PCL (гидроксиапатит/поликарполактон) с модификации поверхности BCP показал увеличение прочности в два раза (Sungsoo S. et al., 2013). Нанокompозитный коллаген и Bioglass показали раннюю минерализацию в течение 3 дней с увеличением экспрессии алкалинфосфатазы (ALP) после 21 дня культивирования (Zhi-Yong Zhang et al., 2010, Chen J-P, 2012).

Было показано эффективное применение композитных скаффолдов на основе хитозана и желатина для культивирования мезенхимных стволовых клеток костного мозга с целью имплантации в дефекты альвеолярных отростков костей. Обнаружено, что композитный матрикс с мезенхимными стволовыми клетками способствует костной регенерации, увеличению минерализации кости, а также васкуляризации, при этом отмечено полное рассасывание матрицы (Берченко Г.Н., 2008).

1.6. Применение костно-замещающих материалов

Исследования, проводимые по тканевой инженерии, зависят от тканей и используемых материалов, одним из которых является скаффолд.

Скаффолды служат синтетическим внеклеточным матриксом для внедрения клеток в трехмерную структуру, стимуляторов роста и формирования желаемой ткани (Per Bosermark et al., 2015, Cancedda R et al., 2007, Duan W et al, 2018, Gross V.C. et al., 2014,). Материал скаффолда различен для всех тканей организма. Идея тканевой инженерии в том, чтобы пересадить *биофакторы роста* (клетки, гены и/или белки) в пористый биоразлагаемый материал, известный как скаффолд. Фактором роста является природное вещество, способное стимулировать клеточный рост, пролиферацию, заживление и дифференцировку клеток. Обычно это белок или стероидный гормон. Факторы роста важны для регулирования различных клеточных процессов (Bose S, 2012). К биоорганическим факторам относятся стволовые клетки и генная терапия, применяемая для стимуляции и восстановления тканей (Cancedda R et al., 2007, Chien KB et al., 2013, Cutroneo K. R., 2003, Duan W et al. 2018, Gross V.C. et al., 2014, Karp JM et al., 2003, Lederman R.J. et al., 2002). Пористая структура (10 до 1000 мкм в размере) скаффолда играет значительную роль в регенерации костной ткани и дает возможность прорастанию сосудисто-нервному пучку в

скаффолд. «Идеальные» скаффолды должны уравнивать механическую функцию с биофакторами доставки, что обеспечивает последовательный переход из деградируемого скаффолда в необходимую ткань. Этот баланс часто представляет собой компромисс между более плотными скаффолдами, дающими лучшую функциональность, и более пористыми скаффолдами, предоставляющими лучшую доставку биофакторов (Bina Rai et al., 2007),

Нами проанализирована литература, описывающая внедрение и исследования скаффолдов различных моделей на лабораторных животных: подкожная имплантация, внутримышечная имплантация и внутрикостная имплантация.

Подкожная имплантация

Подкожная имплантация - это наиболее простой из всех экспериментальных моделей для внедрения и исследования скаффолдов. Модель может быть выбрана для любого млекопитающего, начиная от мыши и заканчивая крупным рогатым скотом. Грызун, как модель, является предпочтительным и наиболее широко используемым животным из-за низкой стоимости, дряблости кожи (которая вмещает большой объем имплантатов) и наличие иммунодефицитных грызунов для ксенофакторов роста и стимуляторов в эксперименте. Как правило, разрезы должны быть выполнены на тыльной поверхности грызуна так, чтобы уберечь животных от самостоятельного удаления собственных швов. Кроме того, внутрикожные швы могут быть размещены для избегания перевязок (Kenneth M. Dupont et al., 2012, Henkel KO. et al., 2005, Jianglin Wang et al., 2014, Shuilin Wu et al., 2007).

Одна из самых предпочитаемых подкожных имплантаций - во фронтальном положении вдоль позвоночного столба (Cutroneo K. R. et al., 2003).

Другой способ - ягодичная область, где можно создать карман любого размера (Heliotis M et al., 2006).

Важным фактором для подкожного введения костного скаффолда является техническая сторона выполнения этой операции. Физическая идентификация имплантата может быть сложной, т.к. новообразованные кости могут быть похожи на цвет окружающих кожных тканей. Кроме того, дряблая кожа грызунов *приводит к значительным* миграциям имплантата, особенно небольших по размеру. Для облегчения идентификации имплантата (это важно с учетом долгосрочных исследований, отделяющих время имплантации и получения результата) предложено использование цветных скаффолдов или применение клеток/имплантатов с красителем перед имплантацией (Chua et al., 2010).

Мышечный карман имплантации

Часто используется в формировании костей имплантация в мышечный карман (или внутримышечный) (Makinen K. et al., 2002). Как подкожное, так внутримышечное формирование кости также может использоваться почти у любой животной модели. Хотя основой остается опять же модель грызунов, внутримышечную имплантацию легко проводить и на крупных животных (собаки, свиньи, козы и овцы). В небольших животных моделях преимущественно используются задние конечности. Как правило, авторы предлагают имплантацию в бедро комплекса, что дает пространство для большого объема импланта. В мышцы бедра мышцы, например, максимально может быть имплантирован объем до 150 мл. Напротив, в области голени могут быть использованы импланты меньшего объема. Преимущество использования голени является легкое прощупывание имплантата, с помощью которого можно следить за ростом или применить ультразвук при

желании (Chen FM et al., 2012, Wai-Ching Liu et al., 2014, Torroni A et al., 2009).

Внутрикостная имплантация:

Внутрикостная имплантация является более распространенным методом для тканевой инженерии (Do Prado Ribeiro DC et al., 2012, Venay Sager et al., 2003, Vahabi S et al., 2012). Костный имплант внедряется в свою среду, что создает более реальную модель для внедрения.

Внутрикостную имплантацию у грызунов чаще проводят на задних конечностях, в основном на бедренной кости. Выделяют несколько вариантов внутрикостной имплантации: удаление части костной ткани в средней части диафиза бедренной кости или частичное удаление костной ткани в эпифизарной части бедренной кости.

Удаление части кости

Производится удаление части кости в средней части диафиза бедренной кости. Формируется дефект под размер скаффолда (от 3 мм до 10 мм (Arosarena OA et al., 2003, Assmann U et al., 2010, N. Koike et al., 2004) с использованием фиксирующих аппаратов (пластины, стержни).

При удалении в средней части диафиза бедренной кости выполняется кожный разрез в размере от 1,5-4 см, отделение мышц от кости длиной 1 см, затем удаление, счищение надкостницы чуть больше размера скаффолда (от 3 мм до 10 мм). Пятимиллиметровый сегментарный дефект в кости с удалением надкостницы не может зажить самостоятельно, поэтому он считается критическим размером дефекта (Hospenthal DR et al., 2012). В дальнейшем пути выбора модели для фиксации концов кости расходятся – либо проводят стержень, либо устанавливают пластину на боковой стороне бедренной кости (Vi L, 2014).

Накостный остеосинтез

Пластина накладывается на переднюю поверхность диафиза бедренной кости между коленным и тазобедренным суставами. Размер пластины от 2 до 4 см в длину. Пластина закрепляется при помощи винтов диаметром от 1,1 - 1,4 мм (Ayoub AF et al.,2007, Per Bosemark et al.,2015, Harada N et al.,2014, Cancedda R et al. 2007, Hong Cao et al., 2010, Chien KB et al., 2013, Duan W et al.,2018, Einhorn TA et al., 1984, Mariarosaria Galeano et al., 2006, Gross B.C. et al.,2014, Roche C. de Guzman et al.,2013, Hu AJ et al., 2012, Karp JM et al., 2003, Lederman R.J. et al., 2002, Popat A.H. et al., 1998). В некоторых случаях в дополнения к винтам выполняют проволочную фиксацию с проведением витков, огибая кость с пластиной. (Ayoub AF et al.,2007, Bruder SP et al., 1998, Einhorn TA et al.,1984). После установки пластины 8-мм костный сегмент вырезается с помощью микро-сагиттальной пилы. Дефект промывается физиологическим раствором для удаления крови и фрагментов тканей. В качестве материала на костных фиксаторах используют сталь, титан и даже полимер. (Cheng C et al.,2013, Delafontaine P, et al.,2004, Harada N, et al.2014, He Y et al.,2007, Huang Y-C et al.,2006).

Интрамедуллярный остеосинтез

Интрамедуллярный остеосинтез (стержень). В качестве интрамедуллярного фиксатора традиционно используют спицу из медицинской стали 1,2-1,8 мм, которую проводят через медиальный паранодколенный доступ в костномозговой канал, затем через коленный сустав между внутренним и наружным мыщелком бедренной кости до большого вертела. После этого формируют критический дефект вокруг интрамедуллярной установленной спицы (Arosarena OA, et al., 2003, Hollister S.J. et al.,2005, Jin L et al.,2012, Park H et al., 2018).

Большинство имплантатов от 4 до 16 недель после хирургического вмешательства находятся под наблюдением.

1.7. Факторы роста

Ангиогенным фактором роста, часто применяемый в регенеративной медицине, является сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF), имеющий изоформы этого семейства: VEGF-A является доминирующим фактором в регулировании ангиогенеза и роста эндотелиальных клеток; VEGF-B стимулирует эмбриональный ангиогенез (тканей миокарда, в частности); VEGF –C и –D участвуют преимущественно в лимфоангиогенезе (Нефедова Н.А., Давыдова С.Ю. ,2015,Cutroneo K. R. et al.,2003, Drury J.L. et al.,2003).

VEGF продуцируется эндотелиальными клетками, макрофагами, фибробластами, клетками гладких мышц, остеобластами и гипертрофическими хондроцитами, влияет на развитие новых кровеносных сосудов (ангиогенез) и выживание незрелых кровеносных сосудов (сосудистая поддержка), связываясь с двумя близкими по строению мембранными тирозинкиназными рецепторами (рецептором-1 VEGF и рецептором-2 VEGF) и активируя их. Эти рецепторы экспрессируются клетками эндотелия стенки кровеносных сосудов(Michelle T. Poldervaart, 2014). Связывание VEGF с этими рецепторами запускает сигнальный каскад, который в конечном итоге стимулирует рост эндотелиальных клеток сосуда, их выживание и пролиферацию (Бокерия Л.А., Демидова О.А., Аракелян В.С., Еремеева М.В.,2006, Бочков Н.П., Константинов Б.А., Гавриленко А.В. и др. ,2006, Нефедова Н.А., Давыдова С.Ю. ,2015, Giancotti F.G. et al.,1990, Deckers MM, et al. 2002, Delafontaine P et al., 2004, Drossea I., 2008, Drury J.L. et al., 2003, Duan W. et al., 2018).

Опираясь на изученные свойства фактора роста эндотелия сосудов, ученые исследовали и доказали, что VEGF может быть легко включен в конструкции скаффолда без потери биологической активности и влиять на механизмы ангиогенеза.

В литературе описаны случаи, что повышение экспрессии VEGF приводит к возобновлению роста и прогрессии опухолей разной локализации.

Инсулиноподобный фактор роста (IGF)

IGF участвует в эндокринной, аутокринной и паракринной регуляции процессов роста, развития и дифференцировки клеток и тканей (Beckman DL et al.,1999, Fleissner F et al.,2008). Повышает общую биодоступность оксида азота, что способствует привлечению эндотелиальных клеток-предшественников (EPC) из костного мозга (Fleissner F et al.,2008, Jain A.P. et al.,2013) и стимулирует ангиогенез и образование новых сосудов (Костив Р.Е., Калиниченко С.Г., Матвеева Н.Ю., 2017, Furth ME et al.,2007, Jain A.P. et al.,2013).

Система IGF состоит из гормонов (IGF-1 и IGF-II), группы мембранных клеточных рецепторов, опосредующих биологические эффекты IGF, IGF-1 - белок из семейства инсулиноподобных факторов роста, состоящий из одной полипептидной цепи длиной 70 аминокислотных остатков с тремя внутримолекулярными дисульфидными мостиками (Костив Р.Е., Калиниченко С.Г., Матвеева Н.Ю., 2017).

Было выявлено, что IGF обладают нейротоксичностью и могут вызывать болезнь Альцгеймера, провоцировать ожирение, умственную отсталость, непереносимость глюкозы.

Интегрины

Интегрины - это молекулы межклеточной адгезии, которые присутствуют на поверхности различных клеток, в том числе и лейкоцитов. Они участвуют в адгезии лейкоцитов к внеклеточному матриксу (ECM) и к эндотелию. Все белки, входящие в это крупное семейство, состоят из двух нековалентно связанных полипептидных цепей (альфа и бета). Обе цепи

пронизывают клеточную мембрану. Альфа цепь содержит 3 или 4 тандемных повтора мотива связывающего двухвалентные ионы и нуждаются в Mg и Ca для функционирования. Альфа цепи при связывании с бета цепью дают функциональный рецептор (Boyan BD et al.,1996). Бета цепь имеет функциональное значение и интегрины классифицируются по ним. Так интегрины с бета 1 или бета 3 цепью преимущественно вовлечены во взаимодействие клетки - ECM. Интегрины с бета 2 цепью преимущественно вовлечены во взаимодействие лейкоцитов между собой. Семейство интегринов делят на три основных подсемейства по типу бета-цепи (бета1, бета2 и бета3). Тип альфа-цепи не так важен для функциональной активности.

Интегрины бета1 участвуют, в основном, в связывании клеток со структурами внеклеточного матрикса; Интегрины бета 2 участвуют в адгезии лейкоцитов к эндотелию или другим клеткам иммунной системы; Интегрины бета3 (цитоинтегрины) участвуют в слипании тромбоцитов с нейтрофилами в очагах воспаления или местах повреждения сосудов (Boyan BD et al.,1996).

Костные морфогенетические белки (BMPs; bone morphogenetic proteins) - одна из основных групп морфогенетических сигнальных белков, была открыта благодаря их способности воздействовать на формирование кости и хряща. BMP продуцируются остеобластами, хондроцитами и остеопрогенезированными клетками и локализуется в костной ткани, в плаценте, в простате, в пульпе зубов и в дентине ([Xia P, 2019](#)).

Вначале были расшифрованы и изучены гены семи белков. В настоящее время открыты еще 13 видов белков BMP. Из них шесть (BMP2 – BMP7) по своим структурно-функциональным свойствам относятся семейству молекул трансформирующего фактора роста- β (TGF- β), который

вместе с пролангином E, глюкокортикоидами, витамином D и эстрадилом, усиливает эффекторное действие BMP (Cheng N,2013). TGF- β - существует в трех изоформах: β 1, β 2 и β 3, которые секретируются остеобластами и остеоцитами и всегда присутствуют в латентной форме в костном матриксе.

BMP действуют на рецепторы клеточной мембраны и играют значительную роль в регулировании роста, дифференцирования и апоптоза различных типов клеток включая остеобласты, хондробласты, нервные и эпителиальные клетки (Kenneth M. Dupont, 2012, Li D et al.,2016, Sungsoo S. Lee,2013).

Современные биомедицинские технологии предусматривают использование данных остеоиндукторов в виде рекомбинантных белков (rhBMP), фиксированных на носителях, которыми могут быть синтетические, биологические, минеральные или биокompозитные полимеры (Берченко Г.Н.,2008, Бокерия Л.А., Демидова О.А., Аракелян В.С., Еремеева М.В., 2006 Константинов Б.А., Бочков Н.П., Гавриленко А.В. и др.2005, Kevin W.,2012).

Побочные эффекты при применении BMP проявляются местной эритемы. Клиническую дозу BMP при использовании в клинику сложно подобрать. На данный момент экономическая доступность препарата ограничена.

Стволовые клетки

Исследования в области тканевой инженерии и регенерации тканей проводят с использованием эмбриональных стволовых, индуцированных плюрипотентных и соматических стволовых клеток (Chris Hyunchul Jo,2013). Но клиническое применение нашли аутологичные мезенхимальные стволовые клетки (МСК), выделяемые из костного мозга, жировой ткани, кожи, пупочного канатика и плаценты. Мировой опыт их использования, с положительным эффектом, представлен

многочисленными трансплантациями при различных заболеваниях. Эмбриональные стволовые и индуцированные плюрипотентные клетки в клинической практике не применяют из-за ряда проблем, в том числе из-за нестабильности генома и онкогенности (Иванов, 2014, Семенов М.Г., Степанова Ю.В., Трощиева Д.О., 2016).

Остеогенная дифференцировка МСК предполагает способность данных клеток развиваться в остеобласты, что перспективно для применения ММСК в обеспечении репаративной регенерации костной ткани, в том числе для лечения несовершенного остеогенеза. Для индукции остеогенной дифференцировки ММСК (мультипотентные МСК) в культуральную среду добавляют дексаметазон, аскорбиновую кислоту и β -глицерофосфат. Дифференцировка ММСК в остеобласты подтверждается экспрессией щелочной фосфатазы, наличием внеклеточных преципитатов солей (Иванов, 2014).

Биоисследования для прямой остеогенной дифференциации взрослых мультипотентных стромальных клеток (MSC) без экзогенных белков являются современным подходом к регенерации кости. Идентификация *in vivo* остеогенных вкладов экзогенных MSCs на биошаблонах после долговременной имплантации имеет жизненно важное значение для жизнеспособности клеток и продолжительности эффекта (Chen FM et al., 2012).

Для изучения возможности регенерации костного дефекта критического размера с использованием аутогенных MSC в области ортопедии и челюстно-лицевой хирургии были проведены исследования на разных моделях животных (Lee JY et al., 2009).

Основываясь на данных, описанных в работе González-García M et al., можно сделать вывод, что трансплантация мезенхимальной стволовой клетки из костного мозга, внедренная в скаффолды β -ТСР в мышечных моделях,

является безопасной и эффективной, стимулируют формирование костей (Jain A.P. et al.,2013, González-García M et al., 1993, Семенов М.Г., Степанова Ю.В., Трошиева Д.О.,2016).

Однако многие клинические испытания не смогли продемонстрировать эффективные результаты, потому что, такие критические аспекты, как доза клеток, возвращение в исходное положение, приживление биораспределение in vivo оказались существенной проблемой.

Эритропоэтин (ЕРО)

Эритропоэтин (ЕРО) представляет собой хорошо известный гормон, регулирующий образование красных кровяных клеток (Arosarena OA и др,2003, Megan E. Oest et al., 2007). ЕРО, с его антиапоптотическим и тканезащитными эффектами, используется в клинике при лечении хронической анемии, нарушение миокарда, сахарного диабета, повреждение спинного мозга, острое повреждение легких и др(С. Li, 2015). Исследования показали, что ЕРО может увеличить экспрессию VEGF в местах травм, способствовать дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в остеобласты, содействовать ангиогенезу и помогать в формировании сосудистой сети и ускорении заживления ран (Giancotti F.G. et al.,1990, Henkel KO. et al.,2005). Также он играет определенную роль в регенерации костной ткани (Megan E. Oest et al., 2007).

Заключение

В результате анализа литературы можно сделать вывод, что при заболеваниях опорно-двигательного аппарата, травмах, остеопорозе одним из ведущих направлений в области реконструктивно-пластической хирургии является создание индивидуальных аддитивных имплантов с учетом формы, объема и структуры кости.

В качестве одного из важнейших факторов тканевой инженерии является создания скаффолда как механической опоры и внутреннего пространства для клеточной адгезии, пролиферации и дифференцировки, а также формирования и роста тканей. Поэтому вопрос применения скаффолдов, имитирующих природные механические свойства костной ткани становится первоочередной задачей после биосовместимости. Помимо химического состава материалов скаффолда, пористость и размер пор также существенно влияют на механические свойства и вращение. Идеальные скаффолды обязаны обладать достаточной прочностью, чтобы поддерживать регенерацию костной ткани после операции и полностью замещаться новообразованной костной тканью без реоперации.

Достижения в области химии и физики фосфатов кальция дали толчок для исследования и разработки материалов, предназначенных для замещения дефектов костных структур, и создания принципиально новых клеточных технологий, и факторов для регенерации костной структуры.

Поэтому можно считать, что одним из основных материалов в тканевой инженерии для реконструкции костных дефектов критического размера может стать три кальцийфосфат, отвечающий требованиям, предъявляемым идеальному биомиметическому материалу скаффолда.

Получены данные на лабораторных животных по реконструкции костных дефектов критического размера с применением ТСР скаффолдов, обогащенных различными факторами роста. Показана высокая эффективность применения новых моделей.

Надо отметить, что локальное применение различных факторов роста воздействует на пролиферацию, дифференциацию и синтез белковых структур в культурах остеобластов и образование костной ткани в различных моделях на животных, включая экспериментальные переломы и

дефекты костей. В настоящее время факторы роста коммерчески доступны и применяются в некоторых странах в клинической практике; однако малое количество их в костной ткани, трудность выделения и очистки, невозможность генноинженерного синтеза некоторых из них (например BMPs), исключительная дороговизна некоторых из них делают применение этих факторов практически недоступными в экспериментальной и клинической медицине.

Таким образом, для совершенствования свойств ТСФ скаффолда, с целью повышения его регенеративной способности, необходимо провести исследования по созданию ТСФ скаффолда с использованием специальных факторов роста, в частности, - Эритропоэтина.

Глава 2 Материалы и методы

В данной работе проводились исследования, включающие в себя разработку биокерамического скаффолда с помощью трехмерной печати с заданными свойствами и внедрение его оперативным путем в искусственно сформированный дефект лучевой кости лабораторной крысы и анализ биосовместимости и регенерации при помощи рентгеновских, гистологических исследований.

2.1 Изготовление скаффолдов на основе трикальцийфосфата

Трехмерные биокерамические образцы на основе трикальцийфосфата были изготовлены в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт проблем лазерных и информационных технологий Российской академии наук.

Печать биокерамических матриц заданной архитектуры проводилась на трехмерном принтере.

Принцип работы установки основан на послойном выращивании трехмерного объекта.

Рабочий столик установки состоит из двух поршней. Тонкий (100 -200 мкм) слой исходного порошкообразного керамического материала на основе трикальцийфосфата (ТКФ) переносится на рабочий поршень с загрузочного поршня при помощи комбинированного модуля, задающего постоянный уровень поверхности порошка относительно печатающего модуля установки. Затем полученный слой материала смачивается из печатающего модуля связующим веществом (ЗЖ) по координатам, задаваемым исходной компьютерной трехмерной моделью. Далее рабочий столик понижает свой уровень на заданный шаг, а подающее устройство наносит новый слой порошка. Такой подход позволяет получить трехмерную структуру

практически любой геометрии, ограничиваясь только дисперсностью исходного материала и разрешающей способностью самого процесса печати, которая, в свою очередь, зависит, главным образом, от объема связующего на единицу площади, толщины слоя и смачиваемости используемого порошка конкретным жидким связующим.

Перемещение печатающего устройства обеспечивается прецизионной системой позиционирования, выполненной на двух шаговых приводах с винтовой передачей и на прецизионных стальных направляющих с безлюфтовыми линейными шариковыми подшипниками. Ошибка перемещения составляет не более 6 % при шаге 25 мкм. Результаты тестовой печати показали, что такая точность перемещений в 4 раза превосходит наилучшее достигнутое на сегодня разрешение печати у коммерческих трехмерных принтеров. Печатающее устройство собирается на основе улучшенной версии промышленно изготавливаемого картриджа для струйных принтеров HP C6602A. Аналог обладает более мощными и устойчивыми к агрессивным химическим средам соплами диаметром 40 мкм и рабочей частотой инъекции ~ 2 кГц. Объем одной капли ЗЖ сравним с аналогичным параметром для базовой версии печатной головки и составляет 40 пл.

Для управления системой использован коммерчески доступный программируемый AVR-микроконтроллер ATMEGA 2560. Основной функцией этого устройства является прием и трансляция компьютерных команд, а также формирование управляющих сигналов для контроллеров шаговых двигателей и печатающего устройства. Микроконтроллерами шаговых двигателей являются широко распространённые модули на основе интегральных схем Allegro A4983/A4988 или их аналогов.

Программное обеспечение для управления принтером разработано и отлажено в лаборатории ФНИЦ "Кристаллография и фотоника" РАН. По

формату файла-модели оно соответствует принятым стандартам, а по набору команд - является уникальным. В качестве стандарта для файла-модели использовались широко распространенные форматы STL или DICOM.

Основной компонент программного комплекса выполняется на персональном компьютере, где реализуется преобразование файла-модели в растровые слои и затем в командный код для принтера. Помимо этого, программное обеспечение поддерживает двухстороннюю связь для контроля и управления установкой трехмерной печати в ручном режиме. Кроме того, программа-транслятор для микроконтроллера способна самостоятельно контролировать процесс печати по заранее подготовленному и записанному на съемный носитель информации набору команд.

Трехмерная печать биокерамических матриц заданной архитектоники проводилась согласно следующему алгоритму:

-исходные цифровые модели создавали с помощью программ моделирования данных, получаемых с медицинского диагностического оборудования (томографа).

-исходные данные преобразовывали в командный код принтера с учетом заданных параметров печати: толщины слоя, разрешения и состава композиции.

-исходный мелкодисперсный порошок ТКФ с заданным размером и морфологией частиц загружался в систему подачи и проводилось тестирование подачи порошка и работы выравнивающего устройства.

-в печатающее устройство заливалось связующее вещество и проводилась проверка функционирования сопел.

-осуществлялось послойное изготовление трехмерной конструкции.

-по завершении процесса изготовленные конструкции извлекались из трехмерного принтера и очищались от частиц неиспользованного порошка с помощью сжатого воздуха.

-пригодными признавались образцы, имеющие форму, размеры и структуру, в точности (не хуже 20 мкм) соответствующие их трехмерной компьютерной модели.

Исходные порошки с размером частиц 30-80 мкм загружались в принтер, после чего происходило формирование слоев, толщиной от 100 мкм, без нанесения связующего вещества. Для трехмерной печати порошками с дисперсностью 30-80 мкм использовались следующие начальные условия: разрешение 100 мкм по всем осям и количество связующего 1 капля на точку (к/т). Несмотря на успешное получение единичных слоев, образцы заданной геометрии получены не были. Это было связано с изменением объема порошка при его смачивании. Далее разрешение печати последовательно уменьшалось на 10 мкм до получения устойчивого результата. Наилучшие результаты были достигнуты при печати мелкодисперсными порошками ТКФ размером 80-100 мкм при горизонтальном разрешении 100 мкм и толщине слоя 130 мкм. Для достоверной оценки плотности печати в качестве единицы измерения было выбрано количество импульсов сопла (капель) на одну точку (к/т). Этот параметр варьировался в диапазоне от 1 к/т до 10 к/т. Измерения проводились при влажности окружающего воздуха 40 % и температуре 22 °С. При минимальном количестве связующего (1 к/т) образец обладал низкой прочностью при сжатии (менее 1 МПа) при полном соответствии его геометрии исходной цифровой модели. При количестве связующего 2-8 к/т прочность образца достигала значений около 1,5 - 2,8 МПа. Однако при увеличении объема связующего более 5 к/т наблюдались искажения в геометрии образца, достигавшие 0,5-1 мм. Установлено, что оптимальным соотношением геометрического соответствия и механических свойств обладают образцы с плотностью печати 2 к/т.

