

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования

РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ

Министерство образования и науки РФ

Медицинский институт

Кафедра челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии
(Заведующий кафедрой, член-корр. РАН. д.м.н. профессор Иванов С.Ю.)

на правах рукописи

Стамболиев Иван Атанасов

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
СЛОЖНОГО БИОКОМПОЗИЦИОННОГО МАТЕРИАЛА С
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ ДЛЯ
ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ

(Экспериментальное исследование)

14.01.14 — Стоматология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук

Научный руководитель:

Член-корр. РАН. д.м.н. профессор
Иванов С.Ю.

Москва – 2018

ВВЕДЕНИЕ	4
Актуальность темы исследования	4
Глава I. Обзор Литературы	12
1.1 Регенерация костной ткани.....	12
1.2 Материалы использованные для создания скэффолдов	13
1.3 Костные морфогенетические протеины и фактор роста эндотелия сосудов.	24
1.4 Мезенхимальные стволовые клетки	25
1.5 Клинические исследования костно-инженерных конструкций <i>in vivo</i>	27
Глава 2. Материалы и Методы.....	32
2.1 Методики приготовления различных скаффолдов на основе ПОБ	32
2.1.1 Получение скаффолдов в виде гранул.....	33
2.1.2 Изготовление скаффолдов сложной геометрической формы.....	35
Изготовление костных имплантатов по напечатанным 3D формам	39
Методы насыщения скаффолдов альгината натрия, гидроксиапатита и МСК.....	39
2.2 Методы изучения морфологии и пористости скаффолдов	40
Пористость	41
2.3 Исследование роста и активности щелочной фосфатазы МСК в скаффолдах сложной геометрической формы	41
2.4 Исследование цитотоксичности разработанных скаффолдов <i>in vitro</i>	44
2.5 Исследование биосовместимости <i>in vivo</i>	44
2.5.1 Исследование биосовместимости разработанных скаффолдах на мягких тканей крысь <i>in vivo</i>	45
2.5.2 Исследование биосовместимости разработанных скаффолдах на бедренных костях крыс <i>in vivo</i>	49
2.5.3 Гистологическое исследование	52
2.6 <i>In vivo</i> исследования на критическом костном дефекте черепах крыс.....	52
2.6.1 Методика операции.....	53
2.6.2 Введение флюоресцентных меток для изучения скорости регенерации костных дефектов.....	54
2.6.3 Гистологическое и микроскопическое исследование	55
2.7 Методы гистологического исследования	56
2.7.1 Гистологическая парафиновая проводка.....	56
2.7.2 Гистологическая метилметакрилатовая проводка	56

Глава 3. Результаты исследований	57
3.1 Результаты создания тканеинженерной терапевтической системы	57
3.2 Изучении структуры и морфологии скаффолдов	58
3.3 Исследование роста и дифференцировки МСК на скаффолдах сложной геометрической формы	61
3.4 Терапевтическая Эффективность полученной системы на дефекте костной ткани на лабораторных животных <i>in vivo</i>.	65
3.5 Гистологического исследования по биосовместимости на мягких тканях	71
3.6 Гистологического исследования регенерации костных дефектов бедренных костей крыс	71
3.7 Гистологического исследования регенерации костных дефектов на теменных костей крыс	81
Заключение	93
Выводы	103
Практические рекомендации	105
Список сокращений	106
Список Литературы	107

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Разработка новых биомедицинских методик для регенерации костной ткани остаётся актуальной проблемой в челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии, травматологии, нейрохирургии [Cestari Т.М., 2009; Yang Y., 2011].

В России число больных с патологией челюстно-лицевой области и её сложность, особенно травматического происхождения, в настоящее время растёт. Согласно данным Министерства Здравоохранения Российской Федерации (<https://www.rosminzdrav.ru/ministry/61/22/stranitsa-979/statisticheskie-i-informatsionnye-materialy/statisticheskie-materialy>), количество больных с травматическими повреждениями, отравлениями и некоторыми другими последствиями воздействия, составило в 2015 году – 13 млн. 299 тыс. 691 человека, в 2016 году – 13 млн. 086 тыс. 966 человек.

Проблема травматизма является одной из основных тем научных разработок в челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии [Христофорандо Д.Ю., 2011; Левенец А.А., 2013; Бабкина Т.М., 2013]. Также наблюдается утяжеление характера и вида травм, в частности повышение доли тяжелых переломов верхней челюсти, массивных разрушений средней зоны лица [Дубровин М.С., 2013; Лёвина К.С., 2014].

Численность населения, нуждающегося в стоматологической помощи по поводу полного отсутствия зубов, составляет до 18% населения и эта цифра увеличится к 2020 году до 15 млн. человек [Арутюнов С.Д., 2011; Кицул И.С., 2013].

Восстановление объёма и структуры альвеолярной кости челюстей после потери зубов является не менее актуальной и социально-значимой проблемой. Наиболее современным методом ортопедического лечения при частичной или полной потери зубов, является протезирование с

использованием дентальных имплантатов. Достаточный объем кости не только обеспечивает условия для правильного позиционирования имплантатов, но и способствует в дальнейшем ремоделированию костной ткани под нагрузкой. Качество кости влияет на успех остеоинтеграции и, соответственно, на функциональную состоятельность дентальных имплантатов [Альфарио Ф.Э., 2006].

Потеря зубов всегда сопровождается атрофией костной ткани челюстей. В течение первого года после удаления зубов происходит потеря до 25% костного объема; в последующие 2-3 года теряется до 40-60% объема альвеолярного гребня относительно исходного показателя, приблизительно 2/3 от этой резорбции происходит в первые 3 месяца; далее атрофия костной ткани продолжается и характеризуется уменьшением объема на 0,25 - 0,5% в год [Schropp L., 2003; Fugazzotto, P.A., 2005]. До 30% стоматологических пациентов хирургического профиля при лечении нуждаются в использовании костезамещающих материалов [Иванов С.Ю., 2009; Иванов С.Ю., 2010].

Эти данные свидетельствуют о нарастающем количестве использования костезамещающих материалов во всех областях реконструктивной медицины.

Одной из основных причин проблем, связанных с использованием традиционных методик и изделий для челюстно-лицевой хирургии является недостаточное структурное и функциональное соответствие имплантируемых изделий живой ткани. Живая ткань, в частности, костная ткань, является гибридной динамической системой, состоящей из клеток и внеклеточного материала. В такой системе живые клетки находятся внутри сложно структурированного матрикса внеклеточного вещества, которое они синтезируют и подвергают деструкции, создавая тем самым необходимую микроструктуру всей системы. Костная ткань обладает сложной микроструктурой и составом, сконструирована из композитного

полимерно-неорганического материала [Тюкин Ю.В., 2013], который определяет ее физико-химические свойства, а регенерация костной ткани происходит с контролируемой скоростью и интенсивностью, которые зависят от микроокружения и происходит под действием функциональной нагрузки и под управлением различных эндогенных биологически-активных веществ. В то же время, современные костезамещающие остеопластические материалы в большинстве своём обладают остекондуктивными свойствами, за счёт своих матриксных характеристик, или биоактивными свойствами благодаря стимуляции отдельных стадий остеогенеза [Dubruel P., 2014].

Создание сложных комбинированных остеопластических материалов или костных имплантатов с расширенными структурными и функциональными свойствами стало возможным благодаря развитию регенеративной медицины и инженерных направлений в биологии и медицине: биоинженерии (в частности, тканевой инженерии) и биотехнологии. Тканевая инженерия кости предлагает перспективные подходы для создания костезамещающих материалов и имплантатов с контролируемыми во времени остеоиндуктивными и остеогенными свойствами.

Актуальность развития инженерии костной ткани отражена в научной литературе, так при анализе баз данных по ключевым словам «инженерия костной ткани» (bone engineering) получены следующие данные: e-library.ru – 37 221 источника (статьи, патенты), <http://www.sciencedirect.com> – 84 508, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> – 39 775, Google Scholar – 2 320 000, etc....

Цель исследования:

Разработка технологии изготовления костных имплантатов на основе гибридной полимерной конструкции из поли-3-оксибутирата и альгината

заселенным МСК для направленной костной регенерации с применением метода 3D печати.

Задачи исследования:

1. По данным литературы оценить возможность применения МСК для регенерации костной ткани и выбрать группу синтетических полимерных материалов с остеокондуктивными свойствами, применяемых для культивирования МСК.
2. Разработать методику изготовления полимерных матриц, обладающих остеокондуктивными свойствами и тропных к МСК.
3. Оценить биосовместимость и скорость биодеградации разработанных композиций в эксперименте на животных.
4. Исследовать влияние разработанного материала на регенерацию критических костных дефектов в эксперименте на животных.

Новизна исследования:

Научная новизна проекта состоит в исследовании влияния физико-химических и биологических свойств биоматериала скаффолда, изготовленного на основе композита альгинатов и поли-3-оксиалканоатов, на процессы роста и дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в модельных условиях *in vitro* и на модели дефекта кости *in vivo*. Впервые для экспериментальных исследований дифференцировки МСК, культивируемых на композитных скаффолдах, использована оригинальная технология контролируемого биосинтеза полиоксиалканоатов и альгинатов как инструмента для получения полимеров с заданными физико-химическими и биологическими свойствами, что позволяет регулировать свойства композитного биоматериала скаффолда в широких пределах. Впервые исследовано влияние физико-химических и биологических свойств скаффолдов из ПОА и/или альгинатов на привлечение, рост и

дифференцировку эндогенных МСК. Впервые изучено изменение биомеханических свойств МСК в процессе их дифференцировки при росте на композитных скаффолдах.

Практическое значение:

Результаты проведенной работы могут быть использованы для проведения опытно-технологических работ, направленных на создание технологии производства новых медицинских изделий и материалов и новых медицинских хирургических технологий в челюстно-лицевой хирургии. На основании полученных результатов и внедрение в практику новых разработок ведет к более эффективной защите здоровья населения за счет создания медицинских изделий с новой биофункциональностью и высокой терапевтической эффективностью. Разрабатываемые технологии являются уникальными и патентно-чистыми благодаря высокой наукоемкости, что делает их высоко перспективными в части патентоспособности и их лицензионных возможностей. Создание новых медицинских изделий и комбинированных технологий их производства позволит провести эффективное замещение традиционных медицинских изделий в самых различных областях медицины. Полученные результаты и разработанные методики ориентированы на широкое применение в медицинских учреждениях, использующих высокотехнологические методы лечения, научно-исследовательских организациях и фирмах-производителях современных медицинских изделий и будут конкурентоспособными на мировом рынке.

Положительный социальный эффект, достигаемый на основании получаемых результатов, будет включать:

– создание принципиально новых высокотехнологичных медицинских изделий и материалов для регенеративной медицины и замещение (в т.ч. масштабное импортозамещение) традиционных

медицинских изделий изделиями с новой биофункциональностью;

– повышение конкурентоспособности и модернизация отечественной медицинской промышленности за счет внедрения новых комбинированных технологий получения биоматериалов и медицинских изделий на их основе;

– расширение сырьевой базы медицинской и фармацевтической промышленности за счет использования новых полимерных биоматериалов;

– повышение стандартов контроля качества и системы испытаний медицинских изделий за счет внедрения комплекса новых методов исследования новой биофункциональности медицинских изделий;

– повышение технологического уровня отечественного здравоохранения за счет внедрения в медицинскую практику новых методов регенеративного лечения;

– улучшение качества жизни пациентов с дефектами костной ткани, увеличение продолжительности жизни населения России, защиту его здоровья и безопасности.

Методология и методы исследования

В работе использованы следующие методы: гистологические (специфические методы окраски костной ткани, специальные методы подготовки костных шлифов и приготовление гистологических препаратов); методы флуоресцентной микроскопии, в том числе конфокальная микроскопия, 3D моделирование.

Личный вклад автора в исследование

Автор лично провёл экспериментальное исследование остеопластического материала из поли-3-оксибутирата с гидроксиапатитом заполненного альгинатом натрия и мезенхимальными стволовыми клетками. Принял участие в оценке результатов, полученных в ходе эксперимента. Оперировано 86 животных (крысы), изготовлены и изучены

полученные в экспериментах гистологические препараты.

Положения выносимые на защиту

1. Композитная полимерная конструкция для тканевой инженерии в виде трехмерного матрикса на основе поли-3-оксибутирата, заполненного альгинатным гидрогелем, биосовместима с органами и тканями, обладает преимущественно остеокондуктивными, а при добавлении в конструкцию гидроксиапатита и мезенхимальных стволовых клеток, остеоиндуктивными и остеогенными свойствами.

2. Разработана терапевтическая система для инженерии костной ткани на основе трехмерного матрикса из композита ПОБ/ГА, заполненного альгинатным гидрогелем, способная поддерживать рост МСК и позволяющая восстанавливать костные дефекты сложной формы.

Степень достоверности и апробация работы

Апробация работы проведена на научной конференции кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии ФГАОУ ВО РУДН 22.06.2018 г. Результаты исследования докладывались и обсуждались на конференции «Science for Health» (Москва 2016 г.), на XXXVIII Всероссийской научно-практической конференции «СТОМАТОЛОГИЯ XXI ВЕКА» (Москва, 25-27 сентября 2017 г.), на Всероссийском молодежном форуме с международным участием «Неделя Науки-2017» (Ставрополь, 23-24 ноября 2017г), на Международном форуме «Биотехнология: состояние и перспективы развития. Науки о жизни» (Москва, 2018 г.).

Внедрение результатов работы

1. Разработана и получена трехмерная тканеинженерная конструкция на основе полиоксибутирата, гидроксиапатита и альгината натрия,

наполненная мультипотентными стволовыми клетками для реконструкции костных дефектов сложной формы.

2. Получено одобрение этического комитета на дальнейшее исследование разработанной терапевтической системы для инженерии костной ткани на основе трехмерного матрикса из композита ПОБ/ГА, заполненного альгинатным гидрогелем и МСК в клинической практике.

Публикации

По теме диссертационной работы опубликовано 6 научных статей, из них 3 – в рецензируемых журналах, рекомендуемых ВАК.

Объем и структура работы

Работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов экспериментального исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы. Работа изложена на 127 страниц машинописного текста. В работе использовано 5 таблиц, 61 рисунок (из них 3 микрофотографий, 28 фотографий, 30 гистограмм). Проанализировано 188 источников литературы, в том числе 44 отечественных.

Глава I. Обзор литературы

1.1. Регенерация костной ткани

Физиологический и репаративный остеогенез кости изучен достаточно хорошо. При переломе разрушается костная матрица, повреждаются сосуды и формируется гематома. Цитокины из матрицы и дегрануляция тромбоцитов в области перелома образуют среду биологически активных белков, привлекающих мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (МСК), которые мигрируют в область повреждения. Остеокласты разрушают поврежденные фрагменты кости, стимулируя остеобласты, а также привлекая МСК. Затем МСК пролиферируют и под воздействием внеклеточного матрикса и эндогенной стимуляции цитокинами и ростовыми факторами образуют предшественников остеобластов, хондробластов или фибробластов в зависимости от их локального микроокружения в области перелома. И при благоприятных для регенерации кости или хряща биохимических и биомеханических свойствах среды этого микроокружения МСК претерпевают дифференциацию в остеогенном или хондрогенном направлении [Carter DR., 1998]. Эти клетки продуцируют матрикс с образованием костной и хрящевой ткани, создавая костную мозоль. Минерализованные костные и хрящевые ткани подвергаются эндохондральному окостенению, заполняют дефекта и образуют молодую костную ткань. Костная мозоль в процессе реконструкции приобретает геометрические и физические свойства для противодействия приложенных к ней нагрузок.

Таким образом, клеточными действиями по заживлению кости являются химиоаттракция, миграция, пролиферация и дифференцировка, а основными предшественниками этой клеточной группы, являются МСК.

Естественные процессы регенерации костной ткани достаточны для осуществления своевременного восстановления целостности скелета только

при условии сопоставления костных отломков и обеспечения их внутренней жёсткой фиксации. Однако, в некоторых ситуациях необходимо усиление естественных регенеративных механизмов для восстановления обширных дефектов при нарушении целостности костей. Конкретные ситуации, которые могут потребовать дополнительных мер вмешательства, включают в себя значительную потерю кости из-за травмы, резекции опухоли, метаболических заболеваний, эндопротезирования, снижения регенераторного потенциала человека из-за местного или системного заболевания [Cestari T.M., 2009; Yang Y., 2011].

Применение методов тканевой инженерии позволяет преодолеть указанные неблагоприятные факторы для оптимизации костной регенерации. Наибольший интерес в современной тканевой инженерии кости представляют, во-первых – технологии изготовления скэффолдов (матриц) заданной индивидуальной формы с приближенными механическими свойствами и сроками резорбции, характерными для нативной кости; во-вторых – технологии насыщения скаффолдов факторами роста и морфогенами для придания им свойств биологической активности и остеоиндукции; в третьих – технологии культивирования и использования МСК в составе костных имплантатов, что позволяет придать им свойство остеогенности [Attawia M., 2003].

1.2. Материалы использованные для создания скэффолдов

Разработка и выбор подходящего каркаса является одним из важнейших аспектов тканевой инженерии. Каркасы действуют не только в качестве физической поддержки, но и как искусственная внеклеточная матрица (ИВМ), что способствует присоединению, пролиферации и дифференциации посеянных клеток [Bryant S.J., 2003].

Идеальный каркасный материал должен соответствовать следующим критериям [Hollister S.J., 2005; Hutmacher D.W., 2000; Шумаков В.И., 2003; Song Z., 2015; Lace R., 2015; Jeffries E.M., 2015]:

1. Механической прочностью и эластичностью, достаточной для хирургических манипуляций [Godbole S., 2003; Liebschner M., 2004; Chen G., 2015].

2. Материал и его продукты разложения не должны быть токсичными.

3. Способностью полностью биорезорбировать до продуктов, полностью метаболизирующихся в организме, не оставляя следов после выполнения своих функций [Hutmacher D.W., 2000; Hollister S.J., 2002].

4. Биосовместимостью на биохимическом и клеточном уровнях [Chen R.R., 2003; Hollinger J.O., 2004; Wildemann B., 2007].

5. Скорость резорбции матрикса должна соответствовать скорости восстановления костной ткани в области дефекта [Hollister S.J., 2002].

6. Технологичностью изготовления – он должен легко формоваться в виде пористой структуры, обеспечивающие процессы роста и развития ткани и неоваскуляризации;

7. Возможность стерилизации стандартными способами без изменения их медико-технических свойств.

Материалы каркасов для тканевой инженерии можно условно разделить на природные и синтетические материалы. Синтетические материалы, такие, как полигликолевая кислота, полимолочная кислота (ПМК), керамика и биоактивное стекло, широко используются для изготовления медицинских шовных материалов, эндопротезирования тазобедренного сустава, тела позвонков, стентов и носителей для доставки лекарств [Jeong C.G., 2010; Zhong T., 2012]. Природные полимеры, включая коллаген, фибрин, хитозан, и поли-3-оксиалканоаты (ПОА), являются биологически совместимыми и дают обнадеживающие результаты при

использовании в качестве матриц для тканевой инженерии [Jin R., 2009; Wang C.C., 2011].

Перспективным направлением в изготовления костных матриц (скэффолдов) являются CAD/CAM (от *англ.* Computer-aided design/Computer-aided manufacturing) технологии, в частности, аддитивное производство – послойное наложение материала слой за слоем на основе компьютерной 3D-модели (Solid free form (SFF) fabrication techniques) [Susmita Bose 2013; Sophie C.Cox 2014]. К аддитивному производству относятся: лазерная стереолитография (Stereo Lithography Apparatus; 3D Systems, F&S Stereolithographietechnik GmbH, Институт проблем лазерных и информационных технологий РАН); технология лазерного спекания (SLS, Selective Laser Sintering – лазерное спекание порошковых материалов; 3D Systems, F&S Stereolithographietechnik GmbH, The ExOne Company / Prometal, EOS GmbH); технология послойного наплавления (FDM, Fused Deposition Modeling – послойное наложение расплавленной полимерной нити (Stratasys Inc.); технология струйного моделирования (Ink Jet Modelling, 3D Systems, Objet Geometries Ltd., Solidscape, Inc.); технология склеивания порошков (binding powder by adhesives, Z Corporation).

Природные полимеры:

Природные полимеры (альгинаты, коллаген, желатин, хитозан и др.) помимо того, что они проявляют высокую степень биосовместимости с тканями и клетками организма, являются также высокоэффективными биостимуляторами. Они распадаются на более простые соединения, которые выводятся из организма, либо принимают активное участие в биосинтезе, происходящем на клеточном уровне [Maquet V., 1997; Jing Yao, 2011].

К недостаткам естественных полимеров относят низкую механическую прочность, сложность обработки, часто слишком быстрое время резорбции, невозможность ее контроля. Также имеют склонность

вызывать ксеногенные осложнения, так как большинство этих материалов получены из животных или растительных источников [Veis, A., 1960; Lavik, E., 2004; Malafaya P.B., 2007].

Коллаген – является основным структурным компонентом внеклеточного матрикса (ВКМ), а также основной частью соединительной ткани. Он составляет около 30% общей массы белков у млекопитающих и входит в состав почти каждой ткани, обеспечивая прочность и структурную стабильность [Muschler G.F., 2002; Ricard-Blum S., 2011]. Благодаря содержанию аргинин-глицин-аспартат-последовательностей (RGD последовательностей) в первичной структуре коллаген является биоматериалом, обеспечивающим адгезию клеток [Dawson J., 2011; Chaisri P., 2015]. При введении коллагена в организм он подвергается быстрой резорбции, расщепляясь – стимулирует репаративные процессы [Kretzschmar M., 2015], в частности образование собственного коллагена организма, обладает гемостатическими свойствами. В связи с этим коллаген и его производные широко используются в косметологии и медицине [Blomback B., 1996; Kim B.-S., 2000; Griffith L.G., 2002]. Однако серьёзным недостатком коллагена является неконтролируемое время резорбции (до 1 месяца) в условиях живого организма, что недостаточно для полного восстановления тканей и приводит к образованию рубцовой ткани.

Денатурированная форма коллагена – желатин – также используется для создания твердотельных пористых и гелевых матриксов [Hong S.R., 2000]. Пористые желатиновые губки исследовали в качестве транспорта для зрелых мезенхимальных стволовых клеток в хрящевой регенерирующей терапии [Ponticiello M.S., 2000; Chiu C.H., 2009; Tran A., 2014]. Установлено, что благодаря имплантации микросфер из желатина может поддерживаться рост церебральных нейронов, скелетных миобластов и кардиомиоцитов [Chou K.F., 2014].

Из природных полимеров, относящихся к классу полисахаридов, можно упомянуть альгинаты и хитозан. Данные полимеры по своим структурным характеристикам имеют сходство с такими компонентами ВКМ, как гликозаминогликаны [Peters A., 2003]. Гликозаминогликаны – гидратные составляющие ВКМ, находятся в соединительной ткани в виде комплексов с белками и связаны с ними слабыми и прочными межмолекулярными взаимодействиями.

Хитин – поли- $\beta(1\rightarrow4)$ N-ацетил-D-глюкозамин – Хитозаны производные от хитина, получены при его очистки путем ацетилирования, содержащие в своей структуре больше 50% несвязанного амина.

Высокая биосовместимость, биodeградируемость, низкая токсичность, легкость формирования в виде пленок, мембран, губок, фотосшиваемых гидрогелей и низкая стоимость привлекают интерес к данному материалу в тканевой инженерии [Bhattarai N., 2010; Pradines B., 2015; Abou Taleb M.F., 2015; Grigoriadi K., 2015]. Хитин и его производные используют самостоятельно либо в комбинации с другими материалами как альгинат, желатин и др.

Главным недостатком этого природного полимера является малый уровень прочности, изменение структуры при стерилизации различными методами [Marteco P.R., 2004].

Альгинат – это природный линейный полисахарид, экстрагируемый из бурых морских водорослей. Он состоит из 1-4 связанных остатков α -L-гулуруновой и D-маннуруновой кислот. Блоки полиманнуруновой кислоты придают вязкость альгинатным растворам, блоки гулуруновой кислоты ответственны за специфическое связывание альгинатом двухвалентных ионов металлов. Альгинаты формируют гидрогели, прореагировав с дивалентными катионами, такими как Ca, Ba, Sr, особенно с Mg, используют также тривалентные катионы Al и Fe. Приготовление таких гидрогелей заключается в добавлении альгината натрия в раствор,

содержащий сшивающие катионы [Peters A., 2003; Правдюк А.И., 2010]. На основании этого свойства альгинат получил распространение как инъекционное средство сайт-специфической доставки клеток (хондроциты, стромальные клетки костного мозга) и различных факторов (нейротрофический фактор головного мозга, основной фактор роста фибробластов – ОФРФ и др.) [Peters A., 2003; Правдюк А.И., 2010; Грицай Д.В., 2014; Zhang X.Z., 2015; Тарусин Д.Н., 2016].

Матрикссы на основе альгината использовали для восстановления хрящевой ткани. Альгинат, содержащий Р-трикальций фосфат, способен поддерживать рост и дифференцировку остеогенных клеток *in vitro* [Heywood H.K., 2004]. Тем не менее, к недостаткам альгината относят то, что данный полимер не обладает распознающими биологическими доменами, в отличие, например, от коллагена (адгезивный пептид – RGD), что приводит к плохой адгезии клеток на его поверхность. Также свойства альгинатных гидрогелей могут неконтролируемым образом изменяться вследствие потери гелем ионных сшивок [Kim B.-S., 2000; Fialkov J.A., 2003].

Поли-3-оксиалканоаты (ПОА).

Полимеры β -оксимасляной кислоты – класс полиэфиров, которые представляют собой внутриклеточные резервные соединения в гетероцистах у цианобактерий [Vioque A., 2007]. Благодаря своей высокой биосовместимости, наиболее известный представитель ПОА – поли-3-оксибутират представляет весьма перспективный материал для тканевой инженерии [He Y.X., 2012]. В качестве подтверждения этого тезиса следует представить следующие примеры клеточных культур, которые проявляют удовлетворительный уровень клеточной адгезии, пролиферации и жизнеспособности при контакте с пленками или полимерными клеточными каркасами на основе ПОБ: мышечные и человеческие фибробласты [Yang X., 2002; Ostwald J., 2003; Qu X.H., 2006], мезенхимальные стволовые клетки

[Wollenweber M., 2006], остеобласты костной ткани кролика [Wang Y.W., 2005], остеогенные клетки саркомы человека [Pompe T., 2007], хондроциты суставного хряща кролика [Deng Y., 2003] и клетки гладкой мускулатуры кролика [Qu X.H., Liang J., 2006]. Дополнительно, для пленок ПОБ было показано, что фибробласты, эндотелиальные клетки и изолированные гепатоциты, посеянные на поверхность пленок ПОБ, проявляют высокий уровень клеточной адгезии и роста [Shishatskaya E.I., 2004].

Высокая жизнеспособность и пролиферация макрофагов и фибробластов отмечалась при их культивации в присутствии частиц низкомолекулярного ПОБ [Saad B., 1996]. Однако рост клеток на пленках был относительно мал при клеточной плотности в интервале от 1×10^3 до 2×10^5 [Yang X., 2002]. Вместе с тем, такие характеристики полимера как химический состав, морфология поверхности, поверхностная энергия и гидрофобность полимера оказывают большое влияние на жизнеспособность клеток и их рост [Fischer D., 2003].

Таким образом, ПОБ может быть использован в качестве клеточного каркаса в условиях *in vivo* для контролируемой клеточной пролиферации [Bonartsev A.P., Zharkova I.I., 2016].

В большинстве случаев получение каркасов из ПОБ для клеточной инженерии основано на модификации поверхностных свойств этого биополимера, что достигается, например, методом выщелачивания – вымывания предварительно введенной соли или обработки поверхности ферментами или химическими и физическими методами. Роль поверхности наиболее важна, прежде всего, потому, что ключевым фактором, определяющим использование биополимера в клеточной инженерии, является адгезия клеток, которая в свою очередь определяет клеточную физиологию [Cochran D., 1994; Boyan B.D., 1996]. Наиболее эффективными методами, повышающими клеточную адгезию к ПОБ и рост клеток на поверхности, являются обработка поверхности эстеразами, щелочью или

электрофизической плазменной обработкой. Например, обработка липазой увеличивает число здоровых клеток в 200 раз по сравнению с необработанным образцом ПГБ. Обработка щелочью (NaOH) усиливает выше указанный эффект в 25 раз. И обработка поверхности пленок ПОБ в плазме низкого давления в присутствии аммиака увеличивает рост фибробластов человека и эпителиальных клеток респираторной мукозы, как результат возрастания гидрофильности полимерной поверхности. Таким образом, возрастание гидрофильности поверхности вследствие ферментативной обработки (липаза), щелочной обработки (NaOH) или, как это было сказано выше, плазмой приводит к гидрофилизации поверхности, что упрощает протекание адгезии к таким модифицированным поверхностям. Морфология поверхности ПОБ существенно влияет на адгезию и рост клеток. Причем, различные клетки предпочитают различные по структуре поверхности. Так, остеобласты предпочитают развиваться на грубых шероховатых поверхностях с подходящим размером углублений и пор [Boyan B.D., 1996], тогда как фибробласты предпочитают гладкие поверхности, как и эпителиальные клетки, выбирающие для адгезии гладкие поверхности [Cochran D., 1994]. Подобная чувствительность клеток к размерам пор и шероховатости поверхности, по-видимому, связана с жизнедеятельностью клеток, с необходимостью газового обмена и обмена различными веществами, т.е. с возможностью реализовать некоторые диффузионные и гидродинамические условия подачи питательных веществ для клеток, а также с особенностями адсорбции белков [Deng Y., 2003; Wang Y.W., 2005]. Пленки ПОБ, приводимые в контакт с кровью, не активируют (не смещают) гемостаз системы на клеточном уровне, но могут активировать систему коагуляции и реакцию комплемента, т.е. воздействовать на молекулярном уровне [Бонарцев А.П., 2011].

Поли-3-оксибутират-ко-3-оксигексаноат (ПОБГк) является естественным биологическим полиэфирным материалом, который

принадлежит к семейству ПОА [Wang Y.W., 2004]. Наряду с другими хорошо известными полимерами из группы ПОА, поли-3-оксибутиратом (ПОБ) и поли-3-оксибутират-ко-3-оксивалератом (ПОБВ), ПОБГк имеет хорошую способность к биологическому разложению. ПОБГк обладает хорошей биосовместимостью с различными типами клеток, в том числе с клетками гладкой мускулатуры, фибробластами, полученными из суставных хрящей хондроцитами, остеобластами, а также клетками костного мозга [Wang Y., 2012].

Изделия из ПОА, как правило, биоразлагаемые и термообрабатываемые и поэтому получили широкое применение как в традиционных медицинских приборах, так и в тканевой инженерии. Из-за своей хорошей биосовместимости, ПОА все чаще используются как биоматериалы клеточных каркасов для тканевой инженерии. Ye C. и др. [Ye C., 2009] показали, что трехмерный каркас ПОБ/ПОБГк, засеянный дифференцированными стволовыми клетками человека из жировой ткани, способен производить хрящевые ткани после имплантации в подкожный слой голых мышей. Каркасы из ПОБ/ПОБГк были успешно применены в естественных условиях модели восстановления сухожилия, о чем свидетельствует облегчение восстановления движения сухожилия и полного восстановления функций у крыс-реципиентов [Webb W.R., 2013]. Тем не менее, он весьма хрупкий и разлагается медленно, и оба эти свойства ограничивают его практическое применение. Другой член группы ПОА, ПОБВ может быть получен в виде волокон, которые способствуют реэпителизации. После модификации поверхности, ПОБ и ПОБВ могут способствовать остеоинтеграции [Kose GT., 2003].

Синтетические полимеры:

Полигликолид – представляет собой высоко кристаллический полимер (45-55%) с большим пределом прочности по растяжению [Zhu G.C., 2015]. Гликолид мономер, который используют в реакции полимеризации,

синтезируется путем димеризации гликолевой кислоты. Из-за своего большого предела прочности полигликолид впервые был отмечен как рассасывающийся, синтетический шовный материал [Pihlajamäki H., 2007; Bremer F., 2009; Cartmill B.T., 2014]. Полигликолид также является одним из наиболее прочных синтетических биоматериалов, с модулем упругости при растяжении 12,5 ГПа. По этой причине, полигликолид также был исследован в качестве материала ортопедической фиксации перелома (Biofix). Полигликолид также был использован в качестве покрытия швов для увеличения их биосовместимости и доставки антибиотиков в области закрытой раны [Ford H.R., 2005; Ming X., 2007].

Полилактид подобно гликолиду образуется путем димеризации молочной кислоты. Полилактид представляет собой полимер с 35% кристалличности и модулем Юнга 4.8 ГПа, что делает его значительно более гибким, чем полигликолид. Из-за гидролиза сложного эфира основной цепи, полилактид теряет большую часть своей силы через 6 месяцев в естественных условиях. Подобно полигликолиду, полилактид подвергается в организме биodeградации с образованием в качестве конечного продукта молочной кислоты – компонента клеточного метаболизма. Полилактид выступает в качестве исходного материала для печати в 3D-принтерах [Guo S.Z., 2014]. Имплантаты из полилактида в основном применяются в ортопедии из-за высокого модуля Юнга этого полимера и его способности выдерживать большие механические нагрузки, в частности, при сжатии. Клинически доступные ортопедические имплантаты из полилактида; штифты, винты и другие фиксирующие устройства. Мембраны из полилактида также использовались для усиления заживления критических дефектов кости [Meinig R.P., 2009].

