

Власова Наталья Владимировна

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

14.01.17 - Хирургия

14.01.31 - Пластическая хирургия

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

МОСКВА – 2020

Работа выполнена в федеральном государственном автономном образовательном учреждении высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет)

Научные руководители:

Академик РАН, доктор медицинских наук,
профессор

Решетов Игорь Владимирович

доктор медицинских наук

Зелянин Александр Сергеевич

Официальные оппоненты:

Ануров Михаил Владимирович - доктор медицинских наук, Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования "Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова" Министерства здравоохранения Российской Федерации, кафедра организации биомедицинских исследований, профессор кафедры

Ходорковский Марк Анатольевич - доктор медицинских наук, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Воронежский государственный медицинский университет имени Н.Н. Бурденко» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Институт дополнительного профессионального образования, кафедра хирургических дисциплин, профессор кафедры

Ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр хирургии имени А.В. Вишневского" Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится « 7 » декабря 2020 г. в 14.00 часов на заседании Диссертационного совета ДСУ 208.001.03 при ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119991, Москва, улица Трубецкая дом 8 строение 2

С диссертацией можно ознакомиться в ЦНМБ ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет) по адресу: 119034, Зубовский бульвар 37/1 и на сайте организации <http://www/sechenov.ru>

Автореферат разослан « » _____ 20 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета ДСУ 208.001.03
доктор медицинских наук, профессор

Семиков Василий Иванович

Общая характеристика работы

Актуальность темы

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: аутооттрансплантаты 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 аутооттрансплантаты 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 (Gonzálvez-García M, Carlos M., 2018, Анастасиева, Е.А., 2017, Kotsougiani D.,2017). Недостатком аваскуляризированного 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 аутотрансплантата в виде комплекса тканей позволило успешно применять васкуляризированные костные аутоотрасплататы 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 аутотрансплантатах 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., Трошьева 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 преклинических исследованиях (Bose S, 2019).

Важным направлением повышения эффективности (ТСР) 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 направлений 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- новому 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.

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.

Работа выполнена в рамках гранта РФФИ № 15-29-047961.2.

Внедрение результатов исследования.

Полученные результаты исследований используются в экспериментальных работах по инженерии костной ткани на кафедре онкологии, радиотерапии и пластической хирургии ФГАОУ ВО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет). По основным результатам диссертационной работы получено 3 патента на изобретение: входящий номер № 002261, регистрационный номер № 2016101645 «Способ устранения костного дефекта костно-замещающим материалом»; входящий номер № 002259, регистрационный номер № 2016101643 «Способ изучения костных заменителей»; входящий номер № 002258, регистрационный номер № 2016101642 – «Способ формирования модели костного дефекта».

Личный вклад автора состоит в участии на всех этапах проведения научно- практического исследования, включая участие в хирургическом процессе, в сборе, систематизации и статистической обработке полученных результатов, написании диссертации и автореферата. Автору принадлежит определяющая роль в постановке цели и задач исследования, интерпретации результатов, формулировании и обосновании выводов и практических рекомендаций.

Степень достоверности и апробация работы

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

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 Первого Московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский Университет) 28 февраля 2020 года, протокол № 2.

Основные положения и результаты диссертационного исследования докладывались и обсуждались на следующих конференциях:

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

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

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

Публикации

По теме диссертации опубликовано 10 научных работ, отражающих содержание диссертации, из них 2 статьи опубликована в журнале библиографической базы данных Scopus, а также 4 статьи из перечня ведущих периодических изданий ВАК Минобрнауки РФ, 3 патента РФ на изобретение.

Объем и структура диссертация

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 182 источника, из которых 18 источников – отечественные, 164 – зарубежных авторов. Работа изложена на 139 страницах машинописного текста, иллюстрированного 9 таблицами и 62 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

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.

Исследования проведены на 90 крысах. Эксперимент выполнялся на лучевой кости передней левой лапы животного, на которой была сформирована модель костного дефекта критического размера, составляющего - 5 мм. Все крысы были разделены на три группы: контрольная с критическим дефектом, не заполненным имплантом; группа животных с ТСП скаффолдом; группа с ТСП скаффолдом, обогащенным Эритропоэтином. Каждая из этих групп подразделялась на три подгруппы с контролем на сроках 10 дней (на данном сроке гистологию не проводили), 28 дней и 3 месяца после операции.

