

Федеральное государственное автономное образовательное учреждение
высшего образования «Российский университет дружбы народов имени Патриса
Лумумбы»

На правах рукописи

Фидаров Асланбек Феликсович

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
ОСТЕОПЛАСТИЧЕСКОГО СТОМАТОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА
«БАК-1000» В СОЧЕТАНИИ С АУТОЛОГИЧНЫМИ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТВОЛОВЫМИ КЛЕТКАМИ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.1.7 – Стоматология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
Орлов Андрей Алексеевич,
доктор медицинских наук, профессор

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	4
Актуальность исследования	4
Теоретическая и практическая значимость работы	8
Методология и методы исследования	9
Основные положения, выносимые на защиту	9
Степень достоверности результатов	10
Апробация научной работы	10
Публикации по теме исследования данной работы в научной печати	10
Личный вклад автора	11
Объем и структура диссертации	11
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	13
1.1. Osteoplastic materials: current state of the problem	13
1.2. Историческая справка	13
1.3. Механизмы заживления костных дефектов и материалы для их восполнения	15
1.4. Биологические аспекты костного репаративного процесса: первичное и вторичное заживление костных переломов	17
1.5. Регенерация костной ткани в различных топографических зонах	18
1.6. История развития метода культивирования мезенхимальных стволовых клеток	19
1.7. Osteoplastic materials, artificial bone	21
1.8. Синтетические заменители кости	26
1.9. Заменители кости на основе керамики	27
1.10. Мезенхимальные стволовые клетки	32
1.11. 3D-принтинг	34
Заключение по обзору литературы	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	39
2.1. Общее положение, методологическое пособие	39
2.2. Дизайн эксперимента	41
2.3. Методика получения аутологичных ангиоиндуцированных MSC из жировой ткани	41
Выделение мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани	41
2D-культивирование MSC	42
3D-культивирование MSC	43

Характеристика культур клеток	45
2.4. Протокол экспериментальной операции	50
2.5. Послеоперационные мероприятия	51
2.6. Методика гистологического исследования	52
2.7. Статистические методы	53
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	54
3.1. I группа – контрольная, имплантация «Бак-1000»	54
3.2. II группа – опытная, имплантация «БАК-1000» в комбинации с ангиоиндуцированными МСК	64
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ.....	82
ВЫВОДЫ	90
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	91
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	92
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	93

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования

Актуальной проблемой современной имплантологии остается разработка материалов и методов восстановления целостности костной ткани при возникновении ее дефектов вследствие травмы, патологических процессов воспалительно-деструктивной или опухолевой природы. Таким образом, представляется чрезвычайно важным изучение условий костной регенерации, которая осуществляется на основе физиологических процессов, присущих этой ткани в норме и при патологии.

Одним из таких механизмов является индукция восстановления костной ткани после ее повреждения при сохранении структурной и функциональной состоятельности благодаря пролиферации клеток-предшественниц и их последующей дифференцировке в остеобластическом направлении [42].

В ряде работ предлагались различные методики с использованием комплексных материалов, которые обладают способностью индуцировать образование кости. Например, Hotz и Herr описали использование кальций-фосфатной керамики в сочетании с костным морфогенетическим белком в качестве одного из перспективных направлений разработки материалов с остеоиндуктивным эффектом [14,105,105].

Однако, по мере накопления информации о том, как происходит остеогистогенез на различных этапах онтогенеза, начиная с антенатального периода, представления о базовых механизмах, лежащих в основе этого комплексного процесса, включающего в себя ангиогенез и остеогенетическую дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (МСК), подверглись значительным изменениям. Brandi, M. L. и Collin-Osdoby, P. или Street John et al. [172]. В последние годы эта идея получила современное дефинитивное оформление и адекватную доказательную базу [119].

На основании вышесказанного можно судить об актуальности поставленных задач как с точки зрения проблем теоретической медицины, так и

практики применения комплексных имплантационных материалов, используемых для восполнения обширных, длительно незаживающих костных дефектов челюстно-лицевой области [7,163]

Важным аспектом проблемы остается обоснованность выбора остеопластического материала, который претерпевает комплекс превращений в тканевой среде в результате активного биогенного взаимодействия с компонентами местных защитно-приспособительных реакций организма. По информации в немногочисленных литературных источниках известно, что мезенхимальные стволовые клетки могут быть индуцированы в нескольких направлениях, в том числе – ангиогенном. Известно, что ангиогенез является ключевым фактором остеорегенерации, обеспечивающим поступление необходимых для метаболизма костной ткани молекул. Однако, отсутствуют исследования и методики, объединяющие в себе применение остеопластического материала и МСК.

Существует большое количество исследований, посвященных подбору имплантационного материала в модели дефекта кости, однако для заживления критических дефектов до сих пор не было разработано оптимальной методики. Несмотря на достаточно успешное применение различных видов остеопластических материалов в клинической имплантологии при закрытии небольших костных дефектов, использование «БАК-1000» для этой цели представляет большой практический интерес в плане повышения вариативности и эффективности остеорегенерации. Не менее интересным остается раскрытие механизмов взаимодействия между апатитосиликатным материалом и МСК.

С означенных позиций представляется актуальной тема исследования нового малоизученного остеопластического стоматологического материала «БАК-1000» в комбинации с МСК в составе разработанной 3D-биоинженерной конструкции с целью решения конкретных клинических задач. Отечественных работ по анализу остеогистогенеза при имплантации 3D-конструкций подобного состава явно недостаточно.

Важным аспектом проблемы остается обоснованность выбора остеопластического материала, который претерпевает комплекс превращений в

тканевой среде в результате активного биогенного взаимодействия с компонентами местных защитно-приспособительных реакций организма. По информации в немногочисленных литературных источниках известно, что мезенхимальные стволовые клетки могут быть индуцированы в нескольких направлениях, в том числе – ангиогенном. Известно, что ангиогенез является ключевым фактором остеорегенерации, обеспечивающим поступление необходимых для метаболизма костной ткани молекул. Однако, отсутствуют исследования и методики, объединяющие в себе применение остеопластического материала и МСК.

Существует большое количество исследований, посвященных подбору имплантационного материала в модели дефекта кости, однако для заживления критических дефектов до сих пор не было разработано оптимальной методики. Несмотря на достаточно успешное применение различных видов остеопластических материалов в клинической имплантологии при закрытии небольших костных дефектов, использование «БАК-1000» для этой цели представляет большой практический интерес в плане повышения вариативности и эффективности остеорегенерации. Не менее интересным остается раскрытие механизмов взаимодействия между апатитосиликатным материалом и МСК.

С означенных позиций представляется актуальной тема исследования нового малоизученного остеопластического стоматологического материала «БАК-1000» в комбинации с МСК в составе разработанной 3D-биоинженерной конструкции с целью решения конкретных клинических задач. Отечественных работ по анализу остеогистогенеза при имплантации 3D-конструкций подобного состава явно недостаточно.

Цель исследования:

Отработка техники устранения критического дефекта кости для восстановления ее целостности при помощи 3D-биоинженерной конструкции на основе ангиостимулированных аутологичных мезенхимальных стволовых клеток подкожно-жировой ткани и биосовместимого остеокондуктивного апатитосиликатного стоматологического композита «БАК-1000».

Задачи исследования:

1. Разработать технику устранения дефекта кости при помощи 3D-биоинженерной конструкции на основе индуцированных в ангиогенном направлении МСК на апатитосиликатной матрице биосовместимого стоматологического композита «БАК-1000».

2. Провести морфологическую оценку остеогистогенеза и ангиогенеза в месте имплантации комплексного апатитосиликатного стоматологического композита «БАК-1000».

3. Провести морфологическую оценку остеогистогенеза и ангиогенеза в периимплантационных тканях после имплантации комплексного апатитосиликатного стоматологического композита «БАК-1000» в комбинации с аутологичными МСК со специфическим ангиостимулирующим действием.

4. Провести морфометрическую оценку степени биорезорбции апатитосиликатного матрикса имплантата «БАК-1000» и «БАК-1000» в комбинации с ангиоиндуцированными МСК.

Научная новизна исследования

1. Впервые при замещении дефекта кости критического размера была разработана и применена 3D-биоинженерная конструкция на основе индуцированных в ангиогенном направлении мезосфероидов и остеопластического материала – прототип васкуляризованного биотрансплантата.

2. Впервые проведено сравнительное исследование эффективности применения биоинженерной конструкции, заселенной индуцированными в ангиогенном направлении мезосфероидами и не заселенной. Показана их высокая эффективность в отношении стимуляции ангиогенеза с образованием большого количества кровеносных сосудов, преимущественно капиллярного типа, а также умеренное увеличение активности остеогистогенеза.

3. Впервые были исследованы тканевые ответы на внедренную 3D-биоинженерную конструкцию: обнаружили разрушение материала импланта с формированием вокруг него костного ободка и признаки активного ангиогенеза.

4. Впервые в качестве имплантационного материала в модели критического диастаза кости апробирован биосовместимый апатитосиликатный стоматологический композит «БАК-1000».

5. Разработанный метод получения VEGF-индуцированных мезосфероидов активно может применяться для 3D-печати поврежденных тканей и органов в трансплантологии.

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость работы заключается в том, что полученные результаты исследования взаимодействия 3D-биоинженерной конструкции на основе ангиоиндуцированных МСК спериимплантационными тканями имеют значение при выборе оптимального имплантационного материала при повреждении костной ткани в результате ее атрофии, травмы, патологических процессов воспалительно-деструктивной или опухолевой природы. В совокупности, полученные данные позволяют более глубоко изучить механизмы формирования костной ткани и компенсаторно-приспособительных реакций периимплантационной ткани.

Результаты исследования дополняют представления об ангиогенезе и зависимом от него остеогистогенезе, индуцированных имплантацией ангиоиндуцированных МСК на апатитосиликатной матрице, определен спектр структурных и функциональных изменений костной ткани и ее микроокружения.

Доказана эффективность индукции ангиогенеза мезенхимальными стволовыми клетками, стимулирующей остеогистогенез. На основании результатов проведенного морфологического исследования этих взаимосвязанных процессов после имплантации разработанной биоинженерной конструкции выявлено частичное восстановление костной ткани и активное образование новых кровеносных сосудов.

Практическая значимость работы состоит в том, что результаты проведенного исследования структурно-функциональных изменений костной ткани, имплантированного материала и периимплантационной ткани, а также разработанный метод 3D-культивирования ангиоиндуцированных МСК на

матрице апатитосиликатного композита могут быть использованы при выборе оптимальной методики замещения костного диастаза при лечении атрофии костной ткани, ее травмы или ложных суставов в хирургической стоматологии, имплантологии, челюстно-лицевой хирургии и травматологии. Созданная 3D-конструкция за счет ангиоиндуцированных МСК оказалась высокоэффективна в отношении стимуляции ангиогенеза и репаративной регенерации костной ткани.

Методология и методы исследования

Методология исследования базировалась на традиционных теоретических и практических методологических принципах. Был проведен анализ специализированной литературы с целью достижения качества полученных результатов и составления дизайна исследования.