Керамика и биоактивное стекло. Благодаря своим механическим и структурным особенностям керамика играет важную роль в тканевой инженерии кости. Многие керамические материалы не резорбируются,

однако это является положительным свойством в замещении больших костных дефектов, которые заживают более длительно. В этом случае каркас служит основной структурной поддержкой для поврежденных тканей, позволяя интеграцию клеток-хозяев. Некоторые виды керамики, такие как трикальций фосфат и кальций карбонат могут разлагаться в естественных условиях. Их применяют при лечении небольших костных дефектов.

Несмотря на то, что биоактивное стекло уступает керамическим материалам по своей структуре, оно служит важным компонентом в интеграции каркаса. Биоактивное стекло в основном используется в сочетании с керамическими материалами из-за их способности стимулировать сращивание тканей в естественных условиях. Биоактивное стекло может инициировать покрытие его поверхности гидроксикарбонат апатитом. Этот слой структурно похож с минеральным гидроксиапатитом, найденным в кости, и сращивание между материалами позволяет каркас интегрироваться в костной ткани [Rezwan K., 2006; Попков А.В., 2014].

Большое количество приспособлений из керамики и биоактивного стекла было одобрено для клинического использования. Керамические тазобедренные опоры и приспособления для фиксации обычно используются в эндопротезировании тазобедренного сустава [Jeffers J.R., 2012; Кирилова И.А., 2013]. Имплантаты из корундовой керамики были использованы у больных с посттравматическими дефектами и деформациями лицевого скелета [Чернегов В.В., 2005]. Керамические смеси также используются в позвоночных замещениях у пациентов с опухолью спинного мозга [Hosono N., 1995]. Биоактивное стекло и полиуретан также применяется при замещениях тела позвонка [Schulte M., 2000].

1.3. Костные морфогенетические протеины и фактор роста эндотелия сосудов

В настоящее время известно несколько протеиновых молекул, способных существенным образом моделировать процесс костной регенерации. Например, такие факторы, как семейство КМП – костные морфогенетические протеины (англ. BMP, bone morphogenetic protein) и ФРЭС – фактор роста эндотелия сосудов (англ. VEGF, Vascular endothelial growth factor).

В современной научной литературе КМП (костные морфогенетические протеины) представляют собой одно из суперсемейств ТРФ- β и имеют не маловажную роль в регулировании роста, дифференцирования и апоптоза различных типов клеток включая остеобласты, хондробласты, нервные и эпителиальные клетки [Reddi A.H., 2000; Dimitriou R., 2005; Devescovi V., 2008; Hollinger J.O., 2008]. В настоящее время идентифицировано 20 гомо- или гетеродимерных структурно связанных протеинов, которые очень схожи друг с другом и имеются у многих животных включая человека [Wozney J.M., 1999]. Наиболее изученными и нашедшими применение в клинической практике являются BMP 2 и 7 [Devescovi V., 2008; Hustedt J.W., 2013; Carlos del Rosario, 2015]

Интенсивно проводимые исследования по изучению молекулярных и клеточных механизмов костеобразования показывают, что в процессе остеогенеза в месте перелома принимают участие различные ростовые факторы (цитокины), которые влияют друг на друга, взаимодействуют с несколькими типами клеток и, возможно, КМП являются среди них наиболее важными и активными остеоиндукторами. КМП синтезируются клетками костной ткани и одновременно их активизируют. Источник КМП – остеопрогениторные и мезенхимные стволовые клетки, а также остеобласты и хондроциты [Wozney J.M., 1998]. Участвуя в хондрогенезе и

остеогенезе, КМП стимулируют костеобразование в последовательности, подобной эмбриональному морфогенезу [Reddi A.H.,1998].

VEGF-A (Vascular endothelial growth factor) – фактор роста эндотелия сосудов, представляет собой группу гомодимеризованных гликопротеидов молекулярной массы 34-42 кДа. Является ведущим фактором ангиогенеза и блокирует апоптоз эндотелиальных клеток кровеносных сосудов, индуцирует протеиназы, ремоделирующие межклеточное вещество, усиливает проницаемость сосудов и вазодилатацию, ингибирует антиген-презентирующие дендритные клетки. VEGF продуцируется в хондроцитах, эндотелии, макрофагах, фибробластах, остеобластах и гладких мышечных клетках. Это практически единственный из известных ростовых факторов, сохраняющий активность на всех стадиях сращения перелома, начиная с первых часов в межотломковой гематоме и заканчивая спустя несколько месяцев на этапе ремоделирования костной мозоли [Simpson 2006]. VEGF чрезвычайно важен для формирования сосудистой системы в ходе эмбриогенеза и в раннем постнатальном периоде, однако у взрослых его физиологическая активность ограничена регенерацией тканей.

Ранее нами было показано, что введение ФРЭС в состав костезамещающих материалов, может существенным образом модулировать процессы репаративной регенерации костной ткани [Мураев А.А., Иванов С.Ю., 2012; Кобозев М.И. и др., 2016].

Таким образом, можно заключить что КМП и ФРЭС будут играть немаловажную роль в развитии тканевой инженерии кости при восстановление больших костных дефектов.

1.4. Мезенхимальные стволовые клетки

МСК являются мультипотентными клетками, способными дифференцироваться в остеобласты, хондроциты, адипоциты, теноциты и

миобласты [Jaiswal N., 1997; Pittenger M.F., 1999; Zuk P.A., 2001; Jiang Y., 2002; Baksh D., 2004; Adam R., 2011; Фатхуднов Т.Х., 2013; Лызииков А.Н. 2015; F. Gao, 2016]. Их источником является либо камбиальный слой надкостницы, либо костный мозг, хотя другие источники, такие как: мышцы, жир и синовиальная оболочка предусматривают ограниченный источник [Bruder S.P., 1997; Kadiyala S., 1997; Yoo J.U., 1998; Yoo J.U., Barthel T.S., 1998; F. Gao., 2016]. Самыми богатыми источниками МСК у молодых людей являются костный мозг [Jiang Y., 2002] и надкостница. Несмотря на постоянное уменьшение их количества с возрастом, все же они могут быть обнаружены и у пожилых людей [Bruder S.P., 1997; Pittenger M.F., 1999]. Наибольшее число МСК и их биологическая активность находится в метафизе кости и в области толстой, васкуляризированной надкостницы, что способствует более надежному восстановлению в этих местах [Bruder S.P., 1997; Айзенштадт А.А., 2015]. В изучении МСК в основном использовали аспираты, извлекаемые из костного мозга [Bruder S.P., 1994]. Методики изоляции, как правило, основаны на адгезивных свойствах МСК. Центрифугирование в градиенте плотности используется первоначально для разделения ядродержащих МСК. По мере того как клетки культивируют, МСК прилипают к поверхности колбы [Bruder S.P., Kraus K.H., 1998; Dominici M., 2006]. Неадгезивные клетки удаляются с питательной средой при ее изменении, концентрируя МСК. Клетки многократно пассируют, расширяя популяцию клеток, пока не выработается чистая культура. Различными методами подтверждено, что выделенные клетки обладают остеогенным [Cooper L.F., 2001]. Клетки приобретают шестигранную остеобластную форму и существует переходная индукция щелочной фосфатазной деятельности [Bruder S.P., Jaiswal N., 1998]. Клетки экспрессируют белок мРНК костной матрицы и отложение гидроксиапатита – минерализаторов внеклеточной матрицы, подтверждая, что выделенные клетки становятся клетками, образующими

кость. Исследования в естественных условиях, которые документируют остеобластный потенциал МСК [Dominici M., 2006], включают загрузку выделенных и культивированных клеток в пористые керамические носители и имплантирование их в подкожные ткани живого животного. Васкуляризированная кость формируется в пределах границ керамических имплантатов, а не в бесклеточных имплантатах. Модификация этих методов показала, что МСК можно также заставить дифференцироваться в хондрогенном направлении [Barry F., 2001; Barry F.P., 2003; Barry F.P., 2003 (Mesenchymal stem cell therapy in joint disease)]. Кроме того, клетки могут быть помечены, и были показаны для того, чтобы прижилась имплантация и для поддержания их мультилинейного потенциала [Barry F.P., 2004; Quintavalla J., 2002]. После криоконсервации МСК жизнеспособны и сохраняют потенциал мультипотентности.

Таким образом, МСК могут быть эффективно изолированы, культивированы, сохранены и имплантированы.

1.5. Клинические исследования костно-инженерных конструкций *in vivo*

Тканевую инженерию костной ткани в челюстно-лицевой хирургии следует разделить на три направления: реконструктивная хирургия нижней челюсти, хирургическое лечение врожденных костных аномалий челюстно-лицевой области и регенерация костной ткани при дентальной имплантации.

Sylvain Catros, Fabien Guillemot et al. (2010) провели сбор всей научной литературы по клиническому применению тканевой инженерии в челюстно-лицевой хирургии за период с 1999 по 2010 г., по выше указанным направлениям. Было найдено 48 международных статей, из них 19 по реконструкции нижней челюсти, 6 по хирургическому лечению

врожденных костных аномалий и 23 по костной регенерации при дентальной имплантации [Sylvain Catros, 2010].

Подробный анализ рассмотренных статей представлен в виде 3 таблиц:

Реконструкция костной ткани на верхней и нижней челюсти

Тип и кол-во науч. иссл.	Причина и локализация костного дефекта	Каркас	Клетки	Фактор роста	Созревания	Результат
1	Амелобластома нижней челюсти	Dacron-polyuréthane	Губчатая кость	Человеческий BMP	In vivo 4 месеца (facia dorsal)	Эффект временный, 16 месяцев
1	Амелобластома нижней челюсти	Allograft (Dynagraft®)	—	Человеческий BMP	—	Положительный, на 9 мес.(биопсия)
13	Между амелобластомой и огнестрельной травмой	Allograft (Dynagraft®)	—	BMP – бычий	—	2 успешных случаев из 6
1	Ортогнатная бимаксильная хирургия	PRP	-	rhBMP-7	-	Успешный на 1 месяц (биопсия)
1	Епидермоидная карцинома нижней челюсти	Титаневая клетка CAD, блоком Bio-oss и гранулов Bio-oss	Костный мозг	rhBMP-7	In vivo 7 недель в области m. Latissimus dorsi	Ранний Успех , наблюдения 13 мес.
3	Остеомиелит , цементирующий фибром нижней челюсти	Костный аутографт	Аутографтные клетки	Индукцированная мембрана	In vivo 3-4 мес. с метилметакрилатовым цементом	Успех в 4 кл. Случаев
1	Епидермоидная карцинома нижней челюсти	Гидроксипатит (Pro Osteon®: corail)	—	rhBMP-7	In vivo 6,5 месеца m. Pectoralis major	Неуспешный , на 6 месеца , потеря слизистой-надкостничного лоскута
22	Киста нижней челюсти	Говежди колаген (Osteovit)	МСК	—	In vitro 3-4 дней	Материал использования сопоставим с аутоблоком
1	Епидермоидная карцинома нижней челюсти	Аутолого фибрин (PRP)	МСК	—	—	Успешный после distraction, установка 6 имплантатов
1	Осифицирующий фибром нижней челюсти	Колагеновая губка (Helistat) + HA-TCP	—	rhBMP-2	—	Успешный после distraction (36 мес.)
5	Остеомиелит, фолликулярная киста	Колагеновая губка, +/- allogrefe	+/- костный мозг	rhBMP-2	—	Успешных 3 случая от 5
10	Амелобластом и остеомиелит нижней челюсти	Деминерализованная кость аутографт (Dynagraft)	—	rhBMP-7	—	Успешный, наблюдения 1 год – 100%
14	Злокачественное заболевание, остеомиелит нижней челюсти	Колагеновая губка	—	rhBMP-2	—	Успешный в 100% случаев
4	Остеонекроз нижней челюсти после лучевой терапии	HA-βTCP	Костный мозг	Индукцированная мембрана	In vivo 8 недель с метилметакрилатовым цементом	Успешных 2 случая от 4
1	Периимплантит нижней челюсти	Polycaprolactone	—	rhBMP-2	—	Успешный (установка имплантатов через 6 мес)
1	Кератокиста нижней челюсти	βTCP	ADSC-ob	rhBMP-2	In vivo 8 мес , m. Rectus abdominus major	Успешный , установка имплантатов через 4 мес
1	Остеомиелит нижней челюсти	βTCP	Костный мозг	—	In vivo 6 мес., m. Latissimus dorsi	Успешный, наблюдения 12 мес.
1	Гемангиом нижней челюсти	Лиофилизированная кость + фибриновый клей	hBMSC-OB	—	—	Успешный, 3 интервенции + distraction

ADSC-OB : Мезенхимальные клетки жировой ткани с остеобластным фенотипом; **HA-TCP** : Гидроксипатит – трикальцийфосфат ; **PRP** – обогащенная тромбоцитарная плазма; **hBMSC-OB**: мезенхимальные стволовые клетки остеобластного фенотипа; **rhBMP-2** : костный морфогенный протеин(КМП) 2; **rhBMP-7** : костный морфогенный протеин (КМП) 7

Реконструкция врожденных аномалии ЧЛО

Тип и кол-во науч. иссл.	Причина и локализация костного дефекта	Каркас	Клетки	Фактор роста	Созревания	Результат
1	Реконструкция на врожденной комплексной расщелиной + гипоплазия нижней челюсти	Колагеновая губка (Helistat)	-	rhBMP-2	-	Наблюдение до 4,5 г, затем проведено частичная реконструкция
50	Реконструкция расщелин без использования аутографта	Колагеновая губка	-	rhBMP-2	-	Успешный в 49 от 50 случаев , +/- дистракция
1	Алвео-палатинальная расщелина	PRP	HBMSC-ob	-	-	На 79% регенерация дефекта
1	Реконструкция на алвеопалатинальной расщелине	Колагеновая губка (Osteovit)	HBMSC	-	От 3 до 4 дня	Полное закрытие расщелины, рентген контроль на 18 мес
2	Реконструкция алвеопалатинальной расщелине	Деминерализированная кость + сульфат кальция (Osteoset)	HBMSC-ob	-	-	Закрытие на 66% и 75% от дефекта

HBMSC: человеческие костные стволовые клетки; **HBMSC-OB**: человеческие костные стволовые клетки остеобластным фенотипом; **PRP** – обогащенная тромбоцитарная плазма; **rhBMP-2** : констный морфогенный белок (КМП) 2

Таблица № 3

Реконструкция костной ткани при дентальной имплантации

Тип и кол-во науч. иссл.	Причина и локализация костного дефекта	Каркас	Клетки	Фактор роста	Созревания	Результат
12	Надежность и эффективность ВМР при периимплантарной НКР	Колагеновая губка	-	rhBMP-2	-	Не наблюдается отрицательный локальный или генерализованный эффект ВМР. 100% выживаемость имплантатов при 3г. наблюдение
11 (34 имплантов)	Цель исследования оценить интерес в добавлении ВМР при НКР в дентальной имплантации	Bio-oss	-	rhBMP-2	-	Увеличения объема новообразованной костной ткани при уменьшении времени с участием rhBMP-2
2	Цель синус лифтинг (СЛ) при помощи тканевой инженерии костной ткани (ТИ)	Мембрана Ethisorb® + fibrine (Tissucoll®)	PDSC-OB	-	In vitro 1 недель	Успешно (рентген + биопсия). Установка имплантатов на 4 мес.
27	Цель синус лифтинг при помощи тканевой инженерии костной ткани	Membrane Ethisorb®	PDSC-OB	-	In Vitro 1 недель	Успех при 18 случаях , остальные 9 неудовлетворительный успех
3	Периимплантарная НКР с применением ТИ	аутофибрин (PRP)	HBMSC-OB	-	-	Успешно при 3 случаях (10 имплантатов)
48)	Оценить необходимой концентрации на rh BMP – 2 при СЛ	Колагеновая губка (Helistat®)	-	rhBMP-2	-	80% успех , идеальная концентрация на rhBMP-2 1,5мг/мл
1	Горизонтальное увеличение объема кости на нижней челюсти	PLGA (Vicryl); Protocole Bioseed®	PDSC-OB	-	In vitro 5 недель	Успешно , установка 2 имплантата через 6 мес.
13	СЛ	Ксенограф (биоос), колагеновая губка (lyostypt)	Hbmсc-ob PDSC-OB	-	In vitro от 7 до 40 дней	По сравнению аутокости у ТИ результат лучше

20	Сравнение резорбции костной ткани между аутоблоком и ТИ при СЛ	PLGA (Ethicon) + fibrine (Tissucol®)	HBMSC-OB -	-	In vitro 6-9 дней	29% резорбции – аутографта При ТИ – 90%
6	Цель ТИ при СЛ	HA-TCP	HBMSC-OB	-	-	93% успеваемости имплантатов при ТИ
12	ТИ при синус лифтинг	Fibrine autologue (PRP)	HBMSC-OB	-	-	Увеличение объема костной ткани на 8 мм с 100%-ой выживаемости имплантатов (n=41 в сроках от 2 до 6г)
8	Горизонтальные и Вертикальные дефектов костной ткани альвеолярной кости	Кальций фосфат (Biomatrix®)	ADSC-OB	-	In vitro 7 дней	Успех при 8 случаях , установка имплантатов через 3 мес.
6	HKP	HA (Proosteon®)	HBMSC-OB	-	In vitro 7 дней	1 случай на костной неоформации при применении ТИ от 6 пациентов
30	HKP в пародонтологии	HA + Fibrine (PRP)	PDSC-OB	-	-	У ТИ лучший результат (восстановление костных дефектов + восстановление прикрепленной десны
3	СЛ	Fibrine (Tissucoll®) PLGA (Ethicon)	PDSC-OB	-	In vitro 21 дней	100% успеваемость , зрелая кость через 6 мес
14	Сл + онлей пластики	Fibrine autologue (PRP)	HBMSC-OB	-		100% успеваемости
7	Регенерация костной ткани у альвеолы 38,48 зуба	Колагеновая губка	DPC-OB (18-28)	-	-	Полное закрытие дефекта при ТИ. Результаты лучше чем при контрольной группе
22	Сл	Ксенопластика Bio-oss	HBMSC-OB	-	-	Удовлетворительный для установки имплантатов ,но наблюдается резорбция на 6 и 12 мес.
5	СЛ сравнение между Biosoral® и IT	PLGA (Ethisorb®)	HBMSC-OB	-	In vitro 6-9 дней	Успех у обоe , но лучшая плотность кости при ГА
160	Сл – аутографт или ТИ	Колагеновая губка	-	rh-BMP-2		Успех одинаковый
35	Сл (аутографт против ТИ)	PLGA (Ethicon®)	PDSC-OB	-	8 недель	Применение аутокости эффективнее чем ТИ
31	Сл , сравнение между GDF5-βTCP и βTCP аутографт	βTCP	-	GDF5	-	Успех одинаковый
1	Онлей пластики без применения аутокости	TCP (Vitoss®)	-	rhBMP-2	-	Успешно , установка 6 имплантатов через 4 мес.

ADSC-OB : Мезенхимальные клетки жировой ткани с остеобластным фенотипом; **HA-TCP** : Гидроксиапатит – трикальцийфосфат ; **PRP** – обогащенная тромбоцитарная плазма; **HBMSC-OB**: мезенхимальные стволовые клетки остеобластного фенотипа; **rhBMP-2** : констный морфогенный протеин(КМП) 2; **rhBMP-7** : констный морфогенный протеин (КМП) 7

Огромное количество различных по своей структуре (природных, синтетических и 3D напечатанных) скэффолдов были использованы в реконструктивной челюстно-лицевой хирургии с целью улучшения процессов регенерации кости. Для восстановления этих структур хирургу необходимо обладать знаниями о различных биоматериалах, технологиях их изготовления, а также об их преимуществах и недостатках.

Глава 2. Материалы и Методы

Исследование включало три этапа:

I. На первом этапе проведена разработка полимерного каркаса из поли-3-оксибутирата (ПОБ), исследование его *in vitro* на цитотоксичность и *in vivo* на биосовместимость на мягких тканях бедренной кости крыс.

II. На втором этапе были отработаны новые методики операции и проведено экспериментальное исследование критических дефектов на черепах крыс с применением полимерного каркаса из ПОБ.

III. В итоге на третьем этапе проведено экспериментальное исследование критических дефектов на черепах крыс с применением костного каркаса из ПОБ совместно с МСК.

2.1. Методики приготовления различных скаффолдов на основе ПОБ

Для экспериментальных *in vitro* и *in vivo* исследований были разработаны матриксы, имеющие различное строение и состав.

В работе были использованы следующие материалы:

- Поли-3-оксибутират (ПОБ, $M = 147$ кДа), полученный биотехнологическим путем и предоставленный лабораторией биохимии азотфиксации микроорганизмов Института биохимии им. А.Н. Баха РАН ФИЦ Биотехнологии РАН [Bonartsev A.P., Zharkova I.I., 2017];

- Альгинат натрия (Сигма-Алдрич, Германия);
- Трихлорметан (EKOS-1, Russia);
- Карбонат аммония (Химмед, Россия);
- Сахароза (Химмед, Россия);
- Гидроксипатит (Сигма-Алдрич, Германия);
- Стрэнг из полилактида для 3D печати методом послойного наплавления (температура плавления $200-255^{\circ}\text{C}$, плотность $1,2-1,08 \text{ кг/м}^2$), (Московский завод FDPlast, Россия);

- МСК выделения из костного мозга 3-х дневных крысят;
- Рометар (Bioveta, Чехия);
- Золетил 100 (Virbac, Франция);
- Доксициклин (Бинергия ЗАО, Россия);
- Тетрациклин (Биохимик ОАО, Россия);
- Ализариновый красный (ХимМедСервис, Россия);
- Цефазолин (Sandoz, Австрия).

2.1.1. Получение скаффолдов в виде гранул

Частицы получали при помощи метода «водная фаза/масляная фаза/водная фаза», с последующим вымыванием. В качестве пороборазователя был выбран водный раствор карбоната аммония, ввиду его способности к термическому разложению до аммиака и углекислого газа.

Был приготовлен хлороформенный раствор полимера ПОБ, молекулярной массы 300 кДа и концентрации 120 мг/мл. Для преодоления ограничения по вязкости, раствор с концентрацией 50 мг/мл был упарен на ротаторном испарителе. Также был приготовлен 5% (w/v) раствор карбоната аммония в воде.

Для того, чтобы загрузка частиц наногидроксиапатитом произошла равномерно, и избежать агломерации наночастиц, навеска 120 мг нГА была диспергирована в 1 мл чистого хлороформа, с последующим размешиванием на высокоскоростном гомогенизаторе IKA T 25 digital Ultra-Turrax. Далее к суспензии были добавлены 4 мл хлороформенного раствора ПОБ и производилось перемешивание 5 минут при 15 000 об/мин. По истечении времени в смесь были добавлены 2,2 мл 5% раствора $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$. После еще 15 минут гомогенизации, полученный сложный коллоид по каплям добавляли в 1% (w/v) раствор ПВС при постоянном перемешивании на верхнеприводной мешалке R2R 2021 (Heidolph,

Германия) при скорости 450 об/мин. После полного испарения хлороформа частицы были отделены от эмульгатора (ПВС) путем осаждения центрифугированием и промывки дистиллированной водой. Для полного выхода порообразователя, структуры были подвергнуты кипячению.

Готовые частицы проверяли на наличие следов карбоната аммония путем помещения в раствор фенолфталеина. По отсутствию розового окрашивания был сделан вывод о полном удалении порообразователя. Далее частицы лиофилизировали, используя Freeze dryer ALPHA 1-2 LDplus (Германия), предварительно заморозив их в жидком азоте (рис.1).

Разработка методики получения частиц на основе ПОБ была проведена совместно с группой в.н.с. Бонарцева А.П. кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

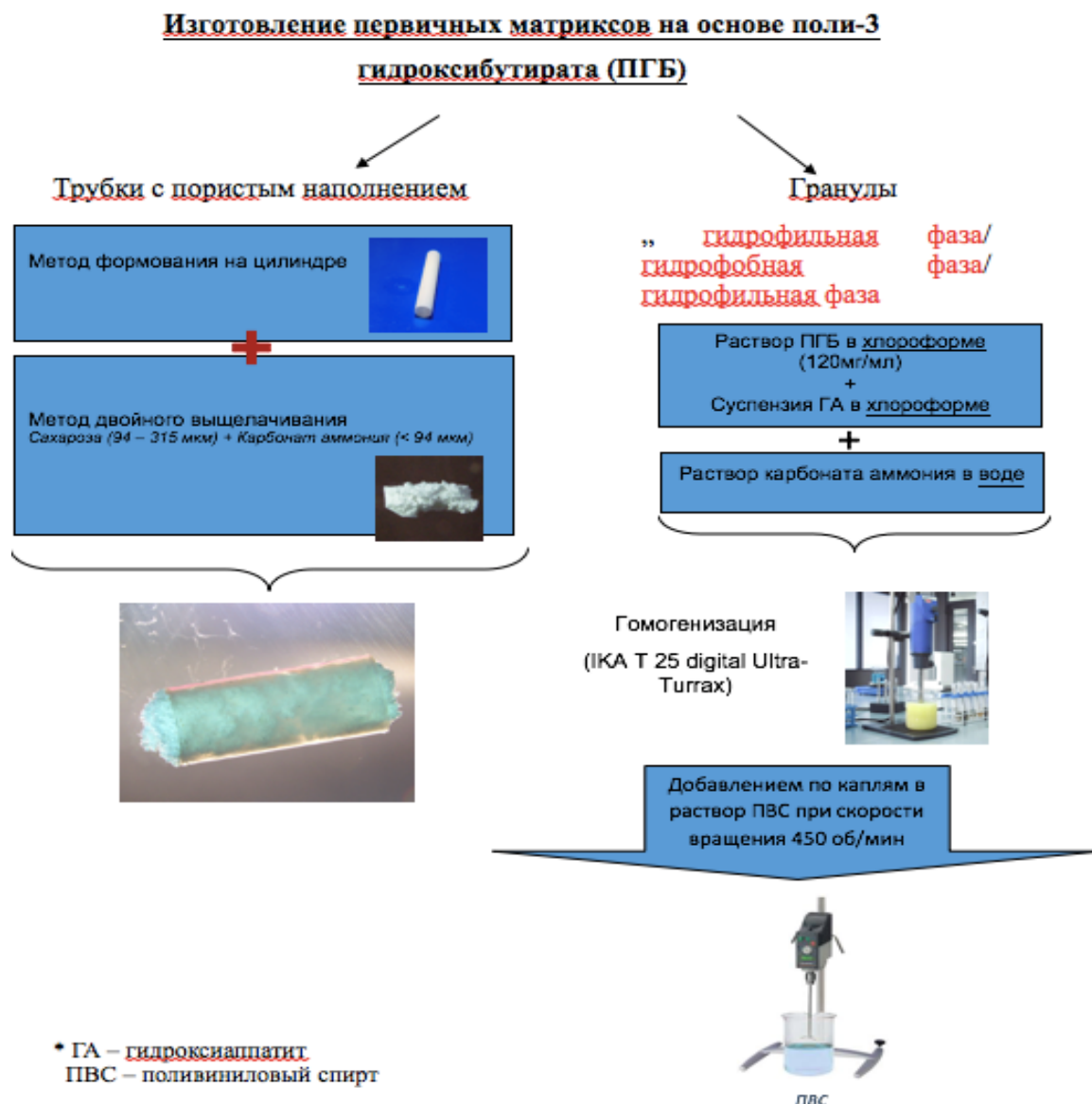


Рисунок 1. Изготовление первичных матриц на основе поли-3-гидроксibuтирата (ПГБ)

2.1.2. Изготовление скаффолдов сложной геометрической формы

Для получения пористых матриц была использована новая модификация широко применяемого для изготовления матриц в тканевой инженерии метода выщелачивания [Nam Y.S., 2000; Park J.K., 2002; Hou Q., 2003; Nublat C. et al., 2006] – метод двойного выщелачивания [Kundu et al., 2013] с использованием в качестве порообразующих агентов карбоната аммония и сахарозы. Размер кристаллов карбоната аммония составлял 40-94 мкм, сахарозы – 94-315 мкм. Нормирование размеров

производилось с помощью лабораторных сит с ячейками 40, 94 и 315 мкм (U1-ESL (Крафт, Россия). На первой стадии метода двойного выщелачивания происходит термическое разложение карбоната аммония ($(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$) – при этом образуются поры меньшего диаметра. После чего, на второй стадии, воду меняли несколько раз до полного вымывания сахарозы [Жаркова И.И., 2017] (рис.2).

Раствор ПОБ 65 мг/мл в трихлорметане добавляли к смеси карбоната аммония и сахарозы (1:3) до состояния смеси близкому к жидкой пасте. Этой смесью заполняли форму, изготовленную ранее. После испарения растворителя, форму погружали в горячую воду ($\sim 90^\circ\text{C}$). После прекращения газообразования полученные матриксы удаляли из формы и промывали дистиллированной водой 5 x 30 мин на шейкере.

Для получения матриксов, содержащих гидроксиапатит (ГА), раствор ПОБ 65 мг/мл в трихлорметане диспергировали совместно с ГА в концентрации 6,5 мкг/мл, т.е. соотношение ГА к ПОБ составляло 1:10. Такое соотношение было выбрано на основании литературных данных и проведенных ранее исследований, как наименее токсичное для МСК и при этом придающая матриксам остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства [Blaker J.J., 2005; Huang Y.X., 2008].

Перед имплантацией матриксы заполняли 1% раствором альгината натрия до полного насыщения и затем помещали в 5% раствор CaCl_2 до полного гелирования альгината в матриксе, после чего полученный гибридный матрикс промывали ФБС.

Подобная гибридная конструкция из матрикса на основе ПОБ, заполненного альгинатом натрия была разработана с учетом ранее полученных данных [Kundu et al., 2013; Gazhva J.V., Bonartsev A.P., 2014]. Нами было показано, что барьерная мембрана из ПОБ и паста для заполнения костных дефектов на основе микросфер из ПОБ в альгинатном геле являются эффективными для регенерации костной ткани. Кроме того,

альгинат может быть использован в дальнейшем в качестве средства для инкапсулирования и введения в матрикс мезенхимальных стволовых клеток и других клеток, используемых для стимуляции регенерации костной и хрящевой тканей [Bai H.Y., 2010].

Разработка методики получения пористых матриксов на основе ПОБ и его композита с ГА была проведена совместно с группой в.н.с. Бонарцева А.П. кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

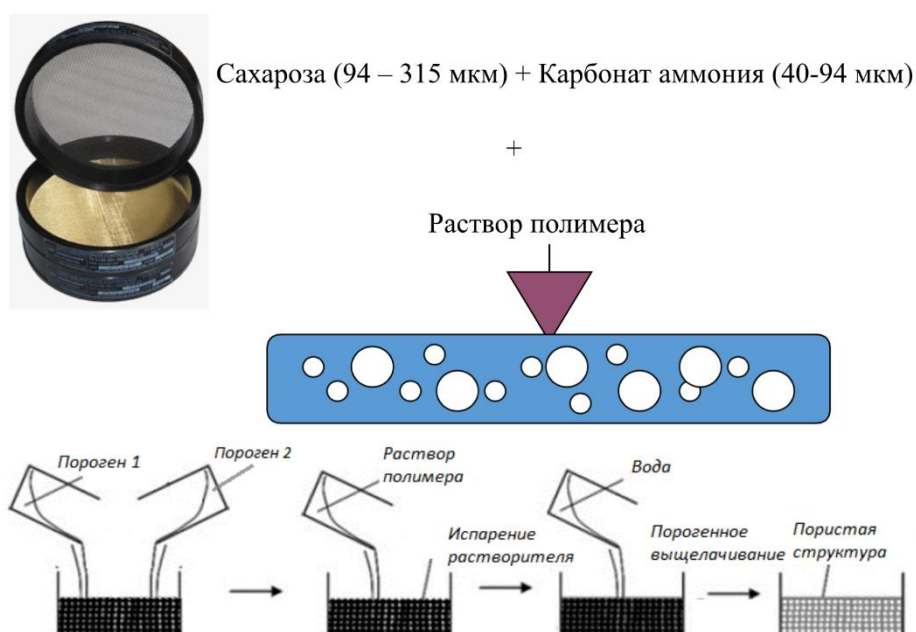


Рисунок 2. Метод двойного выщелачивания

Компьютерное моделирование и 3D печать форм для изготовления костных имплантатов при критических дефектах на черепе крыс

Проведена конусно-лучевая компьютерная томография головы крысы. Сканирование проводили в конусно-лучевом томографе Point 3D Combi 500 C, (Pointnix, Ю. Корея) на отработанном режиме 63kVp/7mA. На основе DICOM файлов проведена реформация 3D модели черепа используя программное обеспечение Horos Project-Free DICOM Medical Image Viewer (рис. 3). По центру теменной кости смоделирован костный дефект

цилиндрической формы диаметром 8 мм с высотой 1,5 мм (рис. 4). Модель имплантата смоделирована таким образом, чтобы не только заполнять костный дефект, но также перекрывать его снаружи. Это позволяло защитить твёрдую мозговую оболочку и головной мозг от внешнего воздействия (рис. 5). Так как дальнейшее исследование проводилось на крысах одной массы и размера, все модели были изготовлены одного размера. На рисунке 6 представлена 3D модель формы для изготовления КИ. [Мураев А.А., Бонарцев А.П., Стамболиев И.А., 2016].