Исследовано взаимодействие между мелкодисперсным порошком ТКФ и связующим в процессе печати трехмерных образцов биоактивных керамик. Избыток связующего приводит к образованию фаз непригодных для использования в качестве остеорегенеративных матриц, а его недостаток значительно снижает механические характеристики изделия и ухудшению параметров печати. Следует отметить, что трехмерная струйная печать формирует структуру за счет дискретных капель-точек. Ключевым моментом в таком процессе формирования трехмерного объекта является не только количественное отношение материал/связующее, но и распределение связующего в объеме.

Полученные трехмерные биокерамические образцы были использованы в последующих биологических экспериментах.

2.1.1 Исследование структуры скаффолдов

Для исследования фазового состава количества связующего на точку варьировалось от 1 к/т до 8 к/т. По данным рентгенофазового анализа (РФА), все исследуемые образцы являются однофазными и их фазовый состав соответствует трикальцийфосфату.

По данным сканирующей электронной микроскопии (СЭМ), образцы характеризуются пористой мелкокристаллической структурой с размером кристаллов около 80-100 мкм, между которыми находятся прослойки дикальцийфосфат дигидрата (ДКФД).

Таким образом, реакционное твердение в процессе печати при выбранных условиях происходит только по поверхности мелкодисперсных порошков ТКФ, что приводит к их «склеиванию».

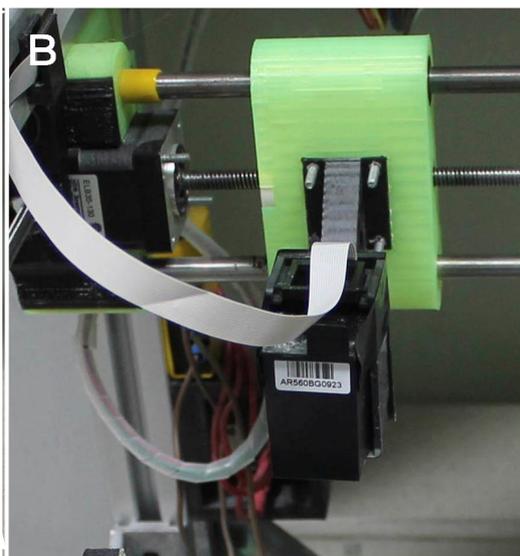
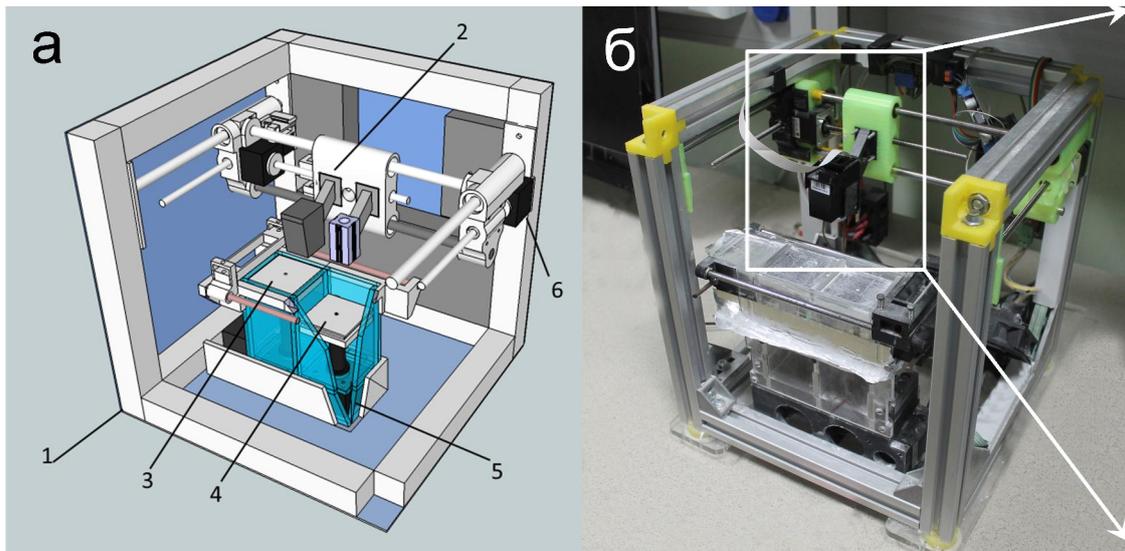


Рисунок 1. Установка трехмерной печати порошковых материалов жидкими связующими

а-б: 1 – корпус; 2 – печатающий модуль; 3 – резервуар для порошка; 4 – столик; 5- рабочая камера;

б – шаговые приводы.

в - Печатающая головка с системой позиционирования

2.1.2. Основные свойства скаффолда на основе ТКФ

С учетом химической структуры скаффолда и присущих ему физико-химических свойств отобраны необходимые критерии для обеспечения воспроизводимого эффекта эксперимента.

1. Резорбируемость или частичная резорбируемость
2. Способность выступать в роли матрицы при регенерации костной ткани
3. Пористость
4. Прочность
5. Биосовместимость материалов, клеток и вспомогательных компонентов в комплексе трехмерной печати.

Размеры полученных образцов при их измерениях составили по длине от 4900 до 5100 мкм (5000 ± 100 мкм) и по диаметру 2900 до 3100 мкм (3000 ± 100 мкм), что соответствовало величине мелкодисперстного порошка, образующий слой.

Таблица 1 Размеры скаффолдов, созданные при помощи трехмерной печати

Параметры скаффолдов	Количество	Размер (длина (мкм))	Размер (диаметр(мкм))
Заданные параметры	60	5000 (100%)	3000 (100%)
Реальные параметры	60	5000 ± 100 ($100 \pm 2\%$)	3000 ± 100 ($100 \pm 3\%$)
p		p=0.005505	p=0.005505

Скаффолд помещали в пробирку, в которую находилось 3 мл 1000 МЕ Эритропоэтин. Данный раствор ставили на водяную баню, содержащую поворотную плиту (50 об / мин) при 37 ° С. Раствор меняли каждые 6 ч, 12 ч, 24 ч, 3 дня, 7 дней. Затем скаффолды имплантировали в кость(Рис 2 а и б). В течение 7 дней 1 раз в сутки в место имплантации скаффолда проводили инъекцию Эритропоэтин 0,01мл 1000 МЕ (Рис. 2 в).



А



Б



В

Рисунок 2.а и б – Фотография скаффолда, в- Инъекция Эритропоэтином

2.2. Биологические свойства скаффолда.

Идеальный скаффолд является трехмерным имплантом, созданным с помощью 3D принтера, обладающий свойствами биосовместимости, биорезорбирования и должен обладать механическими свойствами, позволяющими выполнить его обработку, расположение в области дефекта и обеспечить стабильность положения и формы на период регенерации костной ткани. При определенных известных недостатках аутологичный костный трансплантат является «золотым» стандартом среди костных трансплантатов, поскольку имеет высокую степень эффективности для восстановления костных структур (Nandi SK, 2018).

Трикальцийфосфат (ТСР) является фаворитом среди других материалов для создания костных скаффолдов, так как композит из этого материала подобен минеральному составу натуральной кости (Masashi Miyazaki et al., 2015). Перед тем как внедрять любой материал, необходимо проверить его на биосовместимость и цитотоксичность, что было выполнено и описано в данной главе.

2.2.1. Материалы, методы и результаты скрининга *in vitro* двух лабораторных партий образцов биокерамики.

В данном исследовании использовали трикальцийфосфат (ТСФ), размер гранул которого достигал 300-600 мкм, с пористостью 54%, и диапазоном размера пор: 1-5 мкм, с удельной поверхностью: 0,51 м².

Образцы керамики, перед началом исследования, тщательно отмывали 5-6 раз дистиллированной водой в объеме 130-150 мл, далее стерилизовали в сухожаровом шкафу (150⁰ С, 120 минут). Исследование образцов производили в 24-х луночных планках (Costar, США). До того как начать эксперимент в планшеты помещали заранее подготовленный стерильный материал (100 мг на лунку) и добавляли культуральную среду в объеме 1 мл

для полного насыщения биокерамических материалов ростовой средой. Каждый образец в платах был размещен в триплетах.

Эксперименты по оценке острой цитотоксичности исследуемых материалов *in vitro* и процесс нарастания на них клеток выполнялись на модели клеточной линии иммортализованных нормальных фибробластов человека (ФЧ, клон № 1608), полученной из Коллекции Типовых Клеточных культур ФГБНУ Медико-Генетического научного центра РАН, г. Москва. Клеточную линию содержали в полной ростовой среде (ПРС) следующего состава: 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ФУРО, Москва), глютамин (600 мг/л), гентамицин (50 мкг/мл), среда ДМЕМ, обеспечивающая ростовую активность клеток (Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва).

В экспериментах были использованы клетки в логарифмической фазе роста (предконфлюэнтный монослой). Чтобы получить суспензии одиночных клеток монослой ФЧ сначала обрабатывали 0,25% раствором трипсина (Sigma, США), а затем полученную взвесь клеток дважды очень тщательно отмывали путем центрифугирования в большем объеме ПРС. Подсчет и оценку жизнеспособности их производили путем окрашивания клеточной суспензии 0,04% раствором трипанового синего. Далее в платы с керамическими образцами (опыт) и без них (контроль) помещали ФЧ ($180 \text{ тыс. кл./см}^2$) в объеме 1,5 мл ПРС и инкубировали: для установления острой цитотоксичности - в течение 24 часов; для того чтобы дать оценку матричных свойств биокерамики - 4, 7, 11, 14, 18, 21 сутки с регулярной полной заменой ПРС (замену производили два раза в неделю). Все манипуляции с материалами и ФЧ производили в стерильных условиях, а культивирование осуществляли в атмосфере влажного воздуха (содержание CO_2 составляло 5% при 37°C).

В динамике экспериментальных исследований оценивали жизнеспособность ФЧ с помощью МТТ метода - колориметрический тест для оценки метаболической активности клеток (Т. Mossman, 1986 г.), который основан на способности дегидрогеназ живых клеток восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазолил-2)-2,5-дифенилтетразолий бромистый (МТТ, Sigma, США) в голубые кристаллы формазана, нерастворимые в воде. Количество образовавшегося формазана способно охарактеризовать пролиферативную активность (жизнеспособность/количество) различных типов клеток человека и животных. Для проведения МТТ-теста в опытах *in vitro* по окончании культивирования ФЧ на культуральном пластике-полистирене (контроль) и ФЧ на образцах биокерамики (опыт) из каждой лунки отбирали по 1000 мкл среды и вносили по 125 мкл раствора МТТ в концентрации 5 мг/мл. Через 3 часа инкубации (5% CO₂, 37⁰) из каждой лунки декантировали по 250 мкл среды. Растворение образовавшегося формазана осуществляли с помощью изопропилового спирта (150 мкл на лунку).

В результате преципитации белков в изопропанол образывался осадок. От него освобождались центрифугированием плат в течение 10 мин. при 3000 об/мин. Далее из каждой лунки забирали по 100 мкл супернатанта и переносили в 96-луночный плоскодонный планшет (Costar, США) для того чтобы оценить оптическую плотность раствора формазана. Исследования проводили на спектрофотометре МСС-340 (Швеция) при длине волны 540 нм. В качестве спектрофотометрических контролей (бланк) применяли пробы с чистой ПРС и пробы, которые содержали тестируемые образцы в ПРС (без клеток).

Цитотоксичность материалов определялась путем расчета пула жизнеспособных клеток (ПЖК), выжившего после 24 часов инкубации с данными материалами, по формуле:

$$\text{ПЖК} = \frac{\text{ОД}^*_{\text{опыт.}}}{\text{ОД}_{\text{контр.}}} \times 100\%$$

ОД* - оптическая плотность раствора формазана

Матриксные свойства биокерамических материалов оценивали путем определения изменения пула ФЧ (Δ) в установленный срок по формуле:

$$\Delta = \frac{\text{ОД}_{\text{наст.}} - \text{ОД}_{\text{пред.}}}{\text{ОД}_{\text{пред.}}} \times 100\%$$

ОД_{наст.} - величина оптической плотности в конкретный срок

ОД_{пред.} - величина оптической плотности в предыдущий срок

О приросте популяции ФЧ говорит положительная величина пула, отрицательная свидетельствует о гибели части популяции.

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента, считая достоверными различия при $p < 0,05$.

2.2.2. Оценка острой цитотоксичности и матриксных свойств поверхности образцов лабораторной партии биокерамики ТСР

Также было проведено исследование восьми образцов ТСР с таким же составом, что описывался ранее, но полученные другим методом (путем осаждения из водных растворов). Определено, что острой цитотоксичностью, в отношении культуры ФЧ, опытные образцы ТСР данной лабораторной партии не обладают. Культивировании их на этих материалах выявило, что через 24 часа показатель величины оптической плотности раствора формазана в опытной группе не отличался от контрольных значений. Величина пула жизнеспособных клеток находилась в пределах 70-89% от

контроля (табл.3). Полученные в результате исследования данные указывают на то, что образцы ТСР обладают удовлетворительными для клеток адгезивными способностями и не являются токсичными для этих клеток (табл. 2).

Таблица 2. Оптическая плотность раствора формазана (МТТ-тест, усл.ед.) и величина пула жизнеспособных клеток (ПЖК в %) через 24 часа их культивирования ТСР

№ образца**	Материалы	Измеряемые параметры	
		Оптическая плотность (усл.ед.)	Пул выживших клеток (ПЖК в %)
1	Полистерен (контроль 1)*	0,634±0,031	100
2	Полистерен (контроль2)*	0,454±0,001	100
3	ТСР	0,348±0,023	77,0

Исследования матричных свойств данных образцов ТСР установило, что популяция ФЧ при длительном культивировании (до 28 суток) постоянно возрастала и статистически достоверно превышала контрольные значения, что отражалось высокими значениями оптической плотности раствора формазана в опытной группе в процессе наблюдения (табл.2) и в превышающих контроль показателях пула жизнеспособных клеток (табл.3).

Таблица 3. Величина оптической плотности раствора формазана (МТТ-тест, усл. ед.) в динамике культивирования ФЧ на полистерене (контроль) и образцах биокерамики ТСР (опыт).

№	Материалы	Величина оптической плотности р-ра формазана (усл. ед.) в динамике эксперимента (сутки)							
		1	3	7	10	14	17	21	28
1	Полистерен (контроль1)	0,6	0,810	1,072	1,301	1,362	2,010	1,993	3,173
		34	±0,00	±0,05	±0,03	±0,07	±0,00	±0,05	±0,00
		±0, 031	4	2	3	0	0	5	7
2	Полистерен (контроль2)	0,4	0,700	0,878	1,669	2,061	2,509	3,186	3,412
		55	±0,01	±0,08	±0,08	±0,02	±0,07	±0,10	±0,00
		±0, 001	6	9	9	9	7	6	
3	ТСР	0,3	0,740	0,978	1,942	2,346	2,973	3,586	3,931
		48	±0,00	±0,01	±0,11	±0,02	±0,05	±0,12	±
		±0, 023 *	6	3	8	4*	5*	2	0,061 *

* - статистически достоверная разница с контролем ($p < 0,05$)

В контрольных группах, при культивировании ФЧ на полистерене, величина оптической плотности раствора формазана за 28 суток исследования увеличилась с 0,634 до 3,173 усл.ед. и с 0,455 до 3,412 усл.ед., а в опытных образцах ТСР с 0,348 до 3,931 усл.ед. Это говорит о том, что получено статистически достоверное превышение показателя оптической плотности раствора формазана над контрольными значениями.

Полученные результаты в некоторой степени указывают на численное превосходство пула фибробластов на опытном материале по сравнению с контролем (культуральный пластик полистирен). Данный факт был полностью подтвержден при оценке изменения величины пула ФЧ (по отношению к контролю в определенный срок эксперимента) и скорости прироста клеточной популяции в процессе культивирования на ТСП (табл.3, табл.4).

Таблица 4. Величина пула жизнеспособных клеток (в % по отношению к контролю) при культивировании фибробластов на полистерене (контроль) и образцах биокерамики ТСП (опыт).

№	Материалы	Величина пула жизнеспособных клеток по отношению к контролю (%) в динамике эксперимента (сутки)							
		1	3	7	10	14	17	21	28
1	ТСП	76	106	111	116	114	118	113	115

Начиная с 3 суток наблюдения установлено, что пул ФЧ на опытных материалах данной лабораторной партии незначительно превышал контроль.

Анализируя процесс изменения популяции ФЧ в условиях культивирования на образцах кальций-фосфатной биокерамики ТСП до 4-х недель были получены результаты, утверждающие, что максимальный прирост пула ФЧ как в опыте, так и в контроле происходит, в основном, в первую неделю эксперимента. Однако в опытной группе процесс клеточной экспансии протекает интенсивнее, чем в контроле. Так, к концу первой недели культивирования величина прироста популяции ФЧ на опытных образцах материалов составляла 181% vs 69,1 – 93,0% в контроле I и II, соответственно, а далее при увеличении плотности клеток на поверхности, -

снижалась. В целом, к концу эксперимента пул ФЧ в опытных группах увеличится на 275-375%, в контроле – на 200-275% (табл. 5, рис. 3 а,в)

Таблица 5. Скорость прироста популяции (1%) ФЧ при культивировании их на полистирене (контроль) и образце ТСР, синтезированных методом осаждения из растворов (опыт) в динамике эксперимента, 28 vs 1 сутки.

№	Образцы	Прирост популяции ФЧ (в %) в динамике наблюдения (сутки)			
		7vs1	14vs7	21vs14	28vs21
1	Полистирен (контроль I)	69.1	27.1	46.3	59.2
2	Полистирен (контроль II)	93.0	134.7	54.6	7.1
3	ТСР	181.0	139.9	52.9	9.6

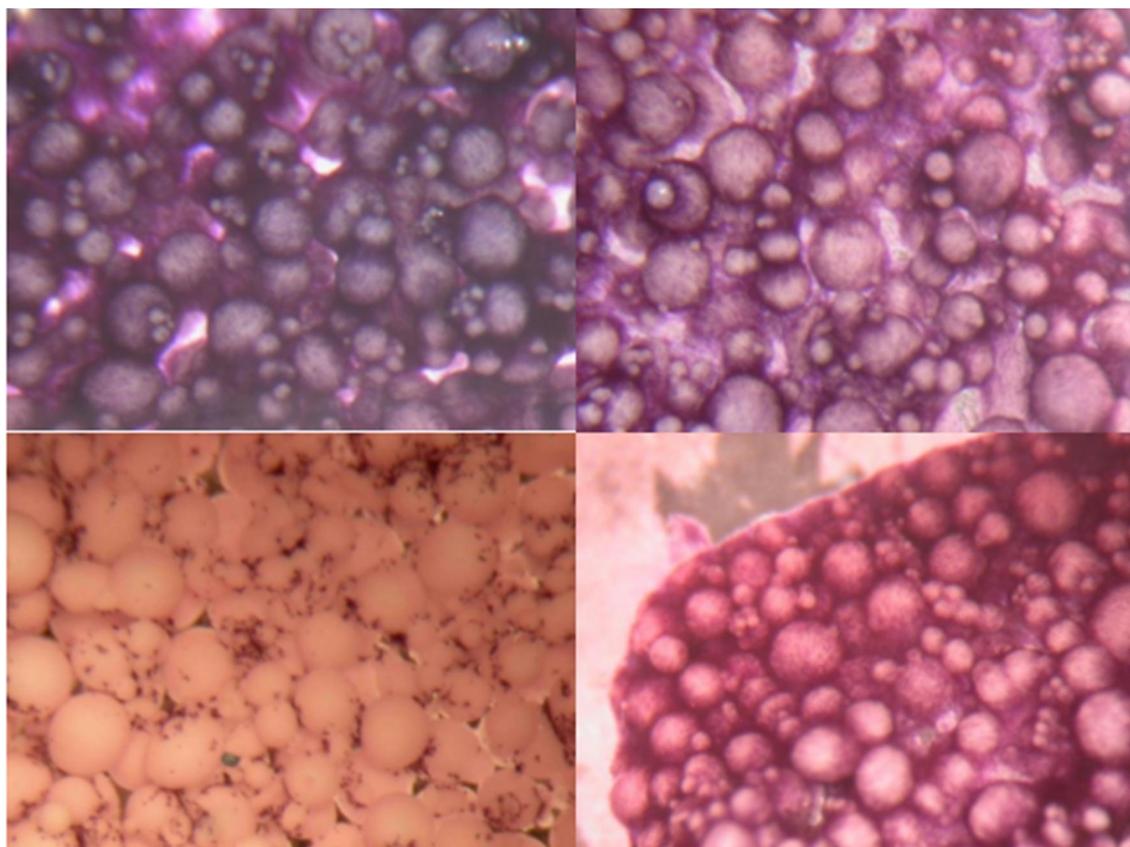


Рисунок 3. Динамика изменения пула ФЧ при культивировании на бифазной керамике ГА/ТСП (80/20): а-1 сутки, б-7 сутки, в-14 сутки, г-21 сутки (МТТ-тест, х16).

2.3 Описание модели и эксперимента. Хирургический метод исследования.

В работе использовались лабораторные крысы, предоставленные питомником «Светлые горы» Федерального государственного бюджетного учреждения науки "Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства". Весь эксперимент с животными проводился согласно руководству по уходу за лабораторными животными и использованию их, как это определено национальными институтами здоровья (nih, США, Animal Care and Use Committee), Института теоретической и экспериментальной биофизики РАН, в соответствии с

Декларацией Всемирной Медицинской Ассоциации Хельсинки (2000), в соответствии с требованиями приказов «Санитарные правила по устройству, оборудованию и содержанию вивариев» № 1045- 73 от 06.04.197 и № 1179 МЗ СССР от 10.10.1983, №267 МЗ РФ от 19.06. 2003, «Правила проведения работ с использованием экспериментальных животных», «Правила по обращению, содержанию, обезболиванию и умерщвлению экспериментальных животных», утвержденных МЗ СССР (1977) и МЗ РСФСР (1977), принципов Европейской конвенции (Страсбург, 1986).

Все животные были в возрасте 5-6 месяцев, породы Vister, как самки, весившие приблизительно 300-350 г на момент проведения операции, так и самцы, вес которых достигал 450-500 г. Использование в эксперименте разнополых крыс обусловлено определением показателя биосовместимости и резорбируемости у самцов и самок.

Животные содержались в условиях конвенционального вивария, в качестве подстила использовались древесные опилки. Воду и комбикорм полнорационный для лабораторных животных давали *ad libitum*. Перед включением в эксперимент крыс помещали в изолятор, где они на протяжении 14 дней проходили карантин. Последнее кормление крыс осуществляли за 12 часов до постановки эксперимента. Исследования проведены на 90 крысах.

Все крысы были разделены на три группы:

- контрольная группа с критическим дефектом, не заполненным имплантом;
- группа животных с ТСП скаффолдом;
- группа с ТСП скаффолдом, обогащенным Эритропоэтином.

Каждый из этих групп подразделялась на три подгруппы с контролем на сроках 10 дней (на данном сроке гистологическое исследование не проводили), 28 дней и 3 месяца после операции. (табл. 6)

Таблица 6. Распределение крыс по группам

Группы крыс/время	10 дней	1 месяц	3 месяца
Контрольная группа	10 крыс	10 крыс	10 крыс
Без имплантов			
С имплантом TCP	10 крыс	10 крыс	10 крыс
С имплантом TCP, обогащенным Эритропоэтином	10 крыс	10 крыс	10 крыс

В первой группе ($n = 30$) крысам проводилось ложнооперативное моделирование с формированием дефекта без внедрения скаффолда. Наблюдение проводилось за крысами на 10, 28 сутки и через 3 месяца.

Во второй группе ($n = 30$) крысам выполнялась операция по созданию критического дефекта. Заполнение дефекта осуществлялось трикальцийфосфатным скаффолдом (без внедрения в скаффолд дополнительных факторов стимуляции) и наблюдали за крысами на 10, 28 сутки и через 3 месяца.

В третьей группе ($n = 30$) крысам проводили операцию по формированию дефекта и последующим заполнением его трикальцийфосфатным скаффолдом, обогащенным дополнительным фактором для стимуляции роста костной ткани - Эритропоэтином. Наблюдение проводилось за животными на 10, 28 сутки и через 3 месяца.