В первой группе ($n = 30$) крысам проводилось оперативное моделирование с формированием дефекта без внедрения скаффолда. Во второй группе ($n = 30$) крысам выполнялась операция по созданию критического дефекта. Заполнение дефекта осуществлялось трикальцийфосфатным скаффолдом (без внедрения в скаффолд дополнительных факторов стимуляции). В третьей группе ($n = 30$) крысам проводилась операция по формированию дефекта и последующим заполнением его трикальцийфосфатным скаффолдом, обогащенным дополнительным фактором для стимуляции роста костной ткани - Эритропоэтином.

Изготовление скаффолдов на основе трикальцийфосфата методом трехмерной печати.

Трехмерная печать биокерамических матриц заданной архитектуры проводилась на трехмерном принтере. Для управления системой использовался программируемый AVR-микроконтроллер ATMEGA 2560. Микроконтроллерами шаговых двигателей являлись модули на основе интегральных схем Allegro A4983/A4988. Для достоверной оценки плотности печати в качестве единицы измерения было выбрано оптимальное соотношение количества импульсов сопла (капель) на одну точку (к/т), которое составило 2 к/т.

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±2%)	3000±100 (100±3%)

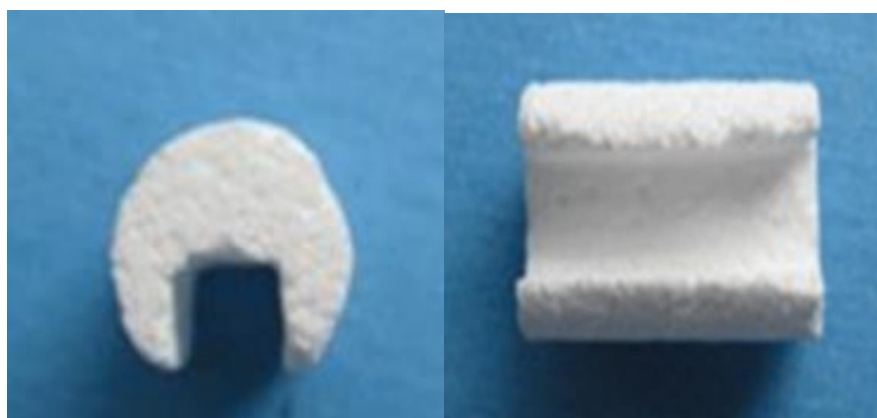


Рисунок 1 Фотография скаффолда

Биологические свойства трикальцийфосфата в аспекте тканевой инженерии

Эксперименты *in vitro* по оценке острой цитотоксичности данных материалов и динамики нарастания на них клеток выполнены 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. Жизнеспособность ФЧ в динамике экспериментов оценивали с помощью МТТ метода - колориметрического теста для оценки метаболической активности клеток. Клеточную линию поддерживали в полной ростовой среде (ПРС) следующего состава: среда ДМЕМ (Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ФУРО, Москва), глютамин (600 мг/л), гентамицин (50 мкг/мл). В экспериментах использовали клетки в логарифмической фазе роста (предконфлюэнтный монослой). Получали суспензии одиночных клеток монослой ФЧ, производили их подсчет и оценку жизнеспособности, окрашивая клеточную суспензию 0,04% раствором трипанового синего и инкубировали: для определения острой цитотоксичности в течение 24 часов, для оценки матриксных свойств биокерамики - 4, 7, 11, 14, 18, 21 сутки с регулярной (дважды в неделю) полной заменой ПРС.

Для определения цитотоксичности материалов рассчитывали пул жизнеспособных клеток (ПЖК), который выжил после 24 часов инкубации с этими материалами.

Исследованные образцы из партии трикальцийфосфатной 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 биосовместимые свойства (в 115% живых клеток от пассажа).