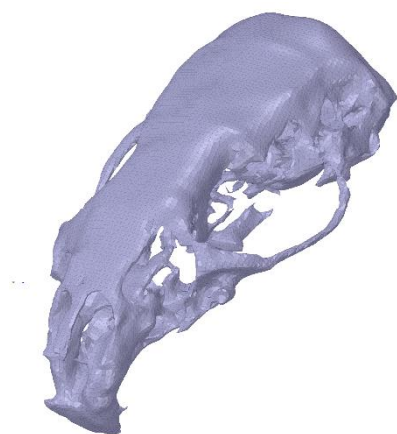


Рисунок 3. 3D череп крысы, реформированный из DICOM файлов

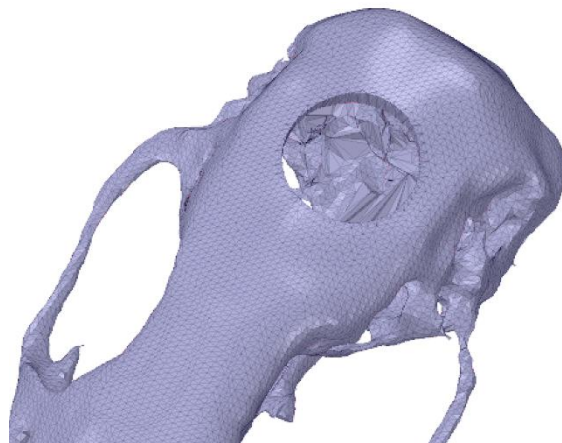


Рисунок 4. Модель черепа крысы с искусственно смоделированным дефектом

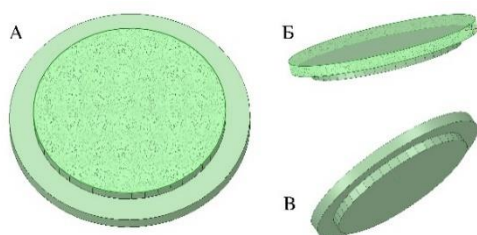


Рисунок 5. 3D модель костного имплантата. А – вид снизу, Б – вид с боку и сверху, В – вид сбоку и снизу. Верхняя часть имплантата, будет перекрывать костный дефект защищая головной мозг

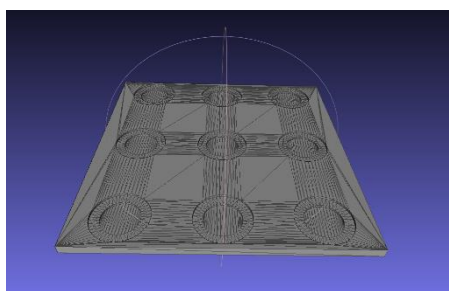


Рисунок 6. 3D модель формы для отливки имплантатов

Изготовление костных имплантатов по напечатанным 3D формам

С использованием 3D принтера PrusaMendel v2, работающего по принципу послойного наплавления, были изготовлены формы из полилактида. Так как в процессе изготовления КИ применяется органический растворитель хлороформ, растворяющий полилактид, формы были изолированы алюминиевой фольгой (рис.7, 8) [Мураев А.А., Бонарцев А.П., Стамболиев И.А., 2016].

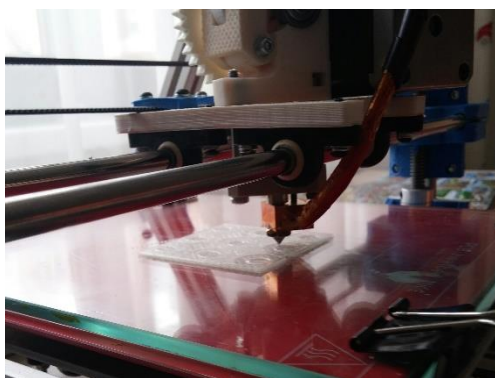


Рисунок 7. Форма для отливки имплантатов на этапе печати



Рисунок 8. Форма для отливки имплантатов

Такой процесс отливки имплантатов легко масштабируется для изготовления имплантатов размером не менее 5х5х5 мм.

Методы насыщения скаффолдов альгината натрия, гидроксиапатита и МСК

Матрицы на основе ПОБ обладают только остеокондуктивными свойствами [Chen GQ., 2005]. Для придания остеоиндуктивных свойств получали композитные матрицы с ГА и заполняли их альгинатным гидрогелем, содержащим МСК [Чеснокова Д.В., Стамболиев И.А., 2018; Стамболиев И.А., 2018].

Метод введения МСК в матрицы заключался в том, что на стадии заполнения пористых скэффолдов из ПОБ/ГА/АЛГ, в скэффолды вводили МСК, предварительно помещенные в 1% альгинат натрия. Порошок

альгината натрия (Сигма-Алдрич, Германия), стерилизованный в спирте и под ультрафиолетом, растворяли 6 часов при перемешивании на магнитной мешалке в физиологическом растворе в концентрации 1,5% в стерильных условиях в ламинарном шкафу. Затем готовили суспензию АЛГ с клетками в концентрации 200 000 клеток в 1 мл суспензии (итоговая концентрация альгината составила 1,0%). Полученной суспензией с помощью автоматической пипетки пропитывали полученные на первой стадии матриксы ПОБ/ГА по 100 мкл (20 000 клеток) суспензии на один скаффолд. После пропитки удаляли лишний альгинат и заливали стерильным 50 мМ раствором CaCl_2 для полимеризации альгинатного гидрогеля, содержащего клетки. После инкубации в течение 3 минут в хлориде кальция, матриксы промывали в фосфатном буфере и затем помещали в среду для дальнейшего эксперимента.

2.2. Методы изучения морфологии и пористости скаффолдов

Исследование внешнего вида, морфологии и структуры полученных матриксов проводилось с использованием сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) на JSM-6380LA (Япония) рис.9. Перед исследованием образцы закрепляли на алюминиевых столиках и напыляли золотом 15 мин при 15 мА (IB-3, Giko Engineering Co., Япония).



Рисунок 9. Сканирующий электронный микроскоп JSM-6380LA

Пористость

Определение пористости матриксов проводилось с помощью метода определения пористости через массу. Сначала была измерена масса пористого матрикса (Acculab AL-64, USA), после чего измерены его диаметр и высота, и посчитан теоритический объем монолитного матрикса, а через плотность полимера (1,25 г/см³) была рассчитана масса сплошного непористого образца. Пористость рассчитывалась по формуле:

$$П = (1 - m_1 / m_2) \times 100\%,$$

где m_1 – измеренная масса пористого образца, а m_2 – расчетная масса монолитного образца без пор, объем которого совпадает с пористым образцом.

Наличие открытых пор проверяли методом окраски чернилами. Образец матрикса обмакивали в чернила, высушивали, после чего разрезали.

2.3. Исследование роста и активности щелочной фосфатазы МСК в скаффолдах сложной геометрической формы

Для исследования роста МСК на биополимерных композитах и биокомпозитных скаффолдах *in vitro* были использованы МСК крыс. МСК были выделены из костного мозга 3-х дневных крысят. Клетки культивировали в среде ДМЕМ в стандартных условиях согласно диссертации Жаркова 2017 [Maniatopoulos C, 1988; Bonartsev A.P., Zharkova I.I., 2017]. Все эксперименты были проведены согласно правилам гуманного обращения с лабораторными животными по ГОСТ ISO 10993-1-2011.

Для исследования роста МСК *in vitro* в матриксах, не содержащих АЛГ, образцы сначала помещали в лунки 96-луночного планшета и клеточную суспензию наносили сверху на каждый образец из расчета 2000 тысяч клеток в лунку. Для исследования роста МСК в матриксах, содержащих АЛГ, сначала готовили суспензию АЛГ соответствующей

концентрации с клетками в концентрации 200 000 клеток в 1 мл суспензии. Полученной суспензией с помощью автоматической пипетки пропитывали матриксы на основе ПОБ и ПОБ/ГА из расчета 2000 клеток на один образец скаффолда для исследования. После пропитки удаляли лишний альгинат и заливали стерильным 50 мМ раствором CaCl_2 для полимеризации альгинатного гидрогеля, содержащего клетки. После инкубации в течение 3 минут в хлориде кальция, матриксы промывали в фосфатном буфере и затем помещали в среду для дальнейшего эксперимента. Учет пролиферации клеток исследовали с помощью метода ХТТ с использованием набора реактивов (Сигма-Алдрич, Германия). Данная методика основана на том, что живые клетки преобразуют соли тетразолия в окрашенные соединения формазана. Её биохимические механизмы основаны на активности митохондриальных ферментов, которые инактивируются вскоре после гибели клетки. Этот подход оказался очень эффективным при оценке жизнеспособности клеток. Планшеты инкубировали 24, 72, и 120 ч. В случае теста на цитотоксичность и 24, 72, 120 и 168 ч в случае теста на биосовместимость. По прошествии экспериментального времени в случае теста на цитотоксичность, матриксы извлекали из лунок, а затем добавляли по 50 мкл смеси ХТТ в каждую лунку; в случае же теста на биосовместимость матриксы переносили в лунки с 100 мкл свежей среды и инкубировали при 37 °C в течение 2,5 ч, после чего матриксы извлекали из лунок и растворяли SDS (натриевая соль лаурилсерной кислоты). Измерения проводили на планшетном спектрофотометре Zenyth 3100 Microplate Multimode Detector (Anthos Labtec Instruments GmbH, Австрия) [Bonartsev A.P., Zharkova I.I., 2016; Kuznetsova E.S., Zharkova I.I., 2016; Bonartsev A.P., Zharkova I.I., 2017].

Оценивали относительное количество прикрепленных клеток на первые сутки, а также увеличение их количества к 5 или 7 суткам. Численно выражали через число клеточных делений, рассчитанных по формуле:

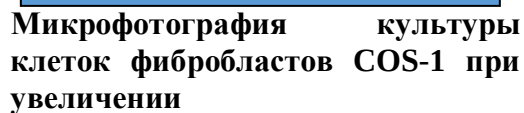
$$n = \lg N - \lg N_0 / \lg 2,$$

где n - число клеточных делений, N - конечное количество клеток, N_0 -изначальное количество. Количество клеток определяли по калибровочной кривой. Затем рассчитывали относительное количество клеток в процентах от начального их количества, добавленного к образцу скаффолда [Bonartsev A.P., Zharkova I.I., 2017].

Были получены предварительные результаты исследования спонтанной дифференцировки МСК в матриксах *in vitro* с использованием теста на активность щелочной фосфатазы культивируемых на биокомпозитных скаффолдах МСК.

Для определения щелочной фосфатазы использовали образцы матриксов ПОБ/АЛГ и ПОБ/ГА/АЛГ. Изначально МСК засевали из расчета 20000 клеток на образец и анализировали на 7, 14 и 21 сутки. Образцы, с растущими на них клетками, промывали 2 раза в ФБС (фосфатно-буферной системе), затем помещались в лизирующий буфер (250мМ NaCl, 0,1% Triton X-100, 50мМ Hepes, pH 7,5) и подвергали 3-м циклам замораживания-оттаивания. Затем образцы центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин и измеряли показатели щелочной фосфатазы. В 96-луночную плашку добавляли 100 мкл пробы и 50 мкл буфера (15 мМ н-нитрофенилфосфат (Sigma, США), 2 мМ Mg Cl, pH=10), инкубировали в термостате 60 минут и измеряли оптическую плотность при 405 нм. Отрицательным контролем служил лизирующий буфер, также в качестве контроля использовали клетки, растущие на культуральном пластике [Bonartsev A.P., Zharkova I.I., 2017].

Анализ роста МСК на матриксах, цитотоксичность матриксов и активность щелочной фосфатазы МСК были исследованы совместно с группой в.н.с. Бонарцева А.П. кафедры биоинженерии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.



2.5. Исследование биосовместимости *in vivo*

Животные закуплены за 3 недели до операции (18 штук), чтобы они адаптировались к предстоящему эксперименту. Животные содержались в виварии ЦНИИЛ НижГМА при 15 часовом световом дне при температуре +22С. Пища и вода в постоянном доступе. К моменту эксперимента масса животных составляла 400 мг. Содержание и работа с лабораторными животными отвечала требованиям ГОСТ Р ИСО 10999.2.-2006, и проведена в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных

животных, используемых для экспериментальных или иных научных целей (Страсбург 1986).

2.5.1. Исследование биосовместимости разработанных скаффолдах на мягких тканях крысы *in vivo*

Для эксперимента были подготовлены 2 вида скаффолдов: в виде полого цилиндра, заполненного гранулами и в виде гранул (рис. 10,11).



Рисунок 10. Полый цилиндр (трубочка) из полиоксибутирата заполненная гранулами скаффолда



Рисунок 11. Скаффолд из полиоксибутирата в виде гранул

Операции проводили под внутримышечным наркозом раствором Zoletil 100 (Virbac, Франция, раствор). Zoletil – один из самых безопасных препаратов для неингаляционной анестезии грызунов. Он практически не угнетает дыхание и слабо влияет на сердечную деятельность, лишь в некоторых случаях, вызывая кратковременную тахикардию. Безопасность этого препарата подтверждается тем, что летальная доза (ЛД) Zoletil для грызунов составляет 200 мг/кг, в то время, как доза для общей анестезии обычно не превышает 50 мг/кг. Таким образом, видно, что летальная доза в 4 раза превышает среднюю терапевтическую дозу. Zoletil имеет очень большую терапевтическую широту и, в зависимости от дозы, вызывает состояние от слабой иммобилизации до глубокого наркотического сна. Недостатками этого препарата является отсутствие прямого антидота, хотя есть данные о применении Флумазенила для инактивации одного из компонентов – Золазепам. Однако, действие Золазепам гораздо продолжительнее действия его антагониста и для реверсии требуются

многократные повторные введения. Препарат является приоритетным для иммобилизации и краткосрочной анестезии грызунов. Использование минимальной дозы обеспечивает иммобилизацию достаточную для проведения физикального обследования, взятия крови, рентгенографии и мелких болезненных манипуляций. При этом у животного сохранены корнеальный, лингвальный и глотательный рефлекс. Реверсия наблюдается через 40-80 минут после введения препарата. Для достижения общей анестезии используют более высокие дозировки. При наступлении хирургической стадии наркоза наблюдают отсутствие лингвального, гортанного и pedalного рефлекса. Корнеальный рефлекс, как правило, сохранен. Применение Zoletil в этом случае позволяет проводить полостные операции, остеосинтез и т.д. В случае если операция длится более 40-60 минут, может потребоваться повторное введение в среднем составляющее 20% от первоначальной дозы. Реверсия обычно наступает через 1-3 часа после последнего введения [Анестезия грызунов Гершов С.О. ВК «Кобра» 2004].

После наступления анестезии произведен поперечный разрез кожи в паравerteбральной области на спине крысы длиной 5 мм. Хирургическими ножницами отсепарована и мобилизована кожа, далее подкожно введен скэффольд из ПОБ (слева скаффолд в виде цилиндра, а справа в виде гранул). Затем рана ушита наглухо.

После проведенных операций всем животным был введен антибиотик цефазолин (Sandoz, Австрия 25мг/кг) для профилактики инфекционно-воспалительного послеоперационного процесса (рис. 12,13).



12А. Эпиляция волос в области имплантации



12Б. Разрез длиной 5мм



12В. Отслаивание и мобилизация кожи

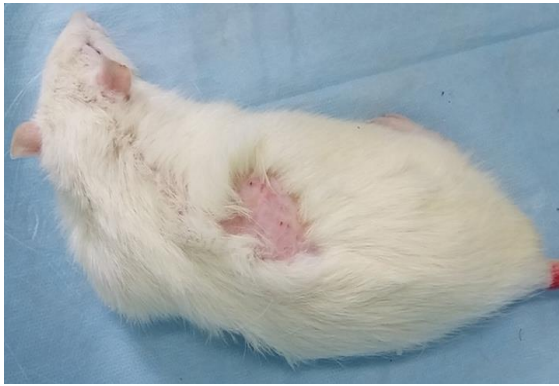


12Г. Имплантация матрикса из ПОБ в виде трубочки



12Д. Наложение швов

Рисунок (12). Схема этапов операции.



13А. Эпиляция волос в области имплантации



13Б. Разрез длиной 5мм



13В. Отслаивание и мобилизация кожи



13Г. Имплантация матрикса из ПОБ в виде гранул



13Д. Наложение швов

Рисунок (13). Схема этапов операции.

Срок наблюдения составил соответственно протоколу 7, 14, 21 и 28 дней. В указанные сроки проводили вывели животных, биопсию исследуемой области. Материал отправляли на гистологическое исследование.

2.5.2. Исследование биосовместимости разработанных скаффолдах на бедренных костях крыс *in vivo*

Исследование проводили на (28 штук) самцах крыс линии Wistar массой тела 400г. Эксперимент соответствовал рекомендациям локального биоэтического комитета и этического комитета РУДН (Протокол № 10 заседания биоэтической комиссии НижГМА от 07.04.2013; Протокол №8 от 18.02.2016г),, при его постановке руководствовались «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и № 701 от 24.07.1978 г. и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г.

Под внутривенным наркозом «Золетил 100» (Virbac, Франция) в дозировке 125 мкг/кг крысам производили разрез кожи в бедренной области справа над бедренной костью длиной 1 см. Затем последовательно тупым и острым путём отсеивали мягкие ткани и скелетировали бедренную кость. Далее с использованием физиодеспенсера с помощью фиссурного бора формировали дефект кости длиной 5мм, шириной 2мм. Далее в сформированный дефект вносили губчатый матрикс ПОВ из цилиндра. Сам цилиндр из ПОВ разрезали вдоль, раскрывали и оборачивали им область имплантации, создавая таким образом тканевой барьер. Рану послойно ушивали (рис.14). Аналогично был произведен разрез и с левой стороны, где ввели матрикс ПОВ в виде гранул (рис.15).



14А. Эпиляция волос в области имплантации



14Б. Разрез длиной 1см



14В. Создание дефекта бедренной кости



14Г. Имплантация матрикса из ПОБ в виде трубочки



14Д. Наложение швов

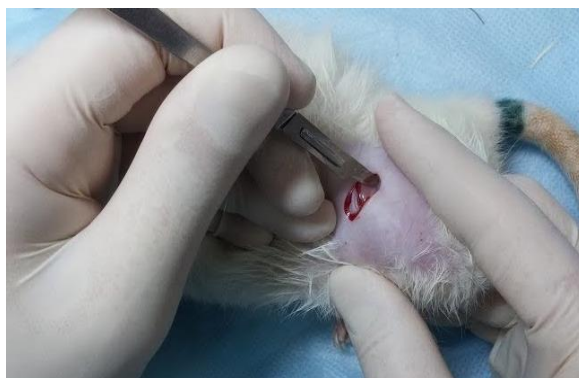


14Е. Наложение швов

Рисунок (14). Схема этапов операции



15А. Эпиляция волос в области имплантации



15Б. Разрез длиной 1см



15В.Создание дефекта бедренной кости



15Г. Имплантация матрикса из ПОБ в виде гранул



15Е. Наложение швов

Рисунок (15). Схема этапов операции

Срок наблюдения составлял соответственно протоколу 28, 60 дней. В указанные сроки выводили животных, взята биопсия исследуемой области. Материал отправляли на гистологическое исследование.

2.5.3. Гистологическое исследование

Гистологическое исследование образцов ткани выполнялось непосредственно после биопсии. Материал помещали на 72 часа в 10% раствор формалина на фосфатном буфере, после чего в течение 24 часов образцы ткани промывали в проточной воде. Затем после стандартной парафиновой проводки из кусочков изготавливались парафиновые срезы толщиной 3-5 мкм. Срезы окрашивались гематоксилином и эозином. После окраски препараты заключали в монтирующую среду и высушивали в течение 2 недель при комнатной температуре.

2.6. *In vivo* исследования на критическом костном дефекте черепах крыс

Для исследования регенерации костей черепа наиболее показательной является модель критического дефекта свода черепа (теменной кости) у крысы [Spicer P.P., 2012; Бычков А.И., 2015], позволяющая получить воспроизводимые данные и сравнить их с многочисленными результатами других исследований [Kundu J., 2013; Gazhva J.V., 2014; Kuznetsova D.S., 2014; Ivanov S.Y., Bonartsev A.P., 2015]. Данную модель используют для изучения эффективности и безопасности различных костезамещающих материалов, в том числе матриксов с факторами роста и клетками [Pellegrini G., 2009; Lee C.H., 2015; Васильев А.В., 2015; Chang-Hwan L., 2015].

Все эксперименты соответствовали рекомендациям локального биоэтического комитета НижГМА и этического комитета РУДН (Протокол № 10 заседания биоэтической комиссии НижГМА от 07.04.2013; Протокол №8 от 18.02.2016г), при его постановке руководствовались «Правилами

проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и № 701 от 24.07.1978 г., «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г. и ГОСТ ISO 10993-2-2011.

Исследование проводили на 40 самцах крыс линии Wistar массой тела 400 г., которые разделили в 4 группах по 10 штук в зависимости имплантированного в них матрикса.

Группа I – контрольная группа, матрикс не вводили в сформированный дефект

Группа II – имплантация матрикса из ПОБ+АЛГ

Группа III – имплантация матрикса из ПОБ +АЛГ+ГА

Группа IV – имплантация матрикса из ПОБ +АЛГ +ГА+МСК

Для хирургических операций использовали внутрибрюшинный наркоз «Золетил 100» (Франция) в дозировке 125 мкг/кг.

2.6.1. Методика операции

Под внутрибрюшинным наркозом «Золетил 100» (Virbac, Франция) в дозировке 125 мкг/кг крысам производили поперечный и вертикальный латерально-смещённый разрез кожи головы, формируя треугольный лоскут и последовательно, тупым и острым путём обнажали теменные кости. Посередине сагиттального шва на теменных костях формировали круглое отверстие с помощью трепана C-reamer диаметром 8 мм и высотой 1,5 мм из набора Neobiotech SLA (Корея), избегая перфорации сагиттального венозного синуса. Рану послойно ушивали. Поэтапно имплантация матрикса изображена на рисунке 16,17.



Рисунок 16. Схема этапов операции при создании критического дефекта на теменной кости крысы



А.



Б.



В.



Г.

Рисунок 17. Этапы операции: А – хирургический доступ Б – сформирован критический костный дефект, В – дефект закрыт костным матриксом; Г – подшивание костного матрикса к надкостнице

2.6.2. Введение флуоресцентных меток для изучения скорости регенерации костных дефектов

Механизм мечения костного регенерата основывается на связывании тетрациклиноподобных флуорохромов с ионами кальция с образованием хелатных соединений, которые накапливаются в новообразованной костной ткани, что обеспечивает их последующую визуализацию. Для оценки динамики неоостеогенеза на разных сроках проводили прижизненное тройное мечение новообразованной костной ткани. Во всех экспериментальных группах крысам делали внутрибрюшинные инъекции раствора доксициклина к началу активной минерализации остеоида на 8-й, 9-й и 10-й день после операции. Затем на 15-й, 16-й и 17-й день эксперимента крысам внутрибрюшинно вводили раствор тетрациулин, который, включаясь в новообразованную костную ткань, образует новую меченую область. На 22-й, 23-й и 24-й день – вводили ализарин красный С

для полного окрашивания краёв минерализованного регенерата. Метки вводили в дозировке 25 мг/кг массы тела. Таким образом, мечение осуществляли по схеме 7-3-4-3-4-3-4 (три дня введения чередовались с четырехдневными перерывами).

На 28-й день, что соответствовало окончанию процессов первичного остеогенеза [Burr D.B., 2013], крыс выводили из эксперимента передозировкой наркоза Золетил/Рометар (Virbac, Франция / Bioveta, Чехия). Скелетировали свод черепа, область регенерата выделяли с использованием хирургических цилиндрических боров и физиодиспенсера. Полученные образцы свода черепа фиксировали в 70% этиловом спирте в течение 24 часов. Такой способ фиксации широко употребляется для сохранения флуоресцентных меток и хорошей пропитки костной ткани [Yuehuei H., 2003].

2.6.3. Гистологическое и микроскопическое исследование

Образцы фиксировали в 70% этаноле в течение 24-72 часов. Затем промывали, обезвоживали и заливали в метилметакрилат (Osteo-Bead, Sigma-Oldrich) по стандартной методике, рекомендованной производителем с последующей полимеризацией. Получали пластиковые блоки, которые перед изготовлением срезов исследовали на конусно-лучевом компьютерном томографе. Такой метод был выбран так как пластик для фиксации не рентгеноконтрастен, а сами блоки легко позиционировать в поле томографа. Сканирование проводили в конусно-лучевом томографе Point 3D Combi 500 C, (Pointnix, Ю. Корея) на отработанном режиме 63kVp/7mA.

Из полученных блоков изготавливались первичные срезы 200 мкм (Lowspeed saw Jet, Швейцария), из которых готовились вторичные срезы толщиной 40-50 мкм. Контроль толщины среза осуществлялся стандартным механическим микрометром барабанного типа.

Микроскопическое исследование проводилось с использованием

флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B. Микрофотографирование проводилось с использованием стандартного набора светофильтров с последующим сложением RGB-каналов в единое изображение с использованием штатного программного продукта Leica для флуоресцентной микроскопии (мультиканальная гистопантограмма).

2.7. Методы гистологического исследования

2.7.1. Гистологическая парафиновая проводка

Образцы тканей фиксировали в нейтральном формалине в течение 24 часа, после чего промывали в проточной воде и при необходимости декальцинировали 12 часов в смеси соляной и муравьиной кислот, взятых в равных пропорциях. После промывки в проточной воде образцы проводили по стандартной парафиновой проводке через этиловый спирт восходящих концентраций до парафина. Образцы тканей заливали в блоки и изготавливали полусерийные срезы толщиной 3-4 мкм. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином (BioLine, Италия) на каждый. Фотодокументацию срезов проводили с использованием микроскопа Leica DM1500 цифровой камерой EC3.

2.7.2. Гистологическая метилметакрилатовая проводка

Образцы фиксировали в этаноле 70% в течение 24 часов. После чего обезвоживали, пропитывали метилметакрилатом (OsteoBed, Sigma), полимеризовали. Полученные блоки нарезали на станке Isomet1000, шлифовали до толщины 25-35 мкм. Окрашивали небесным трихромом [Волков А.В., 2016]. Заключили в бальзам и высушивали. Фотодокументацию срезов проводили с использованием микроскопа Leica DM1500 цифровой камерой EC3.

Глава 3. Результаты исследований

Исследование включало три этапа:

I. На первом этапе проведена разработка полимерного каркаса-матрикса из поли-3-оксибутирата (ПОБ и композита ПОБ/ГА), исследование его *in vitro* на цитотоксичность и способность поддерживать рост клеток и *in vivo* на мягкие ткани и бедренной кости крыс на биосовместимость.

II. На втором этапе были отработаны новые методики операции и проведено экспериментальное исследование критических дефектов на черепах крыс с применением матриксов из ПОБ.

III. На третьем этапе проведено экспериментальное исследование критических дефектов на черепах крыс с применением костного каркаса из ПОБ совместно с МСК – тканеинженерной терапевтической системы.

3.1. Результаты создания тканеинженерной терапевтической системы

По методике двойного выщелачивания нами были получены трехмерные скаффолды на основе ПОБ в количестве 30. Из них 10 на основе ПОБ заполненные альгинатом натрия, 10 на основе ПОБ/ГА, заполненные альгинатом натрия и еще 10 на основе ПОБ/ГА, заполненные альгинатным гидрогелем и МСК. Последние 10 матриксов представляет собой тканеинженерной терапевтической системы для регенерации костной ткани. На рисунке 18 представлено внешний вид матриксов.



Рисунок 18. Внешний вид матриксов из ПОБ: А – до и Б – после насыщения альгинатом

Так как изготовленные матриксы тканеинженерной конструкции были использованы для ин витро исследования необходимо было обеспечить их стерильность. Для этого матрикс ПОБ/ГА стерилизовали в автоклаве при 112 градусов С (30 мин, 1,5 атм.). Порошок альгината натрия перед получением геля стерилизовали ультрафиолетовыми лучами (длина волны 253,7 нм). Насыщения матриксов альгината натрия и культивация на них МСК проводилось в стерильных условиях.

Для введения МСК в биокомпозитные скаффолды, т.е. собственно для изготовления тканеинженерной конструкции была использована культура МСК крыс. МСК были выделены из костного мозга 3-х дневных крысят. МСК культивировали в стандартных условиях [Жаркова, 2017]. Для эксперимента использовали МСК 3-его пассажа [Bonartsev A.P., Zharkova I.I., 2016].

3.2. Изучении структуры и морфологии скаффолдов

По методике двойного выщелачивания нами были получены трехмерные матриксы из ПОБ ($M = 130$ кДа) (ПОБ) и его композита с ГА (ПОБ/ГА). Внешний вид матриксов из ПОБ до их заполнения альгинатным гидрогелем и после представлен на рис. 18, но внешний вид матриксов ПОБ/ГА практически такой же. На рис. 19 представлены фотографии

полученных матриц до их заполнения альгинатным гидрогелем и после, полученные с использованием метода широкопольной световой микроскопии (СМ). На этих фотографиях хорошо видна разница в морфологии, с одной стороны, матриц, содержащих ГА, по сравнению с матрицами, не содержащими минеральный компонент, а, с другой стороны, матриц, заполненных АЛГ, по сравнению с матрицами, не заполненными гидрогелем.

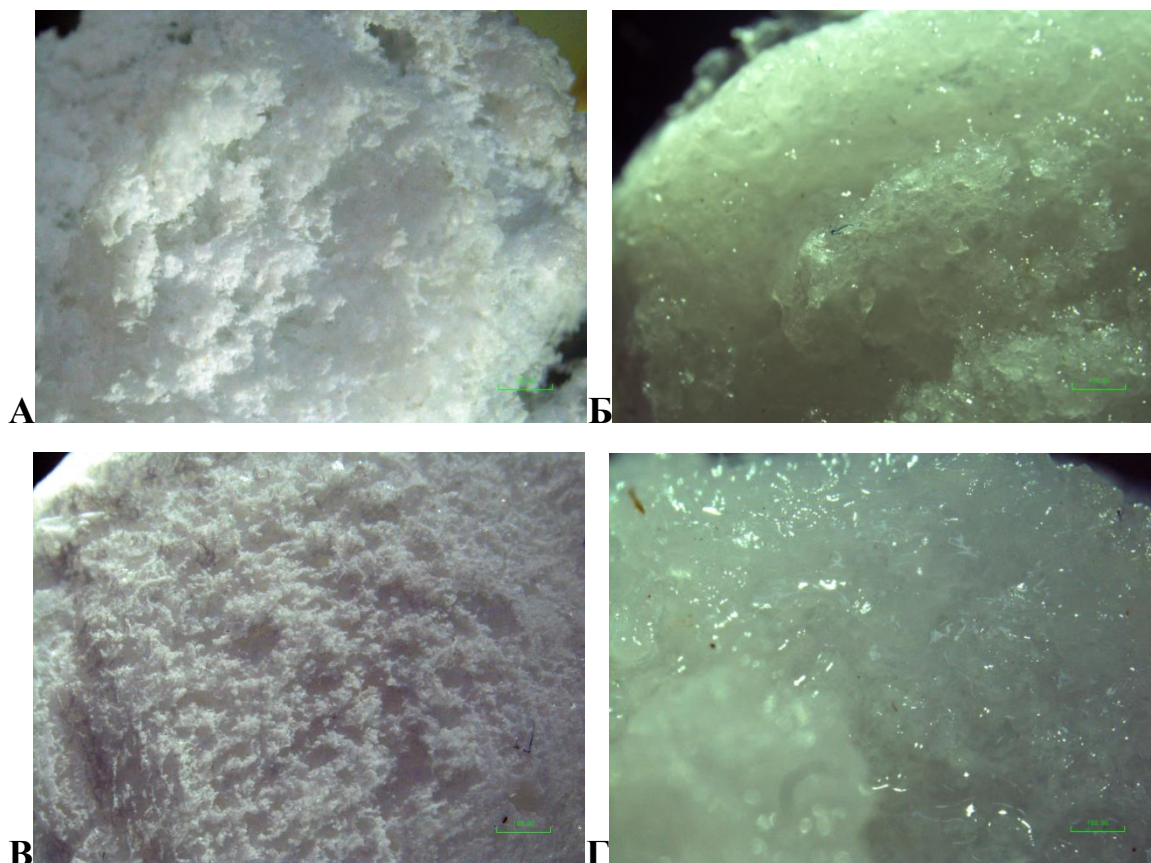


Рисунок 19. Микрофотографии матриц (А) – ПОБ, (Б) – ПОБ/АЛГ, (В) – ПОБ/ГА, (Г) – ПОБ/ГА/АЛГ, полученные методом широкопольной световой микроскопии, $\times 100$.