Исследование проводилось на крысах породы Спрег-Доули (n=48) в модели критического дефекта бедренной кости. Фрагменты кости фиксировали в забуференном формалине, дальнейшее гистологическое исследование проводили по стандартной методике. Применение гистологического метода с окраской гематоксилином и эозином позволило оценить морфологические особенности процессов в кости в норме, в имплантационном ложе и периимплантационной ткани.

Основные положения, выносимые на защиту

В опытах на лабораторных животных (крысах линии SD) подобрана экспериментальная модель критического дефекта бедренной кости. Для восстановления данного дефекта:

1. Разработан метод получения VEGF индуцированных сфероидов из 3D культуры мезенхимных стромальных клеток подкожной жировой ткани.

2. Создана 3D- биоинженерная экспериментальная конструкция, состоящей из биоактивного материала «апатитосиликатный стоматологический композит БАК-1000» и сфероидов, индуцированных в ангиогенном направлении.

Данная экспериментальная конструкция предложена для восстановления критических дефектов костной ткани, применение которой в свою очередь позволит увеличить эффективность методов лечения.

Степень достоверности результатов

Достоверность полученных результатов была обусловлена проведением исследования на достаточном количестве лабораторных животных – крыс породы Спрег-Доули (n=48) и анализом специализированной литературы, который позволяет обосновать и оценить актуальность выбранной темы и степень ее изученности. Использованный материал и выбранные методы соответствуют поставленным целям и задачам. Гистоморфологический анализ проводили на современном сертифицированном лабораторном оборудовании.

Апробация научной работы

Результаты исследования доложены и обсуждены на XXIV Международной научной конференции студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов» (Москва, 2017); VIII Конференция молодых ученых РМАНПО с международным участием «Горизонты медицинской науки» (Москва, 2017).

Диссертация апробирована 29 мая 2025 года (№ 0300-УСП-9) на заседании кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы».

Публикации по теме исследования данной работы в научной печати

По теме диссертационного исследования опубликовано 4 научные работы. Все научные издания рекомендованы ВАК при Министерстве науки и образования РФ для публикации основных научных результатов диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук.

Публикации в изданиях, рекомендованных Перечнями ВАК

1. Морфофункциональные особенности остеорегенерации через два месяца после имплантации "БАК-1000" в комбинации с ангиостимулированными

мезенхимальными стволовыми клетками / Г. А. Демяшкин, С. Ю. Иванов, Г. К. Нуруев, **А. Ф. Фидаров**, В. В. Чуев, А. А. Чуева, М. А. Вадюхин, Ф. Н. Бондаренко // **Стоматология для всех**. – 2022. – № 4(101). – С. 34-38. – DOI 10.35556/idr-2022-4(101)34-38.

2. Морфофункциональные особенности остеорегенерации через четыре месяца после имплантации "БАК-1000" в комбинации с ангиостимулированными МСК / Г. А. Демяшкин, С. Ю. Иванов, А. А. Орлов, И. Н. Сабурин, Г. К. Нуруев, **А. Ф. Фидаров**, М. А. Вадюхин, Ф. Н. Бондаренко // **Проблемы стоматологии**. – 2022. – Т. 18, № 3. – С. 114-118. – DOI 10.18481/2077-7566-2022-18-3-114-118.

3. Современные материалы применяемые при репаративной регенерации костной ткани челюстно-лицевой области / Демяшкин Г. А., **Фидаров А. Ф.**, Иванов С. Ю., Орлов А. А. // **Проблемы стоматологии**. – 2024. – Т. 20, № 3. – С. 5-13. - DOI 10.18481/2077-7566-2024-3-5-13.

4. Особенности репаративной регенерации костной ткани в зоне имплантации «БАК-1000» в комбинации с ангиостимулированными МСК / Демяшкин Г. А., **Фидаров А. Ф.**, Иванов С. Ю., Орлов А. А. // **Проблемы стоматологии**. – 2024. – Т. 20, № 3. – С. 98-102. – DOI 10.18481/2077-7566-2024-20-3-98-102.

Личный вклад автора

Автор данной работы принимал непосредственное участие на всех ее этапах. Автором проведен анализ литературного обзора по данной проблематике, на основании чего разработана сама идея диссертации ее план и дизайн. Автор учувствовал во всех экспериментах, проводимых как *invitro*, так и *in vivo*. Кроме того, автором проведена работа по сбору и интерпретации данных полученных результатов.

Объем и структура диссертации

Материалы диссертации изложены на 117 страницах машинописного текста. Диссертация состоит из введения, 4 глав (обзор литературы, материалы и методы,

результаты собственных исследований и их обсуждение), выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 207 источника, из которых 40 отечественных, 167 зарубежных. Работа проиллюстрирована 4 таблицами, 53 рисунками.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Osteopластические материалы: современное состояние проблемы

Одной из ключевых проблем в современной ортопедической стоматологии и челюстно-лицевой хирургии является создание и совершенствование новых имплантационных материалов, не вызывающих негативные реакции в окружающих тканях. С момента принятия решения о целесообразности широкого применения титановых имплантатов появлялись многочисленные работы, посвященные изучению механизмов взаимодействия и совершенствованию имплантационных материалов и устройств, а также имплантатов типа искусственная кость с прилежащими тканями, однако единого идеального решения данной проблемы до сих пор не было разработано [26].

«Категории мертвой и живой материи рассматриваются в современной науке как два кардинальных, непрерывно сопутствующих друг другу, постоянно взаимодействующих друг с другом, диалектически единых и в тоже время противоположных компонента перманентно развивающейся вселенной» [10]. Именно сложность и многообразие эффектов взаимодействия «живого» и «мертвого» является ключевой, по-прежнему не решенной, проблемой современной имплантологии.

1.2. Историческая справка

Проблема замещения дефекта костной ткани всегда представлялась в высшей степени актуальной и обуславливала активный поиск материалов, эффективно восстанавливающих целостность кости в случае возникновения ее дефектов травматического, воспалительного или опухолевого генеза.

В частности, в челюстно-лицевой хирургии и оториноларингологии широкое применение получили костные ауто трансплантаты (аутогравты) или имплантаты из биоматериалов. Их использование диктуется необходимостью как функционального замещения утраченного органа или ткани, так и сохранения его эстетических характеристик.

Наиболее ранние упоминания о попытках трансплантации костного материала от недавно умерших людей в обширные незаживающие костные дефекты датируются пятым столетием нашей эры [137]

Первые публикации, посвященные клиническим наблюдениям за больными с костными трансплантатами, приходятся на середину девятнадцатого столетия и принадлежат Louis Leopold Ollier, который описывал результаты применения алло- и аутокостных трансплантатов в обширных дефектах костной ткани. Вплоть до второй половины двадцатого столетия они оставались, по существу, единственным материалом, используемым для замещения костных дефектов с удовлетворительной степенью эффективности [68]. В исторической специализированной литературе встречаются упоминания о попытках замещения костной ткани при помощи дерева, слоновой кости [20,52].

Впервые методика хирургического замещения дефекта кости искусственным материалом была описана в конце девятнадцатого столетия и была связана с применением гипса ($\text{CaSO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$), больше известного, как "парижская повязка", а согласно справочной литературе – сульфат кальция. Он характеризуется высокой биосовместимостью и, как правило, не оказывает местного токсического действия [117].

В следующие десятилетия сульфат кальция все в большей степени стал вытесняться кальций фосфатами [53]. Именно это направление исследований послужило началом внедрения искусственных остеопластических материалов в клиническую практику.

Прежде, чем приступить к анализу основных направлений развития исследований по разработке остеопластических материалов, теоретических данных и практических решений на пути поиска и разработки оптимальных методик, необходимо остановиться на ряде основополагающих положений учения о репаративной регенерации. Таким образом, многие функциональные особенности костных имплантационных материалов и их синтетических заменителей становятся понятными в контексте современных представлений о механизмах

регенерации, как о необходимой составляющей жизнедеятельности кости как в норме, так и при патологии.

1.3. Механизмы заживления костных дефектов и материалы для их восполнения

Переломы представляют собой наиболее частые травматические повреждения костей скелета. Их заживление – это постнатальный регенеративный процесс, который повторяет в определенной степени многие онтологические события эмбрионального развития костной ткани. И хотя в процессе заживления переломов она в большинстве случаев восстанавливается в своем клеточном составе и биомеханической функции до уровня, предшествующего травме, тем не менее, в 10% случаев кость не восстанавливается полностью. В связи с этим, проблема адекватного заживления переломов без осложнений представляется важной и по-прежнему остается актуальной как в теории, так и в практике [4,16].

По современным представлениям, в основе механизмов регенерации костной ткани лежат как генетические, так и эпигенетические факторы. Предполагается, что одни и те же группы генов контролируют фетальные и постнатальные процессы остеогистогенеза, при этом события, происходящие после рождения, оказывают непосредственное влияние на течение процесса регенерации этой ткани [64].

Ведущую роль в регенеративных механизмах играют такие субстраты как костный морфогенетический белок (BMP) [88], фактор роста фибробластов (FGF), инсулиноподобный фактор роста (IGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), β -трансформирующий фактор роста (TGF- β) и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF) [182]. Эти факторы обычно депонированы в экстрацеллюлярном матриксе, клетках и α -гранулах тромбоцитов и высвобождаются после травматизации [35].

В естественных условиях этот процесс протекает индивидуально, однако применяемые в лечебных целях протетические устройства могут снижать интенсивность выделения перечисленных факторов роста. В условиях клиники это

требует дополнительного введения препаратов этого типа, в том числе рекомбинантных [51].

Одной из наиболее популярных концепций, трактующих базовые механизмы репаративной регенерации кости, является "сосудистая", где сосудистому и биомеханическому факторам отводится ключевая роль (Рис. 1) [38, 63, 142]. С нашей точки зрения такой подход оправдан, так как структурные и функциональные превращения в костной ткани непосредственно связаны с испытываемыми ею нагрузками и, в частности, с направлением силовых эпюр [162,90].

Приведенная модель устанавливает связь с возможными вариантами регенерации кости в зависимости от подвижности отломков, которая может вызывать нарушение неоваскуляризации. В этом случае происходит образование «аваскулярной» ткани, то есть хряща. После ее образования наступает стабилизация отломков, в условиях которой происходит прорастание микрососудов в эту ткань, а повышенное трофическое обеспечение (при участии цитокинов и металлопротеиназ, осуществляющих деградацию хрящевого матрикса) создает оптимальные условия для дифференцировки привлеченных в область повреждения МСК в остеобласты, начинающие синтезировать костный матрикс [64]. Такой механизм регенерации является наиболее комплексным и системно описывает факторы, воздействующие на костную ткань, с учетом генетически детерминированных локальных реакций см. Рис 1.