Рентгенологическое исследование

Рентгенографию выполняли на аппарате DM-100 Р на сроках 10 дней, 28 дней и 3 месяца после операции. Фокусное расстояние равнялось 70 см при режиме 60kVp и 30 mA. Время экспозиции составляло 0,05 с. на чем фокусировалось. С помощью рентгенологического исследования анализировали размеры костной мозоли, размер дефекта, прирост костной ткани, нахождение имплантата.

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

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. Проводили морфометрию, которая включала в себя анализ прироста костной ткани и оставшегося материала (скаффолда).

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.

Результаты собственного исследования

В исследованиях на экспериментальной модели с использованием ТСР скаффолда, обогащенного Эритропоэтином, 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 ТСР 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 ТСР скаффолда и ТСР 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.2)

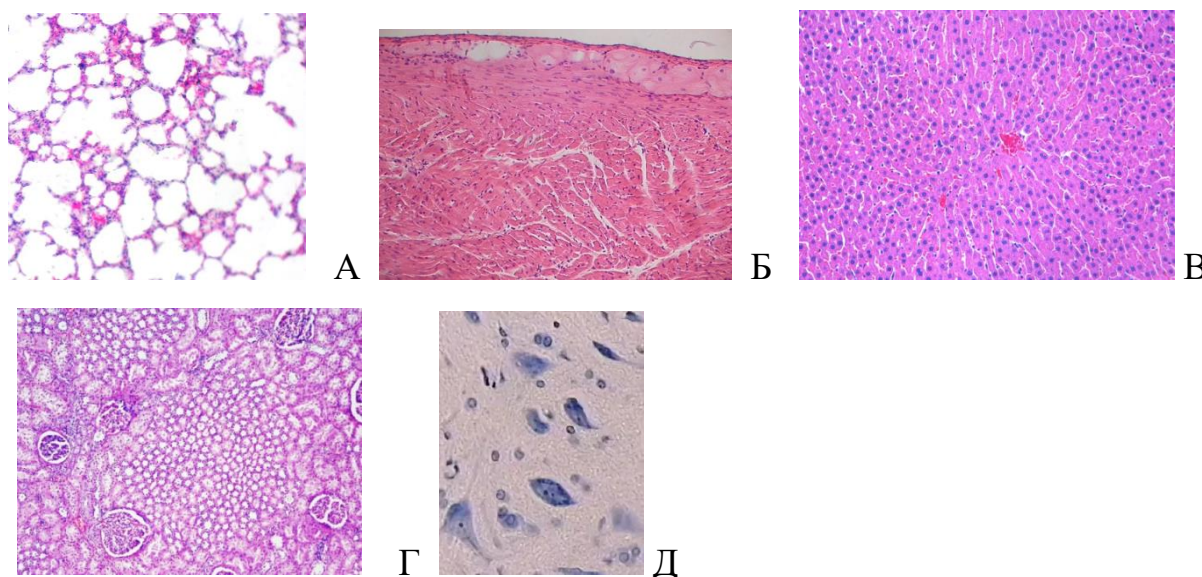


Рисунок 2 Гистологические исследования: а- легких, б- сердца, в- печени, г- почек, д- головного мозга). В этих органах не было обнаружено никаких структурных изменений или повреждений.

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 2, Рис. 2 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.

В течение всего эксперимента в образцах сформированной модели дефекта отмечалось постепенное уменьшение материала и увеличение костной ткани. Но в группе ТСР скаффолд рассасывание материала идет быстрее, чем происходит рост костной ткани. В группе ТСР скаффолд, обогащенный ЕРО, наблюдается одновременное и равномерное уменьшение

материала и образование костной ткани, что является оптимальной моделью для тканевой инженерии. (Таблица 3, Рис. 3 а и б)

Таблица 2.