Изучение образцов полимерных подложек методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рис. 20) показало, что матрицы имеют трехмерную пористую структуру с размером пор и пористостью, указанных в таблице 4. Внутренняя структура матриц гетерогенная: по своему размеру можно выявить макропоры и микропоры. Макропоры больше 300 мкм считаются оптимальным размером для проникновения питательных

веществ и клеток во всем объеме матрикса [Karageorgiou V., Kaplan D., 2005]. Заполнение матрикса альгинатом приводит к тому, что АЛГ выстилает внутреннюю поверхность пор матрикса, однако, следует учитывать, что при приготовлении образцов для СЭМ происходит сублимация гидрогеля, что, разумеется, сильно искажает результаты исследования. Тем не менее, наличие биоматериала АЛГ довольно четко видно на внутренней поверхности пор матрикса – гладкая пленка закрывает и выстилает его поры.

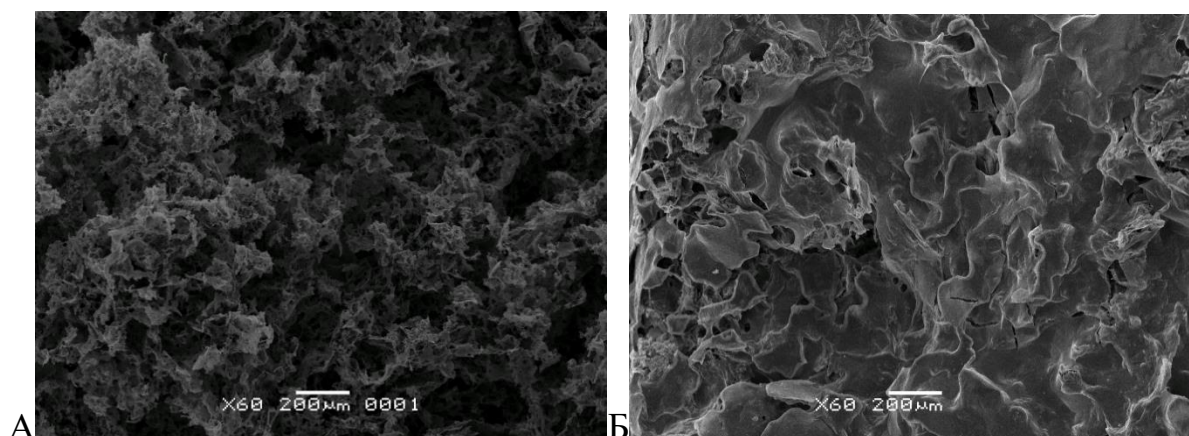


Рисунок 20. Микроструктура матриксов из ПОБ: А – до и Б – после заполнения альгинатом. Сканирующая электронная микроскопия, $\times 60$.

Таблица 4.

Морфологические характеристики матрикса на основе поли- 3-оксибутирата

Тип скэффолда	Пористость, %	Размер пор, мкм		Связность пор
		Макропоры	Микропоры	
С-ПОБ	93 ± 1	410 ± 75	23 ± 8	+
С-ПОБ/ГА	92 ± 1	365 ± 65	18 ± 7	+

На рис. 21 представлены микрофотографии полученных матриксов: С-ПОБ и С-ПОБ/ГА, не содержащих АЛГ, в сравнении, полученные при помощи СЭМ. Как и в случае СМ на этих фотографиях хорошо видна разница в морфологии скэффолдов, содержащих ГА, по сравнению со скэффолдами, не содержащими минеральный компонент.

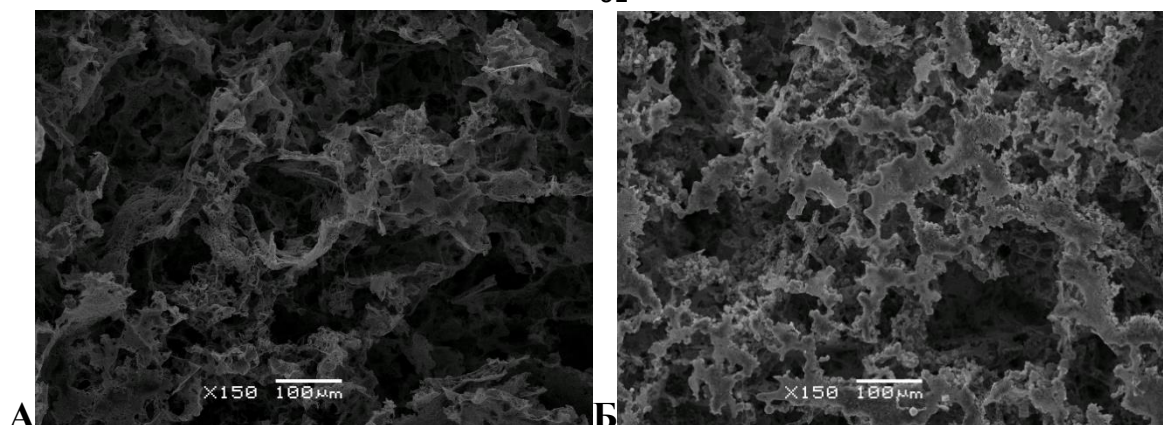


Рисунок 21. Микроструктура матриц: А – ПОВ, Б – ПОВ/ГА, СЭМ, $\times 150$.

Однако, достоверной разницы в параметрах в морфологии матриц не наблюдалось (табл. 4). В результате расчетов в среднем пористость матриц составила 92-93 %. Размер макропор составил более 350 мкм, а микропор – около 20 мкм.

Методом окрашивания чернилами определяли характер системы пор. В результате было доказано, что матрицы из ПОВ имеют сообщающуюся систему пор.

3.3. Исследование роста и дифференцировки МСК на скаффолдах сложной геометрической формы

Был исследован рост МСК на полученных матрицах ПОВ и ПОВ/ГА, не заполненных альгинатным гидрогелем. Исследование роста МСК в матрицах с использованием теста на жизнеспособность ХТТ показало, что наблюдается слабый рост МСК в матрицах, который тормозится к 7 сут. Причем, достоверных отличий в росте МСК в матрицах из ПОВ и композита ПОВ/ГА не наблюдается, хотя и имеется некоторая тенденция к более слабому росту клеток на матрицах из композита полимера с ГА (рисунок 22).

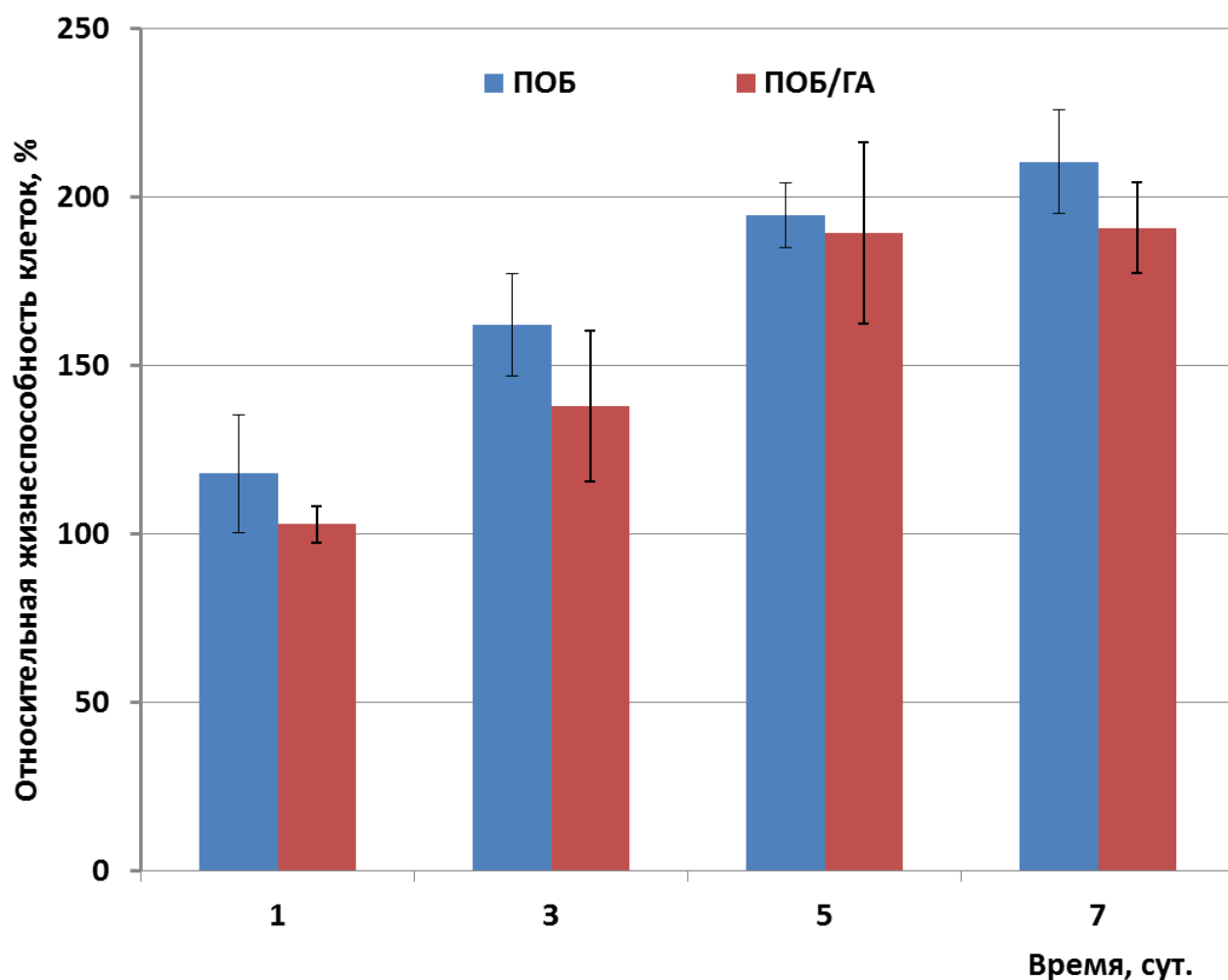


Рисунок 22. Рост МСК в матриксах ПОБ и ПОБ/ГА (относительная жизнеспособность клеток в % от количества первоначально внесенных на матрикс клеток).

Была проанализирована также цитотоксичность матриксов, т.е. их способность подавлять рост клеток в стандартных условиях на пластике также с использованием теста на жизнеспособность ХТТ (рисунок 23).

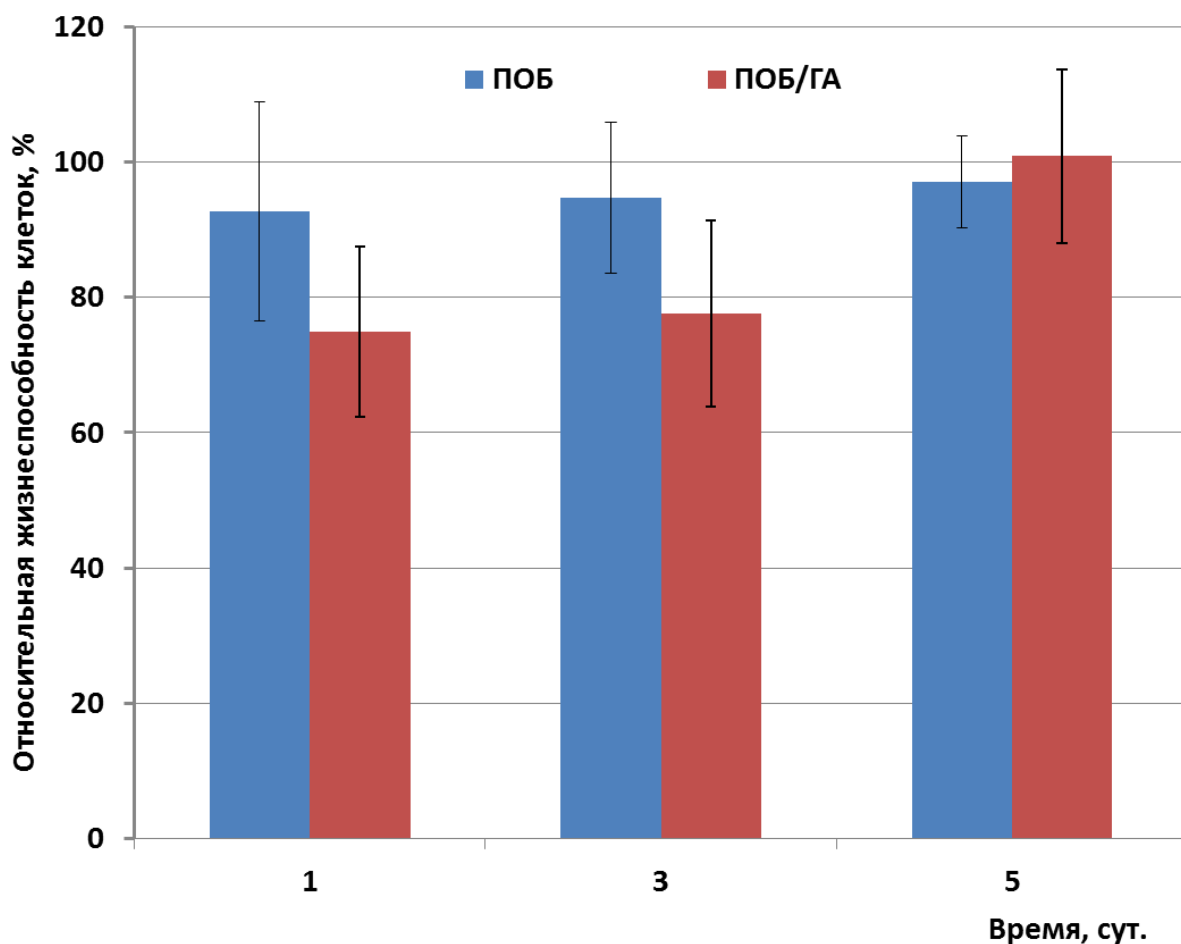


Рисунок 23. Цитотоксичность матриц ПОВ и ПОВ/ГА по отношению к МСК (относительная жизнеспособность клеток в % от количества клеток в контроле на культуральном пластике)

На рисунке видно, что в присутствии исследуемых образцов количество клеток меняется незначительно по сравнению с контролем, что говорит об отсутствии цитотоксичности, хотя имеется тенденция к ингибированию роста МСК на 1-е и 3-е сут. матриксами из композита ПОВ/ГА, но это изменение статистически недостоверно.

На рисунок 24 представлены данные по изменению одного из главных маркеров остеогенной дифференцировки МСК – активности щелочной фосфатазы в обычной ростовой среде для культивирования МСК в течение 3-х недель. Из представленной на рис. 20 диаграммы видно, что при росте МСК на матриксах обоих типов наблюдается спонтанное возрастание активности щелочной фосфатазы на сроках 2 и 3 недели. Причем, наибольшее увеличение активности фермента происходит в МСК,

культивируемых на матриксах из композита ПОБ/ГА, т.е. ГА значительно потенцирует эту активизацию фермента.

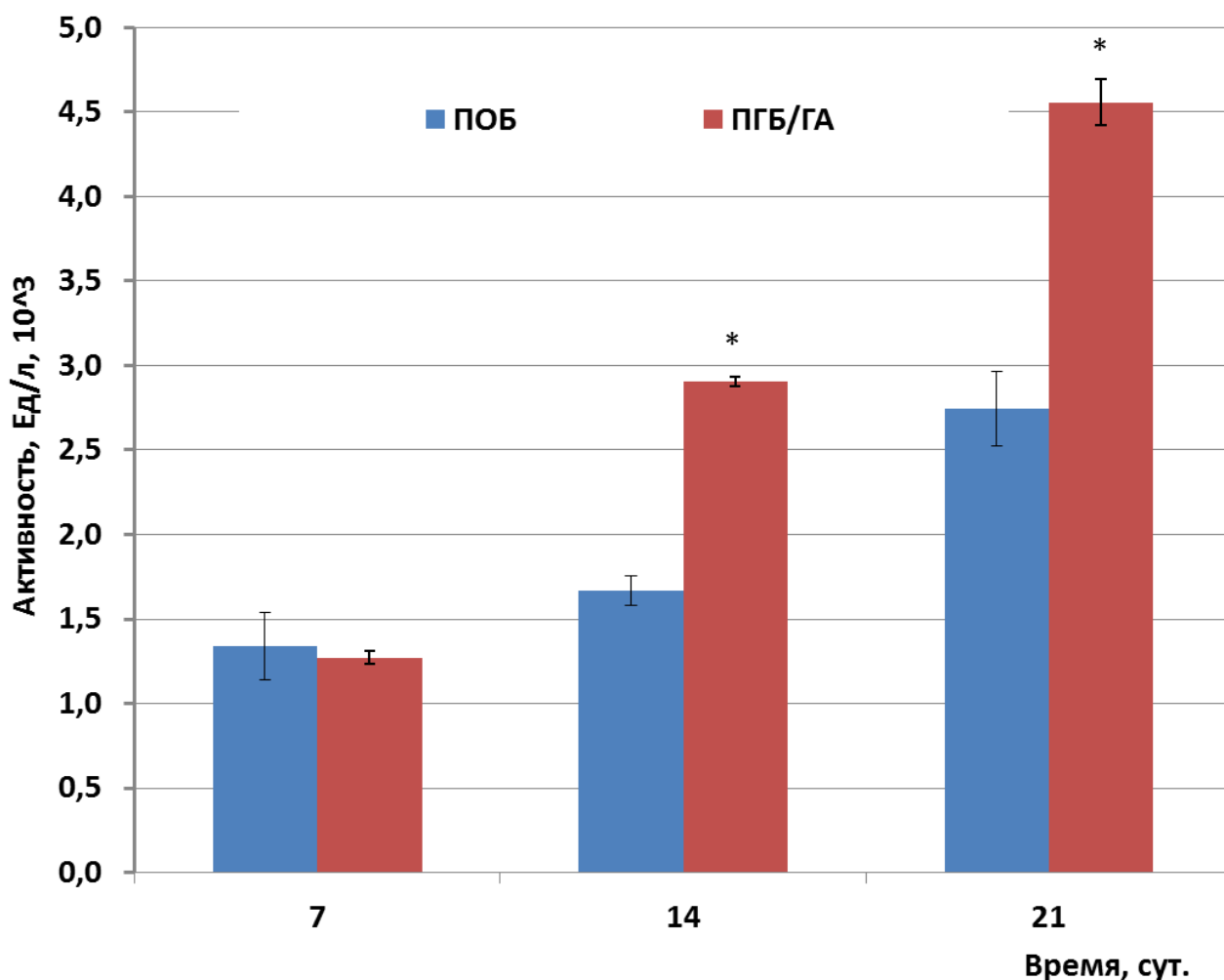


Рисунок 24. Активность щелочной фосфатазы скэффолдов ПОБ и ПОБ/ГА при культивировании в них МСК в стандартной культуральной среде, * $p < 0,05$ достоверное отличие группы ПОБ/ГА от группы ПОБ

Остеогенная активность ГА хорошо известна [Chu Т.М., 2002; Rodrigues С.V., 2003; Yoshikawa Н., 2009; Guda Т., 2012] и, вероятно, именно этим объясняется гораздо большая активация щелочной фосфатазы матриксами ПОБ/ГА по сравнению с матриксами ПОБ. Кроме того, по-видимому, именно с активацией спонтанной дифференцировки МСК и связан слабый рост этих клеток в матриксах, т.к. при дифференцировки стволовых клеток их пролиферация подавляется. Этим же можно объяснить тенденцию ингибирования роста клеток при анализе цитотоксичности матриксов из композита ПОБ/ГА. К сожалению, измерить активность

щелочной фосфатазы в МСК на матриксах, заполненных альгинатным гидрогелем, было затруднительно из-за невозможности извлечения клеток из гидрогеля.

Таким образом, была разработана и получена тканеинженерная терапевтическая система на основе матрикса из композита ПОБ/ГА, заполненная альгинатным гидрогелем, содержащим МСК. Полученная система была использована для исследования ее терапевтической эффективности на критическом дефекте костной ткани на лабораторных крысах *in vivo*.

3.4. Терапевтическая эффективность полученной системы на дефекте костной ткани на лабораторных животных *in vivo*

Исследование проводили на 40 самцах крыс линии Wistar массой тела 400 г., которые разделили в 4 группах по 10 штук в зависимости имплантированного в них матрикса.

Группа I – контрольная группа, матрикс не вводили в сформированный дефект.

Группа II – имплантация матрикса из ПОБ+АЛГ.

Группа III – имплантация матрикса из ПОБ +АЛГ+ГА.

Группа IV – имплантация матрикса из ПОБ +АЛГ+ГА +МСК.

Образцы фиксировали в 70% этаноле в течение 24-72 часов. Затем промывали, обезвоживали и заливали в метилметакрилат (Osteo-Bead, Sigma-Aldrich) по стандартной методике, рекомендованной производителем с последующей полимеризацией. Получали пластиковые блоки, которые перед изготовлением срезов исследовали на конусно-лучевом компьютерном томографе.

Сканирование проводили в конусно-лучевом томографе Point 3D Combi 500 C, (Pointnix, Ю. Корея) на отработанном режиме 63kVp/7mA. Получены результаты компьютерной томографии черепов крыс позволили

измерить площадь регенерации дефектов исследуемых группах, учитывая площадь первоначального костного дефекта $50,24\text{мм}^2$ ($3,14 \cdot R(4\text{мм})^2$). На 25-27 рисунках представлен результат измерений критического костного дефекта в контрольной группе и в группах с матриксов на основе ПОБ/АЛГ, ПОБ/ГА/АЛГ. На рисунках 28-29 представлен результат измерений в группе, содержащей МСК, с минимальным (рис. 28) и максимальным результатом по площади регенерата (рис. 29) [Стамболиев И.А., 2018].

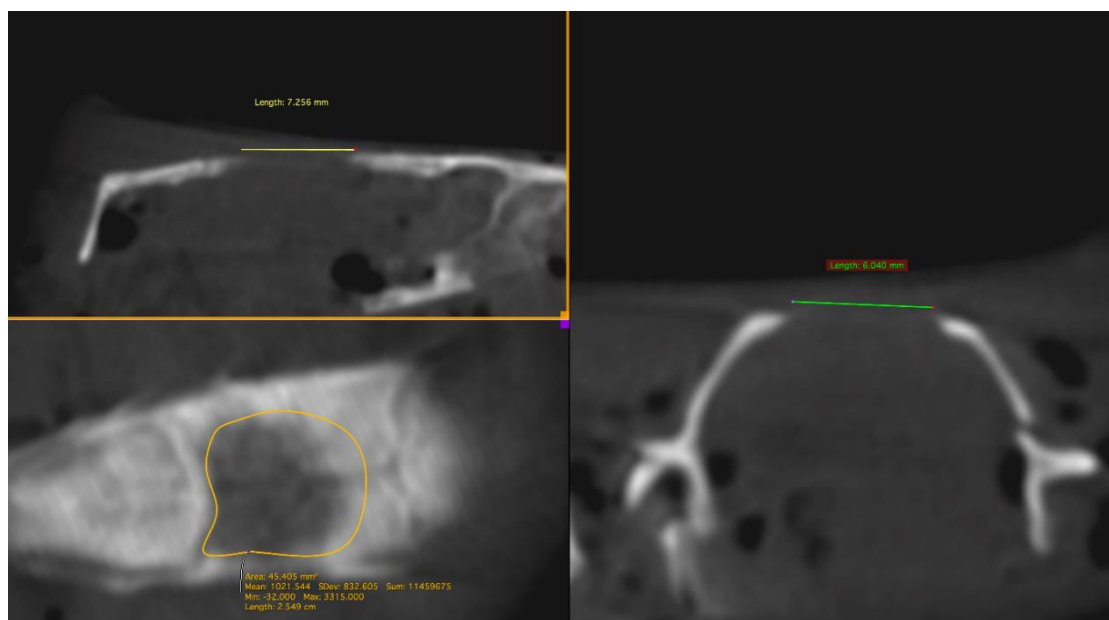


Рисунок 25.Рентгенологическая картина критического костного дефекта свода черепа крысы через месяц в контрольной группе. Площадь неминерализованного костного дефекта составила $45,40\text{мм}^2$, что соответствует 90% от исходной площади дефекта.

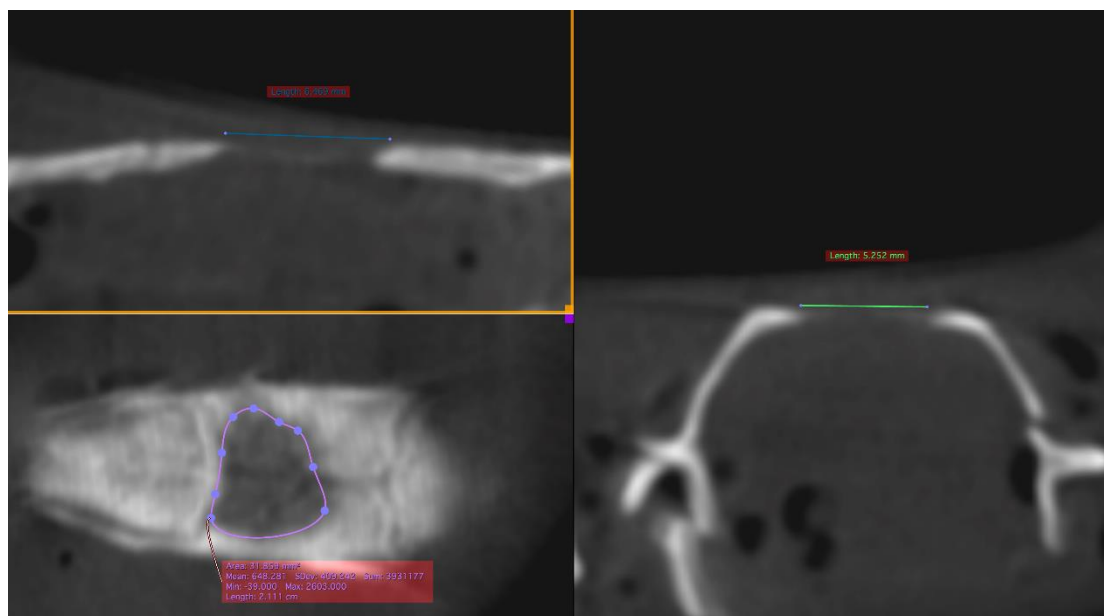


Рисунок 26. Рентгенологическая картина критического костного дефекта свода черепа крысы через месяц после его заполнения матрикса на основе ПОБ. Площадь неминерализованного костного дефекта составила 31,86 мм², что соответствует 63% от исходной площади дефекта.



Рисунок 27. Рентгенологическая картина критического костного дефекта свода черепа крысы через месяц после его заполнения матрикса на основе ПОБ/ГА. Площадь неминерализованного костного дефекта составила 20 мм², что соответствует 40% от исходной площади дефекта.

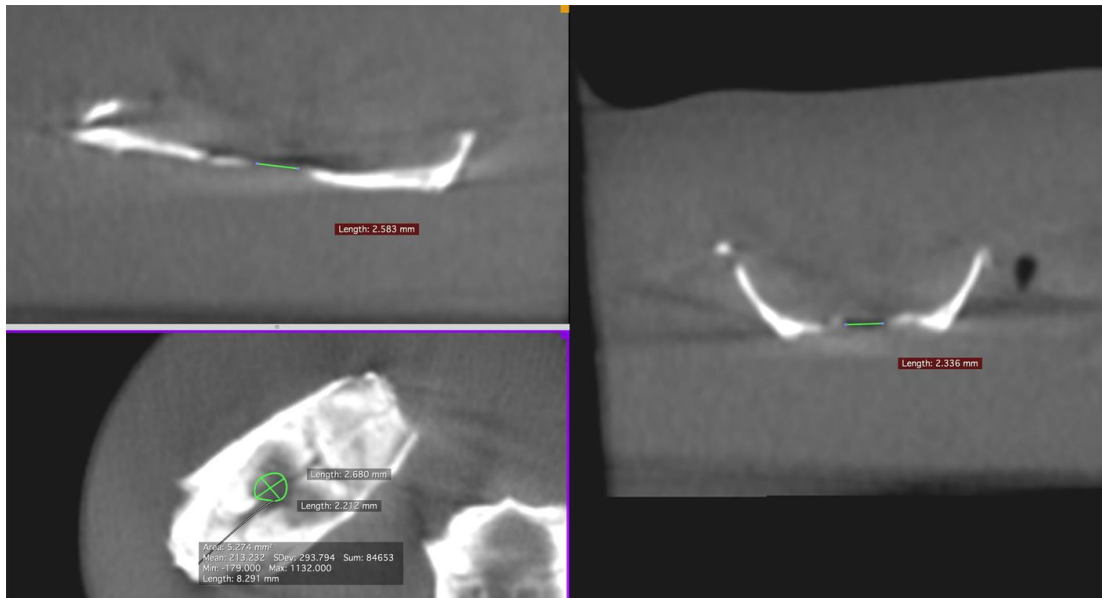


Рисунок 28. Рентгенологическая картина критического костного дефекта свода черепа крысы через месяц после его заполнения ТИК. Площадь неминерализованного костного дефекта составила 5 мм², что соответствует 10% от исходной площади дефекта.

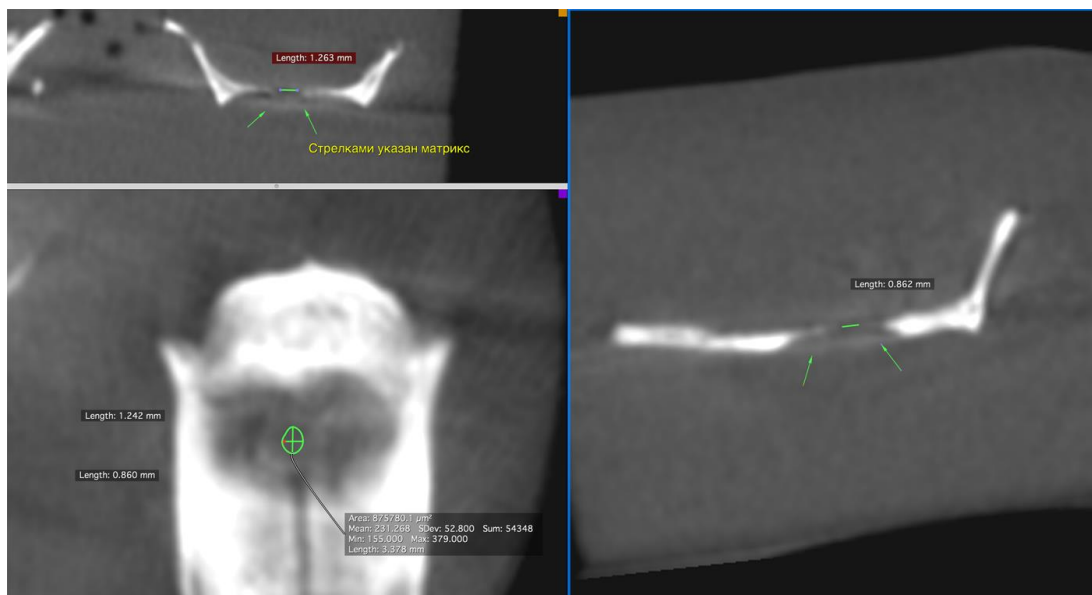


Рисунок 29. Рентгенологическая картина критического костного дефекта свода черепа крысы через месяц после его заполнения ТИК. Площадь неминерализованного костного дефекта составила 0,8 мм², что соответствует 1,6% от исходной площади дефекта.

Далее блоки отправляли на гистологическое исследование. Из полученных блоков изготавливались первичные срезы 200 мкм (Lowspeed sow Jet, Швейцария), из которых готовились вторичные срезы толщиной 40-

50 мкм. Контроль толщины среза осуществлялся стандартным механическим микрометром барабанного типа.

Микроскопическое исследование проводилось с использованием флуоресцентного микроскопа Leica DM 4000B. Микрофотографирование проводилось с использованием стандартного набора светофильтров с последующим сложением RGB-каналов в единое изображение с использованием штатного программного продукта Leica для флуоресцентной микроскопии (мультиканальная гистопантограмма).

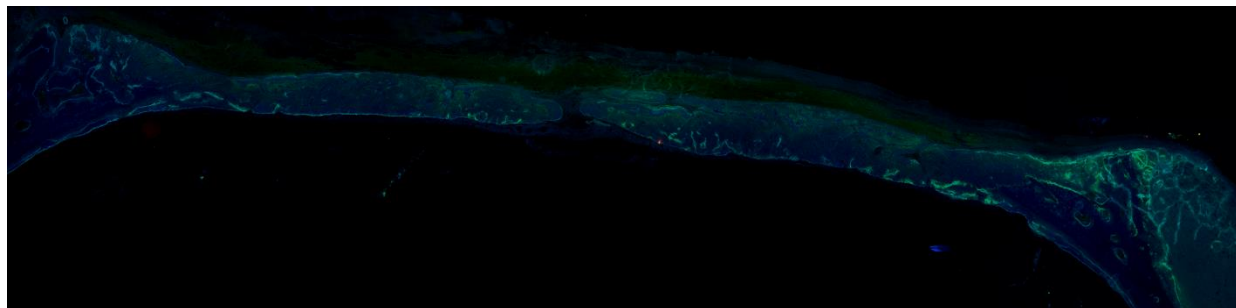
Фотодокументирование проводилось на фотокамеры G3 (LG, Южная Корея) и Cyber-shot DSC-RX100 (Sony, Япония).