2.4 Этапы и особенности внедрения скаффолдов в экспериментальных животных (модели)

Все оперативные вмешательства проводили в условиях асептической операционной на базе вивария «Светлые горы» при использовании одноразовых и стерильных инструментов (в рамках газовой стерилизации) с

соблюдением правил асептики и антисептики. Для анестезии использовали внутримышечное введение золетила-50 в дозе 2 мг/кг массы тела животного и внутримышечного введения ксилы 2% раствора 1,5 мг/кг массы тела животного. После наступления наркоза животное фиксировали на экспериментальном операционном столике в положении на спине. Лапы фиксировали на операционном столике с помощью специальных закрепителей. Выбрасывали верхнюю левую лапку. Операционное поле дважды обрабатывали 70%-м раствором этилового спирта, изолировали салфетками. (Рис. 4)



Рисунок 4 Подготовка операционного поля у лабораторных животных

Эксперимент выполнялся на передней левой лапе животного, на которой была сформирована модель костного дефекта, не требующая остеосинтеза, обеспечивающая доступность для объективного наблюдения, незначительную кровопотерю, минимальное нарушение нормальных физиологических функций животного по сравнению с моделью на задней лапе, которая является опорной конечностью. Исходя из анатомического

строения предплечья, где лучевая кость является меньшей из двух костей и тело ее изогнуто вдоль локтевой кости и, незначительно расширено дистально, на латеральной поверхности локтевой кости лежит лучевая вырезка, а обе кости соединены тонкой перепонкой, было принято решение использовать локтевую кость как фиксатор скаффолда внутри максимального (критического) дефекта, который составил 5 мм. (Рис. 5)

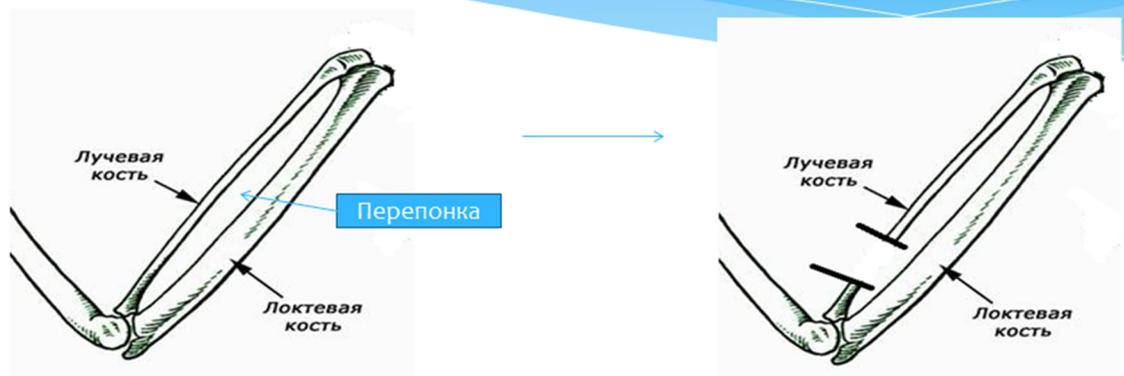


Рисунок 5 схема модели созданного критического дефекта на лучевой кости у крыс.

Скальпелем проводили разрез кожи по средней линии в проекции перепонки между локтевой и лучевой костью протяженностью до 15 мм. (Рис.6).



Рисунок 6 Оперативный доступ осуществляли на ладонной стороне предплечья по средней линии предплечья.

Рассекали поверхностную фасцию, выделяли вентральный сосудистый пучок и отводили его кнаружи, распаторами отводили мышцы (мышцы не разрезались), обнажая лучевую кость в проекции дистального конца. В дистальном конце лучевой кости удалялся фрагмент кости, соответствующей критическому размеру кости и идентичный импланту (соответствующий критериям критического размера). Стерильным электрическим бором диаметром 2 мм формировали дефект с удалением кости и удаления осколков и костной пыли с постоянным орошением. (Рис. 7 а,б и в)

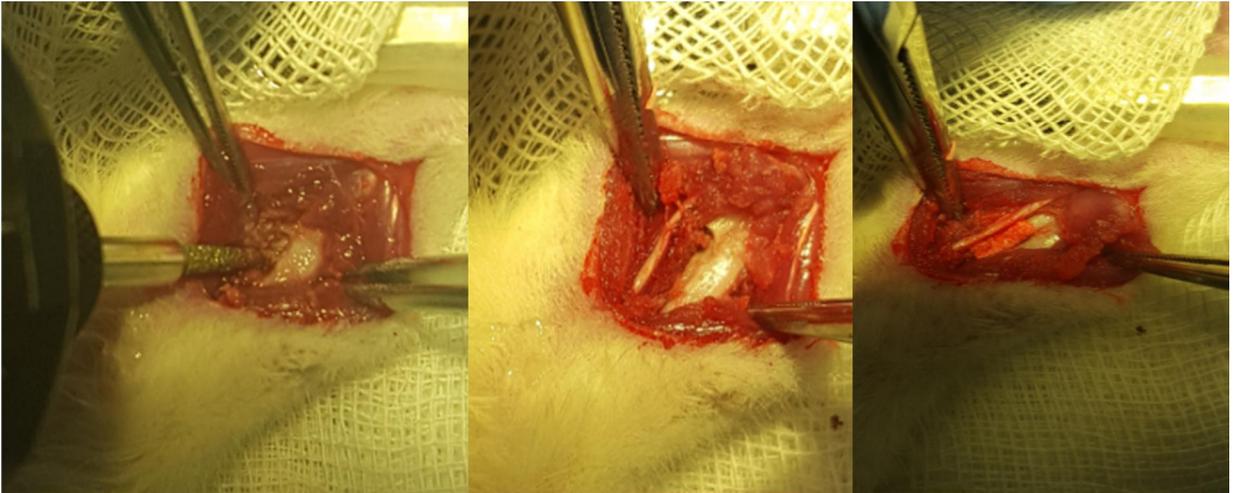


Рисунок 7

а, б - Подготовка операционного поля для создания критического дефекта в лучевой кости у крыс; в- Установка скаффолда в искусственно созданный дефект

Скаффолд, созданный в Институте проблем лазерных и информационных технологий РАН в соответствии с вышеописанными технологиями создания скаффолдов, устанавливался в место удаленной кости. Лучевая кость была стабилизирована с помощью локтевой кости, чтобы сдерживать дефект и в точности фиксировать скаффолд внутри дефекта в течение всего периода исследования.

Гемостаз. Послойное ушивание раны- (пролен- 5/0). Послеоперационные швы обрабатывали 70%-м раствором этилового спирта.

В течение первых трех дней после операции животным вводился линкомицин 10 мг/кг массы тела животного и парацетамол 10 мг/кг массы тела животного 1 раз в сутки в качестве обезболивающего и антибактериальной терапии. По истечении 2-3 х дней после операции у животных возобновлялось нормальное движение правой передней лапки и не наблюдались признаки боли или недомогания.

После окончания операций животных переводили в виварий, размещая по две особи в клетку, где они находились весь период эксперимента. Наблюдение за послеоперационной раной у крыс осуществлялось в течение первых 10 суток после оперативного вмешательства, животные не проявляли признаков боли, ни одного случая инфекции не выявлено. В течение эксперимента ни одно животное не погибло. Все животные вернулись к нормальному питанию в течение 3 дней после операции. Каждые 7 дней в место имплантации скаффолда третьей группы крыс вводился Эритропоэтин (ЕРО) 0,01мл 1000 МЕ. После инъекции поведение животных не менялось.

Выведение животных из эксперимента осуществлялось по заранее составленному графику в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденными приказом МЗ СССР №755 от 12.08.77. Все эксперименты и выведение животных из опытов осуществляли под анестезией с помощью формалина.

2.5. Статистический анализ

Данные анализировались с использованием программного обеспечения SPSS(версия 19, SPSS, Inc., Чикаго, Иллинойс, США). Статистический анализ проводился с использованием U-теста Манна-Уитни или t-теста Стьюдента (другие). Значение $p < 0,05$ было статистически значимым.

Заключение.

Исследовано взаимодействие между мелкодисперсным порошком ТСП и связующим в процессе печати трехмерных образцов биоактивных керамик.

Установлена плотность печати образца на основе ТСП 2к/г.

Определено соотношение геометрического соответствия и механических свойств, которыми обладают образцы с плотностью печати 2 к/г и точностью печати до 25 мкм.

Сформирована модель костного дефекта левой передней лапы крысы с учетом особенностей анатомического строения животных, способная без остеосинтеза фиксировать установленный искусственный имплант.

Для определения оптимальных возможности регенерации костной ткани, лабораторные животные были разделены на три группы:

– контрольная, сформирован дефект кости без внедрения скаффолда (пустой);

- в сформированный костный дефект установлен ТСФ-скаффолд;

- в сформированный костный дефект установлен ТСФ-скаффолд, обогащенный ЕРО.

Каждая из этих групп в свою очередь поделена на 3 подгруппы с контролем на 10, 28 и 90 (3 месяца) день.

Исследованные образцы из партии трикальций фосфатной керамики *in vitro* не токсичны для клеток (ФЧ), то есть цитосовместимы и длительно поддерживают пролиферацию ФЧ человека *in vitro*, при размножении клеток на гранулах биокерамики идет интенсивнее, чем на полистирене, что подтверждает их хорошие адгезивные свойства.

Глава 3. Результаты исследования

3.1. Рентгенологическое исследование

Рентгенографию выполняли на аппарате DM-100 P (Рис. 8) на сроках 10 дней, 28 дней и 3 месяца после операции (таблица 7). Фокусное расстояние равнялось 70 см при режиме 60kVp и 30 mA. Время экспозиции составляло 0,05 с.

Рентгенологическая картина перестройки костной ткани и резорбции установленного в дефект остеозамещающего материала коррелировала в зависимости от метода обработки устанавливаемого имплантата.



Рисунок 8. Рентгенологический аппарат DM-100 P

Таблица 7. Распределение крыс по группам

№ п/п		10 дней	1 месяц	3 месяца
1.	Контрольная группа (Без имплантов)	10 крыс	10 крыс	10 крыс
2.	С имплантом	10 крыс	10 крыс	10 крыс
3.	С Эритропоэтином	10 крыс	10 крыс	10 крыс

На 10 сутки

На рентгенограммах в контрольной группе крыс без импланта сохранялся костный дефект без изменений, как после операции.

На рентгенограммах во второй и третьей группе на месте костного дефекта обнаруживался целый (нефрагментированный) имплант. Имплант сохранял свой размер и форму. Концы импланта и кости были адаптированы без диастаза. Признаков замены импланта на костную ткань нет.

На 28 день**Контрольная группа (без импланта) на 28 день**

В контрольной группе, без устранения циркулярного протяженного костного дефекта парной кости сегмента конечности, согласно разработанной модели, при динамическом рентгенологическом контроле не выявлено никаких репаративных процессов по формированию костного регенерата (Рис. 9).



Рисунок 9. Контрольная группа (без импланта) 28 дней

Скаффолд ТСР без добавок на 28 день

На рентгенограммах во второй группе на месте костного дефекта обнаруживался имплант с частичным рассасыванием. Концы импланта и кости без диастаза. Просматривались элементы замены импланта на костную ткань в виде формирования полутеней со стороны костных фрагментов. (Рис.10).



Рисунок 10. Рентгенограмма скаффолд ТСР без добавок на 28 день

Скаффолд ТСР, обогащенный ЕРО на 28 день

В группе основного исследования с использованием разработанной экспериментальной модели, кальцийфосфатного матрикса с импригнированным Эритропоэтином в качестве костно-замещающего материала, на месте костного дефекта обнаруживался целый (нефрагментированный) имплант. Имплант сохранял свой размер и форму. Концы импланта и кости адаптированы без диастаза, что соответствовало интеграции костной ткани в используемый материал в месте их контактов без проявления признаков гипотрофии костной ткани. Признаков замены импланта на костную ткань нет. (Рис. 11).



Рисунок 11. Рентгенограмма скаффолд ТСР, обогащенный ЕРО на 28 день

3 месяца

Контрольная группа на сроке 3 месяца

На рентгенограммах в контрольной группе не выявлено активных репаративных процессов лучевой кости. К 3 месяцам наблюдали признаки формирования гипотрофичного межотломкового регенерата недостаточного объема (Рис.12).



Рисунок 12. Контрольная группа на сроке 3 месяца

Скаффолд ТСР на сроке 3 месяца

На рентгенограммах во второй группе на месте костного дефекта обнаружены остатки импланта с ростом концов лучевой кости. В динамике наблюдалась резорбция костно-замещающего материала, опережающая формирование костной ткани со стороны торцовых поверхностей костных фрагментов в освобождающемся пространстве. За весь период наблюдения формирование костного регенерата по поверхности костно-замещающего материала, по характеристикам соответствующего нормотрофическому (Рис. 13).



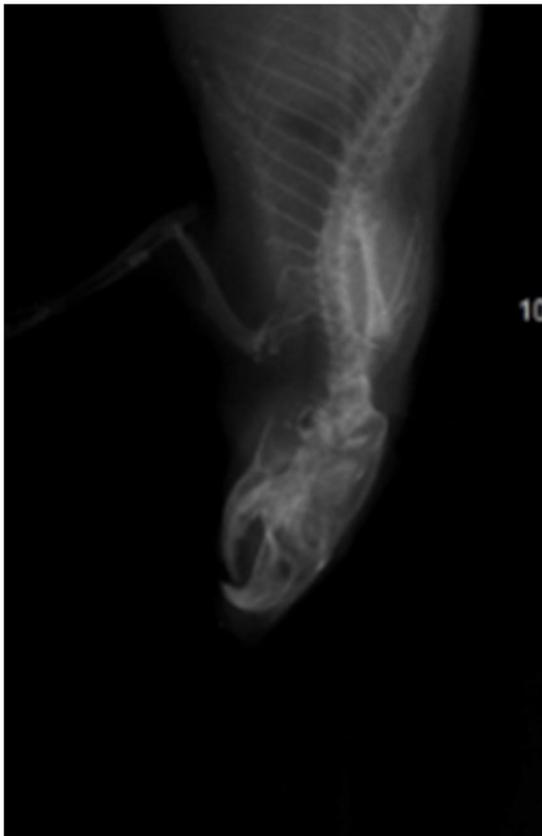
Рисунок 13. Скаффолд ТСП на сроке 3 месяца

Скаффолд ТСП, обогащенный ЕРО на сроке 3 месяца

На рентгенограммах в третьей группе на месте костного дефекта обнаруживался имплант с частичной деградацией и значительным ростом костной ткани. В данной группе (ТСП+Эритропоэтин) динамика отражала практически равные скорости потери рентгенологической плотности костно-замещающего материала и формирование костной ткани в освобождающемся пространстве. (Рис. 14 а и б).



А



Б

Рисунок 14 а и б Скаффолд ТСР, обогащенный ЕРО на сроке 3 месяца

3.2. Гистологическое исследование

Животных всех групп выводили из эксперимента в срок 1 и 3 месяца после операции для морфологического изучения. Кости предплечья с мягкими тканями, взятые из области операции фиксировали в растворе 10% нейтрального формалина, декальцинировали в Electrolytic decalcifying solution («Bio Optica», Италия). В парафин добавляли модификатор парафина ГИСТОМИКС для улучшения качества срезов, ("БиоВитрум", Россия). Из всех образцов изготавливали поперечные и продольные серийные срезы толщиной 4-5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, пикросириусом красным, толуидиновым синим на кислые гликозаминогликаны (ГАГ). Изучение, анализ и микрофотографирование гистологических препаратов проводили с использованием микроскопа «LEICA DM4000 B LED», оснащенного цифровой видеокамерой «LEICA DFC7000 T» и программного обеспечения «LAS V4.8» (Leica Microsystems, Швейцария). Препараты изучали при световой, фазово-контрастной, темнопольной и поляризационной микроскопиях.

Результаты морфологического исследования

Контроль -1 (без импланта)

28 дней (10 животных)

В препаратах у всех животных обнаруживались фрагменты костей предплечья, плечевой кости и локтевого сустава с окружающими мышцами. В проксимальных отделах лучевых костей определялись дефекты с признаками врастания костной ткани в поверхность импланта в местах их контакта по торцевым поверхностям лучевой кости за счет формирования мозолей той или иной степени зрелости, расположенных по краям дефекта и заполняющих костномозговые полости прилежащих к перелому участков лучевых костей. У всех животных мозоль состоит из трех компонентов: фибро-ретикулярной ткани, волокнистого хряща и формирующейся кости,

состоящей из трабекул, между которыми располагаются полнокровные тонкостенные сосуды (Рисунок 15).

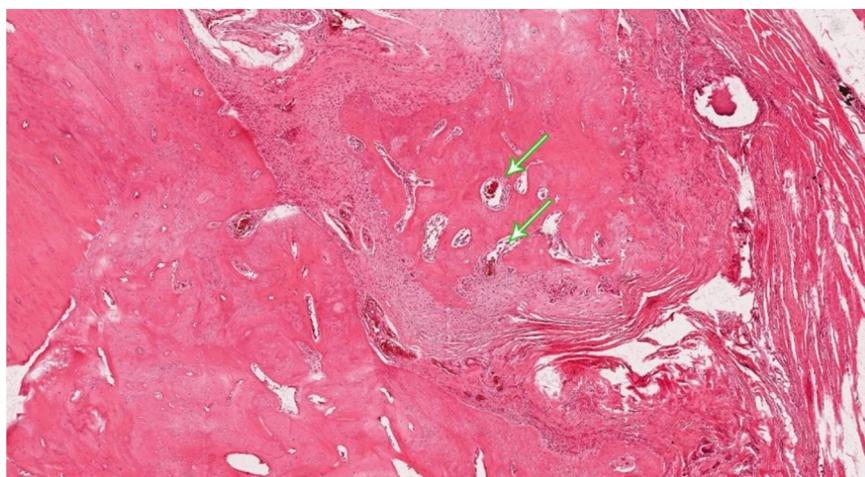


Рисунок 15. Наблюдается формирование костной мозоли с очагами пролиферации фибробластов и обилием сосудов капиллярного типа, заполненных Эритроцитами (обозначены стрелками). Вокруг формирующихся костных балок – соединительная ткань с пролиферацией фибробластов

Костный компонент преобладает над остальными и формируется за счет эндохондрального окостенения. В окружающих мозоль тканях отмечается умеренный фиброз, воспаление отсутствует. В отдельных препаратах окружающие мягкие ткани незначительно спаяны с мозолью. (Рисунок 23).

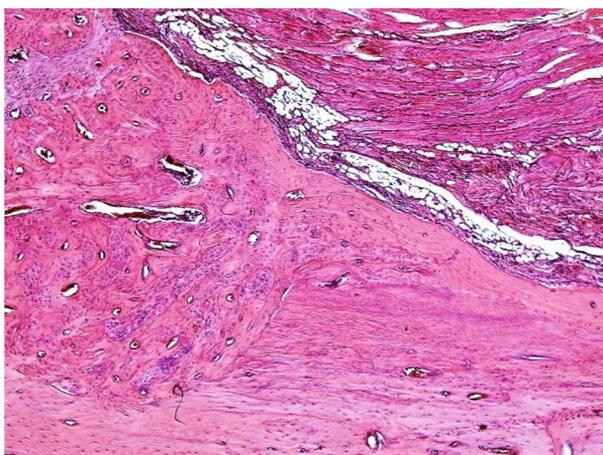


Рисунок 16

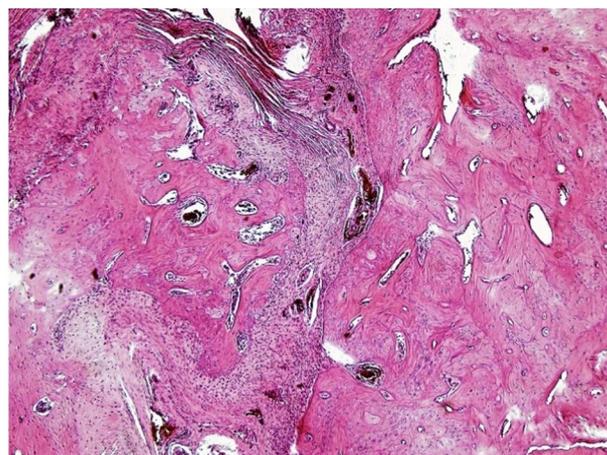


Рисунок 17

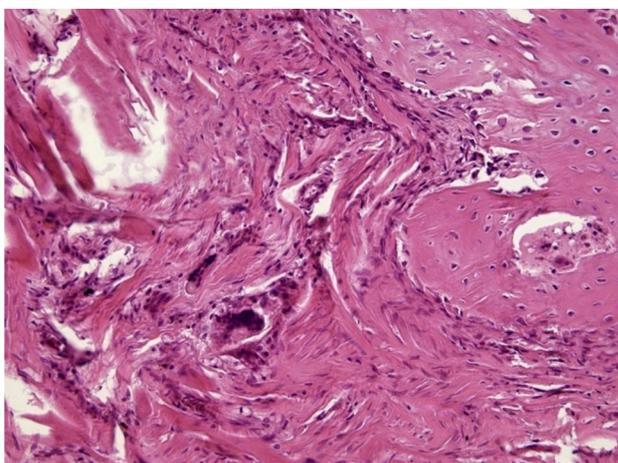


Рисунок 18

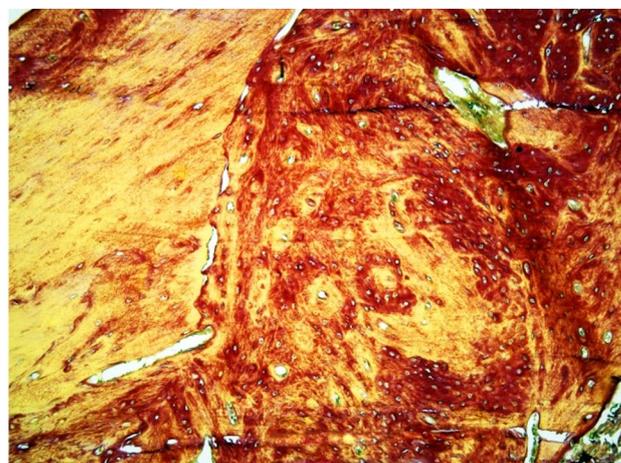


Рисунок 19

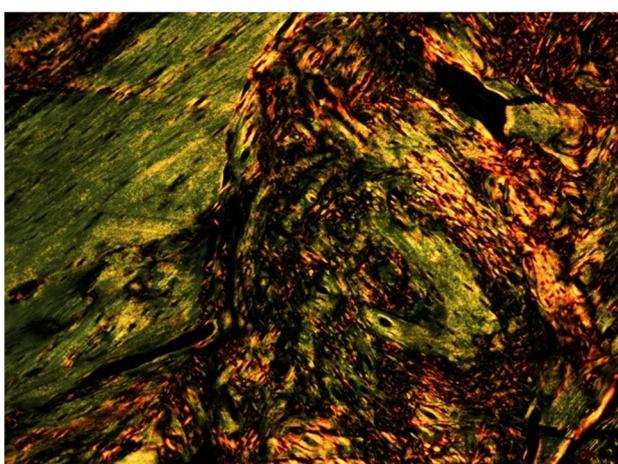


Рисунок 20

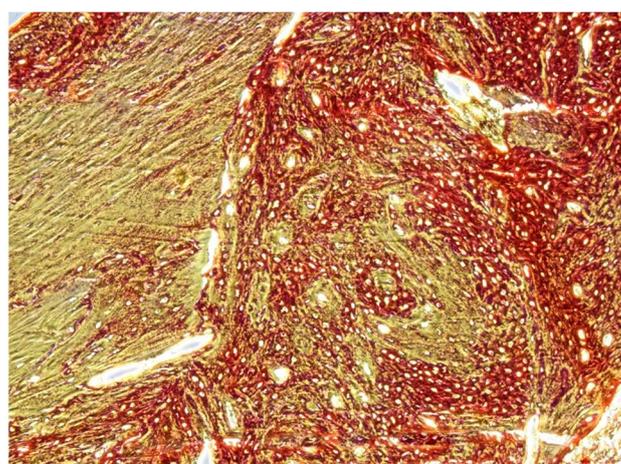


Рисунок 21



Рисунок 22

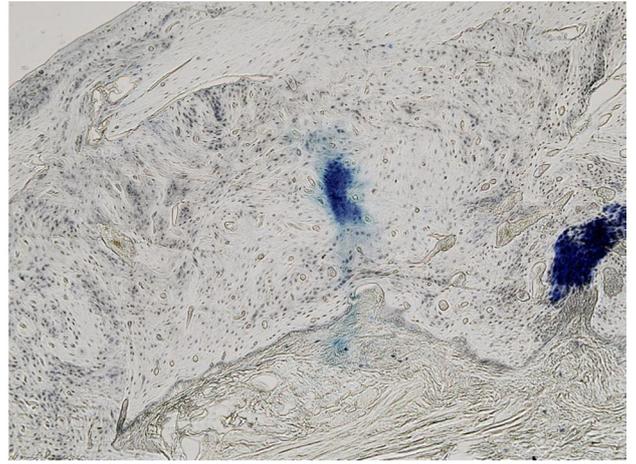


Рисунок 23

На больших увеличениях у отдельных животных в препаратах определяется умеренная остеокластическая реакция, свидетельствующая о remodelировании новообразованной костной ткани мозоли (Рис.18). При окраске пикросириусом красным с использованием простой световой микроскопии, а также – фазово-контрастной, темнопольной и поляризационной микроскопий, видна структурная организация коллагеновых волокон ткани мозоли и сохранной кости. Сохранная костная ткань состоит из организованных коллагеновых волокон, окрашиваемых сириусом в красный цвет, расположенных среди пикринофильного матрикса. При использовании поляризационной микроскопии, матрикс анизотропен, дает, преимущественно, зеленое свечение. В отличие от интактной кости, в ткани мозоли видны многочисленные коллагеновые волокна, встречающиеся, в основном в фибро-ретикулярном и хрящевом компонентах. Коллагеновые волокна формируют более толстые, грубые разнонаправленные пучки, что особенно хорошо видно при использовании фазово-контрастной, темнопольной и поляризационных микроскопий. Волокна анизотропны, но в отличие от интактной кости, дают не только зеленое, но и оранжево-красное свечение, что косвенно свидетельствует об их большей толщине (Рисунок

19). При окраске толуидиновым синим в сохранной хрящевой ткани мозоли видна метахромазия, свидетельствующая о наличии гликозаминогликанов (ГАГ) в составе матрикса хряща (Рисунок 23). Наличие хрящевой и фибро-ретикулярной ткани в области мозоли свидетельствует о ее незрелости, что соответствует сроку 1-го месяца. В других костях костная ткань не имеет признаков деструкции, костный мозг с признаками активного гемопоэза, суставной хрящ интактен (Рис).

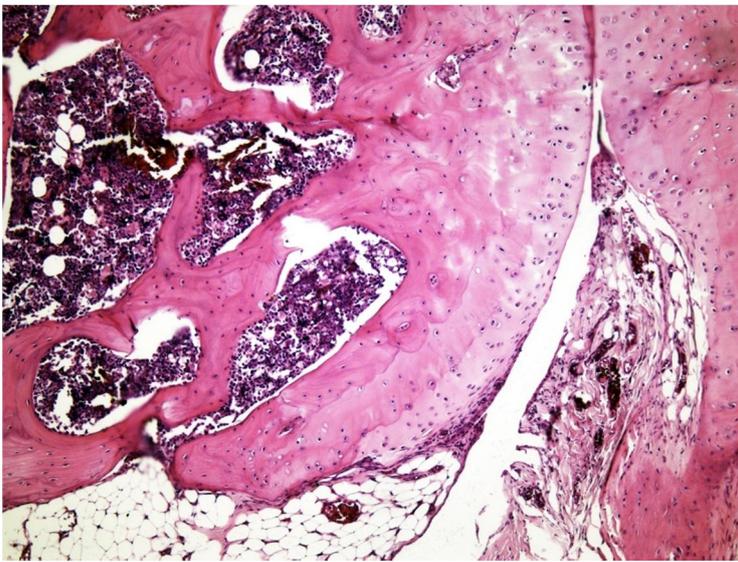


Рисунок 24

Спустя 3 месяца (10 животных) из десяти животных признаки сращения дефекта лучевой кости отсутствовали: мозоли определялись лишь на прилежащих к дефектам краях лучевых костей, заполняя прилежащие участки костномозговых полостей, а пространства между фрагментами лучевых костей были заполнены мягкими тканями. Ткань мозолей имела аналогичное предыдущему сроку строение и состояла из костного, фибро-ретикулярного и хрящевого компонентов, что особенно хорошо видно при использовании стандартной световой микроскопии, а также поляризационной, фазово-контрастной и темнопольной микроскопий при окраске пикросириусом рэд (Рисунок 25).