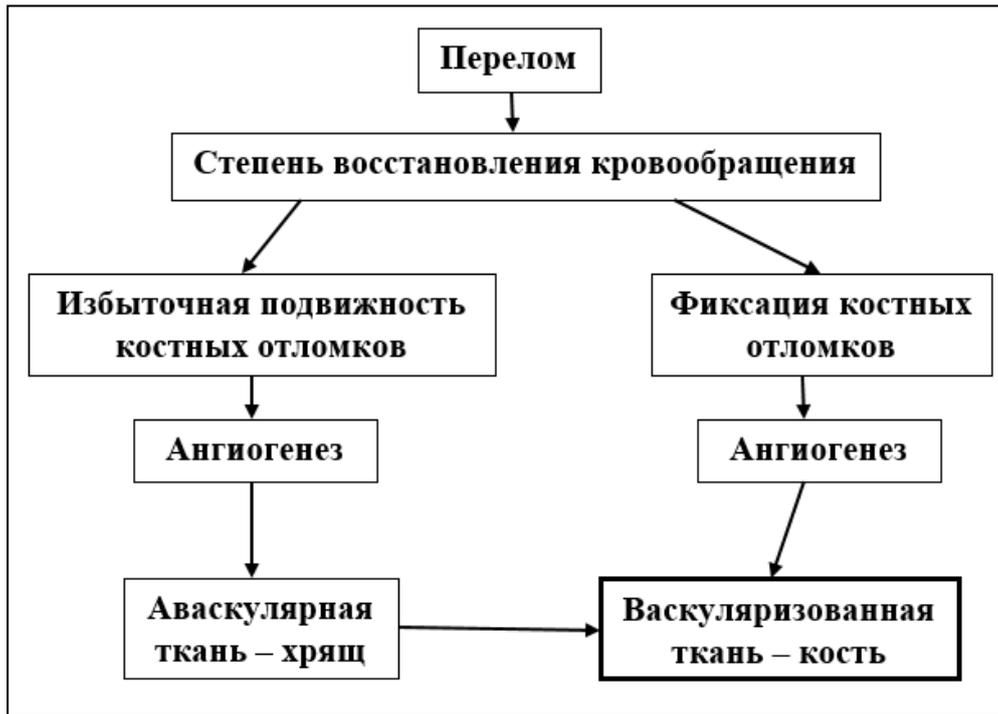


Рисунок 1 – Механизмы регенерации костной ткани в ответ на травматическое повреждение.

1.4. Биологические аспекты костного репаративного процесса: первичное и вторичное заживление костных переломов

В последние десятилетия была предложена концепция «первичного заживления переломов», которая претерпевала множественные изменения и в настоящее время заключается в том, что происходит «остеоальное» заживление костной ткани при условии, что перелом анатомически соответствует микрометрической (мкм) величине. В этом случае остеокласт формирует конус и первично пересекает линию перелома. Однако, это требует обязательной стабильности области дефекта, что практически невозможно в реальной практике [139].

Наиболее часто встречается вторичное заживление, при котором продуцируется большой объем рубцовой ткани. Этот тип заживления в значительной степени определяется микродвижениями отломков, объем и амплитуда которых прямопропорционально коррелируют со степенью неоваскуляризации [174].

В многочисленных исследованиях было доказано, что именно ангиогенез координирует превращение хряща в костную ткань. Ген *Cbfa1* играет существенную роль в контроле созревания хондроцитов и ремоделировании экстрацеллюлярного матрикса, которое происходит при участии металлопротеиназ и желатиназы. Было показано, что *Cbfa1* является важным регулятором дифференцировки клеток остеобластического ряда [112]. Таким образом, при заживлении переломов создается картина каскада процессов, в которых принимают участие как генетические механизмы, так и эпигенетические (в частности, микродвижения отломков). Важнейшим звеном перечисленных реакций является сосудистый фактор, участие которого, в значительной мере, осуществляется благодаря VEGF [182, 22].

1.5. Регенерация костной ткани в различных топографических зонах

Процесс заживления переломов протекает по-разному в различных участках костной мозоли. Можно выделить четыре основные зоны: костномозговой канал, зону между кортикальными пластинами, субпериостальный слой и окружающие мягкие ткани. В основном, именно на уровне костномозгового канала и межкортикального пространства происходит образование соединительнотканной провизорной мозоли и, в последующем, протекает процесс формирования костной ткани посредством энхондрального окостенения. В субпериостальной зоне, непосредственно окружающей перелом, происходит формирование «плотной» мозоли [60].

Энхондральное окостенение представляет собой сложный трехэтапный процесс, в результате которого в области перелома формируется хрящевой «муляж», задающий каркас будущего костного образования. В последующем этот хрящ подвергается деградации и замещению образующейся костной тканью, которая, в свою очередь, подвергается длительному процессу ремоделирования, который в оптимальных условиях завершается восстановлением исходного строения кости [61].

1.6. История развития метода культивирования мезенхимальных стволовых клеток

Стволовые клетки – это ключевые клеточные элементы костнорепаративного процесса.

Наши представления о мезенхимальных стволовых клетках и их роли в осуществлении биологических процессов в организме человека и животных восходят к работам А. Я. Фриденштейна и его коллег, которые впервые выделили из костного мозга взрослых животных фибробластоподобные клетки, обладающие чрезвычайно высокой пластичностью и способные дифференцироваться в нескольких направлениях: хондрогенном, адипозогенном и остеобластогенном [40].

Первые попытки культивирования живых клеток связаны с именем Wilhelm Roux, немецкого ученого, анатома и эмбриолога, который впервые продемонстрировал в экспериментах на клетках нейрональной пластинки куриных зародышей способность клеток, помещенных в физиологический раствор, сохранять на протяжении некоторого времени свою жизнеспособность вне организма [75].

В 1887 году американский ученый немецкого происхождения Leo Loeb разработал метод культивирования в экспериментах с клетками кожи морских свинок. Эта методика получила название «культура тканей в организме» («Tissue culture within the body»). Автор помещал фрагменты кожи эмбрионов морских свинок в агар и коагулированную сыворотку, затем инокулировал их взрослым морским свинкам и наблюдал пролиферацию подсаженного клеточного материала. Эти эксперименты вызвали множество вопросов и критических замечаний, поскольку речь шла не о культуре ткани или клеток, а об имплантатах, перенесенных от одного животного другому. Таким образом, работа Loeb имеет определенное историческое значение, поскольку ее процедура включала извлечение клеточного материала из организма и исследование его биологических реакций вне организма донора [127].

В 1907 году Ross Granville Harrison, американский биолог и эмбриолог, опубликовал статью о культивировании нервных клеток, где описал динамику формирования аксонов и дендритов. Используя фрагменты зародышевой ткани нервной пластинки лягушки, Harrison разработал воспроизводимую методику, заключающуюся в культивировании клеточного материала в капле свежей лимфы на стерильном покровном стекле. После коагуляции лимфы он переворачивал покровное стекло, формируя «висящую» каплю, в которой наблюдал увеличение количества нервных клеток. Harrison использовал эту технику для культивирования эмбриональных нервных клеток, причем полученная линия клеток обладала морфологическими характеристиками элементов нервной ткани [99].

В 1910 году Montrose Burrows применил метод «висящей капли» в работе с куриными эмбрионами, заменив лимфу жидкой (некоагулированной) кровью. В последующем в совместных исследованиях с Alexis Carrel эта методика успешно была использована с применением свежей аутоплазмы. Работы такого рода были проведены на различных тканях: собак, крыс, кроликов, морских свинок, опухолей человека и др. [61].

Следует отметить, что медико-биологические исследования на современном этапе решают обширный комплекс задач, требующих высокой степени точности проведения и повторяемости результатов. Для этого были созданы системы протоколов, единые лингвистические и дефинитивные базы. Эти принципы были распространены и на разработку новых клеточных технологий, в том числе культур МСК человека. В 2012 году группой экспертов были опубликованы протоколы для работы со стволовыми клетками. Важную роль сыграло создание и поддержание стандартных культур МСК человека в Массачусетском банке МСК. Обязательным условием его работы является постоянный контроль за соответствием получаемых штаммов культур МСК выработанным стандартам.

Проведение исследований на культурах клеток и полученные в них данные имеют как теоретическое, так и практическое значение. Благодаря проведению

этих исследований, медицинская наука получила возможность изучать тонкие механизмы развития многих форм патологии человека, а также открыло перспективу создания новых средств и методов лечения заболеваний человека [160, 142, 127, 126, 196].

В последние десятилетия были получены данные о способности МСК мигрировать в область повреждения тканевых структур, что свидетельствует о существовании механизма их мобилизации в условиях стресса [118].

Большое практическое значение имеют данные об источниках и методах получения МСК. В эксперименте было установлено, что одним из оптимальных источников является жировая ткань [151]. Помимо МСК, полученных от взрослых особей, известен так же еще один более проблематичный источник – ткань эмбрионов животных и человека ранних сроков развития (2 – 3 дня после оплодотворения). В США Джорж Буш наложил вето на проведение подобных исследований, а во всем мире по-прежнему остается открытым вопрос об этической целесообразности их проведения.

Не смотря на значительный объем данных, свидетельствующих о перспективности применения стволовых клеток в практике лечения многих заболеваний, в том числе травматических повреждений кости и их последствий, широкое применение МСК в клинической практике все еще связано с некоторыми трудностями. Хотя к сегодняшнему дню опубликовано большое количество работ с доказанной высокой эффективностью МСК как фактора индукции регенерации костной ткани [106, 107].

1.7. Остеопластические материалы, искусственная кость

Основным требованием к остеопластическим биоматериалам является их биосовместимость, выражающаяся в способности сосуществовать в контакте с живой тканью при закрытии костных дефектов, либо для восстановления функций утраченного органа или ткани, без явлений отторжения и нарушения процессов клеточной дифференцировки [2,19,68].

Особое внимание при исследовании биосовместимости остеопластических материалов уделяется оценке воспалительных реакций, мутагенных эффектов и канцерогенного действия имплантированных материалов. Такой подход положен в основу стандартизированных критериев для соответствующих тест-систем, обязательных при проведении доклинических испытаний.

Для оценки степени биосовместимости были предложены следующие ее уровни в зависимости от выраженности и характера реакций тканевых структур в области имплантации [154].

- Биотолерантные материалы. Кость контактирует с этими материалами без выраженных конфликтных реакций. Обычно в области контакта формируется фиброзная капсула. Таким материалом являются полиакрилаты [38];

- Биоинертные материалы. Контакт между материалом и костью может быть прямым, без образования фиброзной прослойки, однако, формирования нового костного вещества также не наблюдается. Таким образом происходит, например, остеоинтеграция титановых дентальных имплантатов [54,54];

- Биоактивные материалы. В области контакта с остеопластическим материалом обычно формируется нечеткая граница (остеокоалесценция). Между материалом и костью происходит активный обмен веществ, материал, постепенно метаболизируясь, подвергается резорбции и замещается вновь образованным костным веществом. Примером таких материалов могут служить: карбонат кальция, некоторые фосфаты кальция или биостекло [97];

- Остеоиндуктивные материалы. Эти материалы активно вступают в обменные процессы в области имплантации остеопластического материала. В процессе метаболических взаимодействий с костью остеопластические материалы этого типа постепенно резорбируются, индуцируя интенсивное образование нового костного вещества. Hotz G., и Herr G. описали направление разработки синтетических материалов с остеоиндуктивным

эффектом и возможность использования кальций фосфатной керамики, несущей на себе костный морфогенетический белок как наиболее перспективное в современной остеопластике. [10,74,2,7,105].