Были получены предварительные результаты исследования регенерации критического костного дефекта при использовании разработанной тканеинженерной терапевтической системы.

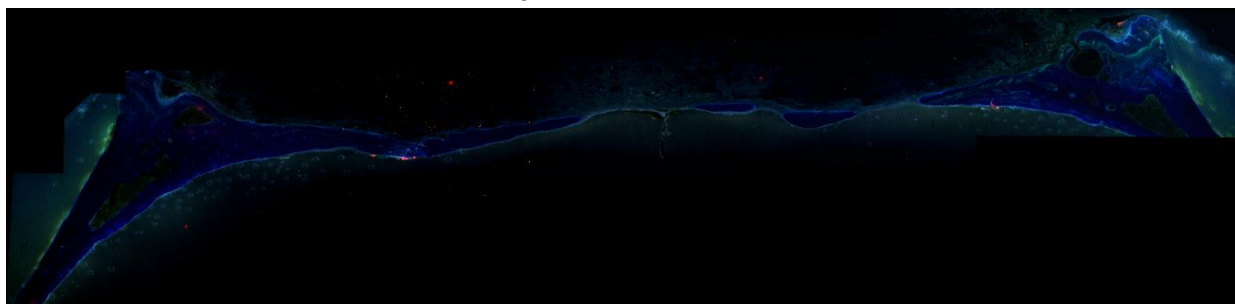
Шлифы от 40-м крыс с дефектом теменных костей и имплантации тканеинженерной терапевтической системы. При микроскопическом исследовании обращало на себя внимание, что теменные кости имели четко контурирующиеся неокрашенные или слабо окрашенные участки материнской кости, заканчивающиеся неровным краем (стенка дефекта). От краев дефекта отмечается аппозиционный рост минерализованной костной ткани с характерным зеленоватым и желтоватым свечением флюорохромных меток.

В части случаев регенерат распространялся от одного края дефекта до другого, с небольшими перерывами (рис. 30А).

А



Б



В



Г

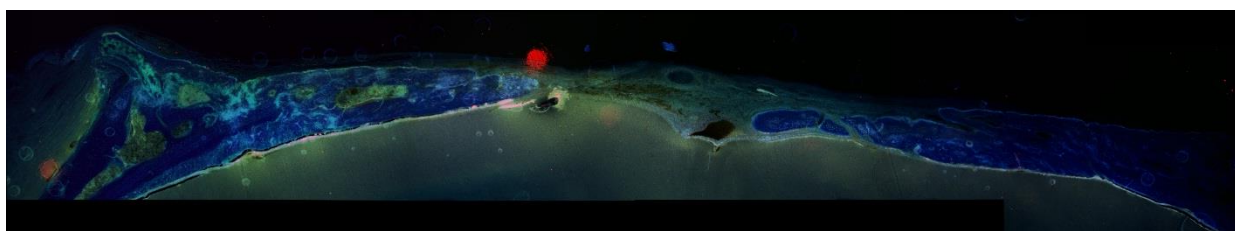


Рисунок 30. Мультиканальная гистопантомограмма гистологического среза теменных костей крыс с отдельным флуоресцентным окрашиванием через 28 дней после трепанации

Толщина новообразованной костной ткани в образцах колебалась в узких пределах. Максимум толщины был по краям регенерата с уменьшением толщины ближе к центру (рис. 30Б).

Иногда костный регенерат представлял собой поли или островки костной ткани на твердой мозговой оболочке. На поверхности всех костных структур обнаруживалась яркая люминисценция, свидетельствующая о продолжающемся процессе образования и минерализации кости (рис. 30В)

Области свободные от костного регенерата были заполнены соединительной тканью с аутофлуоресценцией в красном спектре (коллаген) (рис. 30Г).

Таким образом, результаты свидетельствуют об эффективном восстановлении критического костного дефекта при использовании разработанной тканеинженерной терапевтической системы.

3.5. Гистологического исследования по биосовместимости на мягких тканях

7-суток после имплантации.

При гистологическом исследовании через 7 суток имплантации материала в виде цилиндров обнаруживалось, что со стороны боковых поверхностей материал окружала волокнистая соединительная ткань с небольшой инфильтрацией лимфо-гистиоцитами. С торцов имплантата, где имелись поры в материале, отмечаются начальные признаки миграции грануляционной ткани внутрь цилиндра. Грануляционная ткань содержала в основном лимфоциты и немногочисленные макрофаги. В единичных образцах наблюдались немногочисленные скопления полиморфноядерных лейкоцитов (рис.31).



Рисунок 31. Гистологическое исследование через 7 дней после имплантации. Торец трубочки с начальными признаками врастания грануляционной ткани. Окраска гематоксилином и эозином, x100, гистопантограмма.

Материал в виде округлых частиц был окружен как молодой соединительной тканью, так и грануляционной, в которой так же определялись клетки лимфоидного ряда и немногочисленные макрофаги.

Воспалительный инфильтрат практически не содержал нейтрофилов (рис.32).

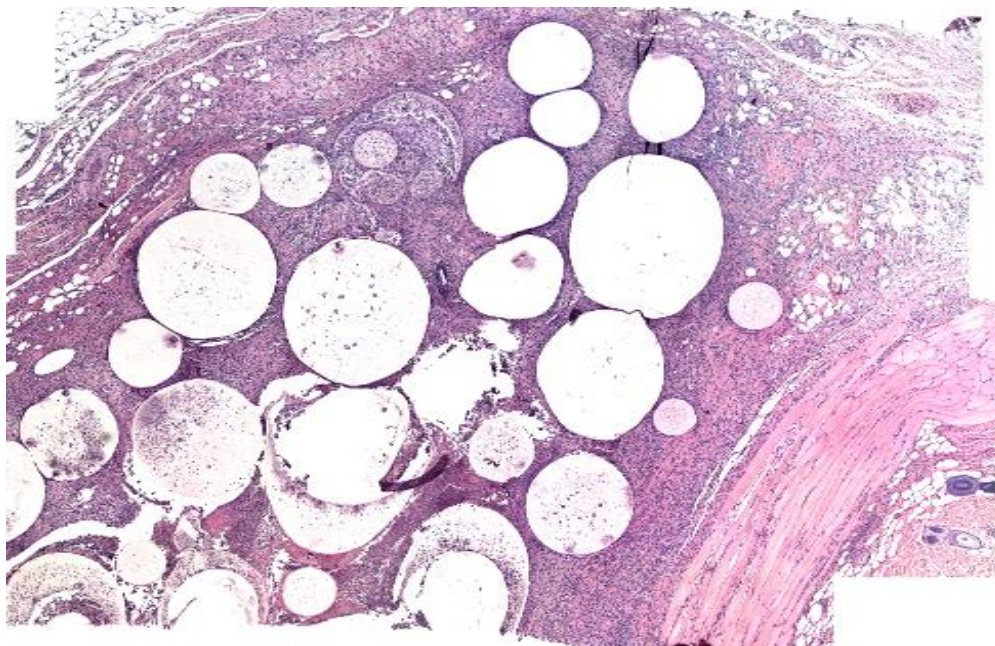


Рисунок 32. Гистологическое исследование через 7 дней после имплантации. Округлые гранулы материала окружены рыхлой соединительной тканью с умеренной воспалительной инфильтрацией. Окраска гематоксилином и эозином, x100, гистопантопограмма

14 суток после имплантации

При гистологическом исследовании через 14 суток имплантации материала в виде цилиндров обнаруживалось, что со стороны боковых поверхностей материал окружала зрелая волокнистая соединительная ткань. С торцов имплантата, где имелись поры в материале, отмечаются признаки миграции грануляционной ткани внутрь цилиндра до $1/6$ его объема, но сами торцы имплантата уже заполнены рыхлой соединительной тканью. Грануляционная ткань содержала в основном лимфоциты и многочисленные макрофаги (гигантские клетки инородных тел). В ряде случаев отчетливо видно разность в зрелости соединительной ткани вокруг гранул материала, что косвенно позволяет судить о том, что разрушение материала гигантскими клетками приводит к заполнению образовавшегося пространства молодой соединительной и грануляционной тканью (рис.33).

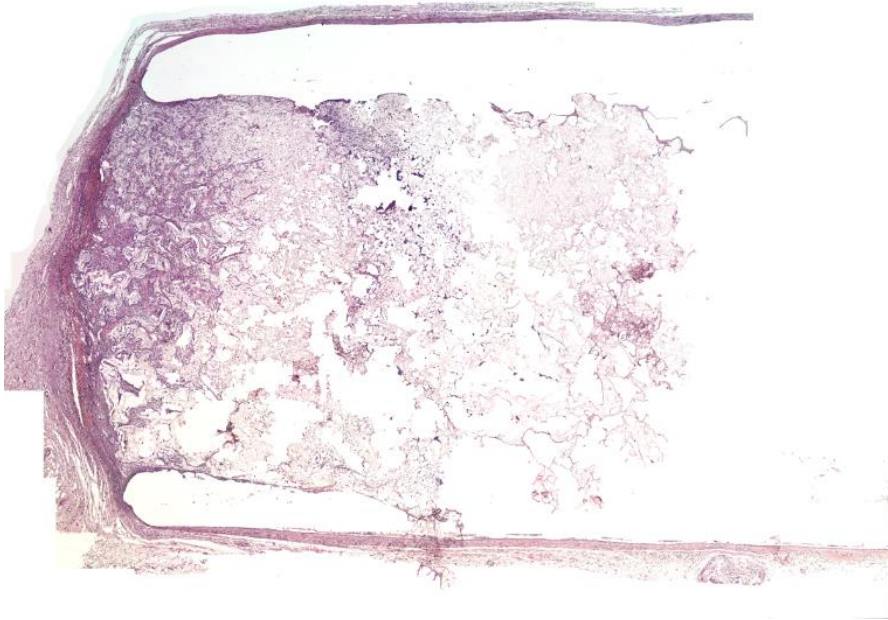


Рисунок 33. Гистологическое исследование через 14 дней после имплантации. Торец трубочки с начальными признаками созревания соединительной ткани в ее просвете, дальнейшее вращение грануляционной ткани. Окраска гематоксилином и эозином, x100, гистопантопограмма

Материал в виде округлых частиц был окружен как молодой соединительной тканью, так и грануляционной, в которой так же определялись клетки лимфоидного ряда и многочисленные макрофаги. Так же отчетливо видно участки с разностью в зрелости соединительной ткани вокруг гранул материала, что косвенно позволяет судить о том, что резорбция материала гигантскими клетками приводит к замещению образовавшегося пространства молодой соединительной и грануляционной тканью (рис.34).

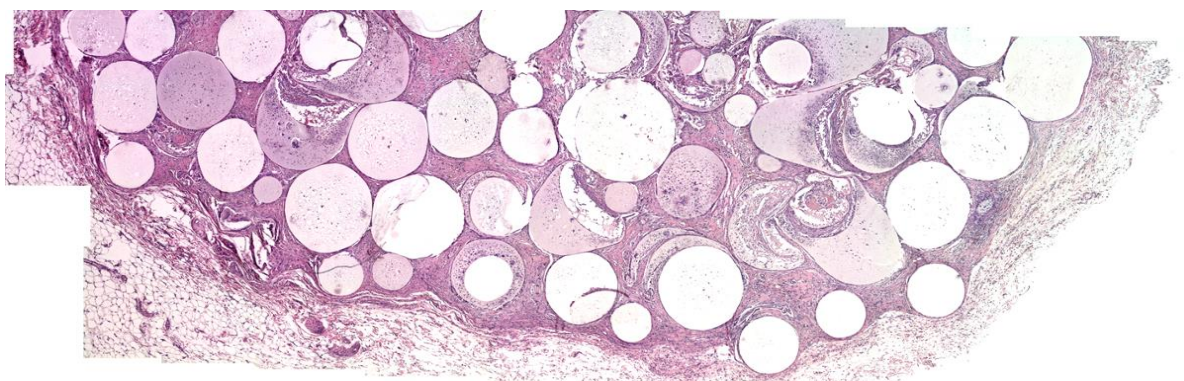


Рисунок 34. Гистологическое исследование через 14 дней после имплантации. Округлые гранулы материала окружены рыхлой соединительной тканью с незначительно воспалительной инфильтрацией. Окраска гематоксилином и эозином, x100, гистопантопограмма

21 сутки после имплантации

При гистологическом исследовании через 21 суток имплантации материала в вице цилиндров обнаруживалось, что со стороны боковых поверхностей материал окружала зрелая волокнистая соединительная ткань. С торцов имплантата, где имелись поры в материале, отмечаются процессы созревания соединительной ткани в градиентной последовательности. Так грануляционная ткань обнаруживалась в проекции средней трети цилиндра, тогда как «входы» цилиндра заполнены зрелой соединительной тканью. Грануляционная ткань так же содержала в основном лимфоциты и многочисленные макрофаги (гигантские клетки инородных тел). В свою очередь соединительная ткань изобиловала клетками с фибробластоподобным фенотипом, лимфо-гистиоцитами. Нейтрофилы не определялись (рис.35).

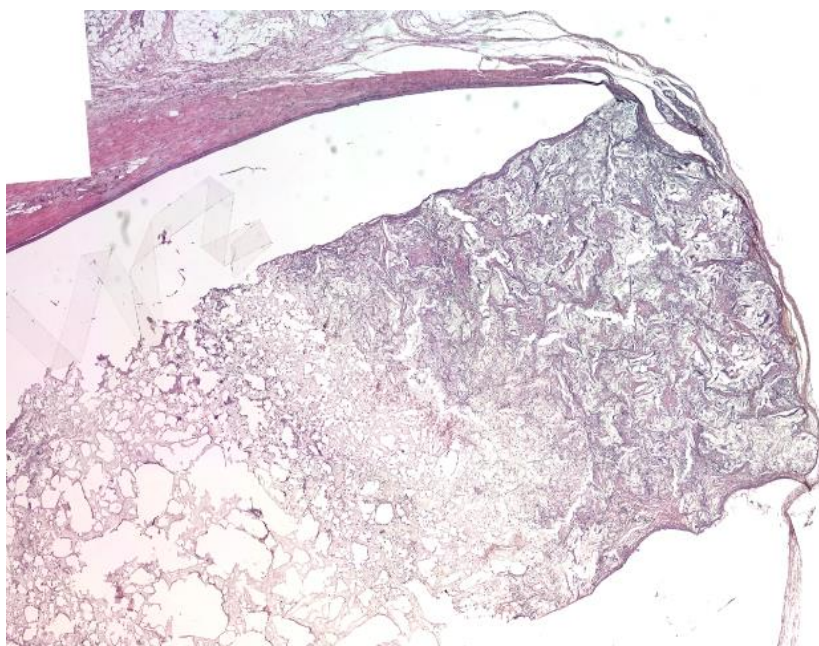


Рисунок 35. Гистологическое исследование через 21 дней после имплантации. Торец трубочки с градиентными признаками созревания соединительной ткани в ее просвете, дальнейшее врастания грануляционной ткни. Окраска гематоксилином и эозином, x100, гистопантопограмма

Материал в виде округлых частиц был окружен как молодой соединительной тканью, так и грануляционной, в которой так же определялись клетки лимфоидного ряда и многочисленные макрофаги. Так же отчетливо видно участки с разностью в зрелости соединительной ткани вокруг гранул материала, что косвенно позволяет судить о том, что резорбция материала гигантскими клетками приводит к замещению образовавшегося пространства молодой соединительной и грануляционной тканью. Нейтрофилы не определялись (рис.36).

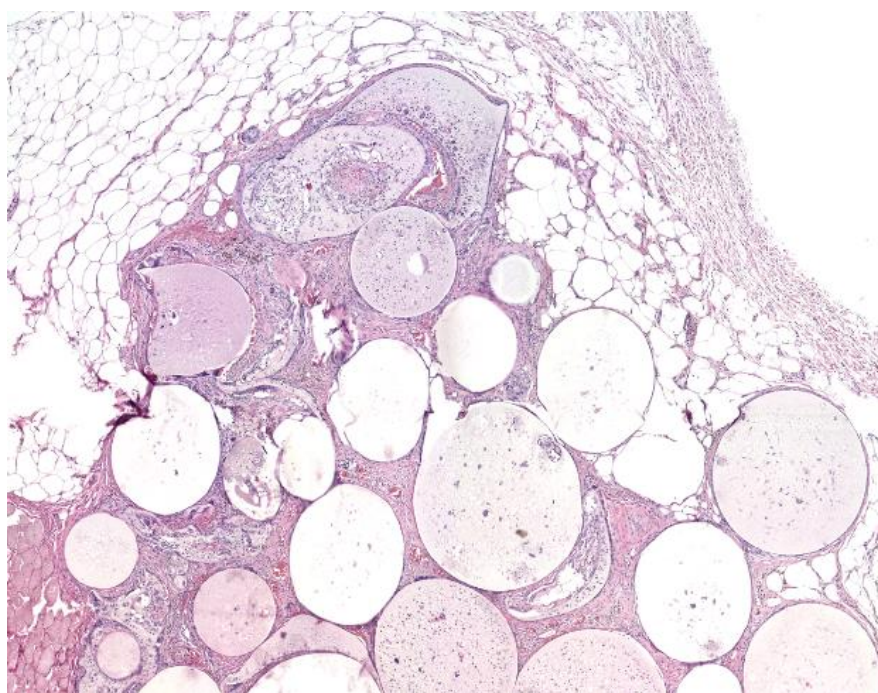


Рисунок 36. Гистологическое исследование через 21 дней после имплантации. Округлые гранулы материала окружены рыхлой соединительной тканью с незначительной воспалительной инфильтрацией. Окраска гематоксилином и эозином, x100, гистопантограмма

28 сутки после имплантации

При гистологическом исследовании через 28 суток после имплантации материала в виде цилиндров обнаруживалось, что со стороны боковых поверхностей материал окружала зрелая волокнистая соединительная ткань. С торцов имплантата, где имелись поры в материале, отмечаются процессы созревания соединительной ткани в градиентной последовательности. Так грануляционная ткань внутри цилиндра уже не

определялась цилиндра. В неоформленной соединительной ткани регенераторного типа определялись многочисленные макрофаги (гигантские клетки инородных тел) в основном на поверхности материала (рис.37).

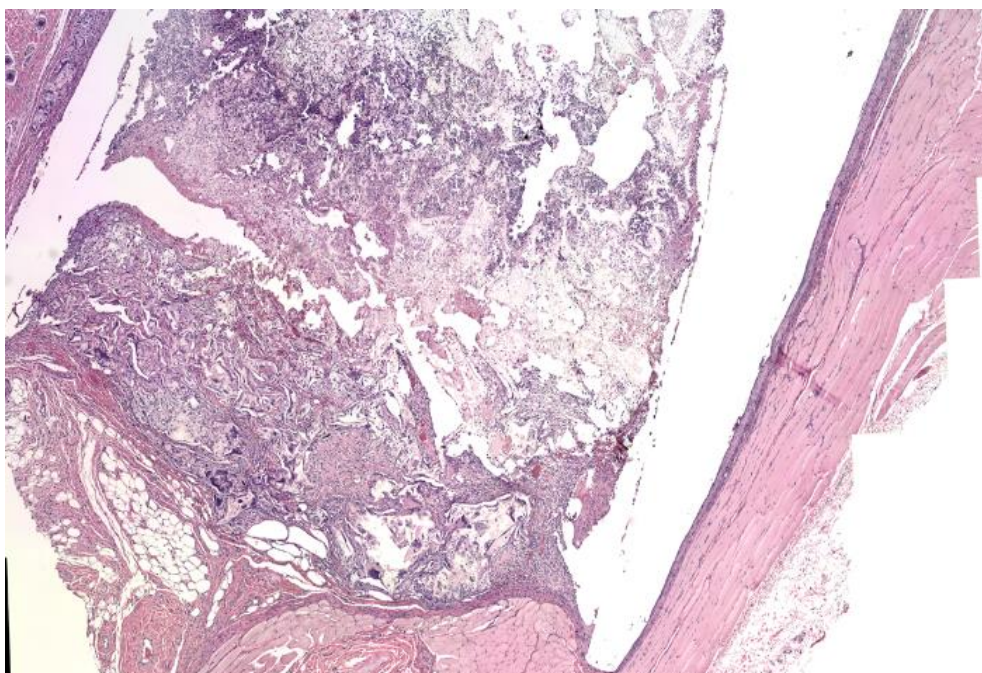


Рисунок 37. Гистологическое исследование через 28 дней после имплантации. Торец трубочки с градиентными признаками созревания соединительной ткани в ее просвете, дальнейшее врастания грануляционной ткани. Окраска гематоксилином и эозином, x100, гистопантограмма

Материал в виде округлых частиц был окружен созревающей соединительной тканью и местами грубоволокнистой соединительной тканью, в которой так же определялись клетки лимфоидного ряда и многочисленные макрофаги. Так же отчетливо видно участки с разностью в зрелости соединительной ткани вокруг гранул материала, что косвенно позволяет судить о том, что резорбция материала гигантскими клетками приводит к замещению образовавшегося пространства молодой соединительной и грануляционной тканью (Рис. 38).

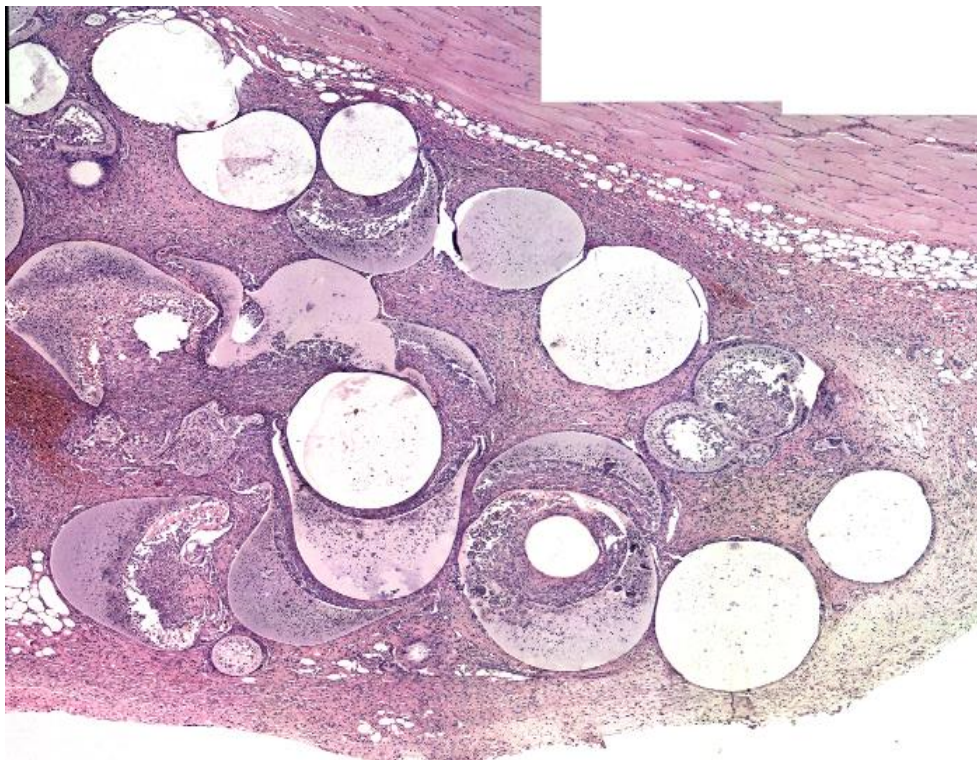


Рисунок 38. Гистологическое исследование через 28 дней после имплантации. Округлые гранулы материала окружены рыхлой соединительной тканью регенераторного типа с незначительной воспалительной инфильтрацией. Окраска гематоксилином и эозином, x100, гистопантограмма

В результате наших исследований было выявлено, что при имплантации исследуемых скаффолдов на основе ПОБ не наблюдалось явлений отторжения или аллергических реакций на имплантируемый материал у всех животных. Течение воспалительного процесса следует охарактеризовать как типичная реакция на инородное тело – гранулематозное воспаление.

В отношении резорбтивных свойств материала следует указать, что стенки (внешний контур) трубочек имели минимальную способность к резорбции, тогда как содержимое их более было ей подвержено. Материал в виде шариков показывал стабильную пролонгированную равномерную способность к резорбции.

На рисунках (39,40) представлена тканевая реакция на имплантацию матрикса в динамике на разных сроках: 7, 14, 21 и 28 день.

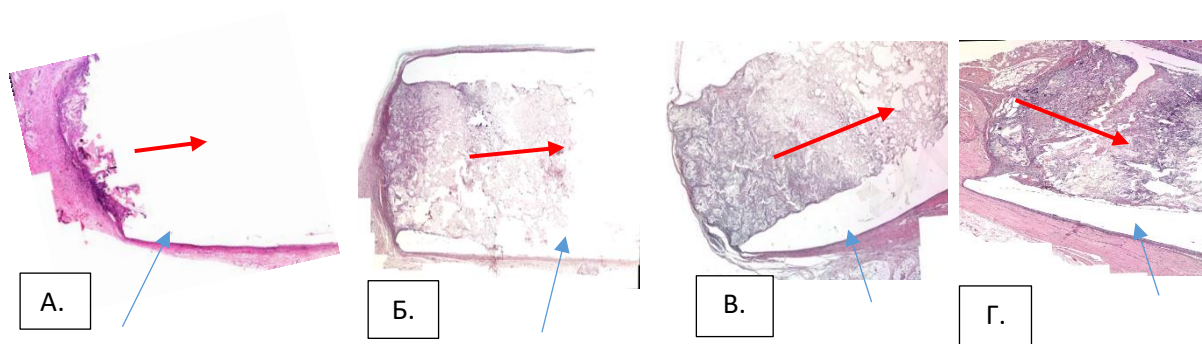


Рисунок 39. Тканевая реакция на имплантацию скаффолда в виде трубочки, заполненной матриксом. А – 7 дней, б – 14 дней, в – 21 дней, г- 28 дней. Видно постепенное прорастание соединительной ткани в полость трубочки по матриксу. Синими стрелками показана стенка трубочки, которая в исследуемые сроки не подвергается резорбции. Красной стрелкой показано направление прорастания соединительной ткани

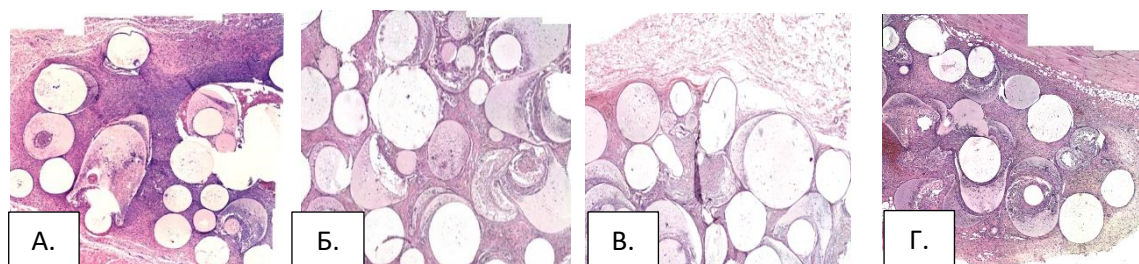


Рисунок 40. Тканевая реакция на имплантацию матрикса в виде гранул. А- 7 дней ; Б- 14 дней; В- 21 дней ; Г- 28 дней . Видна постепенная резорбция материала гранул

3.6. Гистологического исследования регенерации костных дефектов бедренных костей крыс

При гистологическом исследовании образцов костной ткани бедренных костей крыс с имплантированным остеопластическим материалом выявлено, что костная ткань имеет линейный полнослойный дефект кортикальной пластинки с переходом на губчатую кость. Спил кости окружен поперечно полосатой мускулатурой в которой располагаются поля губчатого материала и линейный объект по типу мембраны, частично перекрывающий костный дефект. Диаметр кости резко утолщен за счет большого числа очагов остеогенеза и субнадкостничных наслоений. Кортикальная пластинка диафиза бедренной кости имеет выраженные

субнадкостничные и внекостные очаги активного остеогенеза без формирования четкой структуры. Нагромождения костного матрикса представлено преимущественно балками ретикулофиброзной и пластинчатой кости без четких границ, иногда эти костные структуры входили в контакт с остеопластическим материалом, окружали его.

В свою очередь в просвете костного канала так же расположены губчатые рыхлые структуры остеопластического материала в окружении балок костного вещества. С краев дефекта кортикальной кости, со стороны эндоста определяется рост новообразованной костной ткани без формирования четких структур.

При детальном изучении поверхности остеопластического материала выявлено, что большая ее часть покрыта гигантскими клетками инородных тел, мелкими балками новообразованной костной ткани в окружении соединительной ткани с незначительной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией, кровоизлияниями (рис. 41,42).

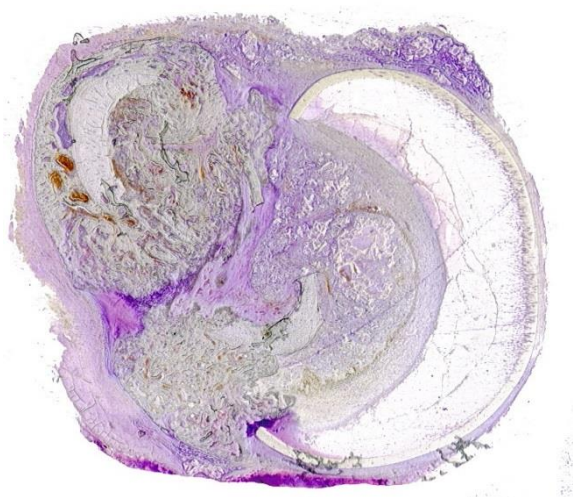


Рисунок 41. Гистологическое исследование на 28 сутки

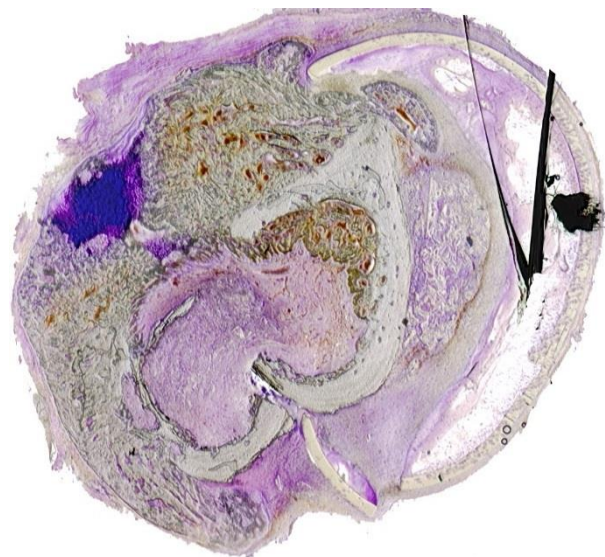


Рисунок 42. Гистологическое исследование на 60 сутки

При гистологическом исследовании образцов костной ткани бедренных костей крыс с имплантированными гранулами остеопластического материала выявлено, что костная ткань имеет линейный полнослойный дефект кортикальной пластинки с переходом на губчатую кость. Спил кости окружен поперечно полосатой мускулатурой в которой располагаются гранулы материала различного диаметра. В свою очередь в просвете костного канала так же расположены гранулы остеопластического материала в окружении балок губчатой кости. С краев дефекта кортикальной кости определяется рост новообразованной костной ткани. Иногда гранулы материала соприкасаются с новообразованной костью, однако в большинстве своем разрозненно находятся среди рыхлой соединительной ткани. При детальном изучении поверхности остеопластического материала выявлено, что ее в некоторых местах покрывают гигантские клетки инородных тел, окружающая соединительная ткань с незначительной лимфо-плазмоцитарной инфильтрацией (рис. 43,44).



Рисунок 43. Гистологическое исследование на 28 сутки

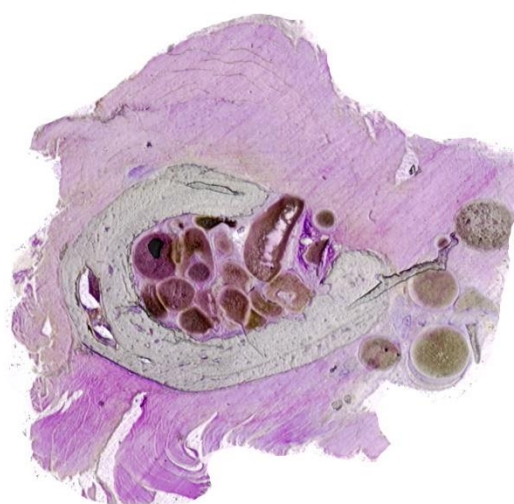


Рисунок 44. Гистологическое исследование на 60 сутки

Таким образом, на данном этапе исследования выявлено, что полиоксибутират в виде гранул самостоятельно не поддерживает остеогенез в костной ране, способен к миграции и частично препятствует растпространению фронта регенерации. Однако в виде губчатой структур активность остеогенеза возрастала, вероятно, из-за развитой поверхности материала.

3.7. Гистологическое исследование регенерации костных дефектов на теменных костях крыс

Группа – КИ-ПОБ.