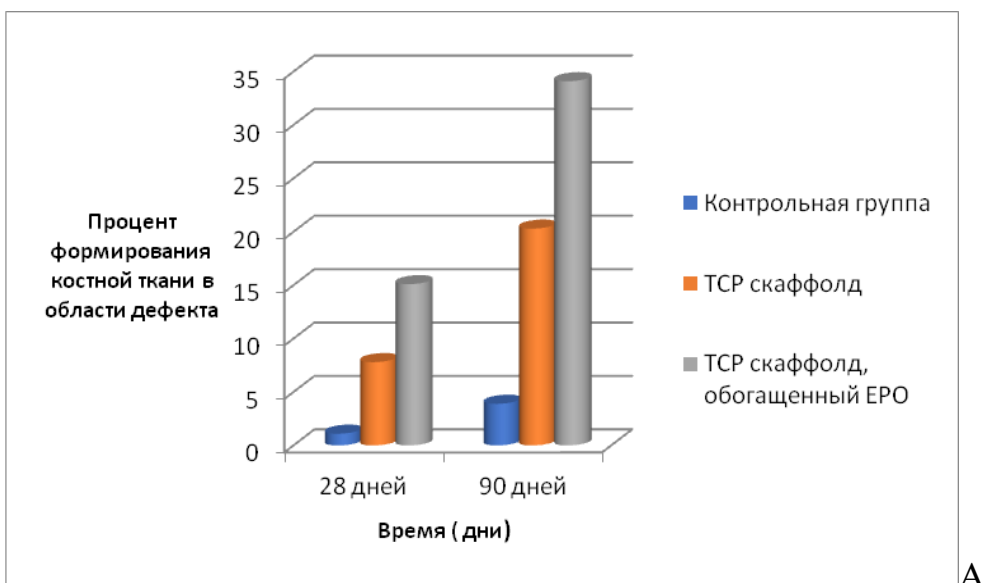
Гистологический анализ формирования костной ткани в области дефекта в контрольной группе, в ТСП скаффолде и в ТСП скаффолде, обогащенном ЕРО, через 28 дней и 90 дней

	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%
p	p< 0.05	p< 0.05	p< 0.05

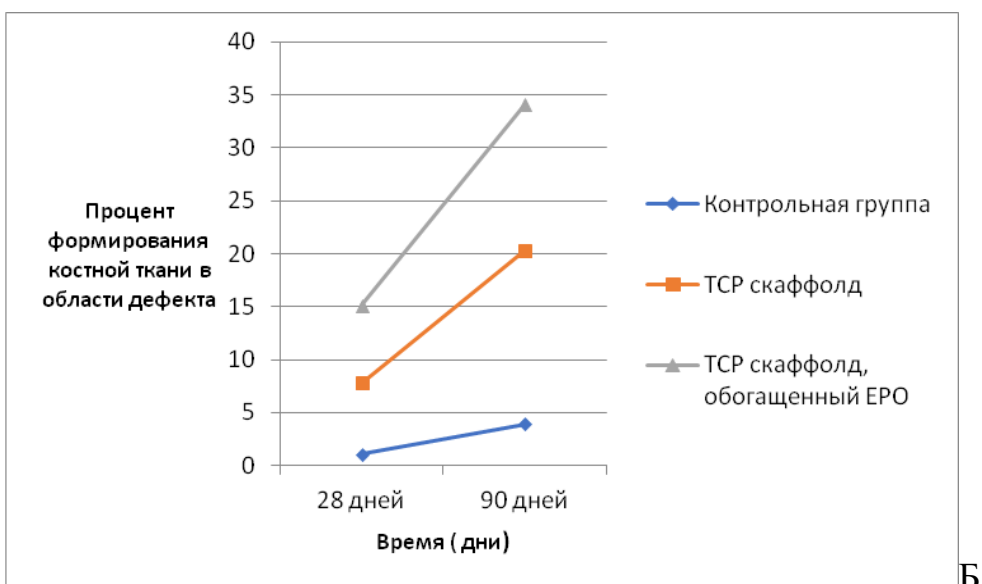
Таблица 3

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

	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%
p	p< 0.05	p< 0.05	p< 0.05



А



Б

Рисунок 3 а и б Гистологический анализ формирования костной ткани в области дефекта в контрольной группе, в TCP скаффолде и в TCP скаффолде, обогащенном EPO, через 28 дней и 90 дней