Октакальций фосфатная керамика. Особый интерес в процессе создания синтетических заменителей кости представляют кальций фосфатные керамики. Известна их способность вступать в метаболические процессы в области их контакта с костью реципиентной зоны и подвергаться замещению новообразованным костным веществом. Благодаря ионному обмену, на границе материал–кость появляется слой аморфного вещества, состоящего из октакальций фосфата, представляющего собой фазу перехода в гидроксиапатит (ГА).

Пристальное внимание привлекают к себе виды кальций фосфатной керамики, обладающие нестабильностью и высокой степенью ионной активности. К ним, в частности, относится октакальций фосфат (ОКФ) [2,166]. В тканевой среде ОКФ более растворим и менее стабилен, чем гидроксиапатит. Он обладает слоистой структурой из перемежающихся гидратированных и апатитных слоев. Гидролиз ОКФ в ГА – процесс термодинамически негэнтропийный и, поэтому, происходит спонтанно и необратимо. ОКФ является центром кристаллизации минеральной фракции кости и эмали [2, 165,164]. Гидролиз ОКФ сопровождается присоединением к его молекуле ионов Ca^{2+} из раствора и переходом части фосфат-ионов в раствор. Преобразование ОКФ в ГА является одним из факторов, стимулирующих дифференцировку остеобластных клеток [186, 17, 106,156].

На остеоиндуктивные свойства ОКФ указывал ряд авторов, [73,2,97;103;166]. Экспериментальные данные показали, что синтетический ОКФ способен вызывать эктопический остеогистогенез в мышечной и подкожной тканях. Было установлено, что вслед за резорбцией ОКФ происходит его замещение новой костью, [97,19].

Некоторые авторы доказали, что ОКФ с адсорбированными стромальными клетками костного мозга человека достоверно повышает экспрессию ($p < 0.01$) маркеров остеогистогенеза по сравнению с контрольной группой (ОКФ без стромальных клеток костного мозга) [187]. Аналогичные данные были получены

Комлевым В.С. и соавт. при использовании в качестве маркера остеогистогенеза остеокальцина [121].

В другом исследовании, Комлев В.С. и соавт. получили на принтере пористый ОКФ в формате 3D. Критический дефект диаметром 10 мм был воспроизведен на черепе кролика. Согласно этим размерам, был получен 3D-блок. Через 6 месяцев эксперимента размер блока уменьшился в 2,5 раза, а авторы отметили активное участие ОКФ в формировании новой костной ткани.

Кораллы и керамика на основе кости животных. Материалы этого типа представляют собой промежуточную форму между трансплантатом и синтетическим материалом. Речь идет о материалах, полученных из кости животных, которые сохраняют определенные характеристики «живой» костной ткани: их основу составляет гидроксиапатит, который сохраняет присущую биоапатиту пространственную организацию. Материалы на основе кораллов, в свою очередь, имеют высоко развитую сквозную пористость и чрезвычайно высокую аффинность к костной ткани.

В современных исследованиях используются две категории таких материалов:

➤ Коралл (CaCO_3), более известный как арагонит. Такие материалы обычно подвергаются специфической обработке (гидротермическому воздействию и замещению карбоната фосфатом), что обеспечивает его безопасность; полученные материалы обладают более выраженной аффинностью к костной ткани и высокой пористостью, что способствует прорастанию клеточных элементов в сквозные каналикулярные системы материалов этого типа и интенсификации в них процесса остеогистогенеза [153]. Кораллы и материалы на их основе использовались главным образом для пластики костных дефектов лицевого скелета, в частности, скуло-орбитальной области и челюстных костей [50,28];

Второй тип материалов получают обычно из бычьей кости, подвергнутой высокотемпературной обработке (свыше 1000°C). Таким образом прежде всего достигается исключение возможности иммунологического конфликта в результате

элиминации белкового компонента материала, причем исключается возможность инфицирования реципиента. Тем не менее, материал практически полностью сохраняет структурную организацию биоапатита [43, 100].

Следует заметить, что вариативность клинических ситуаций зачастую требует поиска индивидуальных оптимальных решений. Например, известно, что одним из обычных последствий потери зубов является атрофия альвеолярного гребня. Это сильно затрудняет оказание ортопедической помощи пациентам, в том числе – постановку зубных имплантатов. Исследование Froum Stuart с соавт. было посвящено проблеме профилактики этого состояния. Авторы изучали процесс заживления постэкстракционных зубных лунок при их заполнении различными материалами: биоактивным стеклом и лиофилизированным аллогенным трансплантатом. Исследовали заживление лунок через 6 и 8 месяцев. В контрольной группе лунки оставляли под кровяным сгустком. Результаты исследования показали, что регенерировавшая костная ткань обнаруживалась в лунках у 59.5% пациентов с имплантированным биостеклом, 34.7% – с лиофилизированным аллотрансплантатом и 32.4% – в контрольной группе. Таким образом, была доказана наибольшая эффективность биостекла (керамики) [90].

Другая работа была проведена в полном соответствии с принципами доказательной медицины: в мультицентровом исследовании на обширном материале клинических наблюдений (80 пациентов) было установлено, что рекомбинантный BMP-2, внесенный в постэкстракционные лунки на коллагеновой губке, проявляет мощное остеоиндуцирующее действие и может быть использован при атрофии альвеолярного отростка [17,75,106,107].

Синтетические заменители кости (искусственная кость). Следует подчеркнуть, что это сложная, еще нерешенная, проблема, требующая сочетания глубоких научных знаний в области материаловедения с новейшими методологическими и техническими подходами для изучения биологических механизмов на всех уровнях организации живых систем, от молекулярного, клеточного, органного, тканевого и организменного вплоть до социума, определяемых как системный подход [17,148].

Синтетический материал «БАК-1000». В нашей стране также проводилась активная разработка новых остеопластических материалов. В частности, был разработан и разрешен к широкому применению в хирургической ортопедии имплантационный материал «БАК-1000». Встречается информация об использовании гранулированного «БАК-1000» для заполнения полостей при цистэктомии по поводу апикальных кист, в том числе обширных. В течение первого года наблюдали рассасывание до 80% материала и его замещение костной тканью [28].

«БАК-1000» представляет собой материал, включающий в свою структуру апатитосиликатную матрицу, обеспечивающую его ячеисто-каналкулярную структуру с распределенными в ней фосфатами кальция, главным образом, гидроксипатитом с различными показателями отношения Ca/P. В состав материала входит силикатная матрица – до 35,0%; волостанин (CaSiO_3) – не более 5,0%; гидроксипатит ($\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$) – не менее 40,0%; β -трикальцийфосфат ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) – не менее 20,0%.

Таким образом, проблема остеопластических материалов и на сегодняшний день остается одной из центральных, требующих комплексного подхода и проведения исследований на различных уровнях организации живых систем при участии специалистов различных областей. Ниже будут рассмотрены результаты современных исследований, посвященных этой проблематике с целью их анализа как с теоретических, так и практических позиций системного, комплексного и многоуровневого подхода.

1.8. Синтетические заменители кости

Принято считать, что аутокость является «золотым стандартом» остеотрансплантологии. Она содержит факторы, определяющие ее высокую остеиндуцирующую активность, иммунологически безопасна и не вызывает местно-воспалительных реакций со стороны организма.

Однако, ее использование сопряжено с дополнительной травмой на этапе забора материала из источника (трансплантационный материал обычно получают

из подвздошной кости или ребра), а применение сильно лимитировано объемами, необходимыми для замещения обширных костных дефектов. Кроме того, нередко возникают ситуации, при которых формирование трансплантатов сложной конфигурации затруднено. В таких ситуациях применение аутокости не является эффективным решением проблемы.

Применение аллогенных и ксеногенных костных трансплантатов обычно приводит к возникновению иммунного конфликта и развитию воспалительных реакций отторжения. Кроме того, при использовании ксеногенного костного материала существует угроза заражения зоонозным инфекционным заболеванием.

Все перечисленное наряду с появлением новых технических возможностей заставляет по-прежнему обращаться к проблеме создания синтетических заменителей костных трансплантатов, обладающих способностью включаться в метаболизм собственной кости, встраиваться в систему тканевых взаимоотношений на молекулярном уровне, способствуя не только сохранению физиологических процессов в костной ткани реципиентной зоны, но и, при необходимости, индукции регенерации костного вещества.

1.9. Заменители кости на основе керамики

Керамики – это соединения, промежуточные по своим свойствам между металлическими и неметаллическими веществами; они имеют ряд преимуществ по сравнению с другими материалами: высокая точка плавления, высокая прочность, низкая плотность и высокая химическая стабильность. Однако, керамические материалы очень хрупкие, и подвержены переломам. Это оксиды, нитриды и карбиды, причем чаще всего керамические материалы включают оксид алюминия (Al_2O_3), клеевые компоненты (фарфор), цемент и стекло [58]. Способность биоактивной керамики связываться с костью является ее уникальным свойством, хотя применение гипса, являющегося разновидностью керамики, известно еще с девятнадцатого столетия [166].

Современная биокерамика относится к керамическим материалам, используемым в медицинской практике, благодаря биосовместимости,

трибологическим свойствам, высокой химической стабильности (выше, чем у металлов) и остеокондуктивности [156,103]. Кальций фосфатные керамики характеризуются широкой вариабельностью молярных отношений Ca/P, от 0,5 до 2 и могут существовать в различных конформациях. Наиболее известная из них – гидроксипатит (ГА), составляющий 30 –70% биоapatитов костной ткани и зубов [100].

Химическая структура биологического ГА очень сложна; это связано с тем, что обычно он в составе кости и твердых тканей зубов может быть дефицитным по Са и этот дефицит восполняется ионами карбоната. В результате, образовавшееся комплексное соединение имеет в своем составе те или иные количества карбонатапатита. Его использование в материаловедении и клинической практике оказалось высокоэффективным, поскольку именно его дополнительное введение в состав керамик позволило значительно увеличить их остеоиндуктивный потенциал [152].

Следует напомнить, что и коралл обладает чрезвычайно высокой остеоиндуктивной активностью. Так, применение гранулята из коралла в экспериментах на свиньях привело к интенсивному остеогистогенезу вокруг гранул материала и образованию костного конгломерата в месте имплантации. Интересно, что при этом авторы наблюдали резорбцию имплантированного материала по мере замещения костной тканью в сроки до 52 недель [157].

В настоящее время карбонатсодержащие ионы начинают использоваться в тканевой инженерии. В частности, появились работы, свидетельствующие об активизирующем рост на поверхности скаффолдов биоapatитов и индукции функций клеток остеобластического ряда под влиянием нанокристаллических покрытий, содержащих ионы карбонатапатита [202].

Из фосфатов кальция, имеющих важное значение для физиологических процессов, протекающих в твердых тканях человека и животных следует указать на следующие: аморфный кальций фосфат (АКФ), дикальций фосфат дигидрат (ДКФД), дикальций фосфат (ДКФ), октакальций фосфат (ОКФ), трикальций фосфат (ТКФ), кальций пирофосфат (КПФ) и гидроксипатит (ГА).