Препараты теменных костей крыс с полнослойным дефектом костной ткани до твердой мозговой оболочки. Над дефектом в окружении соединительной ткани располагается диск материала с пористой структурой. Частично диск проникает в костный регенерат. Под ним с материнской кости определяется рост новообразованной костной ткани. Костные балки образуют островки кости балочного строения на твердой мозговой оболочке. Между островками нежноволокнистая клеточная соединительная ткань богатая тонкостенными сосудами. Островки часто отстоят друг от друга на некотором расстоянии, иногда сливаясь между собой. На поверхности костных балок могут быть обнаружены активные остеобласты и наслоения остеоида. В некоторых случаях с материнской кости фронт регенерации имел строение, напоминающее языки. Изучение серийных срезов не выявило перекрытие дефекта новообразованной костной тканью на этот срок наблюдения.

В свою очередь, нежноволокнистая соединительная ткань незначительно инфильтрирована преимущественно лимфоцитами и плазмócитами. Полиморфноядерные лейкоциты не обнаруживаются. В некоторых местах на поверхности материала можно обнаружить гигантские клетки инородных тел (рис.45,46,47).

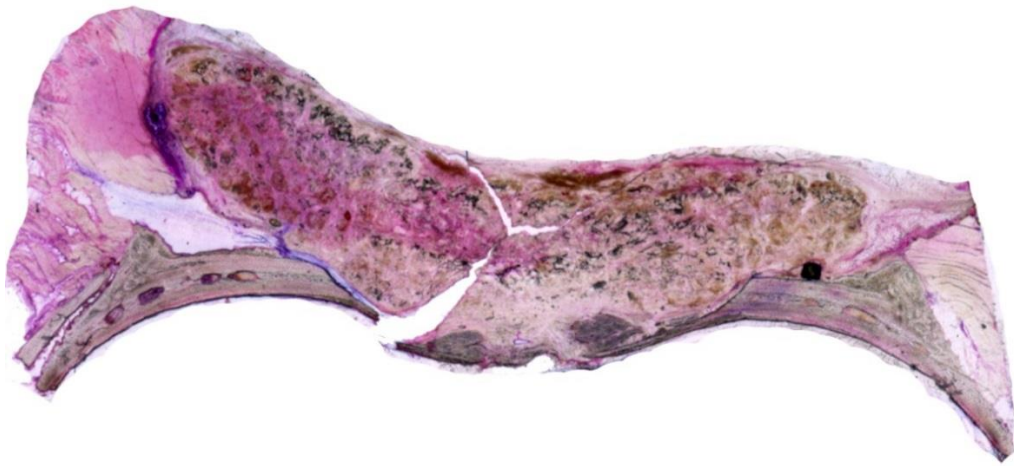


Рисунок 45. Гистопантомограмма теменной кости крыс с критическим костным дефектом спустя 28 дней после операции. Островки костной ткани на твердой мозговой оболочке. Окраска небесный трихром. X50.



Рисунок 46. Гистопантомограмма теменной кости крыс с критическим костным дефектом спустя 28 дней после операции. Островки и фронт регенерации костной ткани по типу языка на твердой мозговой оболочке. Окраска небесный трихром. X50.

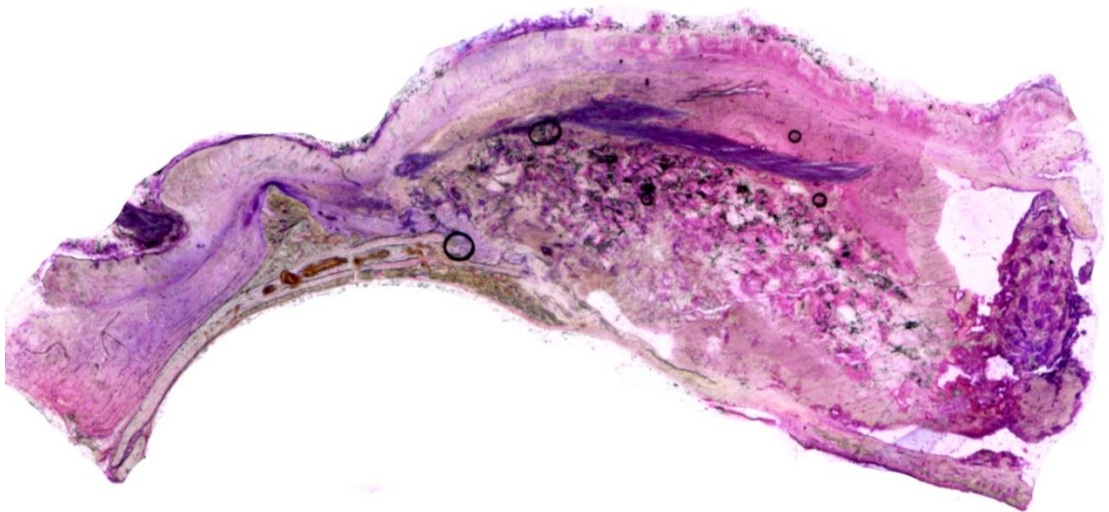


Рисунок 47. Гистопантомограмма теменной кости крыс с критическим костным дефектом спустя 28 дней после операции. Новообразованная костная ткань не заполняет полностью критический дефект. Островки костной ткани на твердой мозговой оболочке. Окраска небесный трихром. X50

Морфометрическое исследование окрашенных препаратов

При морфометрическом исследовании препаратов, окрашенных небесным трихромом, определяли относительный объем костной новообразованной костной ткани (BV/TV) в костном регенерате дефекта и относительный объем соединительной ткани (BV/TV). Относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости составил в среднем 27% (медиана), а соединительная ткань в свою очередь 73 % (медиана).

Флуоресцентная микроскопия

Окрашивание доксициклином (желтое окрашивание) обнаруживалось в ранних костных пластинках, прилежащих к сосудам (до 14 суток эксперимента). Основной костный массив окрашивался тетрациклином (зеленое окрашивание), что свидетельствует о преимущественном остеогенезе на срок с 14 по 21 день. В дальнейшем накопление ализаринового красного (красное окрашивание) демонстрирует снижение скорости остеогенеза и уменьшения объема образованного костного матрикса. Синее окрашивание характеризует фоновое свечение остеина без флуоресцентных меток. В свою очередь фронт регенерации распространялся по твердой мозговой оболочке к центральной зоне дефекта, но не перекрывал его полностью (рис.48,49).

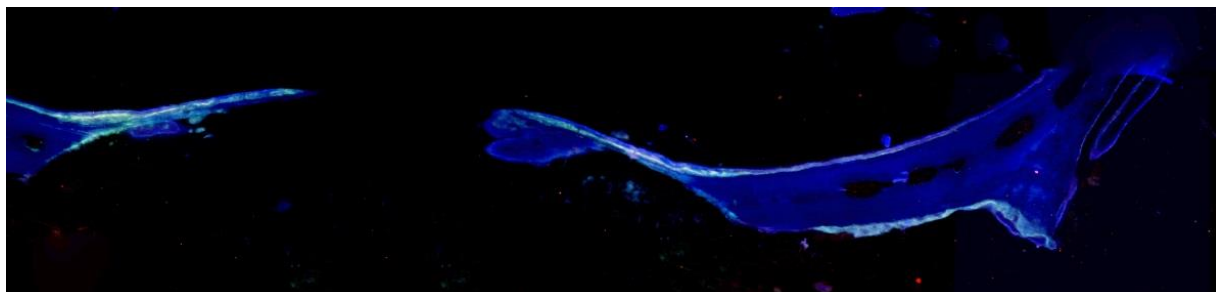


Рисунок 48. Мультиканальная гистопантомограмма гистологического среза теменных костей крыс с разделным флуоресцентным окрашиванием через 28 дней после трепанации. X50

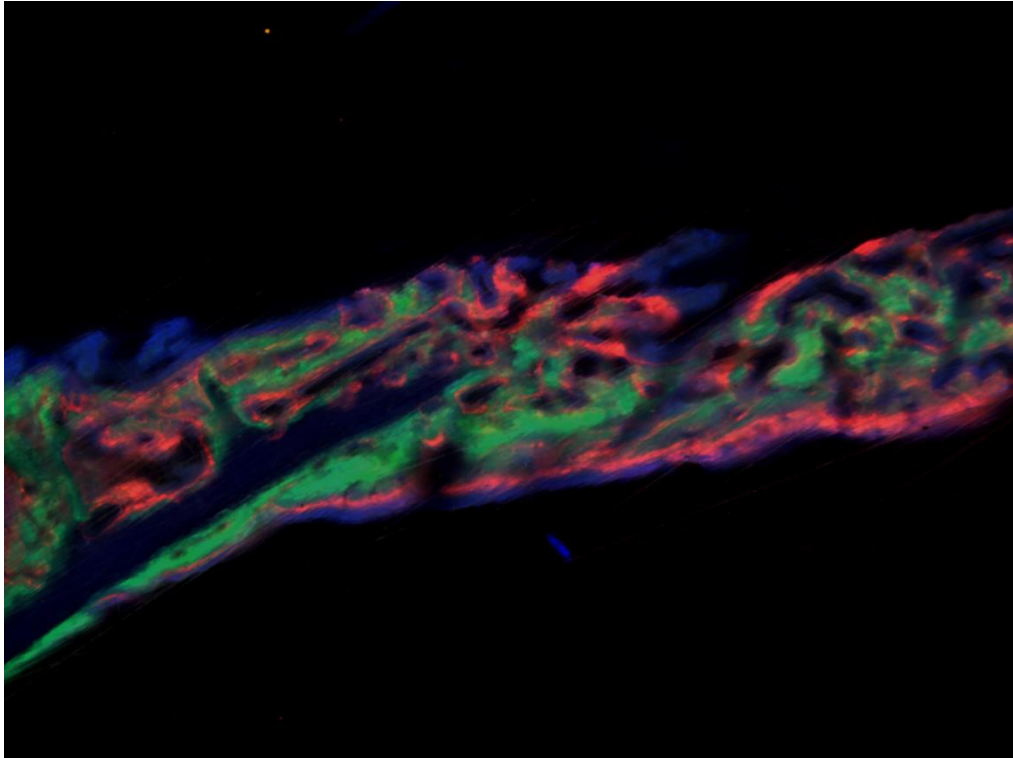


Рисунок 49. Раздельное окрашивание флуорохромами новообразованной костной ткани. Люминисцентная микроскопия. Мультиканальное изображение. x100

Группа – КИ-ПОБ-ГА-Ал.

Препараты теменных костей крыс с полнослойным дефектом костной ткани до твердой мозговой оболочки. Над дефектом в окружении соединительной ткани располагается диск материала с пористой структурой. Частично диск проникает в костный регенерат. Под ним с материнской кости определяется рост новообразованной костной. Новообразованная костная ткань преимущественно имеет пластинчатое строение в виде узких конусов с основанием, обращенным к материнской кости и верхушкой обращенной к центру регенерата. Изучение серийных срезов не выявило полного перекрытия дефекта новообразованной костной тканью на этот срок наблюдения. В большинстве случаев не произошло сближение и слияние фронтов регенератов с краев дефектов. В центральной части остается небольшой участок свободный от костной ткани.

В свою очередь нежнотоволокнистая соединительная ткань незначительно инфильтрирована преимущественно лимфоцитами и

плазмоцитами. Полиморфноядерные лейкоциты не обнаруживаются. В некоторых местах на поверхности материала можно обнаружить гигантские клетки инородных тел (рис.50).

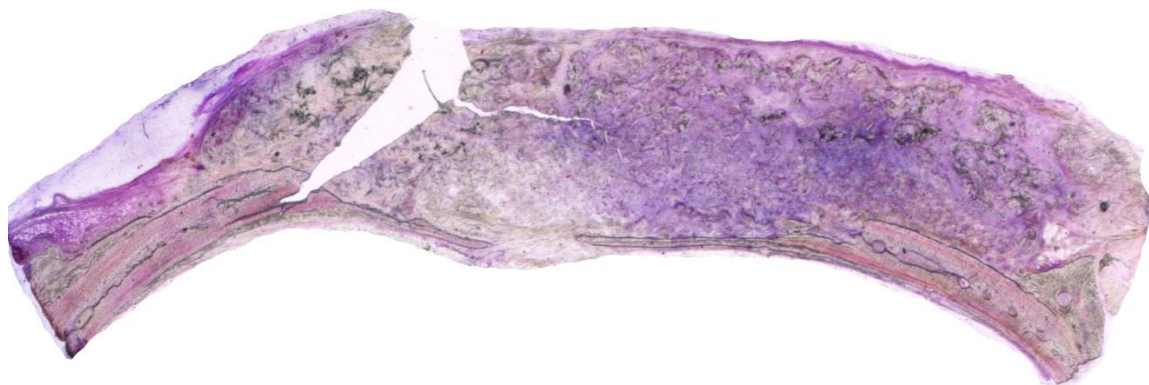


Рисунок 50. Гистопантограмма теменной кости крыс с критическим костным дефектом спустя 28 дней после операции. Новообразованная костная ткань не заполняет полностью критический дефект. Окраска небесный трихром. X50

Морфометрическое исследование

При морфометрическом исследовании препаратов окрашенных небесным трихромом определяли относительный объем костной новообразованной костной ткани (BV/TV) в костном регенерате дефекта и относительные объем соединительной ткани (BV/TV). Относительный объем костной ткани в дефекте теменной кости составил в среднем 36% (медиана), а соединительная ткань в свою очередь 64 % (медиана).

Флуоресцентная микроскопия

При микроскопическом исследовании, с использованием флуоресцентной микроскопии, образцов костной ткани теменных костей крыс выявлено, что накопление флуоресцирующих меток в костной ткани произошло успешно. Окрашивание доксициклином (желтое окрашивание) обнаруживалось в ранних костных пластинках, прилежащих к сосудам (до 14 суток эксперимента). Основной костный массив окрашивался тетрациклином (зеленое окрашивание), что свидетельствует о преимущественном остеогенезе на срок с 14 по 21 день. В дальнейшем

накопление ализаринового красного (красное окрашивание) демонстрирует снижение скорости остеогенеза и уменьшения объема образованного костного матрикса. Синее окрашивание характеризует фоновое свечение остеина без флуоресцентных меток. В свою очередь фронт регенерации распространялся по твердой мозговой оболочке к центральной зоне дефекта, но не перекрывал его полностью (рис.51,52).

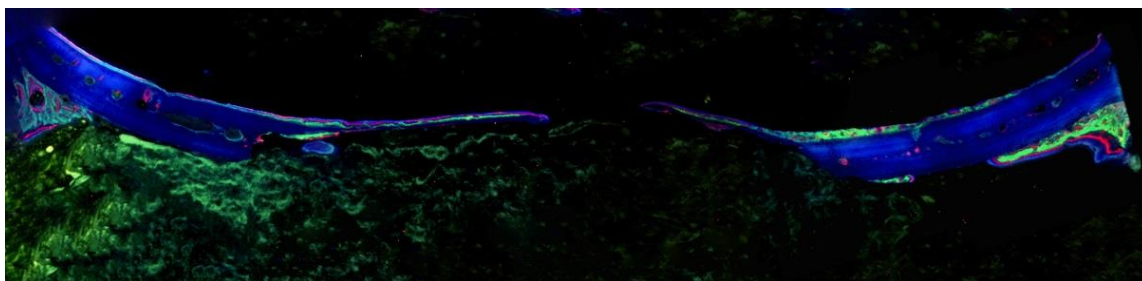


Рисунок 51. Мультиканальная гистопантограмма гистологического среза теменных костей крыс с разделным флуоресцентным окрашиванием через 28 дней после трепанации и установки КИ-ПОБ-ГА-Ал. X50

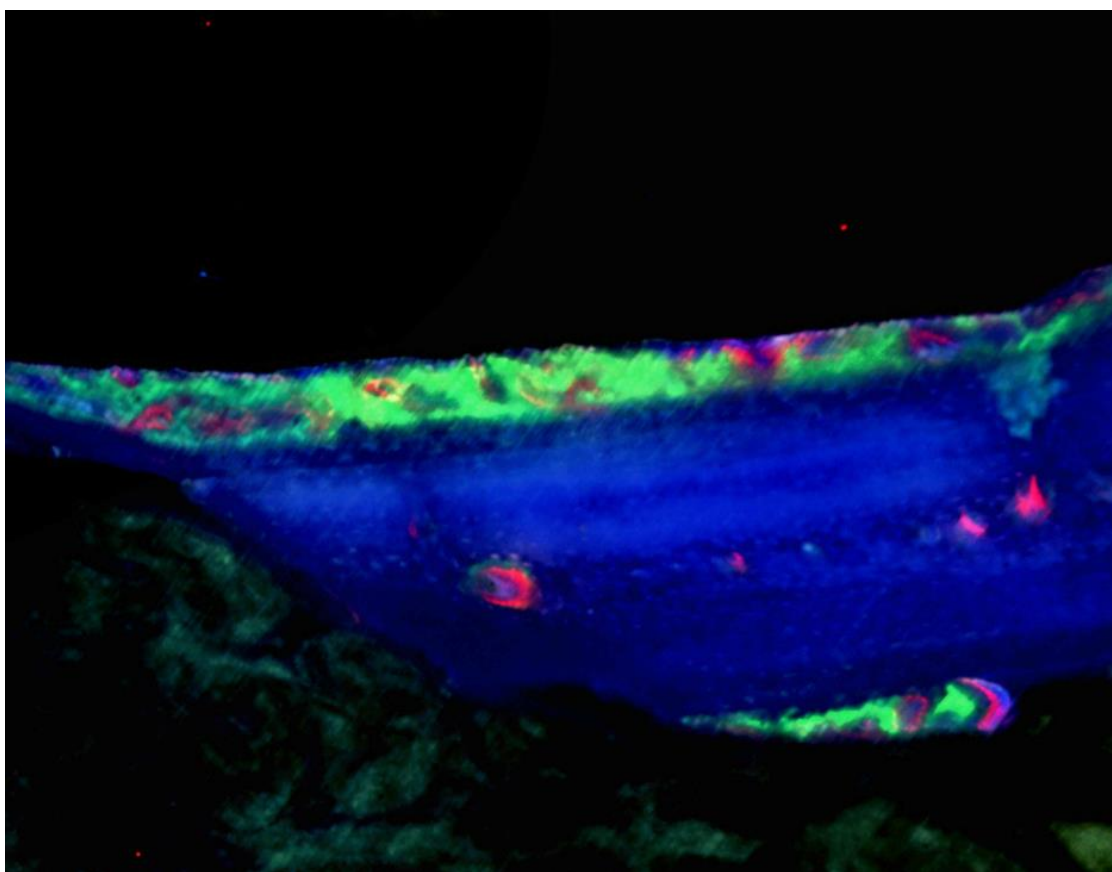


Рисунок 52. Распределение флюорохромов в новообразованной костной ткани теменных костей крыс через 28 дней после трепанации и установки КИ-ПОБ-ГА-Ал. Мультиканальное сложение изображений. X 100

Группа ПОБ/ГА/Алг + МСК

Световая микроскопия

При гистологическом изучении образцов костной ткани теменных костей черепа крыс через 28 дней после имплантации материала с нанесенным на него клеточной культурой выявлено что, костный регенерат состоит из преимущественно пластинчатой костной ткани, перекрывающей область дефекта от 63% до 92% процентов поперечника дефекта (рис.53-56).

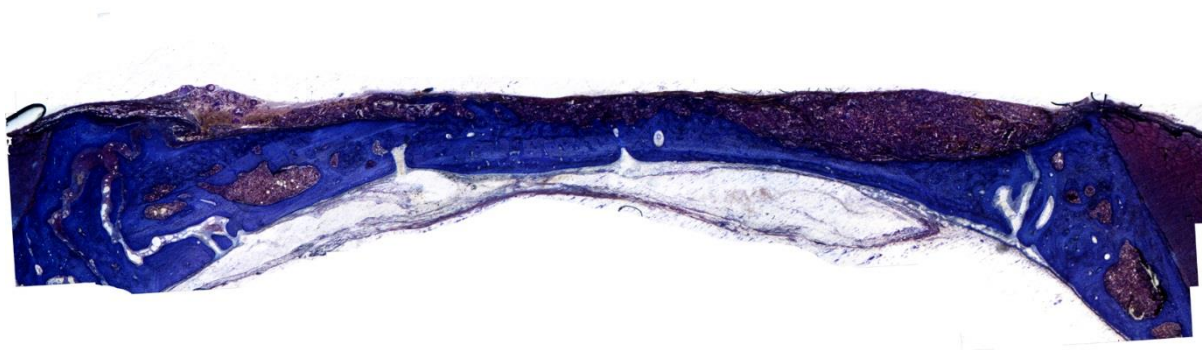


Рисунок 53. Исходный или «нулевой» срез (шлиф) теменных костей черепа крыс с клеточным трансплантатом, через 4 недели после трансплантации. Окраска небесный трихром. X50

Над костным регенератом располагается остеопластический материал с пористой структурой. Внутри пор обнаруживается рыхлая неоформленная соединительная ткань регенераторного типа с умеренной клеточностью (рис.54).

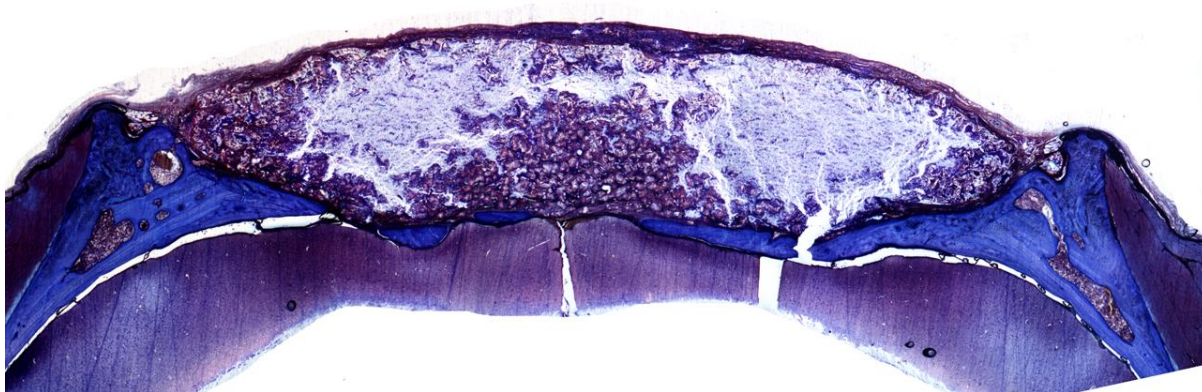


Рисунок 54. Срез (шлиф) из центральной области регенерата теменных костей черепа крыс с клеточным трансплантатом, через 4 недели после трансплантации. Окраска небесный трихром. X50

Костный регенерат неравномерен по толщине. Костный регенерат, прилежащий к материнской кости имеет тенденцию к постепенному утолщению к центральной части регенерата, превосходя толщиной исходную кость (рис.55). Смыкания фронтов регенерата над сагитальным синусом не происходило в большинстве случаев.

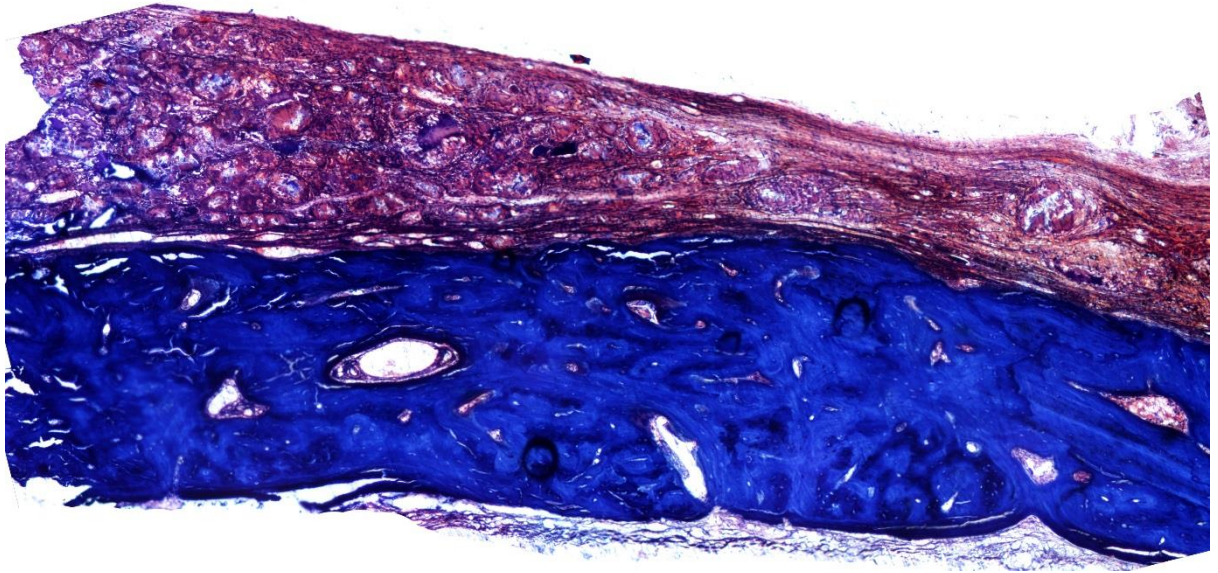


Рисунок 55. Срез (шлиф) из центральной области регенерата теменных костей черепа крыс с клеточным трансплантатом, через 4 недели после трансплантации. Костный регенер превышает толщину исходной кости. Окраска небесный трихром. X50

Структура костного регенерата представляла собой массив пластинчатой костной ткани с фолькмановскими и гаверсовыми каналами, внутри которых среди рыхлой волокнистой соединительной ткани обнаруживали сосуды различного калибра и степеней зрелости. На внутренней выстилке фолькмановских каналов, выявляли наслоения остеоида, пролиферацию остеобластов (рис.56).

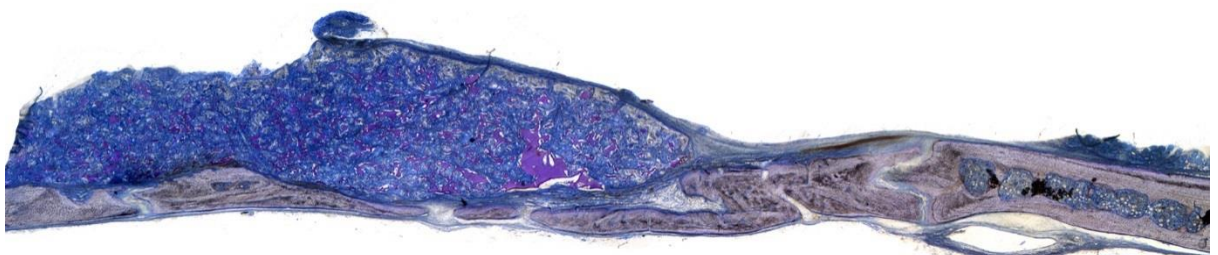


Рисунок 56. Срез (шлиф) из центральной области регенерата теменных костей черепа крыс с клеточным трансплантатом, через 4 недели после трансплантации. Окраска небесный трихром. X50

Твердая мозговая оболочка сохраняла свою структуру. Во всех случаях костный регенерат находился в тесном взаимодействии как с твердой мозговой оболочкой, так и с остеопластическим материалом.

Люминесцентная микроскопия

При моноканальной люминесцентной обзорной микроскопии костный регенерат представлял собой массив костной ткани с неравномерным люминесцентным свечением разной интенсивности, соответствующей всем трем введенным флуорохромам. Распределение свечению люминесцентных меток имело слоистый вид с участками сложной идентификации преимущественного накопления одного из введенных веществ (рис.57).

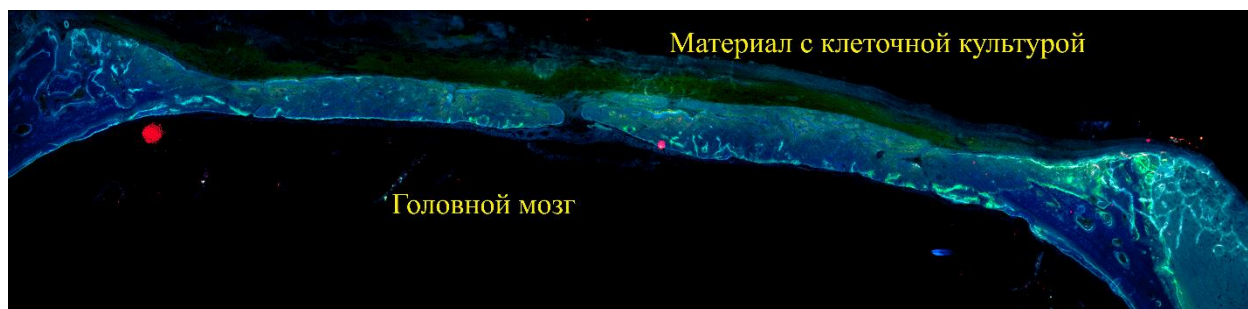


Рисунок 57. Мультиканальное люминисценное изображение костного регенерата. Гистопантограмма. Полное заполнение дефекта новообразованной костной тканью. X50

Мультиканальное исследование (сложение слоев) выявило различное накопление флуорохромов в костном матриксе в зависимости от сроков. Так накопление доксициклина, тетрациклина и ализарина четко определялось в массиве новообразованной кости (рис.58).



Рисунок 58. Мультиканальное люминисцентное изображение костного регенерата. Гистопантограмма. Почти полное заполнение дефекта новообразованной костной тканью. X50

Если накопление тетрациклина и доксициклина имело стертые границы, то костный массив содержащий ализариновый красный четко дифференцировался преимуществовал в данной исследовательской группе.

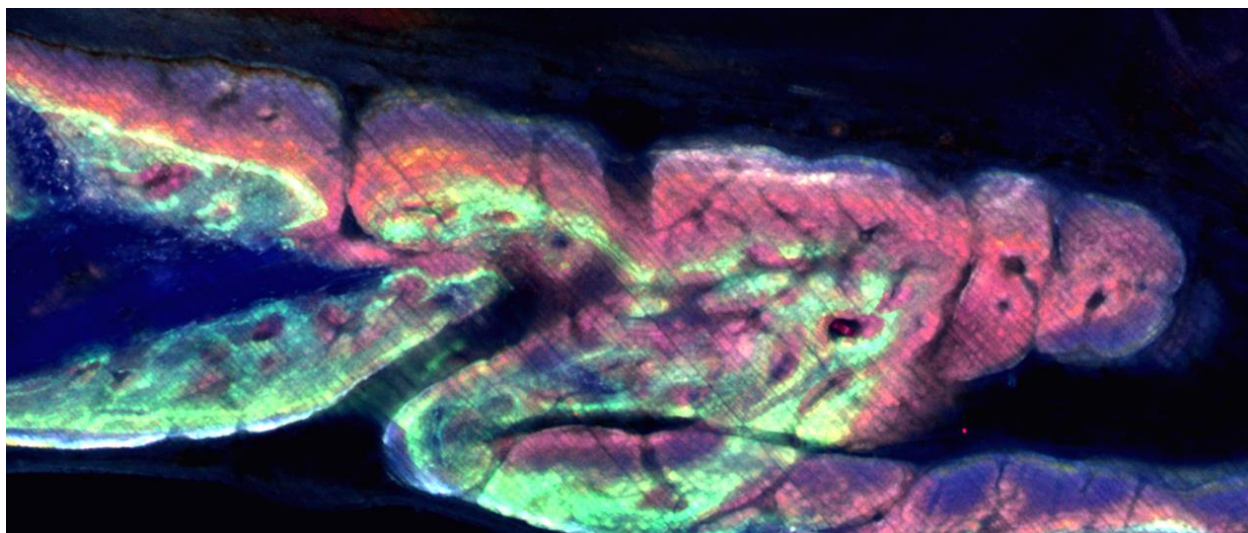


Рисунок 59. Раздельное окрашивание флюорохромами новообразованной костной ткани. Люминисцентная микроскопия. Мультиканальное изображений. x100

В свою очередь костное вещество, содержащее ализариновый красный преимуществовала в костном регенерате, что свидетельствует о нарастании интенсивности репаративного остеогенеза во второй и третьей декаде исследования (рис.59).

Морфометрическое исследование скорости образования костной ткани

При морфометрическом исследовании степени и скорости минерализации было выявлено, что наибольший объем минерализованной

костной ткани образовался в дефектах с 14 по 21 сутки. Максимальные показатели объема минерализованной костной ткани были в группе остеопластического материала с ПОБ-ГА-АЛГ (см. Табл 5).

Таблица № 5

	КИ-ПОБ	КИ-ПОБ-ГА-Алг.	МСК-ТИК	Ед. изм.
T.Ar	2,3±0,41	2,6±0,22	2,4±0,31	см ²
MAR _D	0,02±0,001	0,01±0,005	0,038±0,004	см ²
MAR _T	0,025±0,0014	0,04±0,002	0,021±0,003	см ²
MAR _A	0,015±0,0011	0,025±0,0026	0,029±0,002	см ²
Md.Ar _D	0,015±0,0034	0,022±0,0025	0,065±0,005	см ²
Md.Ar _T	0,021±0,003	0,017±0,0012	0,044±0,005	см ²
Md.Ar _A	0,018±0,001	0,023±0,0009	0,082±0,005	см ²
MFR ₀₋₁₄	114±12	144±21	388±19,5	мкм/сутки
MFR ₁₅₋₂₁	228±17	576±27	333,3±15,7	мкм/сутки
MFR ₂₂₋₂₈	133±10	355±22	483±14,7	мкм/сутки

Таким образом, при морфологическом исследовании выявлено, что стимуляция репаративного остеогенеза клеточным трансплантатом происходит на ранние сроки после трансплантации ткане-инженерной конструкции (ТИК). По сравнению с другими группами происходит как увеличение площади костного регенерата, образовавшегося за первые 14 суток (МСК-ТИК Md.Ar_D=0,065±0,005 см²), так и увеличение скорости прироста костной ткани (МСК-ТИК MFR₀₋₁₄=388±19,5 мкм/сут). Однако в последующем (с 15-21 сутки), скорость образования кости замедляется (МСК-ТИК MFR₁₅₋₂₁=333,3±15,7), что выражается в умеренной стабилизации площади новообразованной костной ткани на уровне 0,044±0,005 см² (МСК-ТИК Md.Ar_T). В последующем (с 22-28 день) скорость образования костной ткани после трансплантации ТИК увеличивается (МСК-ТИК MFR₂₂₋₂₈=483±14,7 мкм/сутки), что приводит образованию значительно массива костной ткани - площадь, занимаемая

новообразованной костной тканью в этот период (22-28 день) составляла $0,082 \pm 0,005 \text{ см}^2$.