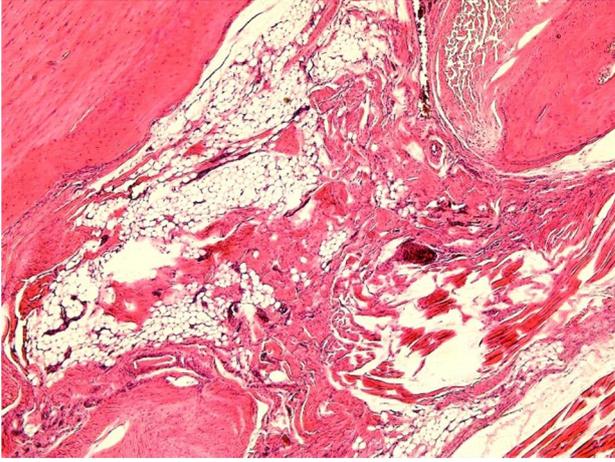


Рисунок 25

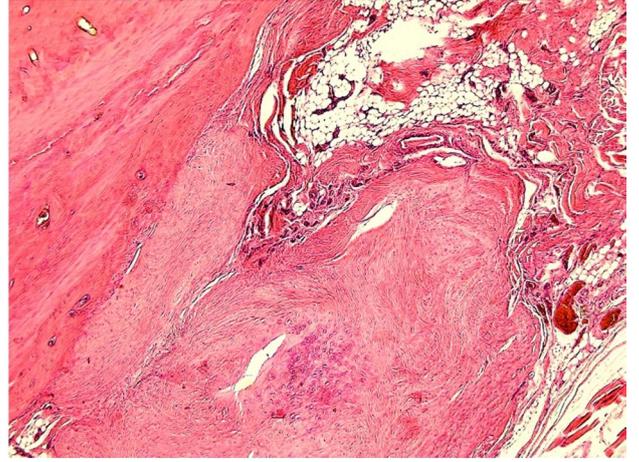


Рисунок 26

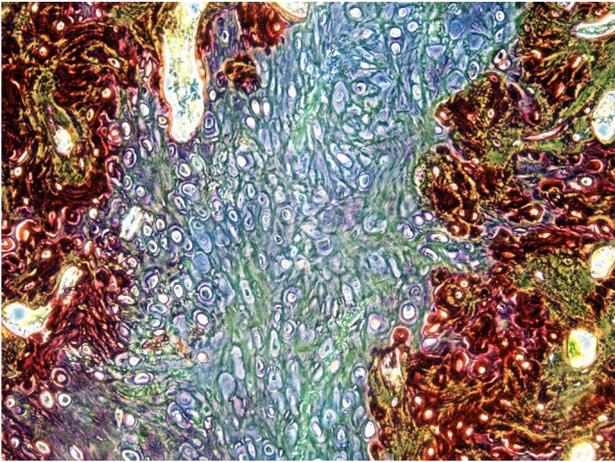


Рисунок 27

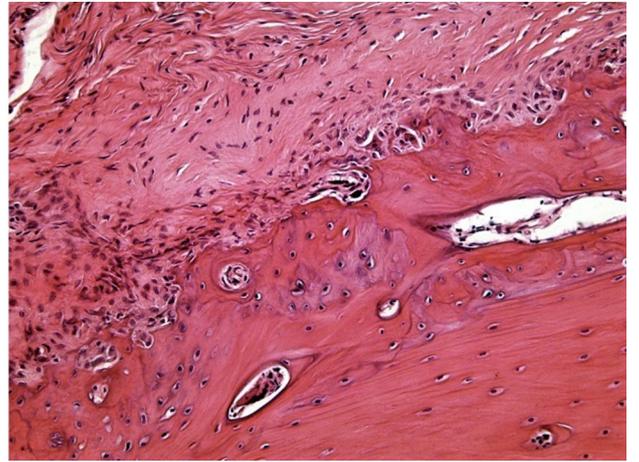


Рисунок 28

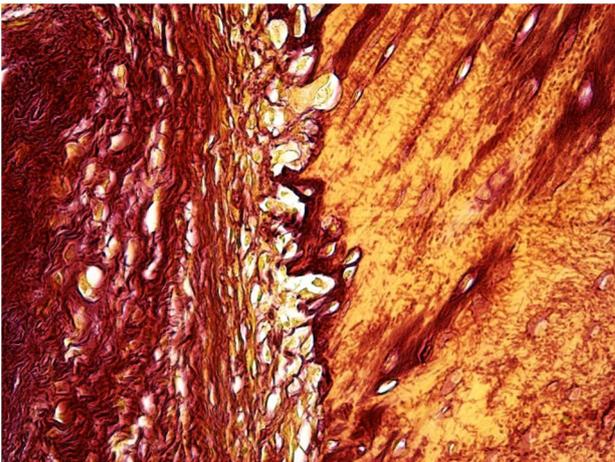


Рисунок 29

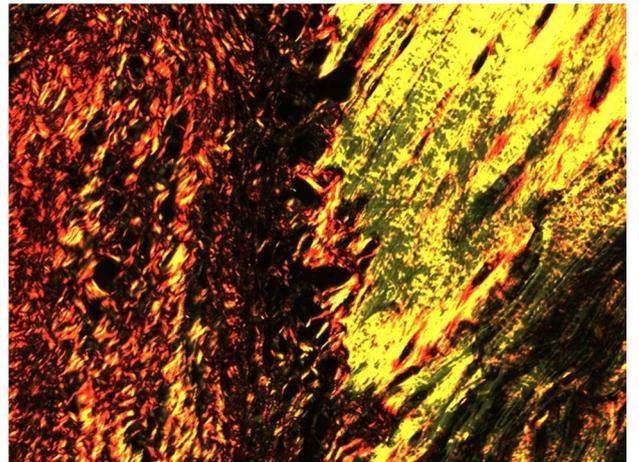


Рисунок 30

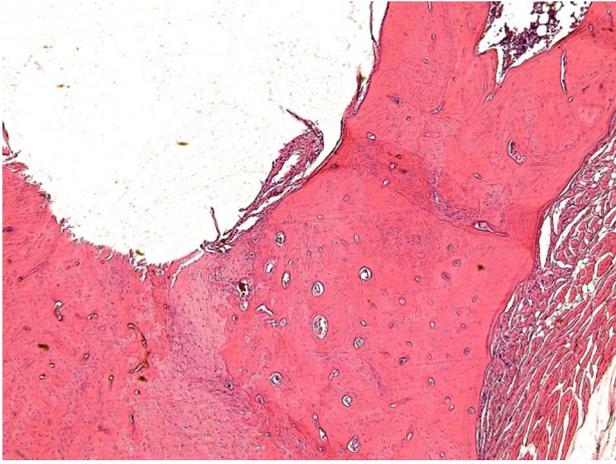


Рисунок 31

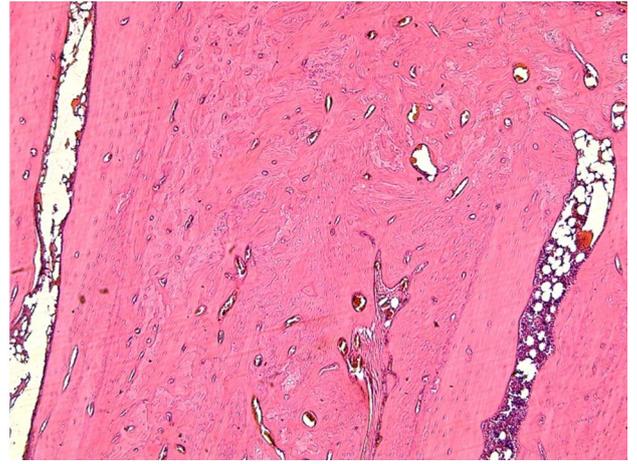


Рисунок 32

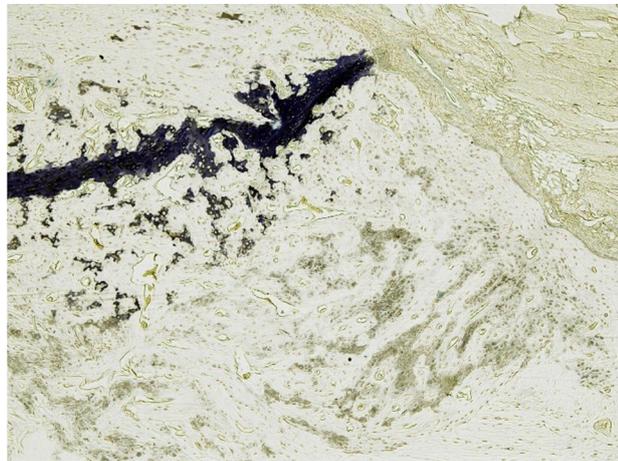


Рисунок 33

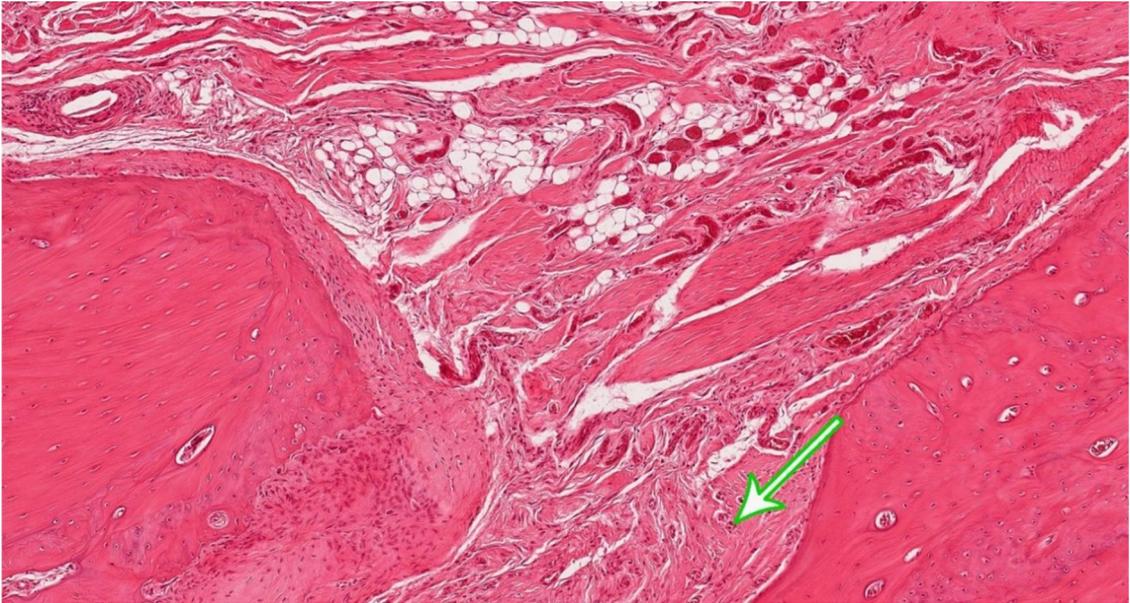


Рисунок 34

Новообразованные трабекулы прочно прикреплены к костному матриксу отломка. Между волокнами соединительной ткани присутствуют остеокласты. Также определяются множественные кровеносные капилляры с выбухающими в просвет эндотелиоцитами (отмечены стрелкой).

Соотношение компонентов мозоли несколько отличалось у разных животных. У одного из животных с вращением костной ткани в поверхность импланта в местах их контакта по торцевым поверхностям лучевой кости отмечалось формирование наиболее зрелой мозоли: костный компонент преобладал над фибро-ретикулярным и хрящевым. Во всех случаях отмечалось энхондральное окостенение хрящевого компонента мозоли (Рисунок 33). Ткань мозоли у всех животных в области дефекта обеспечивала сращение фрагментов лучевой и локтевой костей, что, вероятно, способствовало иммобилизации подвижных костных фрагментов. Остеокластическая реакция в ткани мозоли, свидетельствующая о ремоделировании костной ткани, отсутствовала у всех животных (Рисунок

28). В окружающих дефект тканях отмечался умеренный перифокальный фиброз без воспалительных изменений. Вне дефекта костная ткань костей верхней конечности и суставные хрящи, аналогично предыдущему сроку, не имели патологических изменений, богато кровоснабжались (Рисунок 34)

Контроль -2 (имплантат без добавок)

28 дней (10 животных)

В препаратах определяются фрагменты импланта, представленные базофильными и пикринофильными изотропными массами, не окрашивающимися толуидиновым синим. У 10 животных имплант располагается в области дефекта (Рис. 36, Рис. 41, Рисунок 44). У животных вокруг импланта формируется тонкая зрелая капсула, состоящая из толстых коллагеновых волокон (Рис. 36, Рисунок 37, Рисунок38), Признаки врастания костной ткани в поверхность импланта в местах их контакта по торцевым поверхностям лучевой кости видны у всех животных (Рисунок 35).

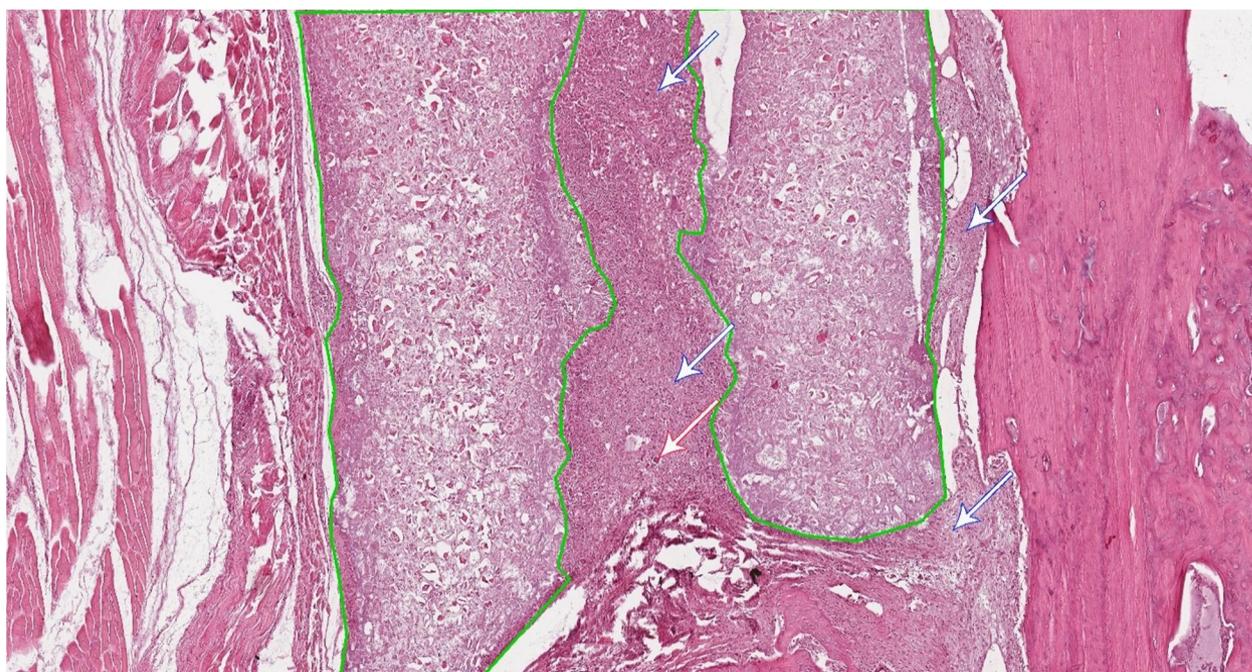


Рисунок 35

Зона внедрения импланта (обведен зеленой линией). Синие стрелки указывают на пролиферирующую соединительную ткань. Красная стрелка указывает на остеокласты.

У животных в области дефекта мозоль муфтообразно охватывает фрагменты лучевых костей, а в ее составе преобладают хрящевая и костная ткани. В то же время, вокруг крупных фрагментов имплантов отмечаются участки ретикуло-фиброзной или фиброзной ткани в составе капсулы (Рис. 36, Рисунок 41, Рисунок 44, Рисунок 45). У большинства животных отмечается сращение фрагментов лучевых костей с локтевыми. У всех животных в окружающих дефект мягких тканях отмечался фиброз разной степени выраженности. Кости с костным мозгом и суставы вне дефекта без изменений. Воспалительная реакция выявлена только у одного из животных в ткани мозоли в области ложного сустава и представлена лимфоидной инфильтрацией (Рис).

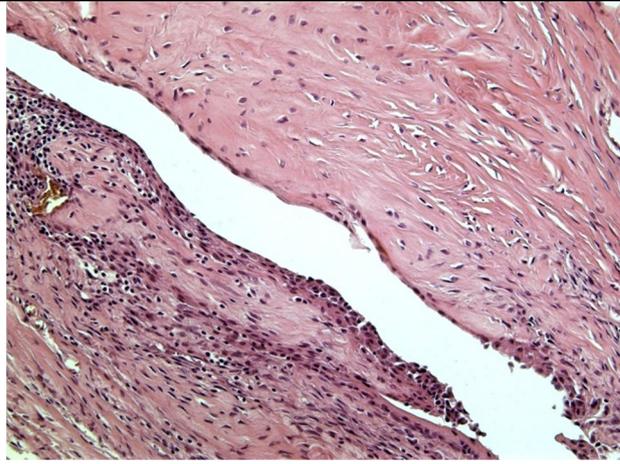


Рисунок 36

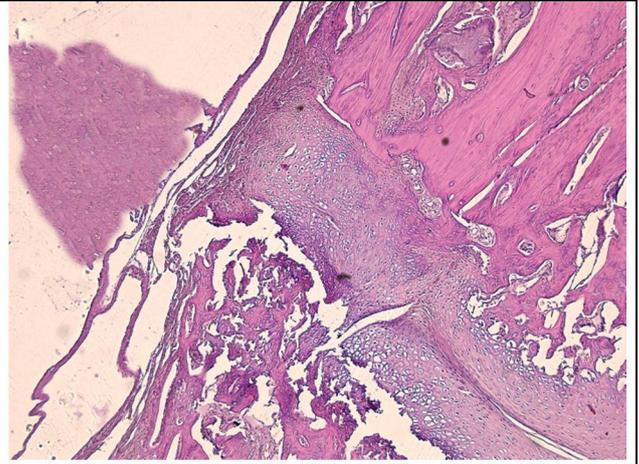


Рисунок 37

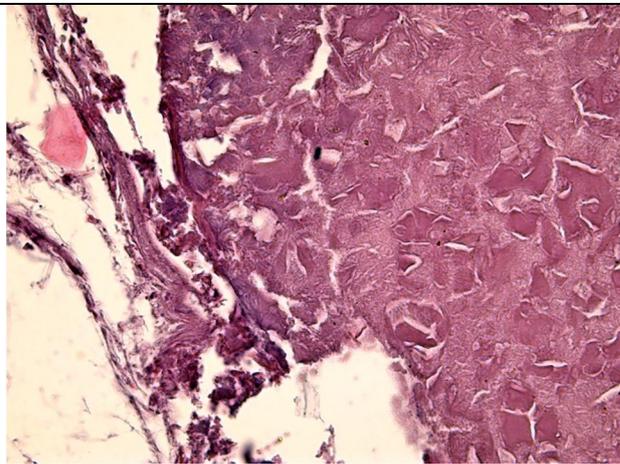


Рисунок 38



Рисунок 39

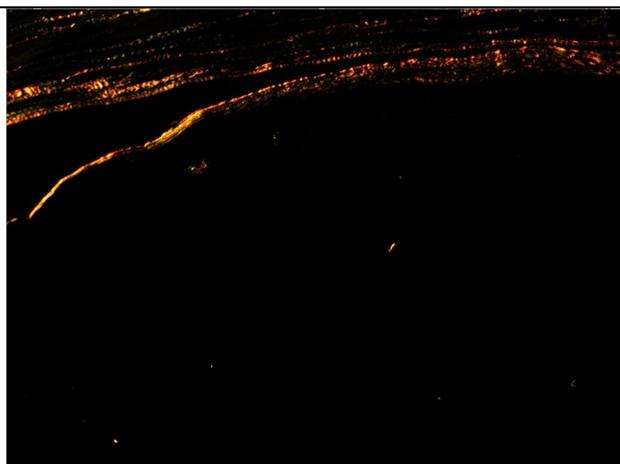


Рисунок 40

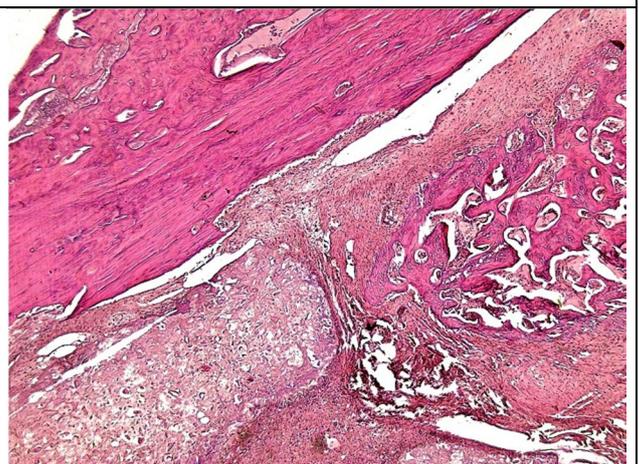


Рисунок 41

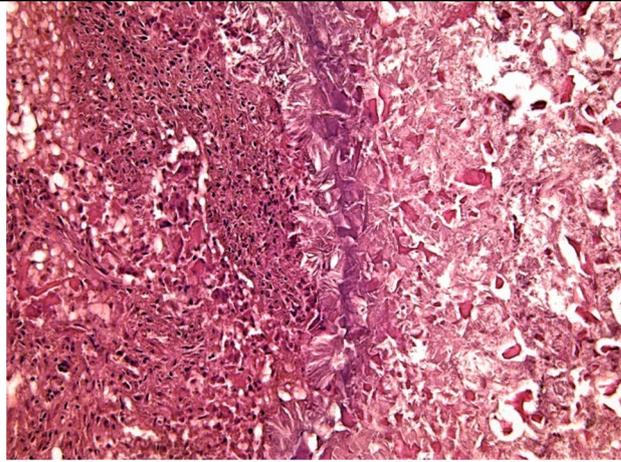


Рисунок 42

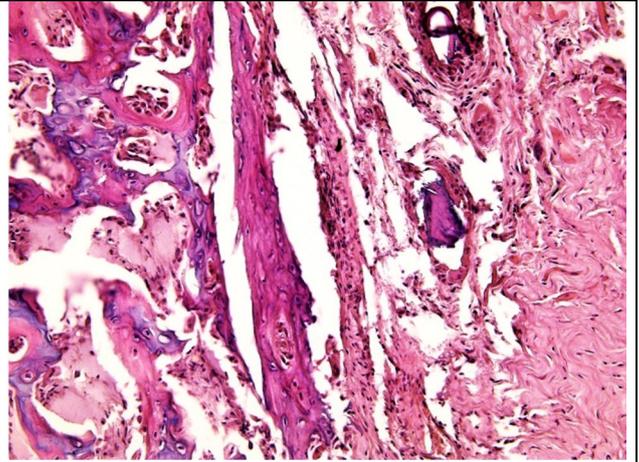


Рисунок 43

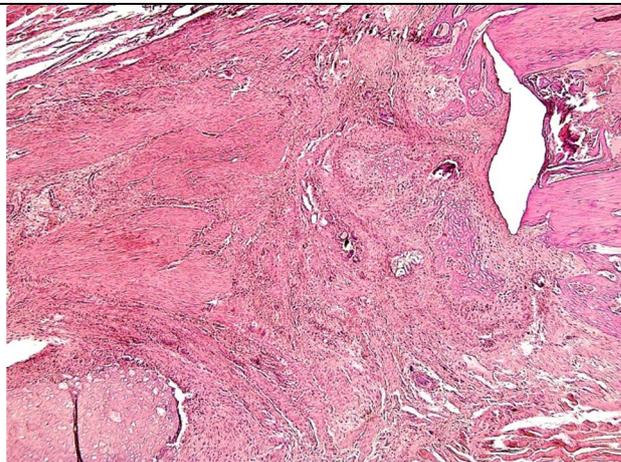


Рисунок 44

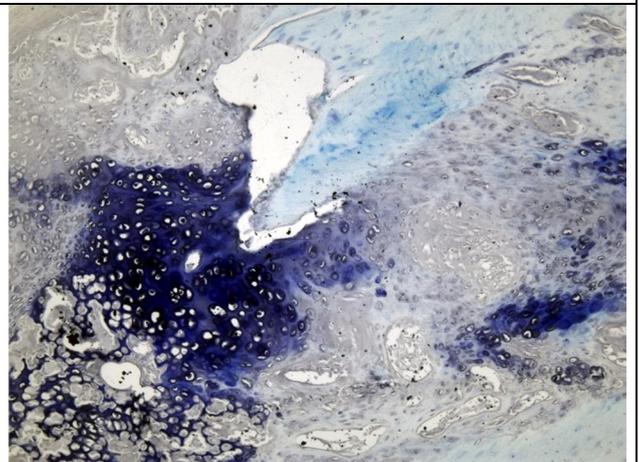


Рисунок 45

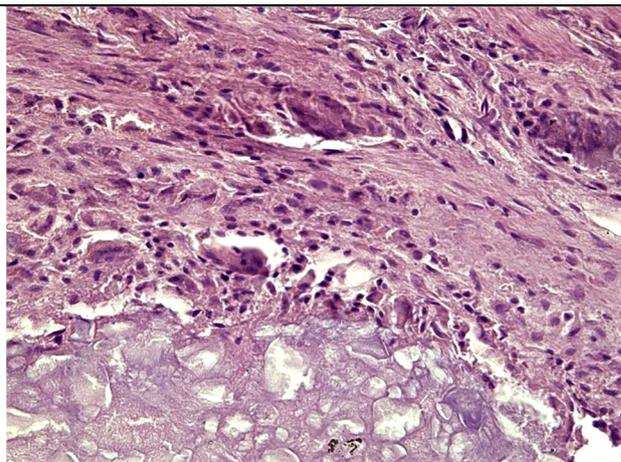


Рисунок 46

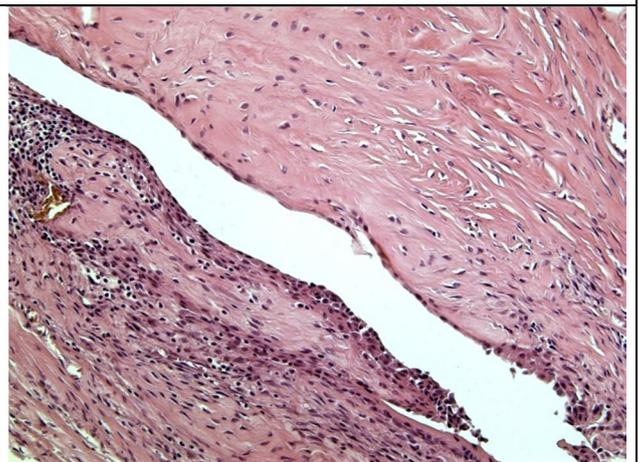


Рисунок 47

3 месяца (10 животных)

На сроке 3 месяца в части препаратов отмечается наличие импланта, аналогичного по строению, оптическим и тинкториальным свойствам предыдущему сроку (Рисунок 48, Рисунок 49, Рис. 50). Импланты расположены в области дефекта, окружены тонкой зрелой фиброзной капсулой. У части животных определяются признаки врастания костной ткани в поверхность импланта в местах их контакта по торцевым поверхностям лучевой кости за счет формирования мозоли, состоящей из ретикулофиброзной, хрящевой и костной ткани и замещающей прилежащие к дефекту участки костномозговой полости (Рисунок 51, Рисунок 52, Рис. 53). Окостенение хрящевой ткани имеет энхондральный характер. Фиброз окружающих тканей у всех животных выражен умеренно, воспалительная реакция отсутствует. Вне дефекта - костная ткань с костным мозгом, а также хрящевая ткань без особенностей.