Чистый гидроксипатит кальция представляет собой стехиометрический композит $(Ca)_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, при молярном отношении Ca/P менее 1,67. Это основной неорганический компонент костей и зубов. Таким образом, становится понятным, почему такое внимание в материаловедении и клинической медицине уделяется изучению этих соединений, и насколько разнообразными и многочисленными могут быть технологии их производства и применения [5, 146,158].

Биокерамики характеризуются различной растворимостью *in vitro*, что, соответственно, отражается в проявлении этого свойства *in vivo*. Причем, чем выше молярное отношение Ca/P, тем ниже растворимость материала в воде. Однако, ее степень зависит не только от соотношения Ca/P, но и от ряда других факторов: химического состава, кристаллической структуры, степени пористости материала [143, 103].

На молекулярном уровне биокерамики подвергаются изменениям в области интерфейса, где и осуществляется их контакт с тканевой жидкостью и тканевым субстратом, и воздействиям, которые приводят к резорбции этих материалов с высвобождением ионов Ca^{2+} и PO_4^{3-} . Благодаря повышению концентрации ионов Ca^{2+} и рН, повышается активность щелочной фосфатазы в дифференцирующихся клетках остеобластического ряда в области реципиентного ложа.

Вновь дифференцирующиеся остеобласты также синтезируют щелочную фосфатазу, коллаген I типа, неколлагеновые белки и т.п. Вследствие этого рН в области интерфейса постепенно восстанавливается и происходит нуклеация кристаллов ГА на поверхности коллагеновых фибрилл.

Биокерамики могут иметь высокую плотность или высокую пористость. Повышение пористости приводит к снижению прочности материала, однако наличие пор обуславливает возможность прорастания клеточных элементов в материал и приводит к увеличению контакта материала с тканевыми элементами, что способствует более активному взаимодействию материала с тканевыми структурами реципиента. С другой стороны, высокая пористость может обуславливать интенсивную циркуляцию тканевой жидкости по каналикулярным

системам, в результате чего увеличивается скорость деградации материала. Существуют также монокристаллы – сапфир; поликристаллические – гидроксилпатит, трикальций фосфат; полукристаллические – стеклокерамики и композиты, которые имеют аморфную и/или одну и более кристаллических фаз [164].

Разработки новых кальцийсодержащих керамик в последнее десятилетие особенно интенсифицировались, нарастает количество посвященных им публикаций. В клинической практике успешно начинают использоваться керамики для заполнения костных дефектов, после удаления зубов, для сохранения альвеолярного гребня. Было показано, что их использование способствует подготовке костного ложа для дентальных имплантатов [185,186].

Однако, биокерамики имеют определенные ограничения в практическом применении, связанные с их несовершенством по механическим показателям, в частности, они имеют низкий модуль упругости по сравнению с другими металлическими или полимерными материалами. В связи с этим, до недавнего времени было принято считать, что биокерамики не должны использоваться там, где возможны большие нагрузки. В то же время их можно успешно применять в качестве наполнителей и покрытий металлических устройств, в частности, имплантатов, и материалов, обладающих высокими прочностными характеристиками [128, 65]. Эти покрытия способствуют первичной стабилизации имплантатов, и, стимулируя оппозиционное образование костного вещества на поверхности имплантатов, обуславливают быструю и надежную фиксацию [96].

Большинство применяемых на сегодняшний день керамических материалов должны обладать рядом свойств, таких как: биосовместимость, остеокондуктивность, остеоиндуктивность, остеоинтеграция и высокие механические свойства [59]. Кроме того, остеогенное воздействие керамики на ткани в области имплантации стимулируют пролиферацию и дифференцировку [103]. Обычно материалы на основе керамики (гидроксилпатит, трикальцийфосфат) используют как для заполнения дефектов костной ткани, так и с целью покрытия имплантатов для улучшения процесса интеграции при контакте

с костной тканью реципиента с формированием промежуточного слоя карбонатного гидроксиапатита [169].

Основным неорганическим компонентом костной ткани является гидроксиапатит, который широко применяется в процессе изготовления биоинженерных конструкций для остеорегенерации. Кроме того, этот материал обладает доказанной высокой биосовместимостью и удовлетворительной биодegradацией, что связано с его сходствами с минеральным составом и структурой нативной кости. Таким образом, применение в качестве матрицы этого материала обуславливает увеличение механической прочности и улучшение остеогенных свойств биоконпозитов [138].

Несмотря на то, что синтетический гидроксиапатит демонстрирует многообещающие результаты в качестве основы для создания биоинженерных моделей для остеорегенерации костных дефектов, он по-прежнему обладает относительно низкой прочностью при воздействии нагрузки [152]. Некоторыми авторами была предложена методика улучшения прочности гидроксиапатита путем легирования ионами металлов / неметаллов; было обнаружено не только достоверное улучшение прочности биоконпозита, но и стимуляция мезенхимальных стволовых клеток в остеогенном направлении [96,97]. Однако данную комбинацию еще предстоит изучить с использованием современных методов на предмет отсроченных нежелательных реакций тканей реципиента.

Другим существенным недостатком применения гидроксиапатита при замещении диастаза костной ткани является риск интра- и постоперационных инфекционных осложнений ввиду активации патогенных микроорганизмов. Это приводит к увеличению финансовых затрат на лечение пациента, а также сроков реабилитации [165]. Более того, антимикробные препараты не обеспечивают должной защиты от многих штаммов бактерий, в том числе полирезистентных. На основании этого факта было предложено легирование гидроксиапатита ионами серебра, цинка, стронция, церия, титана, магния, меди и др. Кроме того, в низких концентрациях данные ионы обладают низкой цитотоксичностью в отношении клеток реципиентной зоны [73].

Кроме того, для увеличения биодоступности были предложены структурные изменения – структуру гидроксиапатита можно модифицировать путем:

- замены центров Ca^{2+} ионами Zn^{2+} , Sr^{2+} , Mg^{2+} и Na^+ ;
- замена центров PO_4^{3-} на ионы CO_3^{2-} или SiO_3^{2-} ;
- замена группы $-\text{OH}$ ионами Cl^- , F^- и CO_3^{2-} .

Предложенный авторами ионный обмен приводит к нарушению кристалличности, изменению поверхностного заряда, параметров решетки и морфологии, влияя, тем самым, на показатели термической стабильности, биодegradации, механических свойств и др. [84]

Кроме того, недавно некоторыми отечественными авторами были исследованы эффекты имплантации сложной биоконструкции на основе биокompозитной кальций-силикатной керамики ($\text{CaSiO}_3\text{-HAp}$), армированной матрицей титанового сплава Ti6Al4V с целью увеличения прочности. Применение такого биоматериала демонстрировало многообещающие промежуточные результаты, однако требует дальнейших исследований [13].

Таким образом, по-прежнему остаются нерешенными проблемы хрупкости и сложности моделирования сложных биокompозитов на основе керамики (в т. ч. гидроксиапатита), что требует проведения новых исследований в этой области с целью поиска и апробации новых комбинаций для остеорегенерации в экспериментальных моделях диастаза костной ткани [158,159]. Кроме того, существуют единичные публикации, описывающие применение аналогов керамики, которые не обладают недостатками гидроксиапатита – биоактивное стекло, фосфаты кальция и некоторые силикаты кальция и магния (диопсид ($\text{CaMgSi}_2\text{O}_6$) и акерманит ($\text{Ca}_2\text{MgSi}_2\text{O}_7$)) [164; 188].

1.10. Мезенхимальные стволовые клетки

В последнее десятилетие постепенно увеличивается количество исследований в области тканевой инженерии с разработкой материалов, обогащенных мезенхимальными стволовыми клетками (МСК). Они обладают

остеогенным потенциалом и могут способствовать усилению роста костей при их включении в керамику или полимеры при помощи различных методов культивирования и формирования сложных биоконструкций [10,133].

В течение фазы воспаления в процессе регенерации костной ткани происходит значительное высвобождение факторов роста и цитокинов, что приводит к миграции, рекрутированию и пролиферации МСК (формирование первичной мозоли). На второй стадии МСК активно дифференцируются в хондроциты (эндохондральная оссификация) [89,110]. Затем запускается процесс васкуляризации и дифференцировка МСК в остеобласты [196]. Таким образом, на всех этапах заживления костных дефектов непосредственными участниками и регуляторами (паракринно индуцируют синтез костного морфогенетического белка и щелочной фосфатазы) являются МСК [24].

Кроме того, МСК способны к синтезу большого количества биологически-активных веществ, выполняя следующие функции: остеогенная дифференциация (TGF β , BMP-1 and miR-196a), противовоспалительная (IL-10, TGF β , TSG-6, LIF, miR-146a-5p, miR-548e-5p, let 7, miR-145), иммуномодулирующая (PGE-2, HLA-G5, HGF, iNOS, TGF β , IL-10), антиапоптотическая (VEGF, HGF, IGF-1, stanniocalcin-1, GM-CSF, TGF β), ангиогенетическая (VEGF, IGF-1, PlGF, MCP-1, FGF-2, IL-6), ауто- и паракринная поддержка роста и дифференцировки стволовых клеток (SCF, LIF, M-CSF, SDF-1, ангиопоэтин-1), высвобождение хемоаттрактантов (CCL2, 3, 4, 5, 6, 20, 26, а также CXCL5, 11, 1, 2, 8, 10, 12), антифибротическая (HGF, FGF-2 и адrenomедуллин) и др. [26].

В последнее время активно исследуется возможность применения аутологических МСК в тканевой инженерии в составе биоконструкций (например, в сочетании с остеокондуктивным каркасом) с целью стимуляции ангиогенеза, пролиферации / дифференцировки, а также потенцирования остеоинтеграции [25]. Такие МСК представляли собой популяцию негематопоэтических мультипотентных клеток костномозгового происхождения, обладающих способностью к размножению и дифференцировке *in vitro* в клетки остеогенного фенотипа.

Исследователями была разработана двумерная культура клеток на плоской поверхности, до сих пор применяемая в некоторых регенеративных и фундаментальных работах с применением стволовых клеток [26]. Однако, 2D-культивирование связано с неестественной полярностью в трехмерной нише с потерей мультипотентности, преждевременным клеточным старением, а также генерацией хромосомных aberrаций в ДНК МСК [23]. В связи с этими недостатками было разработано и предложено для широкого использования в различных сферах регенеративной медицины 3D-культивирование мезенхимальных стволовых клеток: культивирование в виде сфероидов без каркасов [168, 64], а также с применением различных гидрогелевых каркасов, включая альгинаты [102], коллаген [134], матригель [198] и различные составы целлюлозы [49].

По сравнению с 2D-культурой 3D-культивирование стволовых клеток обладает следующими различиями: отсутствие полярности и возможность 3D-адгезии, возможность создания градиента диффузии метаболитических веществ, формирование фибрилл и / или пор, вариабельность упругости и прочности, комплексность [26]. Очевидно, что данный метод культивирования обладает преимуществами, которые позволяют исследователям использовать его в регенеративной медицине, в том числе при замещении костных дефектов и индукции репарации костной ткани [203].