Проводя сравнительный анализ между группами, выявлено что, трансплантация тканеинженерной конструкции (ТИК), содержащая клеточную культуру проявляла выраженную стимуляцию репаративного остогенеза с увеличением первичной площади, занимаемой костным регенератом на поверхности твердой мозговой оболочки. Последующее снижение скорости образования костни на значительной площади костного регенерата, может быть связано с временным истощением регенераторного потенциала новообразованной кости, с последующим восстановлением его и значительным ускорением образования костной ткани, за счет стимуляции со стороны трансплантата.

Заключение

Проблема травматизма является одной из основных тем научных разработок в челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии [Христофорандо Д.Ю., 2011; Левенец А.А., 2013]. Также наблюдается утяжеление характера и вида травм, в частности, повышение доли тяжелых переломов верхней челюсти, массивных разрушений средней зоны лица [Дубровин М.С., 2013; Лёвина К.С., 2014].

В России число больных с патологией челюстно-лицевой области и её сложность, особенно травматического происхождения, в настоящее время растет. Согласно данным Министерства Здравоохранения Российской Федерации количество больных с «Травматическими повреждениями, отравлениями и некоторые др. последствия воздействия» составило в 2015 году – 13 млн 299 тыс 691 человек, в 2016 году – 13 млн 086 тыс 966 человек.

Восстановление объёма и структуры альвеолярной кости челюстей после потери зубов является не менее актуальной и социально-значимой проблемой. Наиболее современным методом ортопедического лечения при частичной или полной потери зубов, является протезирование с использованием дентальных имплантатов. Достаточный объем кости не только обеспечивает условия для правильного позиционирования имплантатов, но и способствует в дальнейшем ремоделированию костной ткани под нагрузкой. Качество кости влияет на успех остеоинтеграции и, соответственно, на функциональную состоятельность дентальных имплантатов [Альфарио Ф.Э., 2006].

Восстановление костных дефектов сложной формы является непростой задачей. Дефекты и деформации в челюстно-лицевой области как правило имеют индивидуальное строение и для их восстановления требуются не просто остеопластические материалы, а костные имплантаты (КИ) повторяющие форму дефекта [Jardini A.L., 2014].

Создание сложных комбинированных остеопластических материалов или костных имплантатов с расширенными структурными и функциональными свойствами стало возможным благодаря развитию регенеративной медицины и инженерных направлений в биологии и медицине: биоинженерии (в частности, тканевой инженерии) и биотехнологии. Тканевая инженерия кости предлагает перспективные подходы для создания костезамещающих материалов и имплантатов с контролируемыми во времени остеоиндуктивными и остеогенными свойствами.

Актуальность развития инженерии костной ткани отражена в научной литературе, так при анализе баз данных по ключевым слов «инженерия костной ткани» (bone engineering) получены следующие данные: e-library.ru – 37 221 источника (статьи, патенты), <http://www.sciencedirect.com> – 84 508, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed> – 39 775, Google Scholar – 2 320 000, etc... .

Благодаря современному программному обеспечению, интегрирующему в себе возможность обработки данных компьютерной томографии и виртуального объёмного (3D) моделирования, у исследователей и клиницистов появилась возможность проводить компьютерное планирование реконструктивных операций и получать модели костных имплантатов полностью конгруэнтных воспринимающему ложе [Мураев А.А., Короткова Н.Л., 2013], т.е. процесс подготовки модели КИ для производства можно считать решённой задачей.

В данной работе описана тканеинженерная терапевтическая система для челюстно-лицевой хирургии, которая была разработана нами на основе созданных на прошлых этапах методах изготовления биокompозитных скэффолдов и метода введения в них МСК.

В работе были использованы следующие материалы: поли-3-оксибутират (ПОБ, $M = 147$ кДа), альгинат натрия (Сигма-Алдрич,

Германия), трихлорметан (EKOS-1, Russia), карбонат аммония (Химмед, Россия), сахароза (Химмед, Россия), гидроксиапатит (Сигма-Алдрич, Германия), стрэнг из полилактида для 3D печати методом послойного наплавления (температура плавления 200-255 °С, плотность 1,08-1,2 кг/м²), (Московский завод FDPlast, Россия).

Исследование включало три этапа. На первом этапе проведена разработка полимерного каркаса - матрикса из поли-3-оксибутирата (ПОБ и композита ПОБ/ГА), исследование его *in vitro* на цитотоксичность и способность поддерживать рост клеток и *in vivo* на мягкие ткани и бедренной кости крыс на биосовместимость. Затем на втором этапе были отработаны новые методики операции и проведено экспериментальное исследование критических дефектов на черепах крыс с применением матриксов из ПОБ. В итоге на третьем этапе проведено экспериментальное исследование критических дефектов на черепах крыс с применением костного каркаса из ПОБ совместно с МСК – тканеинженерной терапевтической системы.

На основании полученных ранее данных для изготовления тканеинженерной терапевтической системы для челюстно-лицевой хирургии был выбран скэффолд из ПОБ/ГА/АЛГ.

Для первой стадии изготовления биокompозитного скэффолда из ПОБ/ГА/АЛГ был использован разработанный ранее модифицированный метод выщелачивания, в котором использовались не один, а два вида порообразователя: карбонат аммония ((NH₃)₂CO₃) и сахароза (C₁₂H₂₂O₁₁) [Мураев А.А., Бонарцев А.П., Стамболиев И.А., 2016; Kuznetsova E.S., Zharkova I.I., 2016]. Все эксперименты проводили в стерильных условиях в ламинарном шкафу. Для создания пор, оптимальных для культивирования клеток, сахарозу и карбонат аммония просеивали через специальные лабораторные сита У1-ЕСЛ (Крафт, Россия) с тканью из сетки по ГОСТ 6613-86 и размером ячеек 40, 94 и 315 мкм: размер кристаллов карбоната

аммония составил 40-94 мкм, сахарозы – 94-315 мкм. Раствор ПОБ 65 мг/мл в трихлорметане добавляли к смеси карбоната аммония и сахарозы (1:3) до состояния смеси близкому к жидкой пасте. Для получения скэффолдов, содержащих гидроксиапатит (ГА), раствор ПОБ 65 мг/мл в трихлорметане диспергировали совместно с ГА в концентрации 6,5 мкг/мл, т.е. соотношение ГА к ПОБ составляло 1:10. Такое соотношение было выбрано на основании литературных данных и проведенных ранее исследований, как наименее токсичное для МСК и при этом придающая скэффолдам остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства [Blaker J.J., 2005; Huang Y.X., 2008].

Этой смесью заполняли форму, изготовленную ранее: 3D-форму. После испарения растворителя, форму погружали в горячую воду (~ 90 °C). На первой стадии метода двойного выщелачивания происходит термическое разложение карбоната аммония $((\text{NH}_4)_2\text{CO}_3 \rightarrow 2\text{NH}_3 + \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O})$ – при этом образуются поры меньшего диаметра. При взаимодействии с водой и небольшом нагревании карбонат аммония полностью разлагается с выделением аммиака и диоксида углерода, а сахароза переходит в водную фазу (вымывается). Процесс образования газов происходит довольно активно, поэтому пористость достигается не только в результате удаления порообразователя, но и за счет деформации полимера. После прекращения газообразования полученные матрицы удаляли из формы и промывали дистиллированной водой 5 по 30 мин на шейкере, воду меняли несколько раз до полного вымывания сахарозы. В результате данной методики мы получали трехмерные скэффолды с системой сообщающихся пор.

Морфологические характеристики матрикса на основе поли- 3-оксибутирата

Тип скэффолда	Пористость, %	Размер пор, мкм		Связность пор
		Макропоры	Микропоры	
С-ПОБ	93 ± 1	410 ± 75	23 ± 8	+
С-ПОБ/ГА	92 ± 1	365 ± 65	18 ± 7	+

Макропоры больше 300 мкм считаются оптимальным размером для проникновения питательных веществ и клеток во всем объеме матрикса [Karageorgiou V., Kaplan D., 2005].

Методики изготовления биокomпозитных скэффолдов описаны в статьях и тезисах конференций, опубликованных в рамках настоящего Проекта [Bonartsev A.P., Zharkova I.I., 2016; Мураев А.А., Бонарцев А.П., Стамболиев И.А., 2016; Kuznetsova E.S., Zharkova I.I., 2016].

Для введения МСК в биокomпозитные скэффолды, т.е. собственно для изготовления тканеинженерной конструкции была использована культура МСК крыс. МСК были выделены в нашей лаборатории из костного мозга 3-х дневных крысят. Для этого бедренные кости крысят были извлечены и очищены от мягких тканей в стерильных условиях. Эпифизы бедренных костей были отрезаны и костный мозг был извлечен путем промывания культуральной средой в объеме 5 мл при помощи шприца с иглой 27G. Извлеченные клетки инкубировали в среде DMEM (Dubecco's Modified EagleMedium, Invitrogen, США) с коллагеназой I типа (215 Ед/мг белка) 1 час при 37°C. После чего клетки центрифугировали 10 мин при 1000 об/мин и осадок собирали в пластиковом культуральном флаконе на 25 мл. Клетки обеих линий культивировали в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС) (FCS, Biological Industries, Israel), 100 МЕ/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Invitrogen, США). Клетки инкубировали в CO₂-инкубаторе MCO-15AC (Sanyo, Япония) при 37 °C в атмосфере, содержащей 5 % CO₂, среда меняли каждые 3 дня. Клетки снимали с подложки раствором трипсина (0,05 % трипсин (Биолаб, Россия) в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) (Serva, Germany) и подсчитывали с помощью гемоцитометра. Для эксперимента использовали МСК 3-его пассажа [Правдюк А.И., 2010].

Для введения МСК в матрикс были выбраны матриксы из ПОБ/ГА/АЛГ, в которых альгинатный гидрогель был использован в

качестве средства введения МСК в объем полимерного матрикса. Метод введения МСК в биокompозитные скэффолды заключался в том, что на стадии заполнения пористых скэффолдов из ПОБ/ГА/АЛГ, в скэффолды вводили МСК, предварительно помещенные в 1% альгинат натрия. Порошок альгината натрия (Сигма-Алдрич, Германия), стерилизованный в спирте и под ультрафиолетом, растворяли 6 часов при перемешивании на магнитной мешалке в физиологическом растворе в концентрации 1,5% в стерильных условиях в ламинарном шкафу. Затем готовили суспензию АЛГ с клетками в концентрации 200 000 клеток в 1 мл суспензии (итоговая концентрация альгината составила 1,0%). Полученной суспензией с помощью автоматической пипетки пропитывали полученные на первой стадии скэффолды ПОБ/ГА по 100 мкл (20 000 клеток) суспензии на один скэффолд. После пропитки удаляли лишний альгинат и заливали стерильным 50 мМ раствором CaCl_2 для полимеризации альгинатного гидрогеля, содержащего клетки. После инкубации в течение 3 минут в хлориде кальция, матриксы промывали в фосфатном буфере и затем помещали в среду для дальнейшего эксперимента.

Полученная тканеинженерная система была использована для исследования ее терапевтической эффективности на критическом дефекте костной ткани на лабораторных крысах *in vivo*.

Для исследования регенерации костей черепа наиболее показательной является модель критического дефекта свода черепа (теменной кости) у крысы [Spicer P.P., 2012], позволяющая получить воспроизводимые данные и сравнить их с многочисленными результатами других исследований [Kundu J., 2013; Ivanov S.Y., Bonartsev A.P., 2015], нами проведено *in vivo* исследование критических дефектов черепа крыс породы Wistar весом до 400 гр. В эксперимента были использованы 40 крыс, которые разделены на 4 групп по 10 животных в каждой группе.

В группе №1(контрольная) у оперированных крыс создан критический дефект 8мм и рана ушита наглухо. В группе №2 после создание критического дефекта имплантирован матрикс ПОб с АЛГ. Аналогично в группе №3 матрикс ПОб +АЛГ+ГА, в группе №4 матрикс ПОб +АЛГ+ГА +МСК.

Под внутривенным наркозом «Золетил 100» в дозировке 125 мкг/кг крысам производили поперечный и вертикальный латерально-смещённый разрез кожи головы, формируя треугольный лоскут и последовательно, тупым и острым путём обнажали теменные кости. Посередине сагиттального шва на теменных костях формировали круглое отверстие с помощью трепана C-reamer диаметром 8 мм из набора Neobiotech SLA (Корея), избегая перфорации сагиттального венозного синуса. Костный дефект заполняли изготовленным КИ, который отличался наполнением в каждой исследуемой группе. Рану послойно ушивали. Для оценки динамики неоостеогенеза на разных сроках проводили прижизненное тройное мечение новообразованной костной ткани тетрациклиновыми красителями. Мечение осуществляли по схеме 7-3-4-3-4-3-4 (три дня введения (раствор доксициклина; раствор тетрациклина; ализарин красный С) чередовались с четырехдневными перерывами) в дозировке 25 мг/кг массы тела. Через месяц (28 дней) крыс подвергали эфтаназии, материал отправляли на гистологическое исследование.

Основываясь на данных исследования гистологических срезов образцов костной ткани при помощи флуоресцентной микроскопии с отдельным окрашиванием флюорохромами было показано, что:

1 группа с гибридный матрикс из поли-3-оксибутирата и альгината обладает ограничительной функцией, обеспечивая условия для нормальной регенерации плоских костей черепа у крыс. Относительный объем восстанавливаемой костной ткани в дефекте теменной кости составлял в

среднем 27% (медиана), а соединительная ткань в свою очередь 73 % (медиана).

2 группа с гибридный матрикс из поли-3-оксибутирата, гидроксиапатита и альгината. Относительный объем, восстанавливаемой костной ткани в дефекте теменной кости составил в среднем 36% (медиана), а соединительная ткань в свою очередь 64 % (медиана).

3 группа с гибридный матрикс из поли-3-оксибутирата, гидроксиапатита и альгината с добавлением в состав матрикса мультипотентных стволовых клеток обеспечивает до 92% закрытие критического костного дефекта свода черепа у крысы с новообразованной костной ткани.

В рисунок (60,61) можно детально можно проследить площадь и скорость образования костной ткани у исследованных скаффолдах.

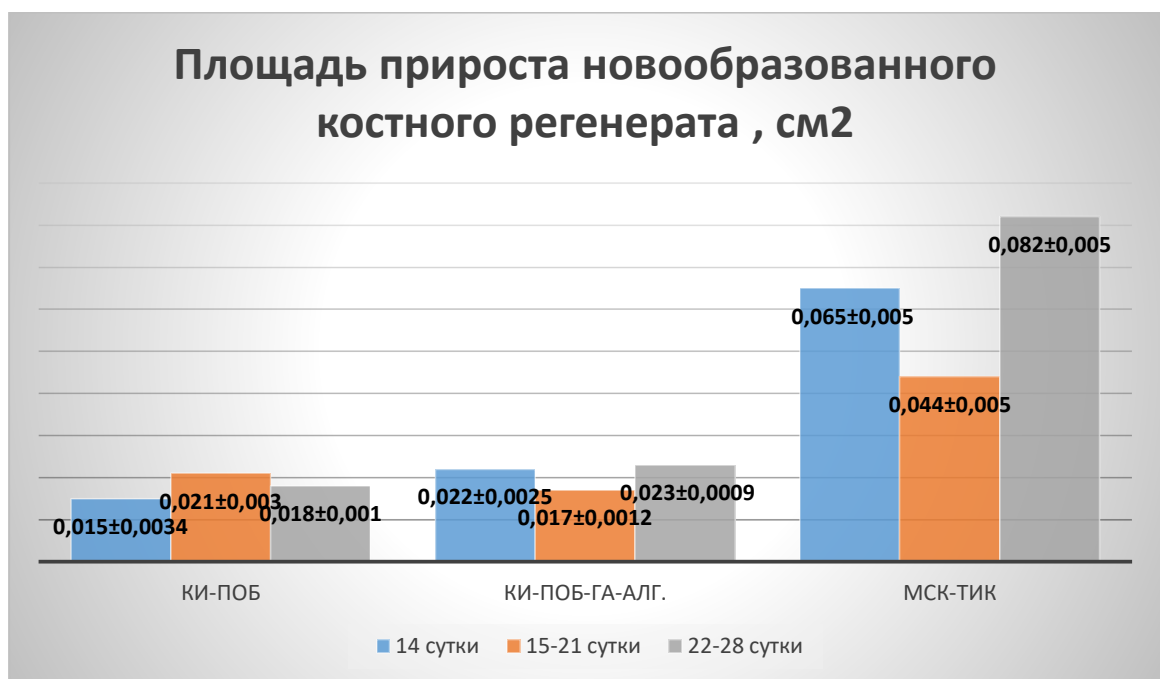


Рисунок 60. Площадь прироста новообразованного костного регенерата , см²

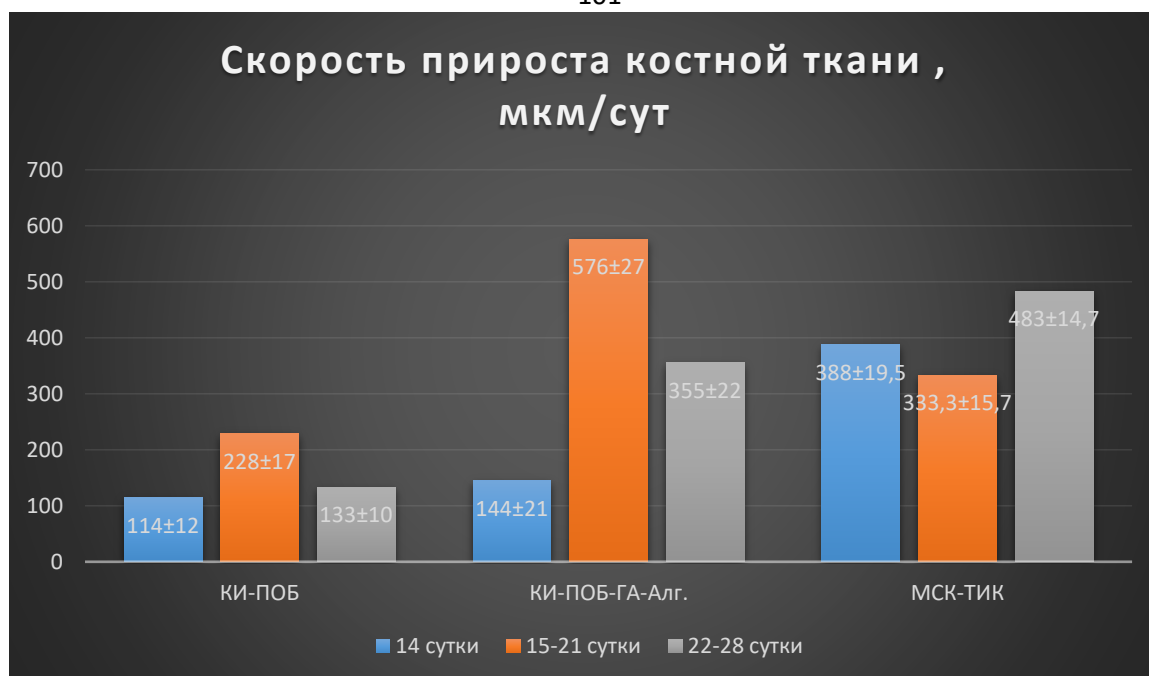


Рисунок 61. Скорость прироста костной ткани , мкм/сут

По сравнению с другими группами в 3-ой группе происходит как увеличение площади костного регенерата, образовавшегося за первые 14 суток (МСК-ТИК $Md.Ar_D=0,065\pm0,005 \text{ см}^2$), так и увеличение скорости прироста костной ткани (МСК-ТИК $MFR_{0-14}=388\pm19,5 \text{ мкм/сут}$). Однако в последующем (с 15-21 сутки), скорость образования кости замедляется (МСК-ТИК $MFR_{15-21}=333,3\pm15,7$), что выражается в умеренной стабилизации площади новообразованной костной ткани на уровне $0,044\pm0,005 \text{ см}^2$ (МСК-ТИК $Md.Ar_T$). В последующем (с 22-28 день) скорость образования костной ткани после трансплантации ТИК увеличивается (МСК-ТИК $MFR_{22-28}=483\pm14,7 \text{ мкм/сутки}$), что приводит образованию значительно массива костной ткани - площадь, занимаемая новообразованной костной тканью в этот период (22-28 день) составляла $0,082\pm0,005 \text{ см}^2$.

Проводя сравнительный анализ между группами, выявлено что, трансплантация тканеинженерной конструкции (ТИК), содержащая клеточную культуру проявляла выраженную стимуляцию репаративного

остогенеза с увеличением первичной площади, занимаемой костным регенератом на поверхности твердой мозговой оболочки.

Эксперимент соответствовал «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии с приказами МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и № 701 от 24.07.1978 г. и «Правилами лабораторной практики в Российской Федерации» от 2003 г.

Таким образом, была разработана и получена тканеинженерная терапевтическая система на основе скэффолда из композита ПОБ/ГА, заполненная альгинатным гидрогелем, содержащим МСК.

Выводы

1. На основании анализа специальной литературы, нами был выбран полимер поли-3-оксибутират (ПОБ), в качестве основы для простых и сложных костных матриксов, в том числе для заселения их мезенхимальными стволовыми клетками. ПОБ и его метаболиты являются нетоксичными, биосовместимыми.

2. Нами была разработана комплексная методика получения гибридных полимерных 3D-матриксов на основе ПОБ, заселенные МСК заданной формы и микроструктуры, включающая методы 3D-печати, двойного выщелачивания и создания гибридных полимерных конструкций.

3. Метод 3D-печати позволяет создавать форму для изготовления шаблонов для заполнения черепных дефектов не менее 5 мм в диаметре.

4. Метод двойного выщелачивания применим для изготовления матриксов, которые могут использоваться при заполнении костных дефектов произвольной формы.

5. Полученные матриксы представляют собой гибридную конструкцию из различных биосовместимых полимеров – поли-3-оксибутирата и альгината, в которой альгинат является гидрогелем-наполнителем твердого высокопористого матрикса из ПОБ.

6. Разработанные нами матриксы на основе ПОБ полностью резорбируются при подкожной имплантации без повреждения окружающих их мягких тканей, не отграничиваются фиброзной капсулой, подвергаются макрофагальной резорбции со скоростью 1 мм в неделю.

7. Основываясь на данных исследования гистологических срезов образцов костной ткани при помощи флуоресцентной микроскопии с раздельным окрашиванием флюорохромами было показано, что гибридный матрикс из поли-3-оксибутирата и альгината заселенный МСК обладает ограничительной функцией, обеспечивая условия для нормальной регенерации плоских костей черепа у крыс. Добавление в состав матрикса

мультипотентных стволовых клеток обеспечивает до 92% закрытие критического костного дефекта свода черепа у крысы.

Практические рекомендации

1. Для изучения и оценки скорости остеогенеза при восстановления критического костного дефекта черепа крыс следует применять флюоресцентные метки (доксциклин-тетрациклин-ализариновый красный), которые необходимо вводит в сроки 7-3-4-3-4-3-4 (три дня введения чередовались с четырехдневными перерывами). Это позволит при гистологическом исследованием визуализировать зонь роста и скорости формирования новообразованной костной ткани.

2. Для изготовления костных имплантатов сложной геометрической формы из ПОБ необходимо: Изготовить компьютерный 3D модель самого имплантата и 3D модель формы для отливки имплантатов при помощи программного обеспечения Horos Project-Free DICOM Medical Image Viewer , далее на 3D принтере напечатать 3D пресс-форму для отливки самого имплантата. Для добавления остеоиндуктивных свойств имплантата из ПОБ следует раствор ПОБ в трихлорметане диспергировать совместно с ГА в соотношение ГА к ПОБ 1:10.

3. Для придания остеогенных свойств имплантата из ПОБ следует заселят его МСК в количестве (200 000 клеток) на 1 мл объема.

4. Для фиксации клеток МСК на скэффолды из ПОБ рекомендовано использовать Альгинат натрия в виде удерживающего и препятствующего размывания клеток тканевой жидкостью.

Список сокращений

АЛГ – Альгинат

ВКМ – Внеклеточный костный матрикс

ГА – Гидроксиапатит

КИ – Костный имплант

КМП – Костные морфогенетические протеины

МСК – Мезенхимальные стволовые клетки

ОФРФ – Основной фактор роста фибробластов

ПОА – Поли-3-оксиалканоатов

ПОБ – Поли-3-оксибутират

ПОБВ – Поли-3-оксибутират-ко-3-оксивалератом

ПОБГк – Поли-3-оксибутират-ко-3-оксигексаноат

ПГБ – Поли-3-гидроксибутират

ПМК – Полимолочная кислота

СЭМ – Сканирующая электронная микроскопия

ТИК – Ткане-инженерной конструкции

VEGF-A/ФРЭС – Vascular endothelial growth factor/ фактор роста эндотелия сосудов

ХТТ – (2,3-бис-(2-метокси-4-нитро-5-сульфофенил)-2Н-тетразолиум-5-карбоксанилид)

Список литературы

1. Адгезия и рост мезенхимальных стволовых клеток костного мозга на трехмерных каркасах из поли (3-гидроксibuтирата) -поли (этиленгликоля) сополимера / А.П. Бонарцев [и др.] // Journal of Biomaterials and Tissue Engineering. – 2016. – Vol. 6, № 1. – P. 42-52.
2. Альфаро Ф.Э. Костная пластика в стоматологической имплантологии. Описание методик и их клиническое применение / Ф.Э. Альфаро ; пер. Е. Ханина, Р. Кононова. – Москва : Азбука, 2006. – 235 с.
3. Арутюнов С.Д. Прогностическая модель индивидуального гарантированного срока службы частичных съемных протезов / С.Д. Арутюнов, В.Г. Бутова, М.Р. Кириллина // Российский стоматологический журнал. – 2011. – № 2. – С. 36-39.
4. Бабкіна Т.М. Сучасні підходи до діагностики травм щелепно-лицьової області (Современные подходы к диагностике травм челюстно-лицевой области) [Электронный ресурс] / Т.М. Бабкіна, О.О. Демидова // Світ Медицини та Біології. – 2013. – Т. 41, № 4. – URL: <https://womab.com.ua/ua/>
5. Биодegradация и медицинское применение микробного поли (3-гидроксibuтирата) / А.П. Бонарцев [и др.] // Журнал Балканской трибологической ассоциации. – 2008. – Т. 14, № 3. – С. 359-395.
6. Биосинтез поли (3-гидроксibuтиратных) сополимеров *Azotobacter chroococcum* 7В: стратегия кормления предшественников / А.П. Бонарцев [и др.] // Препаративная биохимия и биотехнология. – 2017. – Т. 47, № 2. – С. 173-184.
7. Бычков А.И. Изучение остеиндуктивной активности рекомбинантного морфогенетического белка кости (rhBMP-2) в составе остеопластического материала на основе деминерализованного матрикса в эксперименте / А.И. Бычков, М.Э. Долинер, А.И. Ситдикова // Российская стоматология. – 2015. – Т. 8, № 1. – С. 15-17.

8. Валидация ХТТ-теста для оценки антипролиферативной активности препаратов на основе моноклональных антител / И.В. Лягозкин [и др.] // Биопрепараты, профилактика, диагностика, лечение. – 2015. – № 1. – С. 45-50.
9. Васильев А.В. Влияние опиоида периферического действия даларгина на клеточную пролиферацию костной *in vitro* и репаративную регенерацию костной ткани *in vivo* : автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.В. Васильев. – Москва, 2015. – 22 с.
10. Выбор условий криоконсервирования мезенхимальных стволовых клеток в суспензии и альгинатных микросферах на основе изучения их осмотических реакций в растворе 1 М ДМСО / Д.В. Тарусин [и др.] // Проблемы в криобиологии и криомедицины. – 2016. – Т. 26, № 2. – С. 133-144.
11. Гершов С.О. Анестезия грызунов [Электронный ресурс] / С.О. Гершов. – Москва : Ветклиника «Кобра», 2004. – URL: <http://www.cobravet.ru/bibl.htm#top>
12. Двухступенчатый метод выщелачивания для производства пористых 3D-лесов из поли (3-гидроксиалканоатов) / Е.С. Кузнецова [и др.] // Тезисы докладов 24-го Ежегодного Всемирного форума по передовым материалам (ПОЛИХАР), 9-13 мая 2016 г. – Познань, Польша, 2016. – плакат PS 4.5.
13. Дубровин М.С. Медико-социальные особенности больных с повреждениями челюстно-лицевой области / М.С. Дубровин, И.С. Копецкий, В.С. Полунин // Вестник Росздравнадзора. – 2013. – № 2. – С. 46-48.
14. Жаркова И.И. Матриксy из биосинтетического сополимера поли-3-оксибутирата с полиэтиленгликолем для инженерии костной ткани : дис. ... канд. мед. наук / И.И. Жаркова. – Москва, 2017. – 158 с.
15. Иванов С.Ю. Разработка системы дентальных имплантатов для

- реабилитации больных с полным отсутствием зубов / С.Ю. Иванов, В.Л. Параскевич // Хирург. – 2009. – № 3. – С. 16-30.
16. Изучение биологических свойств нового остеопластического материала на основе недеминерализованного коллагена, содержащего фактор роста эндотелия сосудов при замещении костных дефектов / А.А. Мураев [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2012. – № 1. – С. 21-26.
 17. Использование костно-пластического материала, содержащего фактор роста эндотелия сосудов, для сохранения объема альвеолярного гребня после удаления зубов / М.И. Кобозев [и др.] // Здоровье и образование. – 2016. – Т. 18, № 1. – С. 116-122.
 18. Керамические и костно-керамические имплантаты: перспективные направления / И.А. Кирилова [и др.] // Хирургия позвоночника. – 2013. – № 4. – С. 52-62.
 19. Кицул И.С. Прядки оказания медицинской помощи в контексте соблюдения новых требований к качеству и безопасности медицинской помощи / И.С. Кицул, Д.В. Пивень // Заместитель главного врача. – 2013. – № 5. – С. 58-64.
 20. Культивирование мезенхимальных стволовых клеток на поли (3-гидроксibuтирате) и его сополимере с поли (этиленгликолевыми) лесами / Е.С. Кузнецова [и др.] // Cell Technologies at the Edge: исследования и практика : материалы междунар. конф., 6-8 апр. 2016 г. - Санкт-Петербург, 2016. – плакат PS 1.-61. – С. 134-135.
 21. Левенец А.А. Челюстно-лицевой травматизм как социальная, экономическая и медицинская проблема / А.А. Левенец, Н.А. Горбач, Н.Н. Фокас // Сибирское медицинское обозрение. – 2013. – № 2. – С. 13-18.
 22. Лёвина К.С. Особенности травм челюстно-лицевой области, сочетающихся с закрытыми черепно-мозговыми травмами / К.С.

- Лёвина // Бюллетень медицинских Интернет-конференций. – 2014. – Т. 4, № 4. – С. 361.
23. Лососевая и клеточная система костных трансплантатов в тканевой инженерии (обзор) / Д.С. Кузнецова [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2014. – Т. 6, № 4. – С. 201-212.
24. Матрикс и микросферы из поли-3-оксибутирата для инженерии костной ткани [Электронный ресурс] / Д.В. Чеснокова [и др.] // Биотехнология: состояние и перспективы развития : материалы Международ. Форума, 23-25 мая 2018 г. – Москва, 2018. – URL: <https://istina.msu.ru/conferences/presentations/140605119/>
25. Механизмы терапевтической активности мультипотентных клеток при заболеваниях сердца / Т.Х. Фатхудинов [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. – № 4. – С. 183-192.
26. Новый метод окраски недекальцинированной костной ткани / А.В. Волков [и др.] // Клиническая и экспериментальная морфология. – 2016. – Т. 20, № 4. – С. 55-58.
27. Оптимизация метода планирования пластических операций в челюстно-лицевой области / А.А. Мураев [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2013. – Т. 5, № 3. – С. 57-61.
28. Перспективы лечения анемий клетками фетальной печени, иммобилизованными в макропористых альгинат-желатиновых носителях / Д.В. Грицай [и др.] // Теоретична медицина. – 2014. – Т. XIX, № 2. – С. 18-23.
29. Поли-3-оксибутират и биополимерные системы на его основе / А.П. Бонарцев [и др.] // Биомедицинская химия. – 2011. – Т. 57, Вып. 4. – С. 374-391.
30. Попков А.В. Биосовместимые имплантаты в травматологии и ортопедии (обзор литературы) / А.В. Попков // Гений Ортопедии. – 2014. – № 3. – С. 94-99.