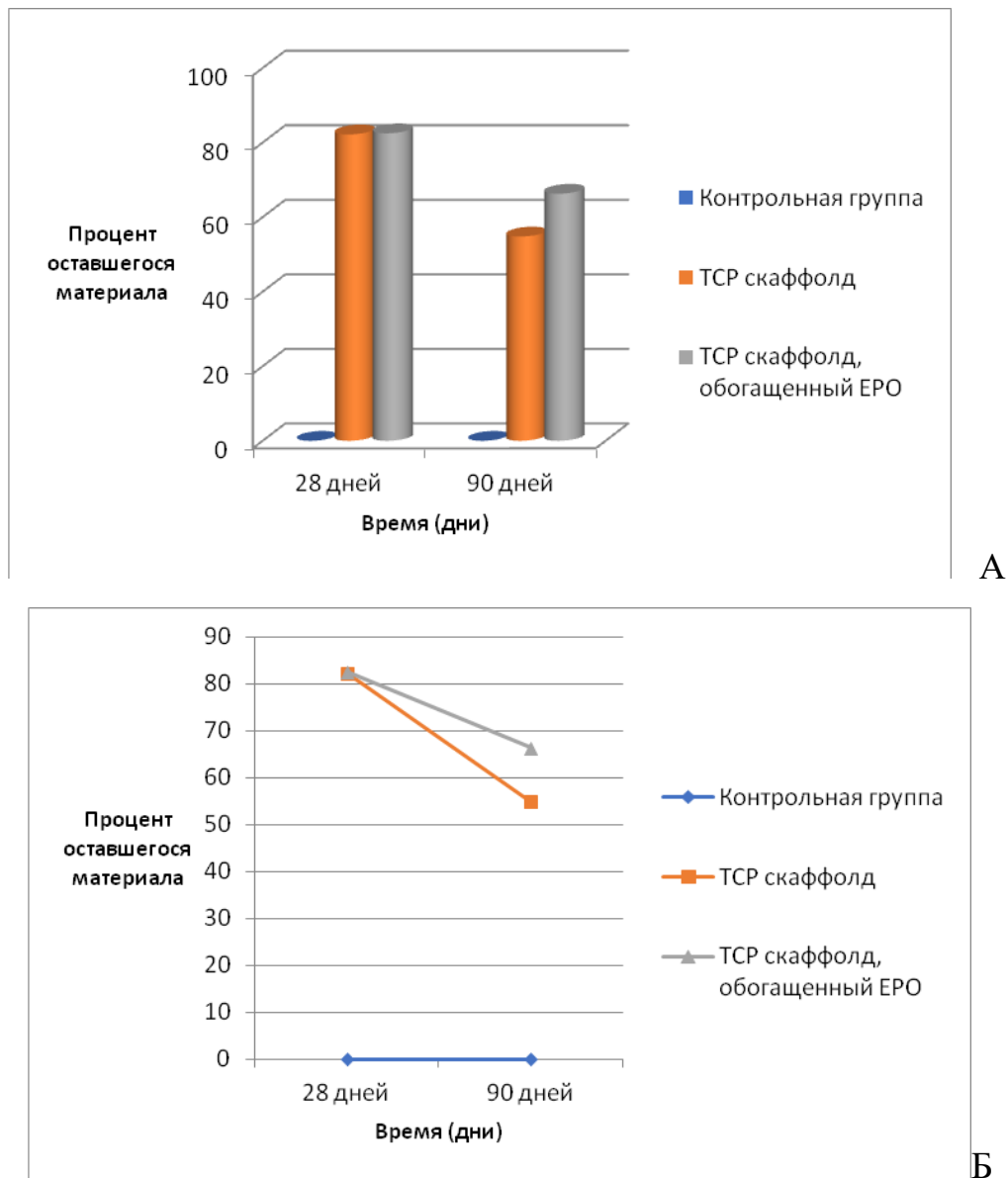


Рисунок 4 а и б Гистологический анализ оставшегося материала в контрольной группе, в TCP скаффолде и в TCP скаффолде, обогащенном ЕРО, через 28 дней и 90 дней

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 TCP скаффолда.