1.11. 3D-принтинг

3D-принтинг, или 3D-печать, – это новое, бурно развивающееся направление разработок, проводимых в самых различных областях медицины, которое уже послужило базисом для дешевых и, в то же время, широкодоступных методик создания устройств и приспособлений, и характеризующееся высокой точностью исполнения и отсутствием лимита тиражирования.

В стоматологии, применение 3D-печати произвело переворот в подходах к решению специфических для специальности задач, а прецессионность исполнения ушла в прошлое. Важным является то, что эта технология позволяет решать задачи

подбора и создания индивидуальных имплантатов и ортопедических конструкций; появилась возможность резкого сокращения числа посещений, а также дистанционного исполнения [14,170]

Таким образом, 3D биопечать – это многообещающая технология в области современной регенеративной медицины, а широкий выбор биочернил позволяет быстро и точно изготовить стабильные конструкции для восстановления, поддержания и улучшения утраченных или поврежденных тканей [193]. Считается, что большинство исследований конкретных приложений в стоматологии все еще находятся на предварительной стадии [47]. Эта технология в сочетании с передовой тканевой инженерией потенциально способна помочь исследователям в решении некоторых ключевых задач черепно-лицевой реконструкции и функциональной регенерации тканей зуба, таких как альвеолярная кость, периодонтальная связка и комплекс дентин-пульпа [111,144].

В настоящее время технология 3D-биопечати с включением клеточного компонента в биочернила стала предпочтительным выбором по сравнению с традиционным методом посева клеток, который имеет несколько существенных недостатков: относительно низкая регенеративная эффективность, гибель части клеток из-за неэффективного посева и миграции, трудности при создании сосудистой системы в каркасе и построении более толстых и сложных тканей [70]. Таким образом, новая технология 3D-биопечати способна устранить ограничения традиционного подхода, а в качестве клеточного компонента могут быть использованы многофункциональные клетки, например, МСК [144].

В современной стоматологии наиболее популярны техники 3D-биопечати, основанные на экструзии, или струйной и лазерной печати [193]. Метод биопечати с экструзией является предпочтительным в связи с широким выбором биоматериалов с высокими показателями концентрации и вязкости ($30 - 60 \times 10^7$ мПа/с), относительно точной печатью, высокой производительностью и низкой стоимостью [193]. Кроме того, возможно создание каркасов сложной структуры с порами и высокой плотностью клеточного компонента [27]. Недостатками этого метода считают сложность достижения структурной целостности и адекватной

механической стабильности при создании больших структур произвольной формы, а также вероятность гибели клеток из-за высокого давления и напряжения сдвига [185;177].

Другая техника биопечати – метод струйной печали, который может быть термическим или акустическим [30]. Преимуществами является высокие скорость обработки и разрешение, низкая стоимость, простота эксплуатации и возможность коррекции параметров печати. Однако, такой метод требует относительно низкой вязкости биоматериала (3,5 – 12 мПа/с), ограничен концентрацией клеточного компонента ($<5 \times 10^6$ клеток/мл), а также лишен возможности создания целостных структур ввиду низкой вязкости биоматериала.

Лазерная биопечать является бесконтактным методом и осуществляется по принципу лазерно-индуцированного прямого переноса (LIFT), используя высокоэнергетический лазерный импульс для создания в слое биоматериала под высоким давлением везикул с биочернилами. Такая печать обеспечивает высокую точность конструкции (до нанометров) и высокое разрешение, что позволяет достигать высокой плотности клеточного компонента (до 1×10^8 клеток/мл) [153]. Однако и этот метод не лишен недостатков: низкая скорость печати, сложности в изготовлении крупных конструкций, а также необходимость в предварительной подготовке клеток реципиента, так как ультрафиолетовое излучение лазера способно повреждать живые ткани [78].

Ключевым моментом в контексте биопечати является выбор биочернил. Это суспензия клеток, которая может содержать в себе как биоматериалы, так и биологически активные вещества. Важным целевым критерием является легкость печати в стабильных 3D-структурах с обеспечением подходящей среды для инкапсуляции клеток во время и после печати [108].

В стоматологии принято использовать материалы для биочернил из природных (коллаген I-го типа [116], альгинат [48], гиалуроновая кислота, желатин, фибрин [111], хитозан [147] и др.) или синтетических (диметакрилат поли(этиленгликоль) [140] и синтетический сополимер поли(этиленгликоль) и поли(пропиленгликоль) [81]) полимеров, а также модифицированных природных

полимеров (метакрилоил желатина [140] и метакрилированная гиалуроновая кислота [121]). Кроме того, проводились эксперименты с добавлением в биочернила керамических соединений (гидроксиапатит [147], трикальцийфосфат [191], наносиликаты) для повышения стабильности и прочности конструкций. Широкое использование получили природные полимеры в связи с их сходством с физиологическим внеклеточным матриксом и биосовместимостью в реципиентной зоне [56;207], однако их серьезным недостатком считается низкая прочность во время и после печати. Это побуждает исследователей разрабатывать и апробировать новые комбинации природных полимеров (с высокой биосовместимостью и физиологичностью) с полимерами, придающими конструкции прочность (соединения кальция, кремния, фосфатов) [147,125].

Не менее важен выбор типа клеток, добавляемых в биочернила. Исследования в стоматологии ведутся в направлении использования клеток эпителия полости рта человека (стволовые клетки пульпы [75], периодонтальной связки [190] или апикального сосочка [191]), стволовых клеток недентального генеза (из костного мозга [147], пуповинной вены [79], околоплодных вод [64]), а также мезенхимальных стволовых клеток свиней, крыс, человека, способных к дифференцировке в различных направлениях, в том числе остеогенном [142, 66].

Тем не менее, при таком широком спектре выбора биочернил и клеточного компонента, 3D-печать до сих пор не является идеальным методом для создания субстратов, замещающих критические дефекты костной ткани, и, очевидно, не лишена недостатков. В связи с этим, поиск и разработка новых способов создания субстратов (в том числе комбинированных) для остеорегенерации по-прежнему остаются актуальными.

Заключение по обзору литературы.

На основании проведенного анализа литературы можно заключить, что проблема разработки и внедрения в клиническую практику остеопластических материалов – это сложная и многоуровневая область совместной деятельности специалистов различных областей: от материаловедов до представителей

клинических специальностей (стоматологов, челюстно-лицевых хирургов, травматологов, медицинских биологов, генетиков, патоморфологов и т.д.).

При изучении теоретических аспектов проблемы, мы исходили из того, что их обсуждение должно способствовать пониманию сущности механизмов, лежащих в основе процессов, происходящих при заживлении обширных диастазов костной ткани. Эта информация представляется важной и необходимой, поскольку служит основой для планирования и создания практических методик в клинических условиях при решении проблемы остеогистогенеза и репаративной регенерации при длительно незаживающих дефектах костной ткани, в комплексе со стимуляцией неоангиогенеза, как одного из ключевых факторов процесса заживления.

Важно также оценить реакцию периимплантационных тканей с помощью морфологического метода по следующим критериям: уровень васкуляризации и ангиогенеза, тип (гемокапилляры, артерии, вены); состояние сосудистых стенок, их толщина, признаки пролиферативной активности; степень фиброзирования; клеточность; наличие воспалительной инфильтрации; проявления деструкции матричного каркаса; степень деградации.

Таким образом, интересными представляются исследования с использованием комбинаций из апатитосиликатного носителя и МСК. Полученные ранее данные засвидетельствовали перспективность такого комплекса, а возможность его применения открывает новое перспективное направление для будущих экспериментов.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Общее положение, методологическое пособие

Экспериментальное исследование проводили на базе лаборатории биологических испытаний Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук в г. Пущино.

Характеристика животных.

В экспериментальном исследовании использовали животных – самцов крыс аутбредного стока породы Спрег-Доули (*Rattus Sprog-Dowly*; вес 220 ± 20 грамм; возраст 9–10 недель; $n=48$). Они содержались при 12-часовом световом дне, кондиционировании при температуре 23°C и влажности 40 – 60%, на стандартном рационе питания с водой *ad libitum*. Крыс содержали в пластиковых клетках со слоем, покрытым абсорбирующим веществом (рисовой шелухой), обеспечивающим гнездовой материал. На время длительного эксперимента животные были размещены в клетках по две особи, чтобы исключить возможное влияние длительного одиночного содержания на поведение.

Этапы эксперимента.

Объект исследования – бедренная кость в области имплантации и перимплантационных тканей, которую изначально исследовали макроскопически на предмет наличия/отсутствия воспаления, отека.

Эксперимент состоял из двух этапов.

Первый хирургический этап. Иссечение жировой ткани производили из паховой области. Выделенные фрагменты помещали в стерильные боксы со средой для культивирования МСК.

Второй хирургический этап. На втором этапе создавали костные дефекты диафиза бедренной кости с их восполнением 3D-биоинженерной конструкцией.

Выведение животных из эксперимента.

Перед выполнением хирургических манипуляций для наркоза использовали смесь препаратов (1:1; 25 мг/кг золетил + 5 мг/кг ксилазина 2% внутримышечно).

Время наступления наркоза составляло от пяти до десяти минут. Все животные хорошо перенесли наркоз.

Животных всех групп (I – II) выводили из эксперимента путем их помещения в атмосферу углекислого газа в соответствии с рекомендациями ВОЗ [62,167]. После плановой эвтаназии, согласно дизайну эксперимента, у крыс были изъяты фрагменты костной ткани из области имплантации и периимплантационной ткани.

Нормативные документы.

Все манипуляции осуществляли согласно Международным рекомендациям по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (ЕЭС, Страсбург, 1985 г.), Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (ЕЭС, Страсбург, 1986 г.; ETS №123), Руководствам по проведению медико-биологических исследований по уходу и использованию лабораторных животных (ILAR, DELS), Правилам лабораторной практики и приказу Минздрава России № 199н от 01.04.2016 г. «Об утверждении правил лабораторной практики», Приказа №755 от 12.08.1977 г. «О мерах по дальнейшему совершенствованию организационных форм работы с использованием экспериментальных животных», Приказа №742 от 13.11.1984 г. «Об утверждении Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных» и Проекта Всеобщей декларации о биоэтике и правах человека.

Исследование было одобрено локальной Комиссией по биоэтике Российской Медицинской Академии Непрерывного Медицинского Образования Министерства Здравоохранения РФ. Локальная Комиссия по биоэтике предназначена для контроля за соблюдением норм и принципов биоэтики при проведении доклинических исследований и исследований с животным биоматериалом в соответствии с принципами GLP.

2.2. Дизайн эксперимента

Экспериментальные животные – крысы породы Спрег-Доули (n=48) случайным образом были поделены на 2 группы:

I-ая группа (n=24; ♂) – контрольная, воспроизведение дефекта бедренной кости с последующим его закрытием апатитосиликатным биокомпозитом «БАК-1000»;

II-ая группа (n=24; ♂) – опытная, воспроизведение дефекта бедренной кости с последующим его закрытием при помощи 3D-биоинженерной конструкции на основе 3D-культивированных МСК, индуцированных в ангиогенном направлении, и апатитосиликатного биокомпозита «БАК-1000».