31. Разработка и доклинические исследования изоляционных мембран на основе поли-3-гидроксibuтират-со-3-гидроксивалерата для регенерации кости [Электронный ресурс] / С.Ю. Иванов [и др.] // Biomed. Khim. – 2015. – Vol. 61, № 6. – P. 717-723. – URL: <https://doi.org/10.18097/PBMC20156106717>.
32. Разработка и доклинические исследования ортотопических костных имплантатов на основе гибридной конструкции из поли-3-оксибутирата и альгината натрия / А.А. Мураев [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2016. – Т. 4, № 8. – С. 42-50.
33. Разработка и исследование in vivo и in vitro остеопластического материала на основе гидроксиапатита, поли-3-гидроксibuтирата и альгината натрия / Ю.В. Гажва [и др.] // Современные технологии в медицине. – 2014. – Т. 6, № 1. – С. 6-13.
34. Разработка тканеинженерной терапевтической системы на основе гибридной конструкции из поли-3-оксибутирата с гидроксиапатитом, заполненной альгинатным гидрогелем, содержащим мезенхимальные стволовые клетки / И.А. Стамболиев [и др.] // Здоровье и образование в XXI веке. – 2018. – Т. 20, № 9. – С. 70-78.
35. Свойства мезенхимальных стромальных клеток человека при инкапсуляции в альгинатные микросферы / А.И. Правдюк [и др.] // Біотехнологія. – 2010. – Т. 3, № 2. – С. 62-70.
36. Современные методы реконструкции альвеолярного отростка верхней челюсти и альвеолярной части нижней челюсти при стоматологической имплантации / С.Ю. Иванов [и др.] // Новые технологии в стоматологии и имплантологии : сб. науч. тр. X Всерос. науч.-практ. конф. с международ. участ. – Москва, 2010. – С. 80-84.
37. Соков Л.П. Руководство по нейроортопедии / Л.П. Соков, Е.Л. Соков, С.Л. Соков. – Москва : РУДН, 2002. – 541 с.

38. Сравнение пролиферативной активности и фенотипа МСК, полученных из костного мозга, жировой ткани и пупочного канатика / А.А. Айзенштадт [и др.] // Вестник Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова. – 2015. – Т. 7, № 2. – С. 14-23.
39. Сравнительная характеристика методов оценки цитотоксических свойств биологических каркасов / Е.В. Куевда [и др.] // Гены & клетки. – 2017. – Т. XII, № 1. – С. 57-61.
40. Стволовые клетки в регенеративной медицине: достижения и перспективы / А.Н. Лызиков [и др.] // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. - Т. 45, № 3. – С. 4-8.
41. Тюкин Ю.В. Использование пористого политетрафторэтилена для замещения костных дефектов околоносовых пазух / Ю.В. Тюкин // Российская оториноларингология. – 2013. – № 1. – С. 204-207.
42. Христофорандо Д.Ю. Анализ распространенности, диагностики и лечения сочетанной черепно-лицевой травмы / Д.Ю. Христофорандо // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2011. – Т. 23, № 3. – С. 36-37.
43. Чернегов В.В. Использование биологически инертной корундовой керамики для устранения дефектов и деформации лицевого скелета (экспериментально-клиническое исследование) : автореф. дис. ... канд. мед. наук / В.В. Чернегов. – Санкт-Петербург, 2005. – 22 с.
44. Шумаков В.И. Биополимерные матриксы для искусственных органов и тканей / В.И. Шумаков, В.И. Севастьянов // Здравоохранение и медицинская техника. – 2003. – № 4. – С. 30-33.
45. Abou Taleb M.F. Radiation synthesis and characterization of sodium alginate/chitosan/ hydroxyapatite nanocomposite hydrogels: a drug delivery system for liver cancer / M.F. Abou Taleb, A. Alkahtani, S.K. Mohamed // Polym. Bull. – 2015. – Vol. 72, № 4. – P. 725-742.

46. A highly organized three-dimensional alginate scaffold for cartilage tissue engineering prepared by microfluidic technology / C.C. Wang // *Biomaterials*. – 2011. – Vol. 32. – P. 7118-7126.
47. Ammonium bicarbonate as porogen to make tetracycline-loaded porous bioresorbable membranes for dental guided tissue regeneration: failure due to tetracycline instability / C. Nublat [et al.] // *J. of Biomaterials Science, Polymer Edition*. – 2006. – Vol. 17, № 12. – P. 1333-1346.
48. Application of microbial polyesters-polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials / G.Q. Chen [et al.] // *Engineering Materials*. – 2005. – Vol. 437. – P. 288-289.
49. Ashman A. Ridge Preservation: Important Buzzwords in Dentistry / A. Ashman // *General Dentistry*. – 2000. – Vol. 48, № 3. – P. 304-312.
50. Attachment and Growth of Periodontal Cells on Smooth and Rough Titanium / D. Cochran [et al.] // *Int. J. Oral Maxillofac. Implants*. – 1994. – Vol. 9, № 3. – P. 289-297.
51. Baksh D. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy / D. Baksh, L. Song, R.S. Tuan // *J. Cell Mol. Med*. – 2004. – № 8. – P. 301-316.
52. Barry F.P. Biology and clinical applications of mesenchymal stem cells / F.P. Barry // *Birth Defects Res. Part C Embryo Today*. – 2003. – Vol. 69. – P. 250-256.
53. Barry F.P. Mesenchymal stem cell therapy in joint disease / F.P. Barry // *Novartis Found Symp*. – 2003. – Vol. 249. – P. 86-96.
54. Barry F.P. Mesenchymal stem cells: clinical applications and biological characterization / F.P. Barry, J.M. Murphy // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. – 2004. – Vol. 36. – P. 568-584.
55. Bhattarai N. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery / N. Bhattarai, J. Gunn, M. Zhang // *Adv. Drug Deliv. Rev*. – 2010. – Vol. 62, № 1. – P. 83-99.

56. Biodegradable and bioactive porous polymer/inorganic composite scaffolds for bone tissue engineering / K. Rezwan [et al.] // *Biomaterials*. – 2006. – Vol. 27, № 18. – P. 3413-3431.
57. Biomaterials for biofabrication of 3D tissue scaffolds / J. Kundi [et al.] // *Biofabrication. Micro- and nano-fabrication, printing, patterning and assemblies*. - Elsevier BV, 2013. – P. 23-46.
58. Biomaterials for Bone regeneration. Novel Techniques and application / Woodhead publishing series in biomaterials: Number 75 / ed. P. Dubruel, S.V. Vlierberghe. – Elsevier, Cambridge, UK, 2014. – 502 p.
59. Blomback B. Fibrinogen and fibrin-proteins with complex roles in hemostasis and thrombosis / B. Blomback // *Thromb. Res.* – 1996. – Vol. 83. – P. 1-75.
60. BMP-2, PDGF-BB, and bone marrow mesenchymal cells in a macroporous β -TCP scaffold for critical-size bone defect repair in rats / C. del Rosario1 [et al.] // *Biomed. Mater.* – 2015. – Vol. 10. – 045008.
61. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats / C. Maniopoulos [et al.] // *Cell and tissue research*. – 1988. – Vol. 254, № 2. – P. 317-330.
62. Bone healing and soft tissue contour changes following single-tooth extraction: A clinical and radiographic 12-month prospective study / L. Schropp [et al.] // *Int. J. Periodontics Restorative Dent.* – 2003. – Vol. 23. – P. 313-323.
63. Bone repair and augmentation using block of sintered bovine-derived anorganic bone graft in cranial bone defect model / T.M. Cestari [et al.] // *Clin. Oral Implants Res.* – 2009. – Vol. 20. – P. 340-350.
64. Bone tissue engineering / ed. J.O. Hollinger [et al.]. – CRC press, 2004.
65. Bremer F. In vitro studies of the mechanical load capability of resorbable monofilament suture materials / F. Bremer, N.C. Gellrich, M. Stiesch // *Schweiz Monatssch Zahnmed.* – 2009. – Vol. 119, № 9. – P. 876-880.

66. Bruder S.P. Growth kinetics, self-renewal, and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation / S.P. Bruder, N. Jaiswal, S.E. Haynesworth // J. Cell Biochem. – 1997. – Vol. 64. – P. 278-294.
67. Bruder S.P. Mesenchymal stem cells in bone development, bone repair, and skeletal regeneration therapy / S.P. Bruder, D.J. Fink, A.I. Caplan // J. Cell Biochem. – 1994. – Vol. 56. – P. 283-294.
68. Bryant S.J. Controlling the spatial distribution of ECM components in degradable PEG hydrogels for tissue engineering cartilage / S.J. Bryant, K.S. Anseth // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2003. – Vol. 64. – P. 70-79.
69. Burr D.B. Basic and applied bone biology / D.B. Burr, M.R. Allen. – Academic Press, 2013. – 392 p.
70. Cell-based approaches for bone graft substitutes / M. Attawia [et al.] // Bone Graft Substitutes / ed. C.T. Laurencin. - West Conshohocken, PA, ASTM International, 2003. – P. 126-141.
71. Cellular utilization determines viability and matrix distribution profiles in chondrocyte-seeded alginate constructs / H.K. Heywood [et al.] // Tissue Engineering. – 2004. – Vol. 10, № 9/10. – P. 1467-1479.
72. Chaisri P. Repetitive GlyLeu-Lys-Gly-Glu-Asn-Arg-Gly-Asp peptide derived from collagen and fibronectin for improving cell-scaffold interaction / P. Chaisri, A. Chingsungnoen, S. Siri // Appl. Biochem. Biotechnol. – 2015. – Vol. 175, № 5. – P. 2489-2500.
73. Characterization of a bovine collagen-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering / C.V. Rodrigues [et al.] // Biomaterials. – 2003. – Vol. 24. – P. 4987-4499.
74. Characterization of the cell response of cultured macrophages and fibroblasts to particles of short-chain poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] / B. Saad [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. – 1996. – Vol. 30, № 4. – P. 429.
75. Characterization of the collagen component of cartilage repair tissue of the

- talus with quantitative MRI: comparison of T2 relaxation time measurements with a diffusion-weighted double-echo steadystate sequence (dwDESS) / M. Kretzschmar [et al.] // *Eur. Radiol.* – 2015. – Vol. 25, № 4. – P. 980-986.
76. Chen R.R. Polymeric growth factor delivery strategies for tissue engineering / R.R. Chen, D.J. Mooney // *Pharmaceutical research.* – 2003. – Vol. 20. – № 8. – P. 1103-1112.
 77. Chondrogenic differentiation of mesenchymal stem cells from bone marrow: differentiation-dependent gene expression of matrix components / F. Barry [et al.] // *Exp. Cell Res.* – 2001. – Vol. 268. – P. 189-200.
 78. Collagen scaffolds with or without the addition of RGD peptides support cardiomyogenesis after aggregation of mouse embryonic stem cells / J. Dawson [et al.] // *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* – 2011. – Vol. 47, № 9. – P. 653-664.
 79. Cranial reconstruction: 3D biomodel and custom-built implant created using additive manufacturing / A.L. Jardini [et al.] // *J. of Cranio-Maxillo-Facial Surgery.* – 2014. – Vol. 42, № 8. – P. 1877-1884.
 80. Cultivation of fibroblasts in gelatin/glycosaminoglycans sponges for artificial skin / S.R. Hong [et al.] // *International symposium biomaterials and drug delivery systems, August 20-22. - Korea, 2000.* – P. 142.
 81. Culture expanded canine mesenchymal stem cells possess osteochondrogenic potential in vivo and in vitro / S. Kadiyala [et al.] // *Cell Transplant.* – 1997. – № 6. – P. 125-134.
 82. Dimitriou R. Current concepts of molecular aspects of bone healing / R. Dimitriou, E. Tsiridis, P.V. Giannoudis // *Injury.* – 2005. – Vol. 36, № 12. – P. 1392-1404.
 83. Drug-free chitosan coated poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles are active against trichomonas vaginalis and non-toxic towards pig vaginal mucosa / B. Pradines [et al.] // *Pharm. Res.* – 2015. – Vol. 32, № 4. – P. 1229-1236.

84. Effect of 3-hydroxyhexanoate content in poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on in vitro growth and differentiation of smooth muscle cells / X.H. Qu [et al.] // *Biomaterials*. – 2006. – Vol. 27, № 15. – P. 2944-2950.
85. Effect of composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on growth of fibroblast and osteoblast / Y.W. Wang [et al.] // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26. – P. 755-761.
86. Effect of composition of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on growth of fibroblast and osteoblast / Y.W. Wang [et al.] // *Biomaterials*. – 2005. – Vol. 26, № 7. – P. 755-761.
87. Effect of crosslinkers on physical properties of gelatin hollow tubes for tissue engineering application / C.-H. Chiu [et al.] // *World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering*, Sept. 7-12. – Munich, Germany : Springer Berlin Heidelberg, 2009. – P. 293-296.
88. Effect of dual treatment with SDF-1 and BMP-2 on ectopic and orthotopic bone formation / L. Chang-Hwan [et al.] // *Plos One*. – 2015. – Vol. 10, № 3. – P. 1-15.
89. Effect of dual treatment with SDF-1 and BMP-2 on ectopic and orthotopic bone formation / C.H. Lee [et al.] // *PLos One*. – 2015. – Vol. 10, № 3. – e0120051.
90. Effects of different sterilization methods on the morphology, mechanical properties and cytotoxicity of chitosan membranes used as a wound dressing / P.R. Marreco [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2004. – Vol. 71B, № 2. – P. 268-277.
91. Enhancing the vaskularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres / A. Peters [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2003. – Vol. 65A, № 4. – P. 489-498.
92. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect /

- P.P. Spicer [et al.] // *Nat Protoc.* – 2012. – Vol. 7, № 10. – P. 1918-1929.
93. Experimental study on the construction of small three-dimensional tissue engineered grafts of electrospun poly-epsilon-caprolactone / G.C. Zhu [et al.] // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2015. – Vol. 26, № 2. – P. 112.
 94. Fluorescently labeled mesenchymal stem cells (MSCs) maintain multilineage potential and can be detected following implantation into articular cartilage defects / J. Quintavalla [et al.] // *Biomaterials.* – 2002. – Vol. 23. – P. 109-119.
 95. Friedenstein A.J. The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells / A.J. Friedenstein, R.K. Chailakhjan, K.S. Lalykina // *Cell Proliferation.* – 1970. – Vol. 3, № 4. – P. 393-403.
 96. Fugazzotto P.A. Treatment options following single-rooted tooth removal: A literature review and proposed hierarchy of treatment selection / P.A. Fugazzotto // *J. Periodontol.* – 2005. – Vol. 76. – P. 821-831.
 97. Gelatin-based resorbable sponge as a carrier matrix for human mesenchymal stem cells in cartilage regeneration therapy / M.S. Ponticiello [et al.] // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2000. - Vol. 52, № 2. – P. 246-255.
 98. Griffith L.G. WTEC Panel on Tissue engineering research, Final report / L.G. Griffith // *Biomaterials. Chapter 2* / L.V. McIntire [et al.]. – 2002. – P. 711.
 99. Growth factors in bone repair / V. Devescovi [et al.] // *Chir. Organi. Mov.* – 2008. – Vol. 92. – P. 161-168.
 100. Guided Bone Regeneration in Long-Bone Defects with a Structural Hydroxyapatite Graft and Collagen Membrane / T. Guda [et al.] // *Tissue Eng. Part A.* – 2013. – Vol. 17-18. – P. 1879-1888.
 101. Guo S.Z. Properties of polylactide inks for solvent-cast printing of three-dimensional freeform microstructures / S.Z. Guo, M.C. Heuzey // *Therriault D. Langmuir.* – 2014. – Vol. 30, № 4. – P. 1142-1150.

102. Handbook of histology methods for bone and cartilage / ed. H.A. Yuehuei, L.M. Kylie. – Springer Science + Business Media, 2003. – 588 p.
103. Highly elastic and suturable electrospun poly(glycerolsebacate) fibrous scaffolds / E.M. Jeffries [et al.] // *Acta Biomater.* – 2015. – Vol. 18. – P. 30-39.
104. Hollister S.J. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints / S.J. Hollister, R.D. Maddox, J.M. Taboas // *Biomaterials.* – 2002. – Vol. 23, № 20. – P. 4095-4103.
105. Hollister S.J. Porous scaffold design for tissue engineering / SJ. Hollister // *Nat. Mater.* – 2005. – Vol. 4. – P. 518-524.
106. Hou Q. Porous polymeric structures for tissue engineering prepared by a coagulation, compression moulding and salt leaching technique / Q. Hou, D.W. Grijpma, J. Feijen // *Biomaterials.* – 2003. – Vo. 24, № 11. – P. 1937-1947.
107. How do absorbable sutures absorb? A prospective double-blind randomized clinical study of tissue reaction to polyglactin 910 sutures in human skin / B.T. Cartmill [et al.] // *Orbit.* – 2014. – Vol. 33, № 6. – P. 437-443.
108. Hutmacher D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage / D.W. Hutmacher // *Biomaterials.* – 2000. – Vol. 21. – P. 2529-2543.
109. In vitro culture of cells from respiratory mucosa on foils of collagen, poly-L-lactide (PLLA) and poly-3-hydroxy-butyrate (PHB) / J. Ostwald [et al.] // *Laryngorhinootologie.* – 2003. – Vol. 82, № 10. – P. 693-699.
110. In vitro cytotoxicity testing of polycations: influence of polymer structure on cell viability and hemolysis / D. Fischer [et al.] // *Biomaterials.* – 2003. – Vol. 24, № 7. – P. 1121-1131.
111. In vivo bone engineering in a rabbit femur / J.A. Fialkov [et al.] // *J. Cranoifac. Surg.* – 2003. - Vol. 14, № 3. – P. 324-332.
112. In vivo studies of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) based polymers: biodegradation and tissue reactions / X.H. Qu [et al.] //

- Biomaterials. – 2006. – Vol. 27, № 19. – P. 3540-3548.
113. Incipient analysis of mesenchymal stem-cell-derived osteogenesis / L.F. Cooper [et al.] // J. Dent. Res. – 2001. – Vol. 80. – P. 314-320.
 114. Ingénierie tissulaire osseuse en chirurgie buccale et maxillo-faciale : applications cliniques / C. Sylvain [et al.] // Med. Buccale Chir. Buccale. – 2010. – Vol. 16. – P. 227-237.
 115. Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering / R. Jin [et al.] // Biomaterials. – 2009. – Vol. 30. – P. 2544-2551.
 116. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering / H. Yoshikawa [et al.] // J. R. Soc. Interface. – 2009. - № 6, Suppl. 3. – P. S341-348.
 117. Interplay between processing and performance in chitosan-based clay nanocomposite films / K. Grigoriadi [et al.] // Polym. Bull. – 2015. – Vol. 72, № 5. – P. 1145-1161.
 118. Intraoperative handling and wound healing: controlled clinical trial comparing coated VICRYL plus antibacterial suture (coated polyglactin 910 suture with triclosan) with coated VICRYL suture (coated polyglactin 910 suture) / H.R. Ford [et al.] // Surg. Infect. (Larchmt). – 2005. – Vol. 6, № 3. – P. 313-321.
 119. Jeffers J.R. Ceramic-on-ceramic bearings in hip arthroplasty: state of the art and the future / J.R. Jeffers, W.I. Walter // J. Bone Joint Surg. Br. – 2012. – Vol. 94, № 6. – P. 735-745.
 120. Jeong C.G. A comparison of the influence of material on in vitro cartilage tissue engineering with PCL, PGS, and POC 3D scaffold architecture seeded with chondrocytes / C.G. Jeong, S.J. Hollister // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31. – P. 4304-4312.
 121. Karageorgiou V. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis / V. Karageorgiou, D. Kaplan // Biomaterials. – 2005. – Vol. 26-27. – P. 5474-5491.

122. Kim B.-S. Biomaterials for tissue engineering / B.-S. Kim, C.E. Baez, A. Atala // *World J. Urol.* – 2000. – Vol, 18, № 4. – P. 2-9.
123. Lace R. Biomaterials for ocular reconstruction / R. Lace, C. Murray-Dunning, R. Williams // *J. Mater. Sci.* – 2015. – Vol. 50, № 4. – P. 1523-1534.
124. Lateral ridge augmentation by the use of grafts comprised of autologous bone or a biomaterial. An experiment in the dog / M.G. Araujo [et al.] // *J. Clin. Periodontal.* – 2002. – Vol. 29. – P. 1122-1131.
125. Lavik E. Tissue engineering: current state and perspectives / E. Lavik, R. Langer // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* – 2004. – Vol. 65. – P. 1-8.
126. Liebschner M.A.K. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone / M.A.K. Liebschner // *Biomaterials.* – 2004. – Vol. 25, № 9. – P. 1697-1714
127. Malafaya P.B. Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications / P.B. Malafaya, G.A. Silva, R.L. Reis // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 2007. – Vol. 59. – P. 207-233.
128. Manufacturing and characterization of 3-d hydroxyapatite bone tissue engineering scaffolds / T.M. Chu [et al.] // *Ann. N Y Acad. Sci.* – 2002. – Vol. 961. – P. 114-117.
129. Maquet V. Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation / V. Maquet, R. Jerome // *Porous materials for tissue engineering : materials Science Forum* / ed. Dean-Mo Liu, Vivek Dixit). – 1997. – Vol. 250. – P. 15-42.
130. Maxillary ridge augmentation with custom-made CAD/CAM scaffolds. A 1-year prospective study on 10 patients / F. Mangano [et al.] // *J. Oral. Implantol.* – 2014. – Vol. 40, № 5. – P. 561-569.
131. Mechanically anisotropic PDLA. Bioglass composite foams as scaffolds for bone tissue engineering / J.J. Blaker [et al.] // *Acta Biomater.* – 2005. –

- № 1. – P. 643-652.
132. Mechanobiology of skeletal regeneration / D.R. Carter [et al.] // Clin. Orthop. 1998. – Vol. 355. – P. S41-S55.
 133. Meinig R.P. Clinical use of resorbable polymeric membranes in the treatment of bone defects / R.P. Meinig // Orthop. Clin. North Am. – 2010. – Vol. 41, № 1. – P. 39-47.
 134. Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects / F. Gao [et al.] // Cell Death and Disease. – 2016. – № 7. – P. 358.
 135. Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration / S.P. Bruder [et al.] // Clin. Orthop. – 1998. – Vol. 355. – P. S247-S256.
 136. Mimicked bioartificial matrix containing chondroitin sulphate on a textile scaffold of poly(3-hydroxybutyrate) alters the differentiation of adult human mesenchymal stem cells / M.I. Wollenweber [et al.] // Tissue Eng. – 2006. – Vol. 12, № 2. – P. 345-359.
 137. Ming X. In vivo antibacterial efficacy of MONOCRYL plus antibacterial suture (Poliglecaprone 25 with triclosan) / X. Ming, M. Nichols, S. Rothenburger // Surg. Infect. (Larchmt). – 2007. – Vol. 8, № 2. – P. 209-214.
 138. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici [et al.] // Cytotherapy. – 2006. – Vol. 8, № 4. – P. 315-317.
 139. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies / P.A. Zuk [et al.] // Tissue Eng. – 2001. – Vol. 7. – P. 211-228.
 140. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells / M.F. Pittenger [et al.] // Science. – 1999. – Vol. 284. – P. 143-147.
 141. Muschler G.F. Connective tissue progenitors: practical concepts for clinical applications / G.F. Muschler, R.J. Midura // Clin. Orthop. – 2002. – Vol. 395. – P. 66-80.
 142. Nam Y.S. A novel fabrication method of macroporous biodegradable polymer scaffolds using gas foaming salt as a porogen additive / Y.S. Nam,

- J.J. Yoon, T.G. Park // J. of biomedical materials research. – 2000. – Vol. 53, № 1. – P. 1-7.
143. N-terminal domain of Bombyx mori fibroin mediates the assembly of silk in response to pH decrease / Y.X. He [et al.] // J. Mol. Biol. – 2012. – Vol. 418, № 3-4. – P. 197-207.
 144. Optimal aspiration volume of vertebral bone marrow for use in spinal fusion / J.W. Hustedt [et al.] // Spine J. – 2013. – № 13(10). – P. 1217-1222.
 145. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro / N. Jaiswal [et al.] // J. Cell Biochem. – 1997. – Vol. 64. – P. 295-312.
 146. PHB/ PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering / C. Ye [et al.] // Biomaterials. – 2009. – Vol. 30. – P. 4401-4406.
 147. Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow / Y. Jiang [et al.] // Nature. – 2002. – Vol. 418. – P. 41-49.
 148. Poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) based tissue engineering matrices / G.T. Kose [et al.] // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2003. – Vol. 14. – P. 121-126.
 149. Poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) promoted production of extracellular matrix of articular cartilage chondrocytes in vitro / Y. Deng [et al.] // Biomaterials. – 2003. – Vol. 24, № 23. – P. 4273-4281.
 150. Pre-clinical models for oral and periodontal reconstructive therapies / G. Pellegrini [et al.] // J. Dent. Res. – 2009. – Vol. 88, № 12. – P. 1065-1076.
 151. Preparation and characterization of biodegradable poly3-hydroxybutyrate–starch blend films / S. Godbole [et al.] // Bioresource technology. – 2003. – Vol. 86, № 1. – P. 33-37.
 152. Preparation and in vitro in vivo characterization of polyelectrolyte alginate–chitosan complex based microspheres loaded with verapamil hydrochloride for improved oral drug delivery / X.-Z. Zhang [et al.] // J. Incl. Phenom.

- Macrocycl. Chem. – 2015. – Vol. 81, № 3-4. – P. 429-440.
153. Preparation and properties of poly(lactide-co-glycolide) (PLGA)/nano-hydroxyapatite (NHA) scaffolds by thermally induced phase separation and rabbit MSCs culture on scaffolds / Y.X. Huang [et al.] // J. Biomater. Appl. – 2008. – Vol. 22, № 5. – P. 409-432.
154. Prevention of postoperative tendon adhesion by biodegradable electrospun membrane of poly(lactide-coglycolide) / Z. Song [et al.] // Chinese J. of Polymer Science. – 2015. – Vol. 33, № 4. – P. 587-596.
155. Quantification of various growth factors in different demineralized bone matrix preparations / B. Wildemann [et al.] // J. of biomedical materials research. Part A. – 2007. – Vol. 81, № 2. – C. 437-442.
156. Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications / J.O. Hollinger [et al.] // J. Bone Joint Surg. Am. – 2008. – Vol. 90. – P. 48-54.
157. Reddi A.H. Morphogenetic messages are in the extracellular matrix: biotechnology from bench to bedside / A.H. Reddi // Biochem. Soc. Trans. – 2000. – Vol. 28. – P. 345-349.
158. Reddi A.H. Role of morphogenetic proteins in skeletal tissue engineering and regeneration / A.H. Reddi // Nat. Biotechnol. – 1998. – Vol. 16, № 3. – P. 247-252.
159. Ricard-Blum S. The collagen family / S. Ricard-Blum // Cold Spring Harb Perspect Biol. – 2011. – Vol. 3, № 1. – aa004978.
160. Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response / B.D. Boyan [et al.] // Biomaterials. – 1996. – Vol. 17, № 2. – P. 137-146.
161. Shishatskaya E.I. A comparative investigation of biodegradable polyhydroxyalkanoate films as matrices for in vitro cell cultures / E.I. Shishatskaya, T.G. Volova // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2004. – Vol. 15, № 8. – P. 915-923.
162. Simpson A.H.R.W. The role of growth factors and related agents in

- accelerating fracture healing / A.H.R.W. Simpson, L. Mills, B. Noble // JBJS (Br). – 2006. – Vol. 88, № 6. – P. 701-705.
163. Studies of in situ forming hydrogels by blending PLA-PEG-PLA copolymer with silk fibroin solution / T. Zhong [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2012. – Vol. 100. – P. 1983-1989.
 164. Surface modification of poly(hydroxybutyrate) films to control cell-matrix adhesion / T. Pompe [et al.] // Biomaterials. – 2007. – Vol. 28, № 1. – P. 28-37.
 165. Sutherland M.W. The tetrazolium dyes MTS and XTT provide new quantitative assays for superoxide and superoxide dismutase / M.W. Sutherland, B.A. Learmonth // Free radical research. – 1997. – Vol. 27, № 3. – P. 283-289.
 166. Synthetic Polymer Scaffolds for Stem Cell Transplantation in Retinal Tissue Engineering / Jing Yao [et al.] // Polymers. – 2011. – № 3. – P. 899-914.
 167. The application of poly(3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyhexanoate) scaffolds for tendon repair in the rat model / W.R. Webb [et al.] // Biomaterials. – 2013. – Vol. 34. – P. 6683-6694.
 168. The chondrogenic potential of human bone-marrow-derived mesenchymal progenitor cells / J.U. Yoo [et al.] // J. Bone Jt. Surg. Am. – 1998. – Vol. 80. – P. 1745-1757.
 169. The differential effects of aligned electrospun PHBHHx fibers on adipogenic and osteogenic potential of MSCs through the regulation of PPARgamma signaling / Y. Wang [et al.] // Biomaterials. – 2012. – Vol. 33. – P. 485-493.
 170. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects / S.P. Bruder [et al.] // J. Bone Jt. Surg. Am. – 1998. – Vol. 80. – P. 985-996.
 171. The effect of microwave treatment on the drug release property of gelatin microspheres / K.F. Chou [et al.] // The 15-th International Conference on Biomedical Engineering. Springer International Publishing. – 2014. – P.

726-729.

172. The impact of polyglycolide membrane on a tendon after surgical rejoining. A histological and histomorphometric analysis in rabbits / H. Pihlajamäki [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2007. – Vol. 81, № 4. – P. 987-993.
173. 3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications S.C. Cox [et al.]. – Elsevier, 2014. – Vol. 47. – 247 p.
174. 3D scaffolds with different stiffness but the same microstructure for bone tissue engineering / G. Chen [et al.] // ACS applied materials & interfaces. – 2015. – Vol. 7, № 29. – P. 15790-15802.
175. Three step derivation of cartilage like tissue from human embryonic stem cells by 2D-3D sequential culture in vitro and further implantation in vivo on alginate/PLGA scaffolds / H.Y. Bai [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. – 2010. – Vol. 94, № 2. – P. 539-546.
176. Tract embolization with gelatin sponge slurry for prevention of pneumothorax after percutaneous computed tomographyguided lung biopsy / A. Tran [et al.] // Cardiovasc. Intervent Radiol. – 2014. – Vol. 37, № 6. – P. 1546-1553.
177. Veis A. Reversible transformation of gelatin to the collagen structure / A. Veis, J. Cohen // Nature. – 1960. – Vol. 186. – P. 720-721.
178. Vertebral body replacement with a bioglass-polyurethane composite in spine metastases – clinical, radiological and biomechanical results / M. Schulte [et al.] // Eur. Spine J. – 2000. – Vol. 9, № 5. – P. 437-444.
179. Vertebral body replacement with a ceramic prosthesis for metastatic spinal tumors / N. Hosono [et al.] // Spine. – 1995. – Vol. 20, № 22. – P. 2454-2462.
180. Vioque A. Transformation of cyanobacteria / A. Vioque // Transgenic microalgae as green cell factories / A. Vioque. – New York : Springer, 2007. – P. 12–22.

181. Widmark G. Mandibular bone graft in the anterior maxilla for single-tooth implants. Presentation of surgical method / G. Widmark, B. Andersson, C.J. Ivanoff // J. Oral Maxillofac. Surg. – 1997. – Vol. 26. – P. 106-109.
182. Williams A.R. Mesenchymal Stem Cells Biology, Pathophysiology, Translational Findings, and Therapeutic Implications for Cardiac Disease / A.R. Williams, J.M. Hare // Circ. Res. – 2011. – Vol. 109, № 8. – P. 923-940.
183. Wozney J.M. Biology and clinical applications of rhBMP-2 / J.M. Wozney // Tissue engineering: Applications in maxillofacial surgery and periodontics / ed. S.E. Lynch, R.J. Genco, R.E. Marx. – Chicago : IL Quintessence Publishing, 1999. – P. 103-124.
184. Wozney J.M. Bone morphogenetic protein and bone morphogenetic protein gene family in bone formation and repair / J.M. Wozney, V. Rosen // Clin. Orthop. – 1998. – № 346. – P. 26-37.
185. Yang X. Effect of surface treatment on the biocompatibility of microbial polyhydroxyalkanoates / X. Yang, K. Zhao, G.Q. Chen // Biomaterials. – 2002. – Vol. 23, № 5. – P. 1391-1397.
186. Yang Y. Craniofacial defect regeneration using engineered bone marrow mesenchymal stromal cells / Y. Yang, B. Hallgrimsson, E.E. Putnins // J. Biomed. Mater. Res. – 2011. – Vol. A 99. – P. 74-85.
187. Yoo J.U. The role of osteochondral progenitor cells in fracture repair / J.U. Yoo, B. Johnstone // Clin. Orthop. – 1998. – Vol. 355. – P. S73-S81.
188. Пат. 6391625 Biochip and method for patterning and measuring biomaterial of the same / J.K. Park, T.H. Kim. – США, 2002.