Исследование позволило оценить взаимодействие между ЕРО и хорошо изученным, обладающим заданной пористостью, биосовместимостью TCP скаффолдом 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 группе, ТСР скаффолд, обогащенный Эритропоэтином, наблюдается сохранение имплантата, а через 3 месяца виден значительный уровень роста костной ткани.

Гистологический анализ исследуемого материала имплантатов показал относительно низкую иммуногенность, а также, что он является резорбируемым и не оказывает токсического воздействия. Модификация трехмерной структуры имплантата, позволяет значительно ускорить процессы резорбции и обеспечивает направленный рост мозоли в имплант с более быстрой ее оксификацией. 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.

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.

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 мм.
3. Оригинальная трикальцийфосфатная керамика не токсична для клеток (фибробласты человека), cito 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 (ТСР) 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 работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Харькова Н.В.** Решетов И.В., Зелянин А.С., Филиппов В.В., Сукорцева Н.С., Попов В.К., Комлев В.С., Миронов А.В. Современные биоинженерные конструкции для реконструкции костной ткани // **Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии.** – 2016. - № 1. – С. 50-59. ВАК.

2. **Харькова Н.В.** Решетов И.В., Зелянин А.С., Филиппов В.В., Сукорцева Н.С., Попов В.К., Комлев В.С., Миронов А.В. Пути витализации биоинженерных конструкция для восстановления опорно-двигательного аппарата // **Head and Neck. Голова и шея.** - 2016 . - №1/2 (май). – С. 55- 59. ВАК

3. **Харькова Н.В.,** Решетов И.В., Зелянин А.С., Филиппов В.В., Папов А.В., Комлев С.В., Миронов А.В., Гольдштейн Д.В., Бухарова Т.Б., Васильев А.В., Заволович Ю.Д., Красковский Ф.Я. Влияние мультипотентных стромальных клеток на остеогенез, ангиогенез // VII Всероссийский съезд трансплантологов, материалы съезда. – Москва: 27-29 июня 2016г.

4. Пат. **2633084** Способ изучения костных заменителей /**Харькова Н.В.**, Зелянин А.С., Филиппов В.В., Жидков И.Л., Красковский Ф.Я.// № 2016101643. - заявл. 20.01.2016. - опубл. 11.10.2017. - Бюл.№29

5. Пат. **2621947** Способ формирования модели костного дефекта. /**Харькова Н.В.**, Зелянин А.С., Филиппов В.В.,//№ 2016101642; заявл. 20.01.2016; опубл. 08.06.2017 Бюл.№16

6. Пат.**2620018** Способ устранения костного дефекта костно-замещающим материалом. **Харькова Н.В.**, Зелянин А.С., Филиппов В.В., Решетов И.В. // № 2016101645; заявл. 20.01.2016; опубл. 22.05.2017 Бюл. №15

7. **Харькова Н.В.** Решетов И.В., Зелянин А.С., Филиппов В.В. Опыт реконструкции опорных тканей кисти с использованием аддитивных технологий // **Анналы пластической, реконструктивной и эстетической хирургии.** - 2017. - №1. - С. 37-41. ВАК

8. **Харькова Н.В.** Бацаленко Н.П., Решетов И.В. Прямая невротизация мышцы: механизм, способы стимуляции аксонального роста // **Head and Neck. Голова и шея** Методы оценки результатов. – 2017. - №4. - С. 53-56 ВАК

9. **Kharkova NV**, Reshetov IV, Zelianin AS , Philippov VV, Sergeeva NS, Sviridova IK, and Komlev VS Biological Properties Of @ -3-Calcium Phosphate in The Aspect of Tissue Engineering // Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences. – 2018. - May–June. - 9(3) - P. 218-223 Scopus

10. **Kharkova NV**, Reshetov IV, Zelianin AS, Philippov VV, Sergeeva NS, Sviridova IK, Komlev VS, Andreeva U.U. and Kuznecova O.A. Three-dimensional TCP scaffolds enriched with Erythropoietin for stimulation of vascularization and bone formation // Electronic Journal of General Medicine. - 2019. - Volum 16. - Issue 2, Art. No: em115. Scopus

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