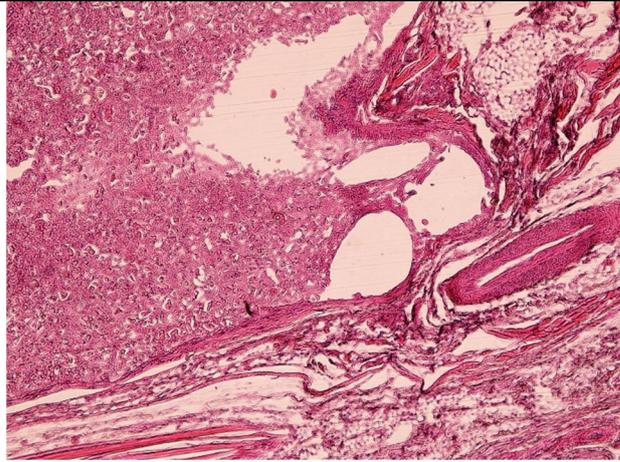


Рисунок 48

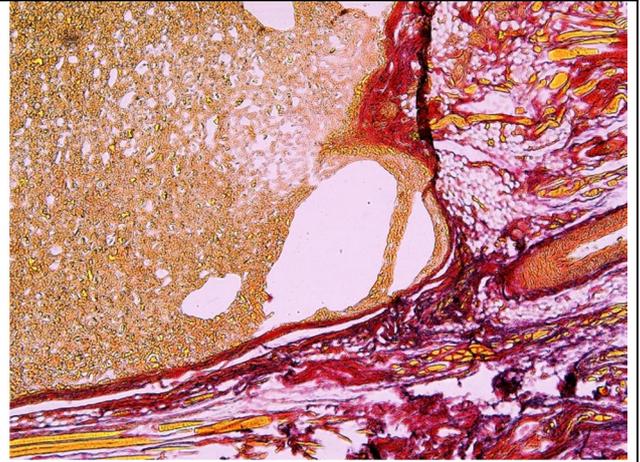


Рисунок 49

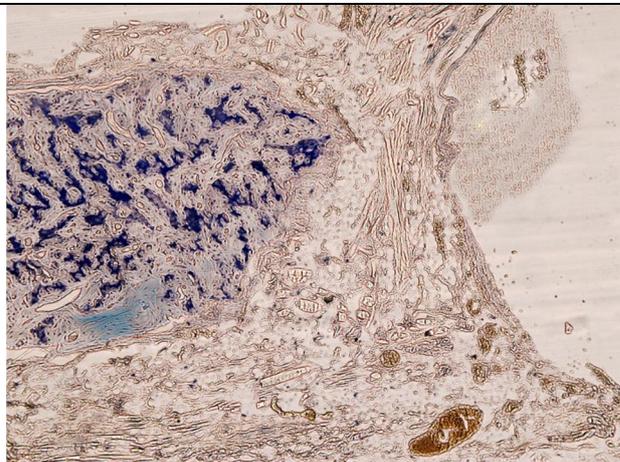


Рисунок 50

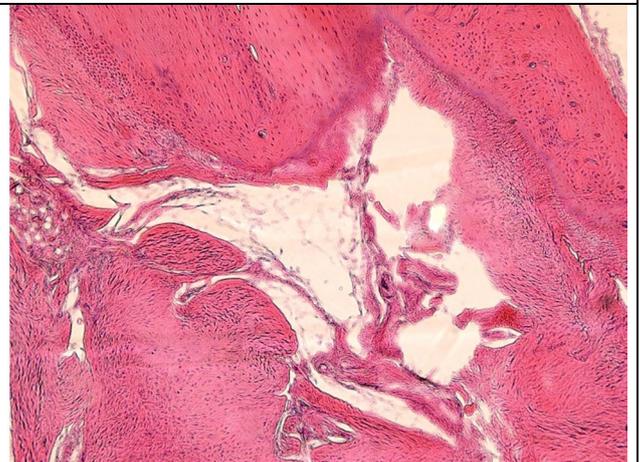


Рисунок 51

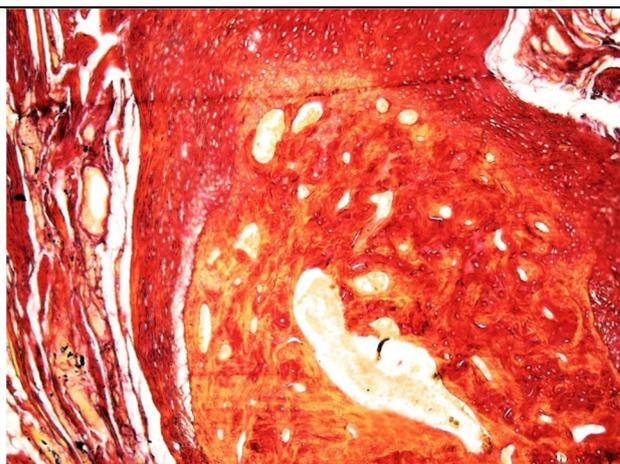


Рисунок 52

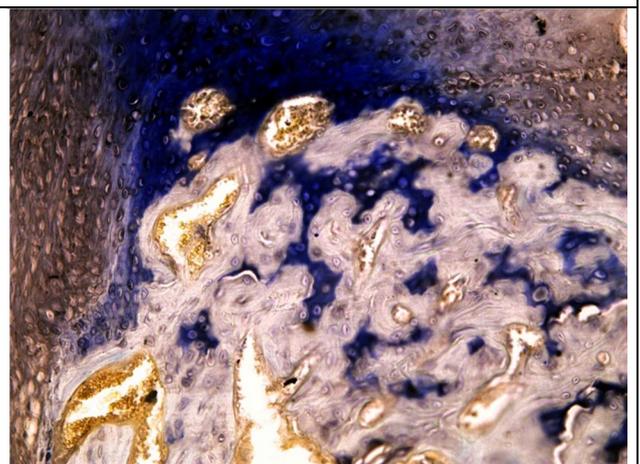


Рисунок 53

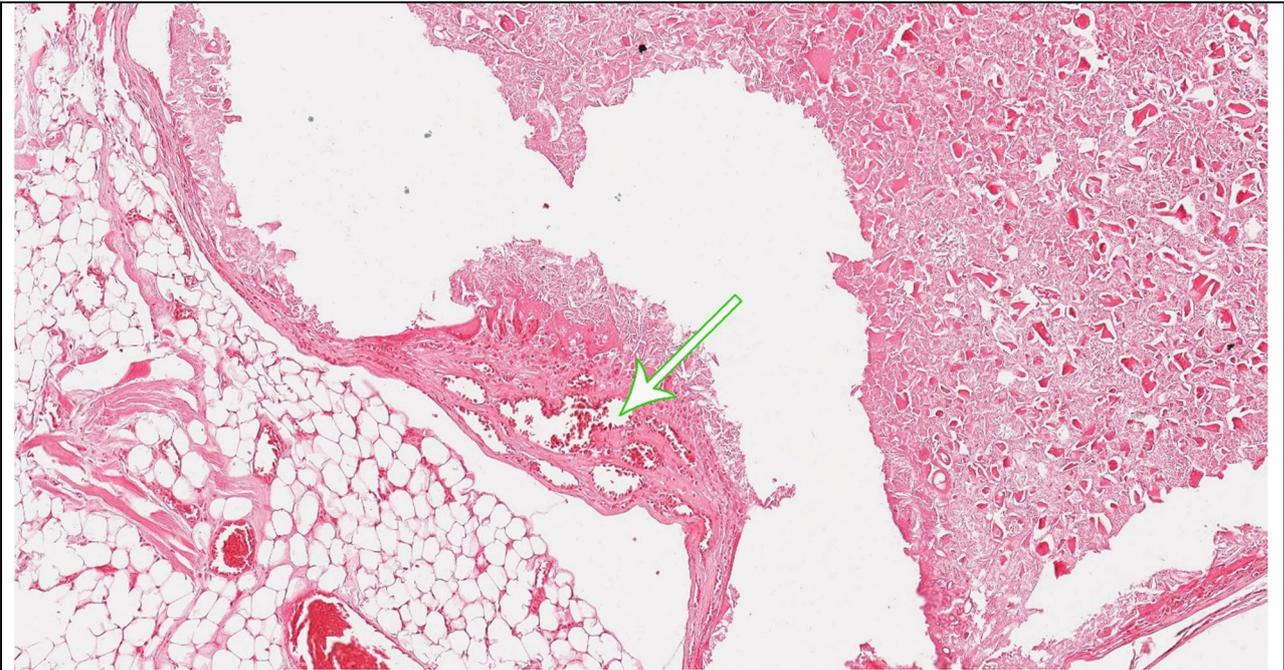


Рисунок 54

Группа крыс с имплантом без добавок, 3 месяца. Зона внедрения импланта. Наблюдается формирование соединительной ткани по его периферии. Наличие молодой рыхлой волокнистой соединительной ткани с обилием кровеносных капилляров и скоплением многоядерных макрофагов. Фиброзная ткань обильно кровоснабжается (указано стрелкой).

Имплант с Эритропоэтином

1 месяц (10 животных)

В препаратах определяется целые (не фрагментированные) импланты. У 10 животных имплант располагается в области дефекта. У животных вокруг импланта формируется тонкая зрелая капсула, состоящая из толстых коллагеновых волокон. У всех животных выявлены признаки врастания

костной ткани в поверхность импланта в местах их контакта по торцевым поверхностям.

3 месяца (10 животных)

В препаратах определяются фрагменты импланта, аналогичного по строению, оптическим и тинкториальным свойствам другим группам. У всех животных фрагмент импланта определяется в месте костного дефекта (Рисунок 55 Рис. 56), У всех животных вокруг импланта формируется капсула: местами она тонкая, зрелая, в других участках представлена грануляционной тканью с многочисленными макрофагами и гигантскими клетками, осуществляющими резорбцию импланта. Костная мозоль, также, как и в других группах, состоит из ретикулофиброзного, хрящевого и костного компонентов, местами она припаивает фрагменты лучевой кости к локтевой. Костная ткань формируется за счет мезенхимального окостенения. Признаки врастания костной ткани в поверхность импланта в местах их контакта по торцевым поверхностям лучевой кости присутствуют у всех животных. В окружающих дефект мягких тканях фиброз разной степени выраженности (от незначительного до умеренного). Вне дефекта костный мозг, костная и хрящевая ткани не отличаются от таковых в других группах.

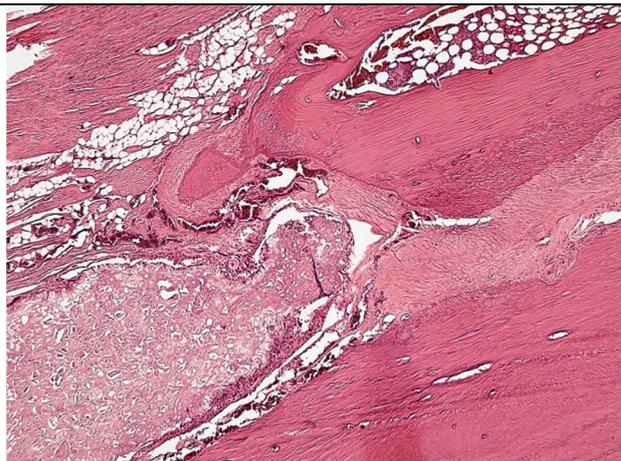


Рисунок 55

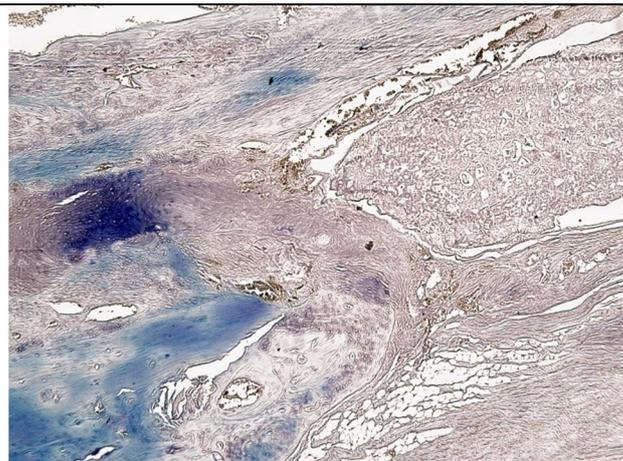


Рисунок 56

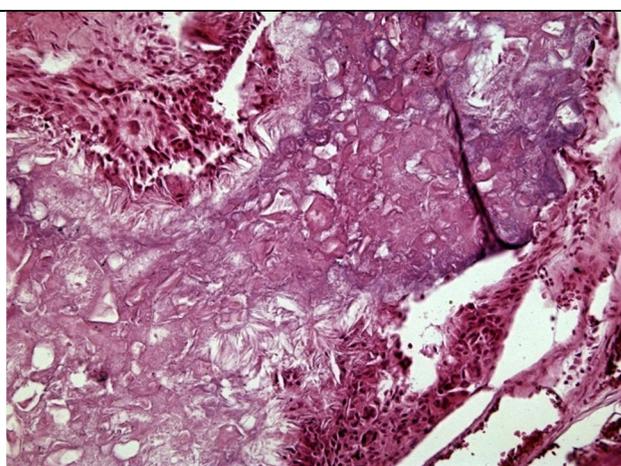


Рисунок 57

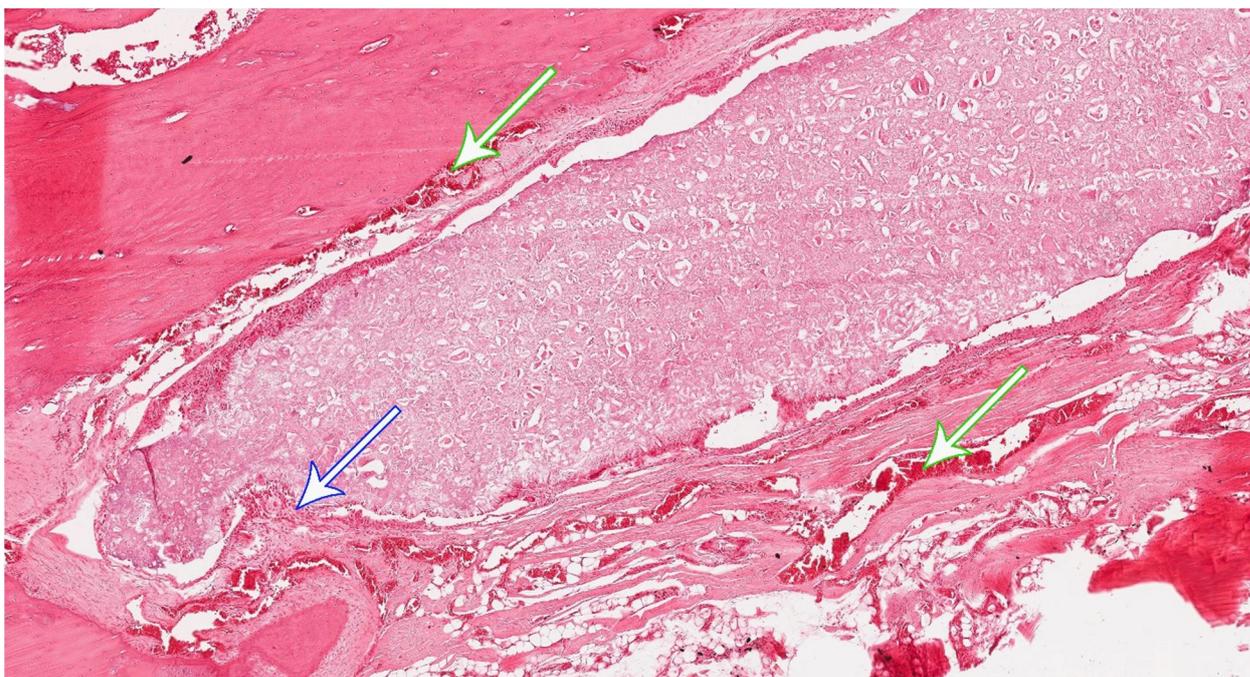


Рисунок 58

Зона внедрения импланта. Зеленые стрелки – сосуды новообразованной ткани, Голубая стрелка – капсула из соединительной ткани с началом формирования тяжа внутрь импланта

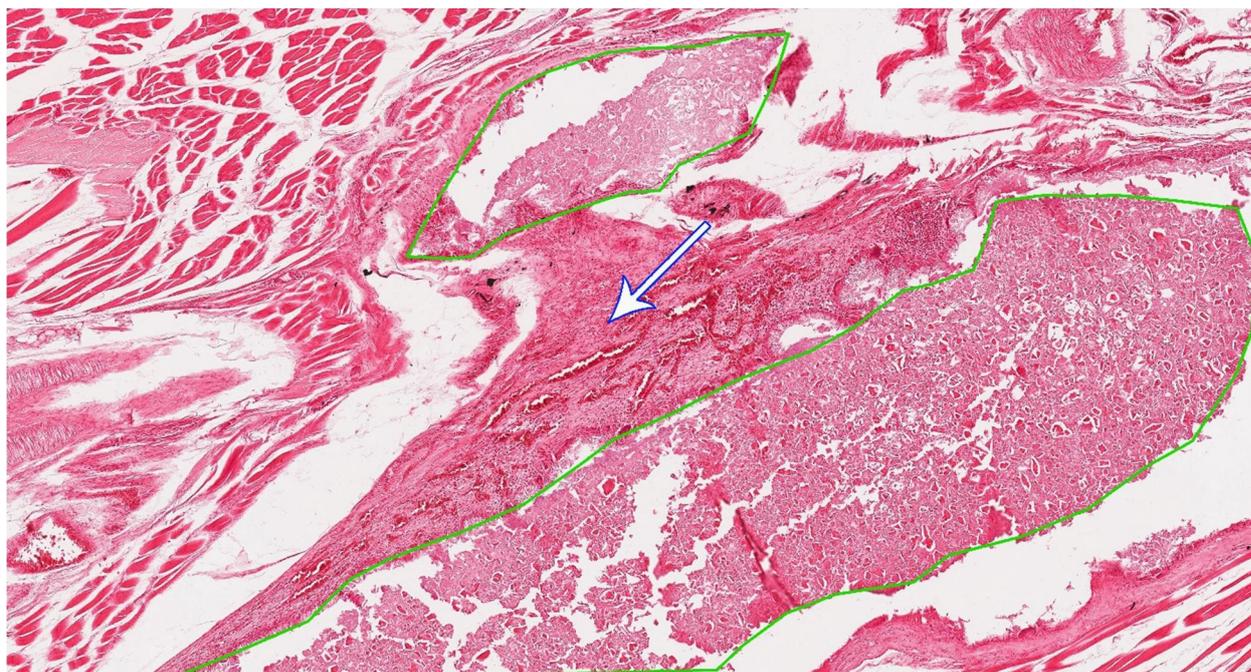


Рисунок 59

Группа крыс с имплантом с ЭП, 3 месяца. Зона внедрения импланта. Зеленым выделен имплант. Имплант используется как матрикс для формирования молодой соединительной ткани, проникающей внутрь него (синяя стрелка)

Заключение

Показано, что через 28 дней после операции на рентгеновских снимках в группе со скаффолдом ТСР обнаружен небольшой рост костной ткани, через 3 месяца также отмечается увеличение костной ткани без явного заживления перелома кости. В другой группе, скаффолд ТСР, обогащенный Эритропоезином, наблюдается сохранение импланта, а через 3 месяца виден значительный уровень роста костной ткани в данной группе.

Во всех трех изученных группах наблюдалось формирование мозолей, состоящих из трех компонентов: фибро-ретикулярной, хрящевой и костной ткани (последняя формируется, за счет мезенхимального окостенения).

Различная степень зрелости мозолей внутри всех изученных групп, на сроке 1-го месяца позволяют сделать однозначного заключения о степени

влияния как самого имплантата, так и содержащегося в нем Эритропоэтина на динамику созревания участков мозоли.

На третьем месяце в группе со скаффолдом и со скаффолдом, обогащенного Эритропоэтином, определяются фрагменты имплантата, формируется капсула: местами она тонкая, зрелая, в других участках представлена грануляционной тканью с многочисленными макрофагами и гигантскими клетками, осуществляющими резорбцию имплантата. Однако в группе со скаффолдом, обогащенного Эритропоэтином костная ткань формируется за счет мезенхимального окостенения, что говорит перспективности имплантата.

Материал имплантатов можно считать перспективным. Он показывает относительно низкую иммуногенность, что проявляется в полном отсутствии эозинофильной и лимфоидной инфильтрации в окружающих тканях у большинства животных, а также – является резорбируемым и не оказывает токсического воздействия. Модификация трехмерной структуры имплантата, например, формирование пор необходимого диаметра для улучшения васкуляризации и миграции клеток (макрофагов, остеокластов и гигантских клеток), позволяет значительно ускорить процессы резорбции и, возможно, обеспечивает направленный рост мозоли в имплант с более быстрой ее оксификацией. Добавление в имплант веществ, улучшающих адгезию клеток и их остеогенную дифференцировку также способствует формированию более зрелой костной мозоли.

Глава 4 Обсуждение собственных результатов

Обсуждение собственных результатов об ТСП скаффолде

В исследованиях на экспериментальной модели с использованием ТСП скаффолда, обогащенного Эритропоезином, наблюдалось активное формирование сосудистой системы, что позволяет говорить о решении задачи по увеличению кислорода и питательных веществ в импланте, и это указывает на улучшение регенерации кости при дефекте критического размера.

Что касается объема регенерации костной ткани, то он зависит от многих факторов, таких как свойства материала, положение дефекта, период исследования и так далее. Выбор репаративной возможности реципиентной области напрямую влияет на эффективность регенерации.

По статистике, почти 20% случаев переломов связано с лучевой костью, поэтому это была еще одна причина для принятия решения применить в данной работе дефект критического размера без остеосинтеза предплечье крысы, с учетом особенностей анатомии животного (мембрана между лучевой и локтевой костью). Результаты, проведенных исследований, подтвердили возможность использования, разработанной модели дефекта лучевой кости критического размера у крыс. Для реконструкции лучевой кости у крыс использовались ТСП скаффолды, с заданным определенным размером пор, что способствует стимулированию васкуляризации и содержанию кислорода для роста клеток ткани, в том числе, сосудистой структуры. Хирургических осложнений не выявлено во время эксперимента.

Важно отметить, что конструкции ТСП скаффолда и ТСП скаффолда, обогащенного ЕРО, не вызывали побочных явлений и проявления токсичности у экспериментальных животных. В течение трех месяцев существенных различий в массе тела между группами не наблюдались; при

вскрытии гистопатологических или опухолевых изменений ни в одном внутреннем органе не обнаружено. (Рис.60)

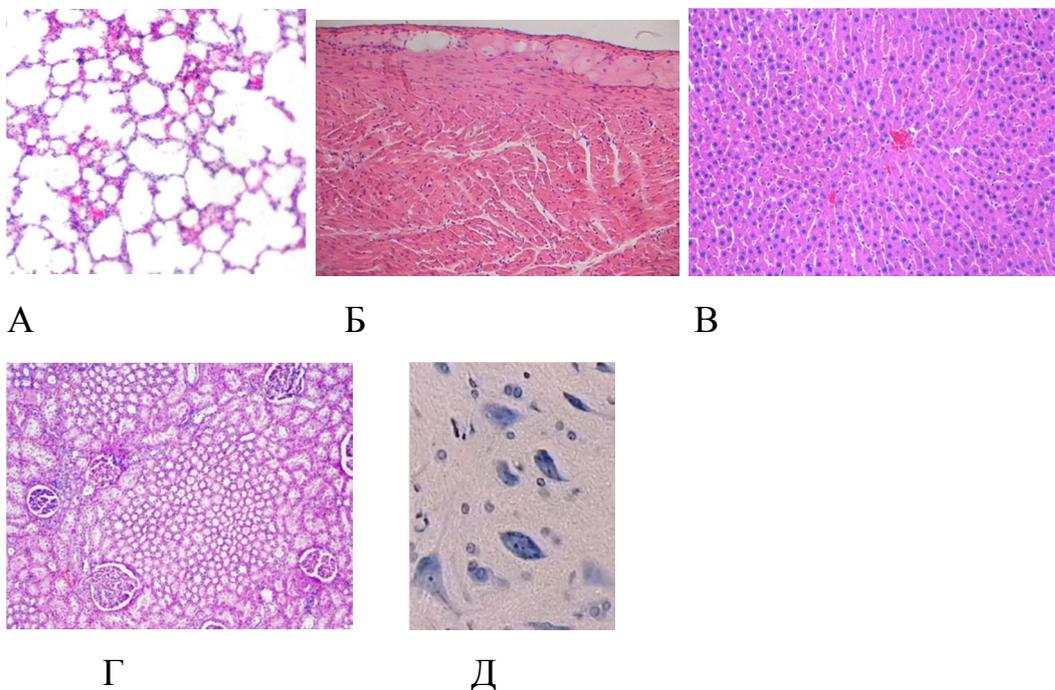


Рисунок 60 Гистологические исследования: а- легких, б- сердца, в- печени, г- почек, д- головного мозга). В этих органах не было обнаружено никаких структурных изменений или повреждений.