По 8 животных каждой из групп выводили из эксперимента на 30, 60 и 120 сутки после окончания второго хирургического этапа (Таблица 1).

Таблица 1

Группа	1. контрольная			2. опытная		
Количество животных	24			24		
Количество животных на сутки	8	8	8	8	8	8
Сутки	30	60	120	30	60	120

2.3. Методика получения аутологичных ангиоиндуцированных МСК из жировой ткани

Выделение мезенхимальных стволовых клеток из жировой ткани.

Клетки стромально-сосудистой фракции выделяли из подкожно-жировой клетчатки по стандартному протоколу [110].

Затем под общей анестезией рассекали кожу, отделяли гиподерму от мышц брюшной стенки, иссекали фрагмент подкожно-жировой клетчатки, кожу зашивали. Извлеченный материал помещали в стерильный транспортный контейнер со средой для культивирования DMEM/F12 (Биолот) с добавлением

глутамин (2мМ L, Биолот) и гентамицин (50мкг/мл, ПанЭко). Полученные образцы отмывали от сгустков крови и волосяного покрова в растворе Хенкса, содержащем антибиотики (1% пенициллин – стрептомицин, 400 ЕД/мл гентамицин, ПанЭко). Далее материал механически измельчали и ферментативно обрабатывали в 0,07% растворе коллагеназы I типа (ПанЭко) и 0,025% диспазы (ПанЭко) в течение 25 минут. После окончания инкубации в этот раствор с тканью добавляли полную среду для культивирования и центрифугировали в течение 5 мин при 1000 об/мин. Полученный осадок ресуспендировали в полной среде и пропускали через нейлоновый фильтр для того, чтобы избавиться от крупных фрагментов ткани. Далее выделенные клетки вместе с ферментированными кусочками тканей помещали на чистые чашки Петри в полную ростовую среду.

2D-культивирование МСК.

Полученные клетки культивировали в стандартных условиях (37⁰С; 5% СО₂) в полной ростовой среде, состоящей из смеси базовых сред ДМЕМ/F-12 (1:1, Биолот), дополненной 2 мМ L-глутамин, 100 ЕД/мл гентамицин (ПанЭко) и 10% эмбриональной телячьей сывороткой (HyClone). Замену среды производили через каждые 3 суток. Когда клетки достигали монослоя, осуществляли пассирование 2D-культуры с помощью раствора Версена (Биолот) и 0,25% раствора трипсина (Биолот). На четвертом пассаже выращивания происходило формирование плотного монослоя культуры МСК (Рис. 2, 3).

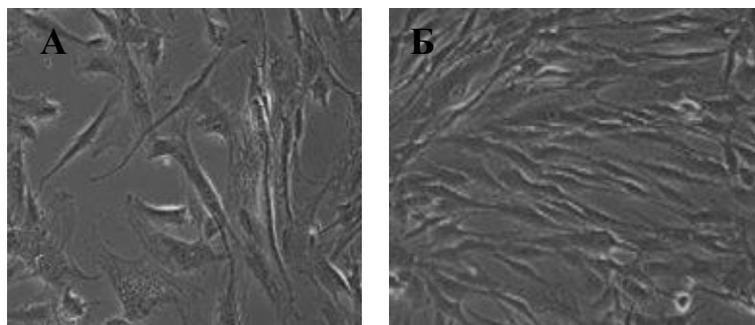


Рисунок 2 - Культура МСК: А - Первичная культура МСК; Б - Культура МСК после 7 дней культивирования

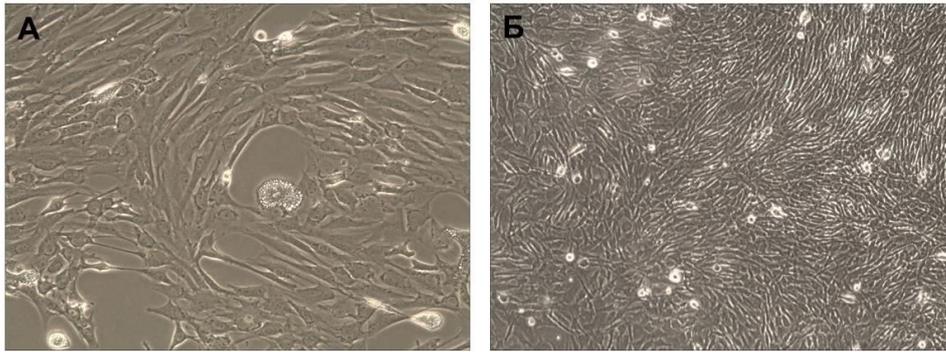


Рисунок 3 - Культура мезенхимных стромальных клеток жировой ткани крысы: А – пассаж 1, прикрепление клеток к субстрату и активная миграция из кусочка обработанной ферментами ткани; Б – пассаж 4, клетки мезенхимного фенотипа формируют плотный монослой. Нефиксированные и неокрашенные клетки под инвертированным микроскопом. Световая микроскопия с фазовым контрастом, увеличение А – $\times 20$; Б – $\times 10$

На 4 пассаже культура СКЖТ представляла гомогенную популяцию активно пролиферирующих прогениторных клеток, способных дифференцироваться в трёх направлениях – адипогенном, хондрогенном и остеогенном. Клетки имели морфологию мезенхимоподобных клеток, формирующих плотный монослой с характерным поточным ростом. Присутствие других типов клеток, контаминирующих культуру, не наблюдалось. После четвертого пассажа выращивания в монослойной культуре МСК переводили в условия 3D-культивирования.

3D-культивирование МСК.

Для получения микросфер клетки каждого образца из монослойной культуры помещали в 12 неадгезивных 256-луночных агарозных планшетов (3D Petri Dishes, Microtissue, США) в количестве 2000 клеток на 1 микролунку (1 мкл) (Рис. 4, 5, 6). При этом использовали бессывороточную ростовую среду: DMEM/F12 (1:1, Биолот) с добавлением 2 mM L-глутамин, 100 ЕД/мл гентамицина (ПанЭко), 1% 100X раствора инсулин-трансферрин-селенит (ИТС, Биолот), bFGF (10 нг/мл, ПанЭко) и гепарина (7,5 ЕД/мл, Синтез). Замену среды осуществляли через каждые 2 суток. Через 7 суток культивирования микросферы вымывали из агарозных планшетов и осаждали с помощью центрифугирования (5

мин, 600 об/мин, 60g). На данном этапе происходило добавление индуктора васкулогенеза VEGF фактора.

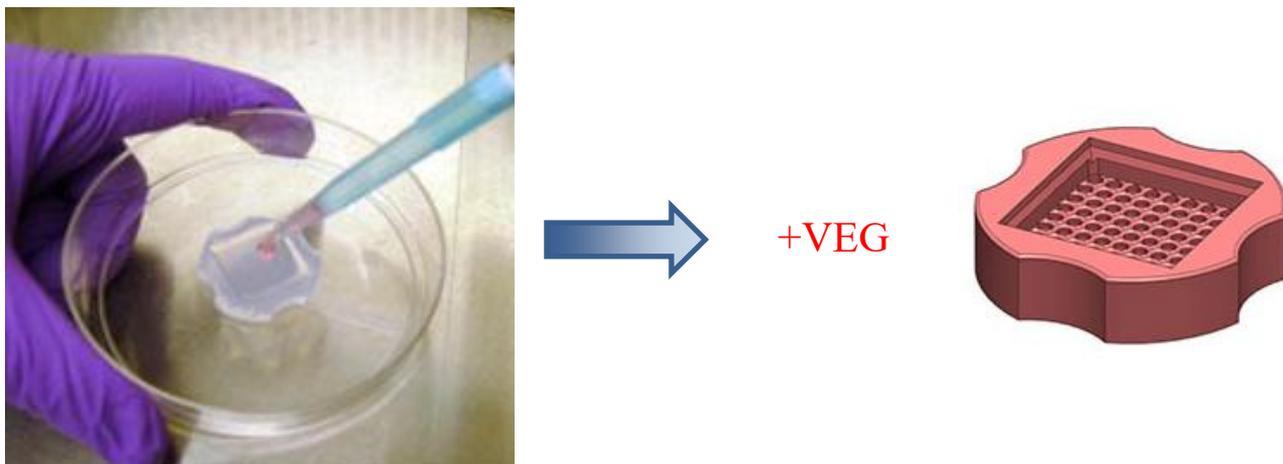


Рисунок 4 – перемещение монослойной культуры в агарозный планшет

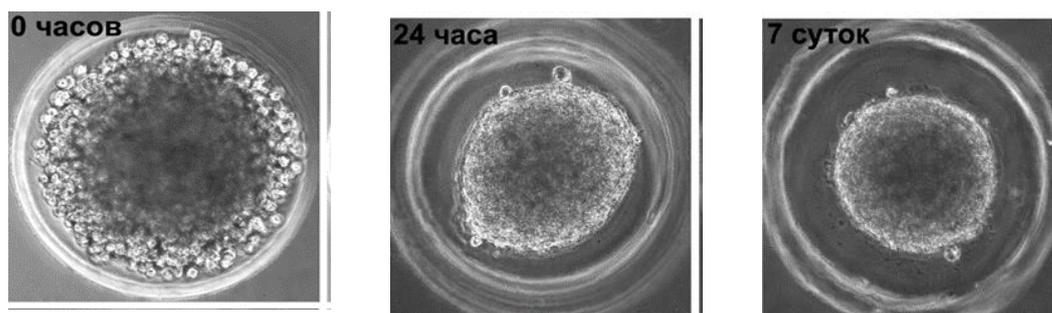


Рисунок 5 - Формирование сфероидов из СКЖТ в микролунках агарозного планшета на разных сроках культивирования: А – 0 часов; Б – 24 часа; В – 7 суток. Фазово-контрастная световая микроскопия

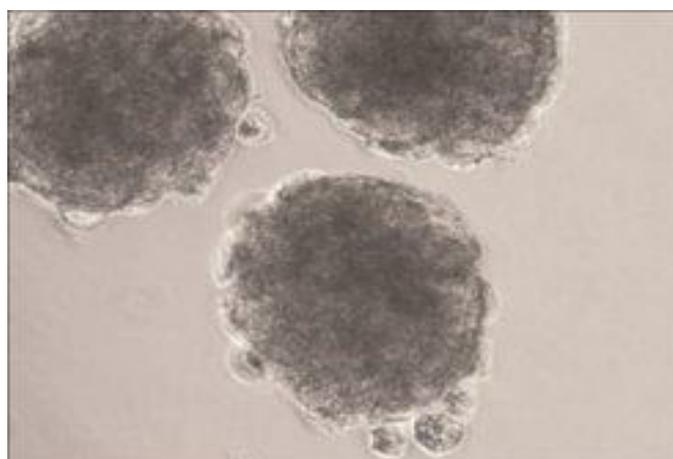


Рисунок 6 - 3D культура МСК сфероидов

Для получения тканеинженерной конструкции сфериды в количестве 3000 шт. помещали на остеопластический материал «БАК-1000» и культивировали в полной ростовой среде в течение 7 суток (Рис. 7). Замену среды осуществляли ежедневно.