Таким образом можно утверждать, что ТСР скаффолд и ТСР скаффолд, обогащенный ЕРО, являются безопасными конструкциями, не вызывающими у крыс острой или субхронической токсичности.

Помимо состава материала, важной характеристикой каркасов, способствующих врастанию тканей и формированию новой кости, является их макроструктура. Миграция клеток и проникновение ткани в каркас требуют минимального размера пор (Alfotawei et al,2014). В нашем случае размер пор ТСР скаффолда составляет 1-5μкм, с пористостью 54%. Достаточный размер пор позволял клеткам мигрировать или прилипать к поверхностному слою материала, а благодаря сети соединяющихся пор расти

клеткам внутри каркаса по каналам пор. Разработанный каркас соответствует конструктивным особенностям доставки клеток, которые включают внутреннюю структуру, совместимую с прикреплением и колонизацией клеток, а также допускающую врастание тканей, совместимых с регенерируемыми.

После вскрытия животных и осмотра образцов сформированной модели дефекта (ТСР скаффолд - лучевая кость), было выявлено, что на 28 день эксперимента имплант находился в установленном месте, наблюдалось образование каллусов, связывающих дефект, на третьем месяце исследований скаффолды были прочно прикреплены к поверхностям лучевой кости с двух сторон. На месте соединения скаффолда с костью наблюдалось большее образование костной ткани. В контрольной группе была фиброзная ткань и новый костный объем контрольной группы был наименьшим. Эти данные были подтверждены гистологически (Таблица 8, Рис. 61 а и б).

В группе ТСР скаффолд и в группе ТСР скаффолд, обогащенного ЕРО, воспаления не было.

Для количественного анализа образцов использовали параметры объема новообразованной кости по отношению к объему ткани (BV / TV). Объем образованной костной ткани составил ($p < 0.05$) в трех группах: $3,9 \pm 1,5$ % для контрольной группы и $20,3 \pm 3,2$ % для группы со скаффолдом, и $34,1 \pm 3,6$ % для группы со скаффолдом, обогащенный Эритропоэтином. Большее количество нового костного образования наблюдалось в группе ТСР скаффолд, обогащенного ЕРО. В группе ТСР скаффолд также обнаружили регенерированную кость, но размер был намного меньше, чем группа ТСР скаффолд, обогащенного ЕРО. В пустой контрольной группе в межотломковом пространстве выявлена фиброзная ткань.

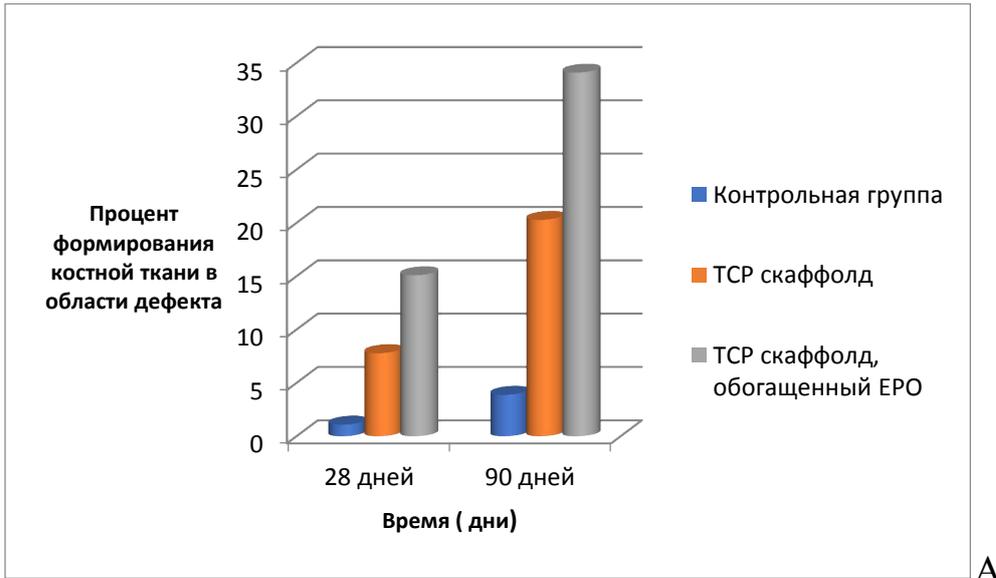
Таблица 8. Гистологический анализ формирования костной ткани в области дефекта в контрольной группе, в ТСП скаффолде и в ТСП скаффолде, обогащенном ЕРО, через 28 дней и 90 дней.

День	Контрольная группа	ТСП скаффолд	ТСП скаффолд, обогащенный ЕРО
28 дней	1,1±0,4%	7,8± 1,5 %	15,1± 2,5 %
90 дней	3,9±1,5%	20,3± 3,1 %	34,1± 3,6%

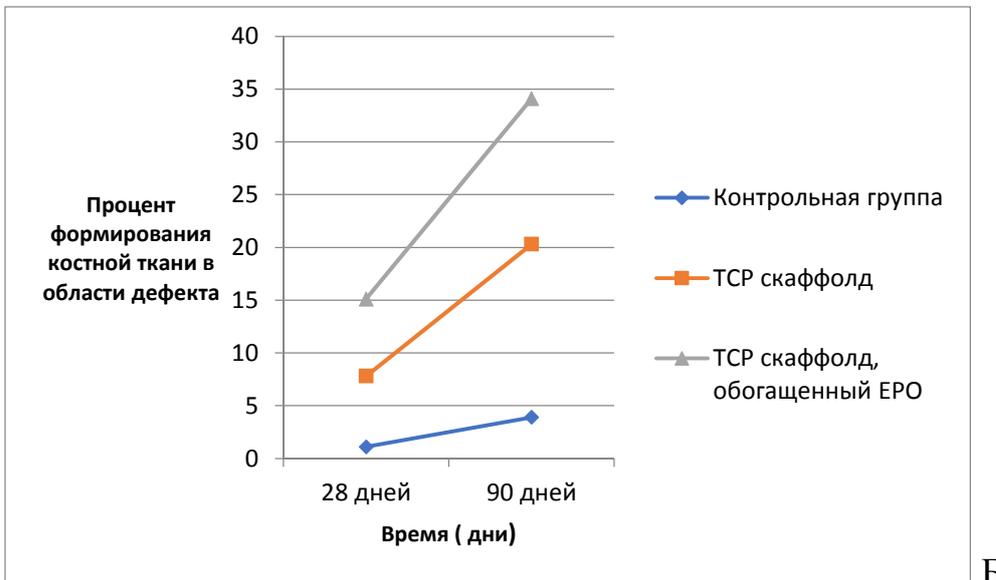
В течение всего эксперимента в образцах сформированной модели дефекта отмечалось постепенное уменьшение материала и увеличение костной ткани. Но в группе ТСП скаффолд рассасывание материала идет быстрее, чем происходит рост костной ткани. В группе ТСП скаффолд, обогащенный ЕРО, наблюдается одновременное и равномерное уменьшение материала и образование костной ткани, что является оптимальной моделью для тканевой инженерии. (Таблица 9, Рис.62 а и б).

Таблица 9. Гистологический анализ оставшегося материала в контрольной группе, в ТСП скаффолде и в ТСП скаффолде, обогащенном ЕРО, через 28 дней и 90 дней.

День	Контрольная группа	ТСП скаффолд	ТСП скаффолд, обогащенный ЕРО
28 дней	0	82,2± 1,5 %	82,5± 1,3 %
90 дней	0	54,8± 3,1 %	66,3± 3,4%



А



Б

Рисунок 61 а и б Гистологический анализ формирования костной ткани в области дефекта в контрольной группе, в TSP скаффолде и в TSP скаффолде, обогащенном EPO, через 28 дней и 90 дней.

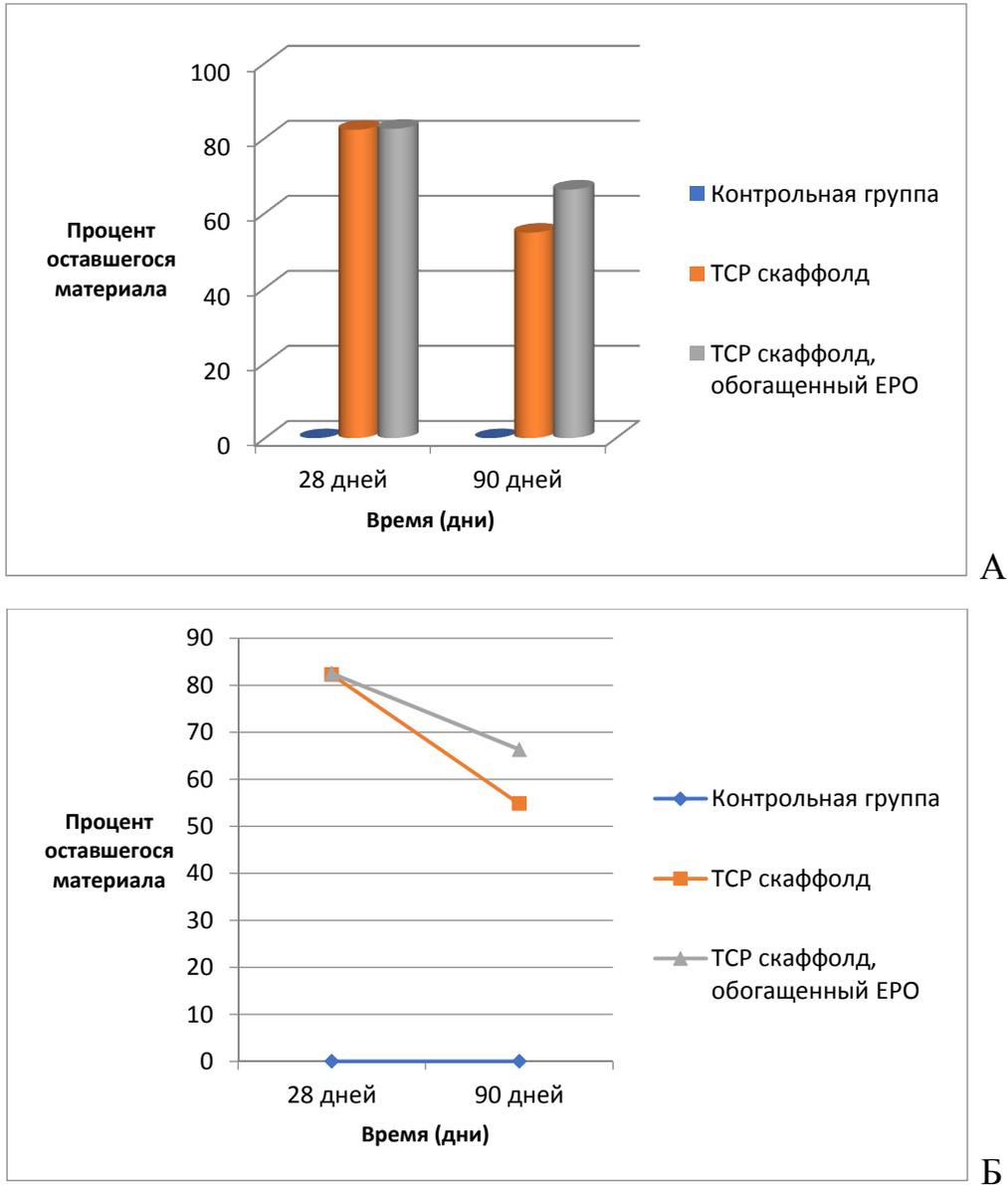


Рисунок 62 а и б Гистологический анализ оставшегося материала в контрольной группе, в TSP скаффолде и в TSP скаффолде, обогащенном EPO, через 28 дней и 90 дней.

В исследовании была разработана оригинальная модель дефекта кости критического размера у крыс на лучевой кости наиболее близкая к клинической ситуации. Разработана методика 3-х мерной печати ТСП скаффолда.

Исследование позволило оценить взаимодействие между ЕРО и хорошо изученным, обладающим заданной пористостью, биосовместимостью ТСП скаффолдом и доказать, что ЕРО в обогащенном ТСП способствует регенерации кости. Объем образованной костной ткани ($p < 0.05$) для группы со скаффолдом составил $20,3 \pm 3,2$ %, а для группы со скаффолдом, обогащенный Эритропоезином, $34,1 \pm 3,6$ %.

Рентгенографический анализ, проводимый через три месяца после операции у группы с ТСП скаффолдом, показал увеличение костной ткани без явного заживления перелома кости. В группе, ТСП скаффолд, обогащенный Эритропоезином, наблюдается сохранение импланта, а через 3 месяца виден значительный уровень роста костной ткани.

Гистологический анализ исследуемого материала имплантов показал относительно низкую иммуногенность, а также, что он является резорбируемым и не оказывает токсического воздействия. Модификация трехмерной структуры импланта, позволяет значительно ускорить процессы резорбции и обеспечивает направленный рост мозоли в имплант с более быстрой ее оссификацией. Имплант, обогащенный ЕРО, улучшает прикрепление клеток и их остеогенную дифференцировку также способствует формированию более зрелой костной мозоли.

Результаты продемонстрировали, что комплекс ТСП скаффолд с Эритропоезином является многообещающим фактором роста для стимуляции развития костной ткани, поскольку ТСП скаффолд, обогащенный Эритропоезином, очень легко получить в неинвазивной и простой процедуре.

Таким образом, главным результатом исследования явилась доказанная возможность оптимизации регенерации за счет применения скаффолдов на основе трикальцийфосфата, полученных методом трехмерной печати и обогащенных ростовыми факторами, на основе созданной экспериментальной ортотопической модели дефекта костей предплечья. В связи с этим трехмерный скаффолд, обогащенный ЕРО, является перспективным для применения в клинике.

Заключение

Достижения в области биоинженерии позволяют говорить о возможности производства костной ткани с биологической изменчивостью, служащей для замены сегментов резецированных или потерянных костей. Продолжение изучения биотехнологии скаффолдов необходимо, поскольку для реконструкции костного дефекта критического размера импланты обеспечивают две основные функции: во-первых, восстановление формы дефекта критического размера, а во-вторых, они действуют как биологическая проводящая структура для клеток и / или факторов роста, способствующих образованию костей (остеокондукция), некоторые могут также иметь остеоиндуктивные свойства (Beamer B et al., 2010). Трудности, связанные с восстановлением сосудистой перфузии и, таким образом, оксигенации и доставки питательных веществ во внутреннюю часть скаффолда, являются значительными ограничивающими факторами для формирования костей в центре скаффолдов (Hettrich C., Joseph Lane, 2010). Учеными были проведены исследования с описанием рекомендаций для индукции ангиогенеза (Beamer B et al., 2010). К ним относятся: введение большой дозы BMP (приблизительно 600 мг) и богатой тромбоцитами плазмы (PRP) или путем инкубации затравочных скаффолдов в сосудистом

биореакторе (Tingwei Bao, 2014). Было проведено несколько исследований на разных моделях животных для изучения возможности регенерации костного дефекта критического размера с использованием аутогенных MSC в ортопедии и челюстно-лицевой хирургии (Guan J et al., 2015). Также было продемонстрировано, что стромальные клетки мышинового или человеческого костного мозга, высеваемые на фосфате кальция (CaP), стимулируют формирование костей, имплантированные подкожно у иммунокомпрометированных мышей (Cheng N, 2013). Однако не найдено оптимальных решений по улучшению регенерации кости.

В исследовании была разработана оригинальная модель критического размера костного дефекта у крыс на предплечье лучевой кости, которые в наибольшей степени соответствуют клинике. Данная модель позволяет проводить исследование без применения остеосинтеза. Восстановление функций передней лапы крыс, без побочных явлений, наблюдалось в течение нескольких дней после операции, что также оказало положительное влияние на заживление и ремоделирование костей.

Исследование позволило оценить взаимодействие между ЕРО и хорошо изученным, обладающим заданной пористостью, биосовместимостью трикальцийфосфат скаффолдом (ТСР) и доказать, что ЕРО в обогащенном ТСР способствует регенерации кости. Объем образованной костной ткани ($p < 0.05$) для группы со скаффолдом составил $20,3 \pm 3,2 \%$, а для группы со скаффолдом, обогащенный Эритропоэтином, $34,1 \pm 3,6 \%$.

Рентгенографический анализ, проводимый через три месяца после операции у группы с ТСР скаффолдом показал увеличение костной ткани без явного заживления перелома кости. В другой группе, скаффолд ТСР, обогащенный Эритропоэтином через три месяца виден значительный уровень роста костной ткани.

Гистологический анализ исследуемого материала имплантов показал относительно низкую иммуногенность, а также, что он является резорбируемым и не оказывает токсического воздействия. Модификация трехмерной структуры импланта, позволяет значительно ускорить процессы резорбции и обеспечивает направленный рост мозоли в имплант с более быстрой ее оссификацией. Имплант, обогащенный ЕРО, улучшает прикрепление клеток и их остеогенную дифференцировку также способствует формированию более зрелой костной мозоли.

Результаты продемонстрировали, что комплекс ТСР скаффолд с Эритропоэтином является многообещающим фактором роста для стимуляции развития костной ткани, поскольку ТСР скаффолд, обогащенный эритропоэтином, очень легко получить в неинвазивной и простой процедуре, а также комплекс способствует взаимодействию с окружающими тканями и индуцированию регенерации костей.

Таким образом, главным результатом исследования явилось создание экспериментальной ортотопической модели травмы костей предплечья, на которой убедительно доказана возможность ускорения регенерации за счет применения скаффолдов на основе трикальцийфосфата, полученных методом трехмерной печати и обогащенных ростовыми факторами. В связи с этим рекомендуется внедрение методики в клиническую практику.

Выводы

1. Разработана ортотопическая модель костного дефекта критического размера лучевой кости у крыс, которая максимально приближена к клиническим условиям и позволяет объективно оценить эффективность различных способов хирургического лечения.
2. Предложенная методика трехмерного прототипирования трикальцийфосфатного скаффолда достоверно многократно воспроизведена с совпадением с размерами дефекта до 0,25 мкм.
3. Оригинальная трикальцийфосфатная керамика не токсична для клеток (фибробласты человека), цито совместима и длительно поддерживает пролиферацию ФЧ человека *in vitro*.
4. Трехмерный скаффолд, обогащенный факторами роста, достоверно и объективно приводит к формированию мезенхимального окостенения за счет увеличения объема сосудистой сети (в 34 % по сравнению с контрольной группой в 3%).
5. Трехмерный скаффолд, обогащенный Эритропоэтином, показывает относительно низкую иммуногенность, что практически позволяет говорить об отсутствии эозинофильной и лимфоидной инфильтрации в окружающих тканях, а также – является резорбируемым и не оказывает токсического воздействия.
6. Разработанная методика реконструкций прототопических критических дефектов трубчатых костей является перспективной для клинических исследований в различных разделах хирургии.

Практические рекомендации

1. Для проведения исследований по регенерации костной ткани при дефектах трубчатых костей рекомендуется использовать ортотопическую модель дефекта лучевой кости нижней трети диафиза, как наиболее близкую к клинической ситуации.
2. Метод трехмерной печати скаффолдов для замены протяженных дефектов костной ткани рекомендован для наиболее точного достижения соответствия объему и размеру дефекта кости.
3. Для получения трехмерной биокерамических образцов, заданной геометрии, на основе трикальцийфосфат (TCP) целесообразно использование мелкодисперсными порошками размером 80-100 мкм при горизонтальном разрешении 100 мкм и толщине слоя 130 мкм.
4. При планировании исследования по восстановлению костной ткани рекомендовано добавить факторы роста, способствующие направленной регенерации, увеличению сосудистой сети.

Список сокращений

ТСР, ТКФ – трикальцийфосфат

ЕРО - эритропоэтин

BMMCs - стволовые клетки с моноклеарными клетками, полученными из костного мозга

MSC - мезенхимальные стромальные клетки, получены из костного мозга

МСК - мезенхимальные стволовые клетки

ММСК - мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки

VEGF - эндотелиальный фактор роста

IGF - инсулиноподобный фактор роста

BMP - костные морфогенетические белки

TGF - трансформирующий фактор роста

РФА - рентгенофазовый анализ

ФЧ - фибробласты человека

Список литературы

1. Здравоохранение в России. 2017: Стат. Сб./Росстат России, 2017, стр 170
2. Абрамов С.С., Болдырев Н.Н., Евсеев А.А. и др. Изготовление пластиковых копий трехмерных объектов по томографическим данным. Оптическая техника. 1998; №1 (13): С. 45–49.
3. Анастасиева Е.А., Садовой М.А., Воропаева А.А., Кирилова И.А. Использование ауто- и аллотрансплантатов для замещения костных дефектов при резекциях опухолей костей (обзор литературы). Травматология и ортопедия в России, 2017; т. 23(3): с.148-155. DOI: 10.21823/2311-2905-2017-23-3-148-155.
4. Берченко Г.Н., Костные трансплантаты в травматологии и ортопедии, Биоматериалы (информационное издание для травматологов и ортопедов), 2008; №9: стр. 3-8
5. Бокерия Л.А., Демидова О.А., Аракелян В.С., Еремеева М.В. Опыт лечения хронической ишемии нижних конечностей с помощью генного препарата сосудисто-эндотелиального фактора роста VEGF165-ангиостимулина. Бюллетень НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН «Сердечно-сосудистые заболевания» 2006; 7: 1: 74—81.
6. Бочков Н.П., Константинов Б.А., Гавриленко А.В. и др. Генно-инженерные технологии в лечении хронической ишемии нижних конечностей. Вестник РАМН 2006; 9—10: 6—11.
7. Валетов В.А. Аддитивные технологии (состояние и перспективы). Учебное пособие. – СПб.: Университет ИТМО, 2015: 63с
8. Зайцев В.В., А.С. Карягина, В.Г. Лунин Костные морфогенетические белки (BMP): общая характеристика, перспективы клинического

- применения в травматологии и ортопедии. Вестник травматологии и ортопедии им.Н.Н.Приорова. 2009;N 4:С.79-84.
9. Иванов А.Н., Норкин И.А., Пучиньян Д.М.- Возможности и перспективы использования скаффолд-технологий для регенерации костной ткани, Цитология – 2014- том 56 №8- стр 543-548
 10. Бочков Н.П., Константинов Б.А., Гавриленко А.В. и др. Генно-инженерные технологии в лечении хронической ишемии нижних конечностей. Вестник РАМН 2006; 9-10: 6-11
 11. Костив Р.Е., Калиниченко С.Г., Матвеева Н.Ю., «Трофические факторы роста костной ткани, их морфологическая характеристика и клиническое значение», Тихоокеанский медицинский журнал, 2017, №1, стр. 10-16. DOI: 10.17238/Pmj 1609-1175.1.10-16
 12. Нефедова Н.А., Давыдова С.Ю. Роль Сосудистого эндотелиального фактора (VEGF) и гипоксия –индуцибельного фактора (Hif) в опухолевом ангиогенезе, Современные проблемы науки и образования – 2015-№3
 13. Панченко В.Я., Лазерные технологии обработки материалов: современные проблемы фундаментальных исследований и прикладных разработок — монография под ред. В. Я. Панченко, раздел «Лазерные технологии быстрого прототипирования и прямой фабрикации трехмерных объектов». - М.: Физматлит, 2009. - 664 с.
 14. Предеин Ю.А., Рерих В.В. Костные и клеточные импланты для замещения дефектов. Современные проблемы науки и образования, 2016, № 6
 15. Семенов М.Г., Степанова Ю.В., Трощиева Д.О. Перспективы применения стволовых клеток в реконструктивно-восстановительной хирургии челюстно-лицевой области, Ортопедия, травматология и

- восстановительная хирургия детского возраста. 2016; Том 4, № 4 , стр. 84-92. DOI:10.17816/PTORS4484-92
16. Тверской М.М. , Л.Н. Петров, А.С.Аладин, А.С. Жаринова, Компьютерная технология изготовления медицинских имплантатов методом послойного спекания //Вестник ЮУрГУ.– №23.– 2012. – С. 64-69.
 17. Шаповалов В.М., Военная травматология и ортопедия . Учебник. Под редакцией профессора В.М. Шаповалова. — СПб.: ВМедА, 2013:547
 18. Шумков А.А. Применение технологии быстрого прототипирования в изготовлении медицинских имплантов // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 2-(часть 2).
 19. Andrews S, Chondroitin Sulfate Glycosaminoglycan, Scaffolds for Cell and Recombinant Protein- Based Bone Regeneration/ Andrews S, Cheng A, Stevens H, Logun MT, Webb R, Jordan E, Xia B, Karumbaiah L, Guldberg RE // Stem Cells Transl Med. -2019 -Jun;8(6):575-585. doi: 10.1002/sctm.18-0141.
 20. Alfortawei R., The use of TriCalcium Phosphate (TCP) and stem cells for the regeneration of osteoperiosteal critical-size mandibular bony defects, an in vitro and preclinical study./ Randa Alfortawei, Kurt Busuttill Naudi, David Lappin, Joseph Barbenel, Lucy Di Silvio, Keith Hunter, Jeremy McMahon, Ashraf Ayoub // J Craniomaxillofac Surg. – 2014- Sep;42(6):863-9. doi: 10.1016/j.jcms.2013.12.006.
 21. Arosarena OA, Defect repair in the rat mandible with bone morphogenic proteins and marrow cells/ Arosarena OA, Falk A, Malmgren L, Bookman L, Allen MJ, Schoonmaker J, Tatum S, Kellman R. //Arch Facial Plast Surg. 2003 Jan-Feb;5(1):103-8. DOI: 10.1001/archfaci.5.1.103

22. Asakawa N, Pre-vascularization of in vitro three-dimensional tissues created by cell sheet engineering / Nahoko Asakawa, Tatsuya Shimizu, Yukiko Tsuda, Sachiko Sekiya, Tadashi Sasagawa, Masayuki Yamato, Fumio Fukai, Teruo Okano// *Biomaterials*.- 2010 - May;31(14):3903-9. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.105.
23. Assmann U, Fiber scaffolds of polysialic acid via electrospinning for peripheral nerve regeneration. / Assmann U, Szentivanyi A, Stark Y, Scheper T, Berski S, Dräger G, Schuster RH. // *J Mater Sci Mater Med*. 2010 Jul;21(7):2115-24. doi: 10.1007/s10856-010-4072-y.
24. Ayoub AF, Use of a composite pedicled muscle flap and rh BMP-7 for mandibular reconstruction / Ayoub AF, Challa R, Abu-Serriah M, McMahan J, Moos K, Creanor S, et al// *Int J Oral Maxillofac Surg* 36: 1183- 1192 ,2007
25. Tingwei Bao, Application of dendrimer/ plasmid hBMP-2 complexes loaded into-TCP/Collagen scaffolds in the treatment of femoral defects in rats/ Tingwei Bao, Huiming Wang, Wentao Zhang, Xuefeng Xia, Jiabei Zhou, Wenjian Weng and Dan Yu// *Biomedical Engineering: Applications, Basis and Communications*- Vol. 26,-No. 1 (2014) – pp. 1450005-1-10
26. Bartold PM, Principles and applications of cell delivery systems for periodontal regeneration/ Bartold PM, Xiao Y, Lyngstaadas SP, Paine ML, Snead ML. // *Periodontol* 2000 2006;41:123–135. DOI:10.1111/j.1600-0757.2006.00156.x
27. Bartolo P J, History of Stereolithographic Processes / Paulo Jorge Ba'rtolo and Ian Gibson// Springer Science+Business Media, LLC 2011
28. Bi L, Healing of critical-size segmental defects in rat femora using strong porous bioactive glass scaffolds / Lianxiang Bi, Brett Zobell, Xin Liu, Mohamed N. Rahaman, Lynda F. Bonewald // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2014 Sep;42- pp. 816-24. doi: 10.1016/j.msec.2014.06.022

29. Beamer B, Vascular Endothelial Growth Factor: An Essential Component of Angiogenesis and Fracture Healing / Brandon Beamer, BA & Carolyn Hettrich, MD, MPH & Joseph Lane, MD// HSS J. 2010 Feb;6(1):85-94. doi: 10.1007/s11420-009-9129-4.
30. Beckman DL, Activation of the erythropoietin receptor is not required for internalization of bound erythropoietin/ Beckman DL¹, Lin LL, Quinones ME, Longmore GD // Blood. 1999 Oct 15;94(8):2667-75.
31. Berthiaume F, Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges /Franc ois Berthiaume,1 Timothy J. Maguire, and Martin L. Yarmush // Annu Rev Chem Biomol Eng. -2011- pp.403-325 doi: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257.
32. Bluteau G, VEGF and VEGF receptors are differentially expressed in chondrocytes./ Bluteau G, Julien M, Magne D, Mallein-Gerin F, Weiss P, Daculsi G, Guicheux J. // Bone 40 (2007) , pp.568–576. DOI: 10.1016/j.bone.2006.09.024
33. Susmita Bose, Recent advances in bone tissue engineering scaffolds/ Susmita Bose, Mangal Roy and Amit Bandyopadhyay// Trends in Biotechnology- 2012- pp. 546-554 doi: 10.1016/j.tibtech.2012.07.005
34. Bose S, Natural Medicinal Compounds in Bone Tissue Engineering/ Bose S, Sarkar N. // Trends Biotechnol.- 2019 - Dec 24. doi: 10.1016/j.tibtech.2019.11.005.
35. Per Bosemark,The Masquelet Induced Membrane Technique With BMP and a Synthetic Scaffold Can Heal a Rat Femoral Critical Size Defect / Per Bosemark, Christina Perdikouri, Mea Pelkonen, Hanna Isaksson, Magnus Ta gil// J Orthop Res. 2015 Apr;33(4):488-95. doi: 10.1002/jor.22815.
36. Boyan BD, Hummert TW, Dean DD, Schwartz Z. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response./ Boyan BD¹, Hummert

- TW, Dean DD, Schwartz Z. // *Biomaterials*. 1996 Jan;17(2):137-46. DOI:10.1016/0142-9612(96)85758-9
37. Brighton CT, The pericyte as a possible osteoblast progenitor cell./ Brighton CT, Lorich DG, Kupcha R// *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1992 - Volume 275, pp. 287–299
38. Brown KV, Improving Bone Formation in a Rat Femur Segmental Defect by Controlling Bone Morphogenetic Protein-2 Release / Kate V. Brown, Bing Li, Teja Guda, Daniel S. Perrien, Scott A. Guelcher, and Joseph C. Wenke // *Tissue Eng Part A*. 2011 Jul;17(13-14):1735-46. doi: 10.1089/ten.TEA.2010.0446
39. Bruder SP, The Effect of Implants Loaded with Autologous Mesenchymal Stem Cells on the Healing of Canine Segmental Bone Defects / Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM // *J Bone Joint Surg Am* - 1998 – Jul- 80 (7) - pp.985 -96. DOI: 10.2106/00004623-199807000-00007
40. Cancedda R., Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone / Cancedda R., Dozin B., Giannoni P., Quarto R. // *Matrix Biology*.- 2003.- V. 22.- pp. 81–91. DOI: 10.1016/s0945-053x(03)00012-x
41. Cancedda R, A tissue engineering approach to bone repair in large animal models and in clinical practice. / Cancedda R, Giannoni P, Mastrogiacomo M//*Biomaterials* 28: 4240-4250, 2007. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.06.023
42. Hong Cao, A biodegradable porous composite scaffold of PGA/ β -TCP for bone tissue engineering / Hong Cao, Noboru Kuboyama // *Bone* – 2010-Feb;46(2):386-95. doi: 10.1016/j.bone.2009.09.031.
43. Castilho M, Fabrication of individual alginate-TCP scaffolds for bone tissue engineering by means of powder printing/ Miguel Castilho, Jorge Rodrigues , Inês Pires , Barbara Gouveia , Manuel Pereira, Claus Moseke ,

- Jürgen Groll , Andrea Ewald and Elke Vorndran// *Biofabrication*- 7 (2015) - 015004-pp.1-19. . doi: 10.1088/1758-5090/7/1/015004.
44. Thomas M., Design of composite scaffolds and three-dimensional shape analysis for tissue-engineered ear/ Thomas M., Cervantes, Erik K. Bassett, Alan Tseng and all // *Journal of the Royal Society Interface*- October 2013. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0413>
 45. Chen J-P, Preparation and characterization of biomimetic silk fibroin/chitosan composite nanofibers by electrospinning for osteoblasts culture. / Chen J-P, Chen S-H, Lai G-J. // *Nanoscale Res. Lett.*- 2012- 7(1) - pp.1–11. doi: 10.1186 / 1556-276X-7-170.
 46. Chen FM, Stem cell-delivery therapeutics for periodontal tissue regeneration./ Chen FM, Sun HH, Lu H, Yu Q.// *Biomaterials*. 2012 Sep;33(27):6320-44. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.05.048.
 47. Cheng C, Application of F-18-sodium fluoride (NaF) dynamic PET-CT (dPET-CT) for defect healing: a comparison of biomaterials in an experimental osteoporotic rat model./ Cheng C, Alt V, Pan L, Thormann U, Schnettler R, Strauss LG, Heinemann S, Schumacher M, Gelinsky M, Nies B, Dimitrakopoulou-Strauss A // *Med Sci Monit*. 2014 Oct 15;20:1942-9. doi: 10.12659/MSM.891073.
 48. Cheng N, Porous CaP/silk composite scaffolds to repair femur defects in an osteoporotic model / Cheng N, Dai J, Cheng X, Li S, Miron RJ, Wu T, Chen W, Zhang Y, Shi B.// *J Mater Sci Mater Med*. 2013 Aug;24(8):1963-75. doi: 10.1007/s10856-013-4945-y.
 49. Chien KB, Three-dimensional printing of soy protein scaffolds for tissue regeneration. / Chien KB, Makridakis E, Shah RN. // *Tissue Eng. Part C Methods* 2013, 19(6), pp. 417–426. doi: 10.1089/ten.TEC.2012.0383.
 50. Chua, Rapid prototyping: principles and applications. /Chua, Chee Kai, Kah Fai Leong, and C. Chu Sing Lim. World Scientific, 2010.

51. Cunha MR, Implants of polyan- ionic collagen matrix in bone defects of ovariectomized rats. / Cunha MR, Santos AR Jr, Goissis G, Genari SC // *J Mater Sci: Mater Med* – 2008- 19(3)- pp.1341–8. DOI: 10.1007/s10856-006-0105-y
52. Gráinne M. Cunniffe, Porous decellularized tissue engineered hypertrophic cartilage as a scaffold for large bone defect healing / Gráinne M. Cunniffe, Tatiana Vinardell, J. Mary Murphy, Emmet M. Thompson, Amos Matsiko, Fergal J. O'Brien, Daniel J. Kelly // *Acta Biomater* - 2015 – Sep- 23- pp.82-90. doi: 10.1016/j.actbio.2015.05.031.
53. Cutroneo, K. R. Gene therapy for tissue regeneration. / Cutroneo, K. R. // *J. Cell Biochem.*-2003- 88-pp.418–425 DOI:10.1002/jcb.10357
54. Deckers MM, Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor / A. Deckers MM, Bezooijen RLvan, Horst Gvan der // *Endocrinology* 143 4, pp.1545–1553, 2002
55. Delafontaine P, Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. / Delafontaine P, Song YH, Li YX. // *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24(3),pp.435- 444.
56. Drossea I., Tissue engineering for bone defect healing: An update on a multi-component approach / Inga Drossea, Elias Volkmera, Rodolfo Capannab, Pietro De Biaseb, Wolf Mutschlera, Matthias Schieker // *Injury, Int. J. Care Injured* - 2008- 39S2- pp.9–20 doi: 10.1016 / S0020-1383(08)70011-1.
57. Duan W, Polymermineral scaffold augments in vivo equine multipotent stromal cell osteogenesis. Duan W, Chen C, Haque M, Hayes D, Lopez MJ, *Stem Cell Res Ther.* 2018 Mar 9;9(1):60. doi: 10.1186/s13287-018-07908.
58. Kenneth M. Dupont, Synthetic scaffold coating with adeno-associated virus encoding BMP2 to promote endogenous bone repair / Kenneth M. Dupont,

- Joel D. Boerckel, Hazel Y. Stevens, Tamim Diab, Yash M. Kolambkar, Masahiko Takahata, Edward M. Schwarz, Robert E. Guldberg // *Cell Tissue Res.* - 2012 – Mar- 347(3)- pp. 575-588. doi: 10.1007/s00441-011-1197-3.
59. Einhorn TA, The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. / Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ.// *J Bone Joint Surg Am.* 1984 Feb;66(2):274-9.
60. Fan W, Enhancing in vivo vascularized bone formation by cobalt chloride-treated bone marrow stromal cells in a tissue engineered periosteum model. /Fan W, Crawford R, Xiao Y. // *Biomaterials.* 2010;31:3580–3589. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.083.
61. Filion TM, Elastomeric osteoconductive synthetic scaffolds with acquired osteoinductivity expedite the repair of critical femoral defects in rats. / Filion TM, Li X, Mason-Savas A, Kreider JM, Goldstein SA, Ayers DC, Song J. // *Tissue Eng Part A.* 2011;17:503–511.
62. Furth ME, Smart biomaterials design for tissue engineering and regenerative medicine/ Furth ME, Atala A, Van Dyke ME. // *Biomaterials* 2007, 28(34), pp. 5068–5073. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2007.07.042
63. Jain A.P., Bone morphogenetic proteins: the anomalous molecules/ Jain A.P., Pundir S., Sharma A. // *Journal of Indian Society of Periodontology.* 2013, Vol.17, №5, h. 583-586 DOI:10.4103/0972-124X.119275
64. Mariarosaria Galeano, Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds /Galeano M¹, Altavilla D, Bitto A, Minutoli L, Calò M, Lo Cascio P, Polito F, Giugliano G, Squadrito G, Mioni C, Giuliani D, Venuti FS, Squadrito F. // *Crit Care Med.* 2006 Apr; 34 (4):1139-46. DOI: 10.1097/01.CCM.0000206468.18653.EC

65. Ghasemi-Mobarakeh L, Electrical stimulation of nerve cells using conductive nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering./ Ghasemi-Mobarakeh L, Prabhakaran MP, Morshed M, Nasr-Esfahani MH, Ramakrishna S. // *Tissue Eng.*, 2009, Part A 15(11), pp. 3605–3619. doi: 10.1089/ten.TEA.2008.0689.
66. M. E. Gomes , Effect of flow perfusion on the osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells cultured on starch-based three-dimensional scaffolds / M. E. Gomes, V. I. Sikavitsas, E. Behraves, R. L. Reis, A. G. Mikos, // *J. Biomed. Mater. Res.*- 2003- pp. 971-977. DOI:10.1002/jbm.a.10075
67. Gross B.C., An Evaluation of 3D Printing and its Potential Impact on Biotechnology and the Chemical Sciences /Bethany C. Gross, Jayda L. Erkal, Sarah Y. Lockwood, Chengpeng Chen, and Dana M Spence// *Analytical Chemistry*- 2014-pp.1-35. DOI:10.1021/ac403397r
68. Guan J, Human Urine Derived Stem Cells in Combination with β -TCP Can Be Applied for Bone Regeneration/ Guan J , Zhang J , Li H , Zhu Z , Guo S , Niu X , Wang Y , Zhang C.// *PLoS One.*- 2015 May 13;10(5):e0125253. doi: 10.1371/journal.pone.0125253
69. Guelcher SA, Dual-purpose bone grafts improve healing and reduce infection. / Guelcher SA, Brown KV, Li B, Guda T, Lee BH, Wenke JC. // *J Orthop Trauma* – 2011- 25- pp.477-82. DOI:10.1097/BOT.0b013e31821f624c
70. González-García M, Preclinical Studies of the Biosafety and Efficacy of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells Pre-Seeded into β -TCP Scaffolds after Transplantation /González-García M, Martínez CM³, Villanueva V, García-Hernández A, Blanquer M, Meseguer-Olmo L, Oñate Sánchez RE, Moraleda JM, Rodríguez-Lozano FJ// *Materials (Basel).*- 2018 - Aug 3- pp.11(8). doi: 10.3390/ma11081349.

71. Guo C, Myoblast-based cardiac repair: xenomyoblast versus allomyoblast transplantation./ Guo C, Haider H, Shim WS, Tan RS, Ye L, Jiang S, et al. // J Thorac Cardiovasc Surg.- 2007- 134- pp.1332–9 DOI:10.1016/j.jtcvs.2007.07.025
72. Roche C. de Guzman, Bone regeneration with BMP-2 delivered from keratose scaffolds / Roche C. de Guzman, Justin M. Saul, Mary D. Ellenburg, Michelle R. Merrill, Heather B. Coan, Thomas L. Smith, Mark E. Van Dyke // Biomaterials. – 2013- Feb;34(6)- pp.1644-56. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.11.002.
73. Harada N, Bone regeneration in a massive rat femur defect through endochondral ossification achieved with chondrogenically differentiated MSCs in a degradable scaffold / Noriko Harada, Yoshinobu Watanabe, Kenji Sato, Satoshi Abe, Katsuyuki Yamanaka, Yuhiro Sakai, Tadashi Kaneko, Takashi Matsushita // Biomaterials 35 - 2014 - pp. 7800-7810 DOI:10.1016/j.biomaterials.2014.05.052
74. He Y, Experimental study on reconstruction of segmental mandible defects using tissue engineered bone combined bone marrow stromal cells with three-dimensional tricalcium phosphate /He Y, Zhang ZY, Zhu HG, Qiu W, Jiang X, Guo W // J Craniofac Surg. – 2007-pp.800- 805
75. Henkel KO, Repair of bone by applying biomatrices with and without autologous osteoblasts / Henkel KO, Gerber T, Dörfling P, Gundlach KK, Bienengräber V// J Craniofac Surg. -2005 -33- pp. 45- 49 DOI:10.1016/j.jcms.2004.08.005
76. Heliotis M, Transformation of a prefabricated hydroxyapatite/osteogenic protein-1 implant into a vascularised pedicled bone flap in the human chest. / Heliotis M¹, Lavery KM, Ripamonti U, Tsiridis E, di Silvio L.//U Int J Oral Maxillofac Surg. -2006- 35- pp.265- 273 DOI:10.1016/j.ijom.2005.07.013

77. Hench LL, Bioactive Glasses: Frontiers and Challenges /Hench LL, Jones JR.// Front Bioeng Biotechnol.- 2015- 3- 194-pp. 1-12
DOI:10.3389/fbioe.2015.00194
78. Hettrich C., Vascular Endothelial Growth Factor: An Essential Component of Angiogenesis and Fracture Healing / Hettrich C., Beamer B, Lane J. // HSS J.- 2010 Feb - 6 (1)- pp.85-94. DOI:10.1007/s11420-009-9129-4
79. Hing K.A., Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering?/ K.A. Hing //Phil. Trans. R. Soc. Lond. A. Math. Phys. Eng. Sci. 362 -2004 – pp.2821–2850. DOI:10.1098/rsta.2004.1466
80. Holtorfa HL, Ectopic bone formation in rat marrow stromal cell/titanium fiber mesh scaffold constructs:Effect of initial cell phenotype / Holtorf HL¹, Jansen JA, Mikos AG. // Biomaterials. 2005 Nov;26(31):6208-16.
81. Hospenthal DR, Guidelines for the prevention of infections associated with combat-related injuries: 2011 update: endorsed by the Infectious Diseases Society of America and the Surgical Infection Society / Hospenthal DR, Murray CK, Andersen RC, Bell RB, Calhoun JH, Cancio LC, et al.// J Trauma – 2011- 71:S- pp. 210-34. DOI:10.1097/TA.0b013e318227ac4b
82. Hribar KC, Light-assisted direct-write of 3D functional biomaterials. / Hribar KC, Soman P, Warner J, Chung P, Chen S. // Lab Chip 2013, 14(2), pp. 268–275. DOI:10.1039/c3lc50634g
83. Huang Y-C, Biomaterials and strategies for nerve regeneration./ Huang Y-C, Huang Y-Y. // Artif. Organs 2006- 30(7)- pp.514–514. DOI:10.1111/j.1525-1594.2006.00253.x
84. Jin L, A novel fluffy conductive polypyrrole nano-layer Coated PLLA fibrous scaffold for nerve tissue engineering / Jin L, Feng ZQ, Zhu ML, Wang T, Leach MK, Jiang Q. // J. Biomed. Nanotechnol.2012, 8(5), pp. 779–785. DOI:10.1166/jbn.2012.1443

85. Chris Hyunchul Jo, Comparative evaluation of in vivo osteogenic differentiation of fetal and adult mesenchymal stem cell in rat critical-sized femoral defect model / Chris Hyunchul Jo, Pil Whan Yoon, Hyang Kim, Kyung Sun Kang, Kang Sup Yoon // Cell Tissue Res. – 2013 – Jul- 353(1)- pp. 41-52. DOI:10.1007/s00441-013-1619-5
86. J. A. Inzana, 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration / Jason A. Inzana, Diana Olvera, Seth M. Fuller, James P. Kelly, Olivia A. Graeve, Edward M. Schwarz, Stephen L. Kates, Hani A. Awad // Biomaterials - 35 (2014) – pp. 4026-4034. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.064.
87. J. M. Kanczler, Osteogenesis and angiogenesis : the potential for engineering bone/ J. M. Kanczler, R. O. Oreffo, // European Cells and Materials -2008 -Vol. 15 – pp. 100-114. DOI:10.22203/ecm.v015a08
88. Karp JM, Fabrication of precise cylindrical three-dimensional tissue engineering scaffolds for in vitro and in vivo bone engineering applications / Karp JM, Rzeszutek K, Shoichet MS, Davies JE. // J Craniofac Surg – 2003- 14(3)- pp. 317–23. DOI:10.1097/00001665-200305000-00009
89. Kevin W., Studies of bone morphogenetic protein-based surgical repair/ Kevin W.-H. Lo , Bret D. Ulery , Keshia M. Ashe, Cato T. Laurencin Journal Article// Adv Drug Deliv Rev.- 2012 – Sep- 64(12)- pp.1277-91. doi: 10.1016/j.addr.2012.03.014.
90. C. Kirker-Head, BMP-silk composite matrices heal critically sized femoral defects / C. Kirker-Head, V. Karageorgiou, S. Hofmann, R. Fajardo, O. Betz, H.P. Merkle, M. Hilbe, B. von Rechenberg, J. McCool, L. Abrahamsen, A. Nazarian, E. Cory, M. Curtis, D. Kaplan, L. Meinel // Bone - 2007- Aug - 41(2)- pp.247-55. DOI:10.1016/j.bone.2007.04.186
91. Jinkoo Kim, Erythropoietin-mediated bone formation is regulated by mTOR signaling/Younghun Jung, Hongli Sun, Jeena Joseph, Anjali Mishra,

- Yusuke Shiozawa, Jingcheng Wang, Paul H. Krebsbach, and Russell S. Taichman// *J Cell Biochem.* – 2012- Jan;113(1)- pp. 220-8. doi: 10.1002/jcb.23347.
92. N. Koike, Creation of long-lasting blood vessels/Koike N, Fukumura D, Gralla O, Au P, Schechner JS, Jain RK //*Nature.*- 2004- Mar 11;428(6979)- pp.138-9. DOI:10.1038/428138a
93. Gelderblom M, IL-23 (Interleukin-23)-Producing Conventional Dendritic Cells Control the Detrimental IL-17 (Interleukin-17) Response in Stroke/Gelderblom M, Gallizioli M, Ludewig P, Thom V, Arunachalam P, Rissiek B, Bernreuther C, Glatzel M, Korn T, Arumugam TV, Sedlacik J, Gerloff C, Tolosa E, Planas AM, Magnus T.// *Stroke.*- 2018 - Jan;49(1)- pp.155-164. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.019101.
94. Kotsougiani D., Recipient-derived angiogenesis with short term immunosuppression increases bone remodeling in bone vascularized composite allotransplantation: A pilot study in a swine tibial defect model./ Kotsougiani D. , Hundepool CA , Bulstra LF , Friedrich PF , Shin AY , Bishop AT .// *J Orthopaedic Res.*- 2017 - Jun, 35(6)- pp.1242-1249. doi: 10.1002 / jor.23378.
95. Laschke M.W., In vitro and in vivo evaluation of a novel nanosize hydroxyapatite particles/poly(ester-urethane) composite scaffold for bone tissue engineering. / Lashke MW¹, Strohe A, Menger MD, Alini M, Eglin D.//*Act. Biomater.* -2010- 6, pp. 2020–2027. DOI: 10.1016/j.actbio.2009.12.004
96. Lederman R.J., Therapeutic angiogenesis with recombinant fibroblast growth factor-2 for intermittent claudication (TRAFFIC study). / Lederman R.J., Mendelsohn F.O., Anderson R.D., Saucedo J.F., Hermiller J.B. // *Lancet* 2002 - 359 pp. 2053—2058. DOI:10.1016/s0140-6736(02)08937-7

97. Sungsoo S. Lee, Bone regeneration with low dose BMP-2 amplified by biomimetic supramolecular nanofibers within collagen scaffolds /Sungsoo S. Lee, Brian J. Huang, Stuart R. Kaltz, Shantanu Sur, Christina J. Newcomb, Stuart R. Stock, Ramille N. Shah, Samuel I. Stupp // *Biomaterials*. - 2013 – Jan- 34(2)- pp. 452-9. DOI:10.1016/j.biomaterials.2012.10.005
98. Lee JY, Customized biomimetic scaffolds created by indirect three-dimensional printing for tissue engineering. / Lee JY, Choi BY, Wu B, Lee M. // *Biofabrication* – 2013- 5(4)- 045003- pp.1-9. DOI:10.1088/1758-5082/5/4/045003
99. Lee JY, Polypyrrole-coated electrospun PLGA nanofibers for neural tissue applications. / Lee JY, Bashur CA, Goldstein AS, Schmidt CE. // *Biomaterials*-2009-30(26)-pp.4325–4335. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.04.042
100. Lewandrowski KU, Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats. / Lewandrowski KU, GresserJD, WiseDL, TrantolDJ. // *Biomaterials* – 2000- 21(8)- pp.757–64. DOI: 10.1016/s0142-9612(99)00179-9
101. C. Li , Erythropoietin Promotes Bone Formation through EphrinB2/EphB4 signaling/ Li C , Shi C , Kim J , Chen Y , Ni S , Jiang L , Zheng C , Li D , Hou J , Taichman RS , Sun H // *J Dent Res*. – 2015- Mar- 94(3)- pp.455-63. doi: 10.1177/0022034514566431
102. Li D, Evaluation of the osteogenesis and angiogenesis effects of erythropoietin and the efficacy of deproteinized bovine bone/ recombinant human erythropoietin scaffold on bone defect repair / Liqing Deng, Xiaowei Xie, Zhouyuan Yang, Pengde Kang//*J Mater Sci Mater Med*.- 2016- Jun; 27 (6)- pp101. doi: 10.1007 / s10856-016-5714-5

103. Li G, Polymer Materials and Engineering Research at Sichuan University./Li G, Fu Q. // *Macromol Rapid Commun.*- 2017- Dec- pp.38(23). doi: 10.1002/marc.201700592.
104. Lian H, Fabrication, characterization and osteoblast responses of poly (octanediol citrate)/bioglass nanofiber composites./Lian H, Meng Z. // *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.*- 2018- Mar 1- 84- pp.123-129. doi: 10.1016/j.msec.2017.11.042
105. Hod Lipson , 3-D Printing the History of Mechanisms / Hod Lipson, Francis C. Moon, Jimmy Hai, Carlo Paventi // *Journal of Mechanical Design*-2005- pp.1029-1033
106. Wai-Ching Liu, The effects of 3D bioactive glass scaffolds and BMP-2 on bone formation in rat femoral critical size defects and adjacent bones / Wai-Ching Liu, Irina S Robu, Rikin Patel, Ming C Leu, Mariano Velez, Tien-Min Gabriel Chu // *Biomed Mater*- 2014 Aug- 9(4) DOI:10.1088/1748-6041/9/4/045013
107. Liu F, I-Optimal design of poly(lactic-co-glycolic) acid/hydroxyapatite three-dimensional scaffolds produced by thermally induced phase separation/Liu J, Zhang J, James PF, Yousefi AM // *Polymetal Sci* .- 2019 – Jun- 59 (6)- pp.1146-1157. doi: 10.1002 /
108. M. Lovett, Vascularization strategies for tissue engineering/ M. Lovett, K. Lee, A. Edwards, D.L. Kaplan// *Tissue Eng*. - 15 (2009)- pp. 353–370. DOI:10.1089/ten.TEB.2009.0085
109. Lu Z., The Osteoconductivity of Biomaterials Is Regulated by Bone Morphogenetic Protein 2 Autocrine Loop Involving alpha beta Integrin and Mitogen-Activated Protein Kinase/ Lu Z¹, Zreiqat H. // *Extracellular Related Kinase Signaling Pathways Tissue Eng Part A* (2010) Lu Z¹, Zreiqat H. // *Tissue Eng Part A*. – 2010- Oct- 16(10)- pp.3075-84. doi: 10.1089/ten.tea.2010.0204.

110. Eduardo Gomes Machadoa, A new heterologous fibrin sealant scaffold to recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and natural latex proteins for the repair of tibial bone defects / Eduardo Gomes Machadoa, João Paulo Mardegan Issa, Felipe Augusto Tocchinide Figueiredob, Geovane Ribeiros dos Santos, Ewerton Alexandre Galdeanoa, Mariana Carla Alvesa, Erivelto Luis Chacona, Rui Seabra Ferreira Juniorc, Benedito Barravierac, Marcelo Rodrigues da Cunha // *Acta Histochem.* 2015 Apr;117(3):288-96. doi: 10.1016/j.acthis.2015.03.006.
111. Maiborodin IV, Regeneration of red bone marrow in rat lower jaw after transplantation of mesenchymal stem cells into the site of injury./ Maiborodin IV, Matveeva VA, Kolesnikov IS, Drovosekov MN, Toder MS, Shevela AI // *Bull Exp Biol Med* – 2012-152 – pp. 528- 534. DOI:10.1007/s10517-012-1569-z
112. Makinen K., Increased vascularity detected by digital subtraction angiography after VEGF gene transfer to human lower limb artery: a randomized, placebo-controlled, doubleblinded phase II study. / Mäkinen K¹, Manninen H, Hedman M, Matsi P, Mussalo H, Alhava E, Ylä-Herttuala S. // *Mol Ther* - 2002; 6: 127—133. DOI:10.1006/mthe.2002.0638
113. Mannoor MS, 3D printed bionic ears./ Mannoor MS¹, Jiang Z, James T, Kong YL, Malatesta KA, Soboyejo WO, Verma N, Gracias DH, McAlpine MC. // *Nano Lett.* – 2013 - 13(6) - pp. 2634–2639. DOI:10.1021/nl4007744
114. Marcacci M, Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. / Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R. // *Tissue Eng.* 2007;13:947–955. DOI:10.1089/ten.2006.0271

115. Miguel, B.S., Enhanced osteoblastic activity and bone regeneration using surface-modified porous bioactive glass scaffolds./ San Miguel B¹, Kriauciunas R, Tosatti S , Ehrbar M , Ghayor C , Textor M, Weber FE . // Biomed. Mater. Res. Part A -2010- 94A- pp. 1023–1033. DOI:10.1002/jbm.a.32773
116. Mironov V, Organ printing: computer-aided jet-based 3D tissue engineering. / Mironov V, Boland T, Trusk T, Forgacs G, Markwald RR. // Trends Biotechnol. 2003, 21(4), pp. 157–161. DOI:10.1016/S0167-7799(03)00033-7
117. Masashi Miyazaki, Enhancement of the Effects of Exfoliated Carbon Nanofibers by Bone Morphogenetic Protein in a Rat Femoral Fracture Model / Masashi Miyazaki, Masahiro Toyoda, Toyomi Yoshiiwa, Masanori Kawano, Nobuhiro Kaku, Hiroshi Tsumura // J Orthop Res. – 2015- Feb- 33(2)- pp.185-92. doi: 10.1002/jor.22751.
118. Moon S, Layer by layer three-dimensional tissue epitaxy by cell-laden hydrogel droplets. / Moon S¹, Hasan SK, Song YS, Xu F, Keles HO, Manzur F, Mikkilineni S, Hong JW, Nagatomi J, Haeggstrom E, Khademhosseini A, Demirci U.// Tissue Eng Part C Methods. 2010 Feb;16(1):157-66. doi: 10.1089/ten.TEC.2009.0179.
119. Nandi SK¹, 3D printed β -TCP bone tissue engineering scaffolds: Effects of chemistry on in vivo biological properties in a rabbit tibia model./ Nandi SK, Fielding G, Banerjee D, Bandyopadhyay A, Bose S// J Mater Res. 2018;33(14):1939-1947. doi: 10.1557/jmr.2018.233.
120. Masashi Nomi, Principals of neovascularization for tissue engineering / Masashi Nomi, Anthony Atala, Paolo De Coppi, Shay Soker// Molecular Aspects of Medicine 23 (2002), pp. 463–483. DOI:10.1016/s0098-2997(02)00008-0

121. Esther C. Novosel, Vascularization is the key challenge in tissue engineering /Esther C. Novosel, Claudia Kleinhans, Petra J. Kluger// *Adv Drug Deliv Rev.* – 2011- Apr 30- 63(4-5)- pp.300-11. doi: 10.1016/j.addr.2011.03.004.
122. Megan E. Oest, Quantitative Assessment of Scaffold and Growth Factor-Mediated Repair of Critically Sized Bone Defects / Megan E. Oest, Kenneth M. Dupont, Hyun-Joon Kong, David J. Mooney, Robert E. Guldberg // *J Orthop Res.*- 2007 – Jul- 25(7)- pp.941-50. DOI:10.1002/jor.20372
123. Owens CM, Biofabrication and testing of a fully cellular nerve graft. / Owens CM, Marga F, Forgacs G, Heesch CM. // *Biofabrication.* 2013 Dec;5(4):045007. doi: 10.1088/1758-5082/5/4/045007.
124. Ozbolat IT, Bioprinting toward organ fabrication: challenges and future trends. / Ozbolat IT¹, Yu Y// *IEEE Trans Biomed Eng.* – 2013- Mar- 60(3)- pp. 691-9. doi: 10.1109/TBME.2013.2243912.
125. Palombella S, Bone Marrow-Derived Cell Therapies to Heal Long-Bone Nonunions: A Systematic Review and Meta-Analysis—Which Is the Best Available Treatment? / Palombella S, Lopa S, Gianola S, Zagra L, Moretti M, Lovati AB.// *Stem Cells Int.* 2019 Dec 27;2019:3715964. doi: 10.1155/2019/3715964.
126. S.N. Parikh, The reliability to determine "healing" in osteochondritis dissecans from radiographic assessment./ Parikh SN¹, Allen M, Wall EJ, May MM, Laor T, Myer GD.//*Orthopedics* -2012- Sep-32(6)-pp.35-39. DOI:10.1097/BPO.0b013e31825fa80f
127. Park H, Effects of three-dimensionally printed polycaprolactone/ β -tricalcium phosphate scaffold on osteogenic differentiation of adipose tissue- and bone marrow-derived stem cells. / Park H, Kim JS¹, Oh EJ², Kim TJ², Kim HM², Shim JH³, Yoon WS³, Huh JB⁴, Moon SH⁵, Kang

- SS⁶, Chung HY². // Arch Craniofac Surg. - 2018 – Sep- 19(3)- pp.181-189.
doi: 10.7181/acfs.2018.01879.
128. Partridge L., Ageing in Drosophila: the role of the insulin/Igf and TOR signalling network. (АНГЛ.)/ Partridge L., Alic N., Bjedov I., Piper M. D. // Experimental gerontology. — 2011. — Vol. 46, no. 5. — P. 376—381. — DOI:10.1016/j.exger.2010.09.003
129. Patel, Z.S., Dual delivery of an angiogenic and an osteogenic growth factor for bone regeneration in a critical size defect model./ Patel, Z.S., Young, S., Tabata, Y., Jansen, J.A., Wong, M.E., and Mikos, A.G. //Bone - 2008 Nov-43(5)- pp.931-40. DOI:10.1016/j.bone.2008.06.019
130. Penn-Barwell JG, Early antibiotics and debridement independently reduce infection in an open fracture model. / Penn-Barwell JG, Murray CK, Wenke JC. // J Bone Jt Sur Br- 2012- 94-B- pp.1-6. DOI:10.1302/0301-620X.94B1.27026
131. Petit I, The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis./ Petit I, Jin D, Rafii S. // Trends Immunol 2007;28(7), pp. 299- 307. DOI:10.1016/j.it.2007.05.007
132. Popat A.H., Rapid prototyping and medical modeling // Phidias Rapid Prototyping in medicine.-1998.-1.-p.10-12
133. Michelle T. Poldervaart, Prolonged presence of VEGF promotes vascularization in 3D bioprinted scaffolds with defined architecture / Poldervaart MT, Gremmels H, van Deventer K, Fledderus JO, Oner FC, Verhaar MC, Dhert WJ, Alblas J. // J Control Release. 2014 Jun 28;184:58-66. doi: 10.1016/j.jconrel.2014.04.007.
134. Rajagopalan S., Regional angiogenesis with vascular endothelial growth factor in peripheral arterial disease : Design of the RAVE trial./ Rajagopalan S, Mohler E 3rd, Lederman RJ, Saucedo J, Mendelsohn FO, Olin J, Blebea J, Goldman C, Trachtenberg JD, Pressler M, Rasmussen

- H, Annex BH, Hirsch AT; // Am Heart J.- 2003 – Jun- 145(6)- pp.1114-8.
DOI:10.1016/S0002-8703(03)00102-9
135. Bina Rai, Combination of platelet-rich plasma with polycaprolactone-tricalcium phosphate scaffolds for segmental bone defect repair / Bina Rai, Megan E. Oest, Ken M. Dupont, Kee H. Ho, Swee H. Teoh, Robert E. Guldberg // J Biomed Mater Res A. 2007 - Jun 15- 81(4) - pp. 888-99.
DOI:10.1002/jbm.a.31142
136. Ren J, Repair of mandibular defects using MSCs-seeded biodegradable polyester porous scaffolds./ Ren J, Ren T, Zhao P, Huang Y, Pan K // J Biomater Sci Polym Ed – 2007- 18- pp. 505- 517.
DOI:10.1163/156856207780852578
137. Do Prado Ribeiro DC, Evaluation of the bone repair in defects grafted with hydroxyapatite and collagen membrane combined with laser therapy in rats. / Do Prado Ribeiro DC, de Abreu Figueira L, Issa JP, Dias Vecina CA, Josédias F, Da Cunha MR. // Microsc Res Tech.- 2012 – Feb- 75(2)- pp.133-7. doi: 10.1002/jemt.21035
138. P. B. Saadeh, Mechanisms of Fibroblast Growth Factor-2 Modulation of Vascular Endothelial Growth Factor Expression by Osteoblastic Cells / P. B. Saadeh, B. J. Mehrara, D. S. Steinbrech, J. A. Spector, J. A. Greenwald, G. S. Chin, H. Ueno, G. K. Gittes, M. T. Longaker, // Endocrinology - 2000 - Vol 141- No 6 -pp. 2075-2083.
DOI:10.1210/endo.141.6.7502
139. Benay Sager, Experimental studies in stereolithography resolution /Benay Sager, David W. Rosen, Meghan Shilling and Thomas R. Kurfess //The Woodruff School of Mechanical Engineering Georgia Institute of Technology Atlanta, GA- 2003- International Solid Freeform Fabrication Symposium-pp70-81

140. Sanan A., Repairing holes in the head: a history of cranioplasty / Sanan A , Haines SJ. //J. Neurosurg. - 1997 -40- pp.588–603. DOI:10.1097/00006123-199703000-00033
141. Carlos J. Sanchez Jr. , Effects of local delivery of D-amino acids from biofilm-dispersive scaffolds on infection in contaminated rat segmental defects/ Carlos J. Sanchez Jr. , Edna M. Prieto, Chad A. Krueger, Katarzyna J. Zienkiewicz, Desiree R. Romano, Catherine L. Ward, Kevin S. Akers, Scott A. Guelcher, Joseph C. Wenke // Biomaterials. – 2013- Oct- 34(30)- pp.7533-43 DOI:10.1016/j.biomaterials.2013.06.026
142. Saracino GaA, Nanomaterials design and tests for neural tissue engineering. / Saracino GaA, Cigognini D, Silva D, Caprini A, Gelain F. // Chem. Soc. Rev.- 2012 - 42(1)- pp. 225–262. DOI:10.1039/c2cs35065c
143. Sarahrudi K, VEGF serum concentrations in patients with long bone fractures: A comparison between impaired and normal fracture healing. / Sarahrudi K, Thomas A, Braunsteiner T , Wolf H , Vécsei V, Aharinejad S //J. Orthop. Res. – 2009 – pp.1293-1297. DOI:10.1002/jor.20906
144. Sean Gao , 3D Printing in Orthopedics: Upper Extremity Trauma and Deformity/Sean Gao , Joseph Dallis Stephens, Caleb Piatt, Taylor Hockman, Andrew Hills, Jay Thompson, Morgan Smith, David Martineau, H. BrentBamberger //3D Printing in Orthopaedic Surgery – 2019- pp. 85-94
145. Shikinami Y, Bioresorbable devices made of forged composites of hydroxyapatite (HA) particles and poly-L-lactide (PLLA): part I. Basic characteristics./ Shikinami Y, Okuno M. //Biomaterials – 1998- 20 – pp.859-877. DOI:10.1016/s0142-9612(98)00241-5
146. Jordan D. Skelly, Vancomycin-bearing Synthetic Bone Graft Delivers rhBMP-2 and Promotes Healing of Critical Rat Femoral Segmental Defects

- / Skelly JD ¹, Lange J, Filion TM, Li X, Ayers DC, Song J . // Clin Orthop Relat Res -2014- 472- pp.4015–4023. DOI:10.1007/s11999-014-3841-1
147. Stark GB, Matrix and carrier materials for bone growth factors state of the art and future perspectives. /Stark GB, Hutmacher D, Kirsch A, Ackermann KL, Huerzeler MB // Biological matrices and tissue reconstruction. -1998. – pp. 197-206.
148. Johan van der Stok, Enhanced bone regeneration of cortical segmental bone defects using porous titanium scaffolds incorporated with colloidal gelatin gels for time and dose controlled delivery of dual growth factors (growth factor loaded gelatin gels in porous titanium scaffolds) / Johan van der Stok, Huanan Wang, Saber Amin Yavari, Michiel Siebelt, Marjan Sandker, Jan H. Waarsing, Jan .A.N. Verhaar, Holger Jahr, Amir A. Zadpoor, Sander C.G. Leeuwenburgh, Harrie Weinans //Tissue Engineering Part A - Dec. 2013- Vol 19- No 23-24- pp.2605-2614 DOI:10.1089/ten.TEA.2013.0181
149. Subramanian A, Development of biomaterial scaffold for nerve tissue engineering: biomaterial mediated neural regeneration. / Subramanian A, Krishnan UM, Sethuraman S. // J. Biomed. Sci.- 2009 – 16- 108- pp.1-11. DOI:10.1186/1423-0127-16-108
150. Baiyan Sui, Evolution of a Mesoporous Bioactive Glass Scaffold Implanted in Rat Femur Evaluated by ⁴⁵Ca labeling, tracing, and histological analysis / Baiyan Sui, Gaoren Zhong, and Jiao Sun // ACS Appl. Mater. Interfaces- 2014 – 6 pp.3528–3535 DOI:10.1021/am4056886
151. Guoming Sun, Functional neovascularization of biodegradable dextran hydrogels with multiple angiogenic growth factors Guoming Sun, Yu-I Shen, Sravanti Kusuma, Karen Fox-Talbot, Charles J. Steenbergen, Sharon

- Gerecht // Biomaterials 32 (2011), pp. 95-106.
DOI:10.1016/j.biomaterials.2010.08.091
152. Takaoka K, Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein./ Takaoka K, Nakahara H, Yoshikawa H, Masuhara K, Ono K.// Clin Orthop Relat Res. - 1988 – Sep(234)- pp.250-4.
153. Solaiman Tarafder, 3D printed tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds: effect of SrO and MgO doping on in vivo osteogenesis in a rat distal femoral defect model / Solaiman Tarafder, Neal M. Davies, Amit Bandyopadhyaya and Susmita Bose // Biomater. Sci.- 2013- 1- pp. 1250-1259. DOI:10.1039/C3BM60132C
154. M. S. Taylor, Six Bioabsorbable Polymers: In Vitro Acute Toxicity of Accumulated Degradation Products / M. S. Taylor, A. U. Daniels, K. P. Andriano, J. Heller, J. Appl// Biomater. – 1994- pp.151-15 DOI:10.1002/jab.770050208
155. Terheyden HD, Mandibular reconstruction with prefabricated vascularized bone grafts using recombinant human osteogenic protein-1: an experimental study in miniature pigs. Part II: transplantation/ Terheyden H¹, Warnke P, Dunsche A, Jepsen S, Brenner W, Palmie S, Toth C, Rueger DR.// Int J Oral Maxillofac Surg. – 2001- Dec- 30(6)- pp.469-78. DOI:10.1054/ijom.2000.0008
156. Thormann U, Differences of bone healing in metaphyseal defect fractures between osteoporotic and physiological bone in rats/ Thormann U, El Khawassna T, Ray S, Duerselen L, Kampschulte M, Lips K, von Dewitz H, Heinemann S, Heiss C, Szalay G, Langheinrich AC, Ignatius A, Schnettler R, Alt V // Injury. – 2014- Mar- 45(3)- pp. 487-93. doi: 10.1016/j.injury.2013.10.033

157. Torroni A: Engineered bone graft and bone flaps for maxillofacial defects: state of art/ Torroni A¹// J Oral Maxillofac Surg.- 2009- May- 67(5)- pp.1121-7. doi: 10.1016/j.joms.2008.11.020.
158. Urbich C, Endothelial progenitor cells - characterization and role in vascular biology. /Urbich C, Dimmeler S. // Circ Res- 2004- 95(4)- pp. 343-353. DOI:10.1161/01.RES.0000137877.89448.78
159. Charles A. Vacanti J, The history of tissue engineering /Charles A. Vacanti J. // Cell. Mol. Med. – 2006- № 3 - pp. 569-576
160. Ch. A. Vacanti, History of Tissue Engineering and A Glimpse Into Its Future / Ch. A. Vacanti //Tissue Engineering- 2006- pp.1137-1142 DOI:10.1089/ten.2006.12.1137
161. Vahabi S, A comparison between the efficacy of Bio-Oss, hydroxyapatite tricalcium phosphate and combination of mesenchymal stem cells in inducing bone regeneration / Vahabi S, Amirizadeh N, Shokrgozar MA, Mofeed R, Mashhadi A, Aghaloo M, Sharifi D, Jabbareh L. // Chang Gung Med J. - 2012 - Jan-Feb- 35(1)- pp.28-37.
162. Valmikinathan CM, Engineered nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering / Valmikinathan CM , Tian J, Wang J, Yu X // Dissertation- 2009- 71(11) – 241 - pp. 422-432.
163. E. Volkmer, Hypoxia in Static and Dynamic 3D Culture Systems for Tissue Engineering of Bone/ E. Volkmer, I. Drosse, S. Otto, A. Stangelmayer, M. Stengele, B. C. Kallukalam, W. Mutschler, M. Schieker //Tissue Eng. -Part A 2008 - pp.1331-1341. DOI:10.1089/ten.tea.2007.0231
164. Wang A, Neural stem cell affinity of chitosan and feasibility of chitosan-based porous conduits as scaffolds for nerve tissue engineering / Wang A, Ao Q, He Q // Tsinghua Sci. Technol. – 2006- 11(4) - pp. 415–420

165. Wang AJ, Porous chitosan tubular scaffolds with knitted outer wall and controllable inner structure for nerve tissue engineering / Wang AJ, Ao Q, Cao WL// J. Biomed. Mater. Res.- 2006- A 79(1)- pp. 36–46. DOI:10.1002/jbm.a.30683
166. Wang DS, Anabolic effects of 1,25- dihydroxyvitamin D3 on osteoblasts are enhanced by vascular endothelial growth factor produced by osteoblasts and by growth factors produced by endothelial cells./ Wang DS, Miura M, Demura H// Endocrinology- 1997 - Vol. 138- No. 7- pp. 2953–2962. DOI:10.1210/endo.138.7.5275
167. Jianglin Wang , Phage Nanofibers Induce Vascularized Osteogenesis in 3D Printed Bone Scaffolds / Jianglin Wang , Mingying Yang , Ye Zhu , Lin Wang , Antoni P. Tomsia ,and Chuanbin Mao// Adv. Mater. - 2014- pp 1-5. DOI:10.1002/adma.201400154
168. Williams, D.F., On the mechanisms of biocompatibility./ Williams, D.F. // Biomaterials -2008- 29- pp. 2941–2953 DOI:10.1016/j.biomaterials.2008.04.023
169. David F. Williams, On the nature of biomaterials/ David F. Williams// Biomaterials - 30(2009)- pp. 5897- 5909 doi:10.1016/j.biomaterials.2009.07.027
170. Wilson SM, Adipose-derived mesenchymal stem cells enhance healing of mandibular defects in the ramus of swine./ Wilson SM, Goldwasser MS, Clark SG, Monaco E, Bionaz M, Hurley WL, et al// J Oral Maxillofac Surg.- 2012-Mar;70(3)- pp.193-203. doi: 10.1016/j.joms.2011.10.029.
171. Wu C., Hypoxia-mimicking mesoporous bioactive glass scaffolds with controllable cobalt ion release for bone tissue engineering. / Wu C¹, Zhou Y, Fan W, Han P, Chang J, Yuen J, Zhang M, Xiao Y. //

- Biomaterials -2012- 33- pp. 2076–2085 doi:
10.1016/j.biomaterials.2011.11.042.
172. Dong-Jin Wu, Enhanced repair of segmental bone defects of rats with *hVEGF-165* gene-modified endothelial progenitor cells seeded in nanohydroxyapatite/ collagen/poly(l-lactic acid) scaffolds / Dong-Jin Wu, Shu-Ling Liu, Ai-Hua Hao, Dong-Sheng Zhou, Jun-Li Liu, Jing-Jie Zhao, Fu-Zhai Cui, Cheng-Jun Zhou, Xiu-Wen Wang, Sheng-Zhong Ma, Cheng Zhang and Chun-Zheng Gao // Journal of Bioactive and Compatible Polymers – 2012- 27(3)- pp. 227–243
173. Shuilin Wu , Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering / Shuilin Wu, Xiangmei Liu, Kelvin W.K. Yeung, Changsheng Liu, Xianjin Yang// Materials Science and Engineering R -2014- 80-pp. 1–36
174. Woodard, J.R., The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity./ Woodard, J.R., Hilldore AJ, Lan SK, Park CJ, Morgan AW, Eurell JA, Clark SG, Wheeler MB, Jamison RD, Wagoner Johnson AJ. // Biomaterials -2007- 28, pp. 45–54 DOI:10.1016/j.biomaterials.2006.08.021
175. Xia P, BMP-2-releasing gelatin microspheres/PLGA scaffolds for bone repairment of X-ray-radiated rabbit radius defects./ Xia P, Wang S, Qi Z, Zhang W, Sun Y.// Artif Cells Nanomed Biotechnol.- 2019- Dec-47(1)- pp.1662-1673. doi: 10.1080/21691401.2019.1594852.
176. Yang S, The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. / Yang S, Leong K-F, Du Z, Chua C-K. //Tissue Eng - 2001-V7-N6-pp.679–689. DOI:10.1089/107632701753337645
177. A W Yasko, The healing of segmental bone defects, induced by recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2). A radiographic, histological, and biomechanical study in rats. / A W Yasko, J

- M Lane, E J Fellingner, V Rosen, J M Wozney, E A Wang // *J Bone Joint Surg Am*- 1992 Jun- 74 (5) - pp.659 -670
178. Toshitaka Yoshii, Local injection of lovastatin in biodegradable polyurethane scaffolds enhances bone regeneration in a critical-sized segmental defect in rat femora / Toshitaka Yoshii, Andrea E. Hafeman, Javier M. Esparza, Atsushi Okawa, Gloria Gutierrez and Scott A. Guelcher // *J Tissue Eng Regen Med* – 2012. doi: 10.1002/term.1547
179. Haiying Yu, Improved tissue-engineered bone regeneration by endothelial cell mediated vascularization / Haiying Yu, Pamela J. VandeVord, Li Mao, Howard W. Matthew, Paul H. Wooley, Shang You Yang // *Biomaterials* 30 (2009), pp. 508–517. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.09.047.
180. Zhi-Yong Zhang, Neo-vascularization and bone formation mediated by fetal mesenchymal stem cell tissue-engineered bone grafts in critical-size femoral defects. / Zhi-Yong Zhang, Swee-Hin Teoh, Mark S.K. Chong, Eddy S.M. Lee, Lay-Geok Tan, Citra N. Mattar, Nicholas M. Fisk, Mahesh Choolani, Jerry Chan // *Biomaterials*. - 2010 Feb - 31(4)- pp.608-20. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.078.
181. Yufeng Zhang, Delivery of PDGF-B and BMP-7 by mesoporous bioglass/silk fibrin scaffolds for the repair of osteoporotic defects / Yufeng Zhang, Ning Cheng, Richard Miron, Bin Shi, Xiangrong Cheng // *Biomaterials*. - 2012 Oct- 33(28) – pp. 6698-708. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.06.021.
182. Wei Zhu, 3D nano/microfabrication techniques and nanobiomaterials for neural tissue regeneration / Zhu W¹, O'Brien C, O'Brien JR, Zhang LG. // *Biomaterial* – 2014- pp.859-875/ DOI:10.2217/nmm.14.36