Визуализацию структуры клеток и микросфер осуществляли с помощью фазово-контрастного микроскопа СКХ41 (Olympus, Япония), фоторегистрацию производили цифровой камерой Invenio3S (Olympus, Япония) в программе DeltaPix (Olympus, Япония).

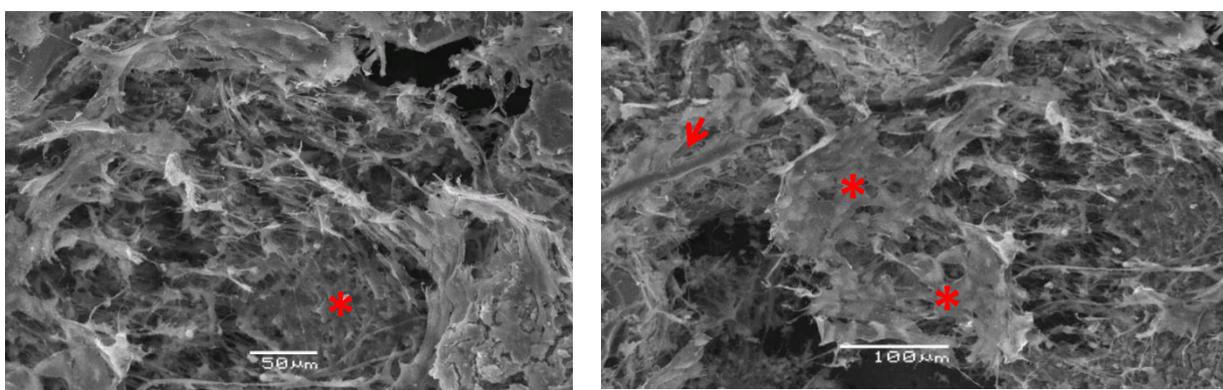


Рисунок 7 - Адгезия сфероидов () на матрице стоматологического материала БАК-1000. Формирование тубулоподобных структур (стрелка).*

Характеристика культур клеток

Иммунофенотипирование монослойной культуры СКЖТ проводили по следующим маркерным белкам: CD29, CD90, CD105, CD45, CD34, CD14, CD11b, CD19. Для анализа клетки отмывали от полной ростовой среды раствором версена, обрабатывали 0,25% раствором трипсина, инактивировали действие фермента добавлением среды с сывороткой, подсчитывали количество клеток и центрифугировали (7мин, 1000g). Полученный осадок ресуспендировали в растворе фосфатно-солевого буфера (pH=7,4) с 1% сыворотки и аликвотировали в пробирки по 100мкл. В каждую пробирку добавляли антитела, конъюгированные с флуоресцентными метками (FITC – fluoresceinisothiocyanate, PE – phycoerythrin, PC5 Phycoerythrin-Cyanin 5.1) из расчета 10 мкл антител на 1млн. клеток и инкубировали в течение 15минут в темноте при температуре 25°C. После центрифугирования (5мин, 400g) пробы ресуспендировали в 1мл раствора

фосфатно-солевого буфера (рН=7,4) с 1% сыворотки в пробирках для проточного цитофлуориметра. Анализ проб осуществляли на проточном цитофлуориметре Cytomics FC-500 (Beckman Coulter, Inc, США).

Анализ экспрессии поверхностных маркеров подтвердил мезенхимную природу клеток (Таблица 2). Низкий уровень или практически полное отсутствие экспрессии маркеров CD11b-, CD14-, CD34-, CD45- и CD133- свидетельствует об отсутствии в культуре эндотелиальных клеток или клеток крови как на 1, так и на 4 пассаже. Высокая адгезивная активность клеток к культуральному пластику, способность активно пролиферировать и формировать плотный монослой, а также высокая экспрессия характерных поверхностных маркеров - CD105+/CD90+/CD29+, подтверждает, что культура СКЖТ имеет характеристики мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (ММСК): низкий уровень экспрессии маркеров клеток гемопоэтического и лимфоцитарного рядов: CD45-/CD11b-/CD34- подтверждает чистоту полученной культуры клеток.

Таблица 2 - Анализ иммунофенотипа культуры СКЖТ на разных пассажах культивирования в монослое.

Маркеры клеток	Уровень экспрессии (%)		Клетки-мишени
	Пассаж 1	Пассаж 4	
Isotype IgG	0.109	0.523	Автофлуоресценция
CD11b-	0.215	5.743	Лейкоциты
CD14-	0.640	2.439	Моноциты
CD19-	2.310	5.702	В-лимфоциты
CD34-	5.529	4.384	Эндотелиальные клетки
CD45-	0.022	0.111	Лейкоциты
CD133-	0.013	0.354	Эндотелиальные клетки
CD29+	99.775	95.330	ММСК
CD90+	29.719	98.907	ММСК

CD105+	87.763	93.423	ММСК
---------------	---------------	---------------	-------------

Иммуноцитохимический анализ антигенов проводили на 2D и 3D культурах клеток, фиксированных с помощью 4% раствора параформальдегида в течение 20 минут. Образцы инкубировали с первичными антителами к виментину (Abcam, R&D systems), коллагену IV типа (Abcam), E-кадгерину (Thermo Scientific), N-кадгерину (Thermo Scientific), CD31 (Thermo Scientific), фактору роста эндотелия сосудов VEGF (Thermo Scientific), фактору вон Виллебранда vW (Thermo Scientific), рецептору 2 к VEGF Flk-1 (Thermo Scientific), остеокальцину (R&D systems) и остеопонтину (Abcam). Далее проводили инкубацию с видоспецифичными вторичными антителами, конъюгированными с флуорохромами AlexaFluor488 и DyLight594 (Thermo Scientific). Ядра докрашивали флуоресцентным красителем бис-бензimid - Hoechst 33258 (Serva). Полученные препараты накрывали покровным стеклом, и анализировали в видимом и ультрафиолетовом световых диапазонах под лазерным конфокальным микроскопом Olympus Fluoview FV10I (Olympus, Япония).

Сравнительное исследование экспрессии специфических маркеров клетками, выращенными в 2D и 3D культуре, показало их различие (Рис.8 а, б). Клетки как в монослое, так и в сфероиде синтезировали маркеры мезенхимных клеток: виментин - белок цитоскелета, белок внеклеточного матрикса коллаген IV типа и белок межклеточных контактов -N- кадгерин. Однако локализация этих маркеров различалась. Коллаген IV типа в монослое выявлен в цитоплазме клеток, а в 3D культуре локализован в цитоплазме и межклеточном пространстве. N-кадгерин в отличие от монослойной культуры, где он локализован в цитоплазме, в сфероидах выявлен, кроме того, и на мембране поверхностных клеток. Белок адгезивных межклеточных контактов E-кадгерин в отличие от монослоя в 3D культуре наблюдали на мембране поверхностных клеток сфероида. Полученные данные свидетельствуют, на наш взгляд, о самоорганизации клеток и морфогенезе в сфероиде. Появление на мембране поверхностных клеток E-кадгерина эпителиальных контактов в сфероиде указывает на частичный мезенхимо-

эпителиальный переход поверхностных клеток при 3D культивировании (Рис. 8 в г).

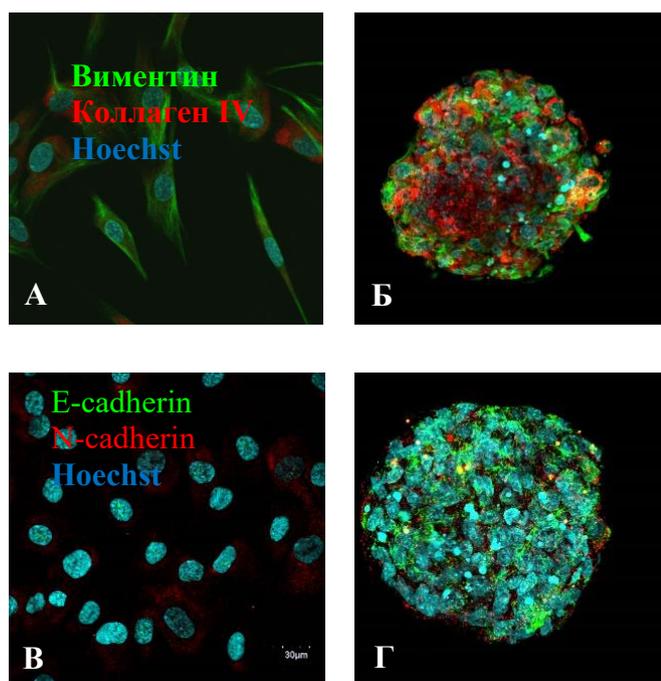


Рисунок 8 - Иммуноцитохимический анализ экспрессии мезенхимных и эпителиальных маркеров в клетках жировой ткани крыс в 2D и 3D культуре. Синтез виментина (зеленый) и коллагена IV (красный) в 2D (А) и 3D (Б) культуре. Синтез E-кадгерина (зеленый) и N-кадгерина (красный) в 2D (В) и 3D (Г) культуре. Ядра окрашены Hoechst 33258 (синий). Лазерная конфокальная сканирующая микроскопия

После 7 суток 3D культивирования СКЖТ в питательной среде с добавлением индуктора васкулогенеза VEGF в сформированных сфероидов наблюдали экспрессию специфических маркеров эндотелиальных прогениторных клеток CD31, Flk-1, VEGF, vonWillebrand (Рис.9).

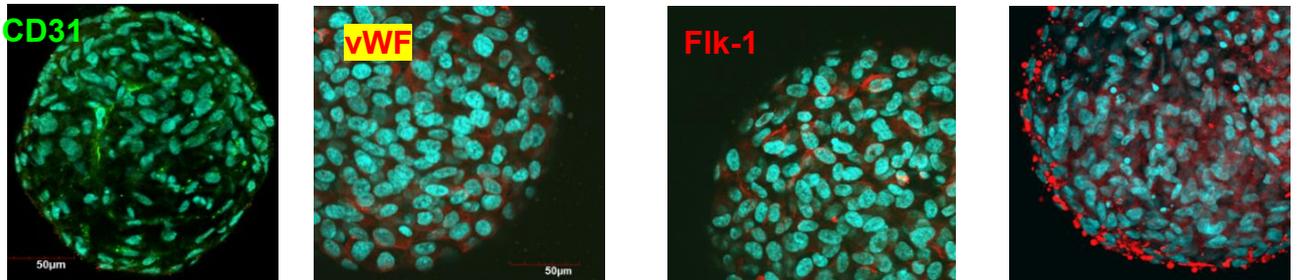


Рисунок 9 - Синтез маркеров эндотелиальных прогениторных клеток в клетках индуцированных VEGF сфероидов: А. CD31 (зеленый); Б. Фактор фон Виллебранда vWF (красный); В. Рецептор 2 к VEGF Flk-1 (красный); Г. Фактор роста эндотелия сосудов VEGF (красный). Ядра клеток окрашены Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

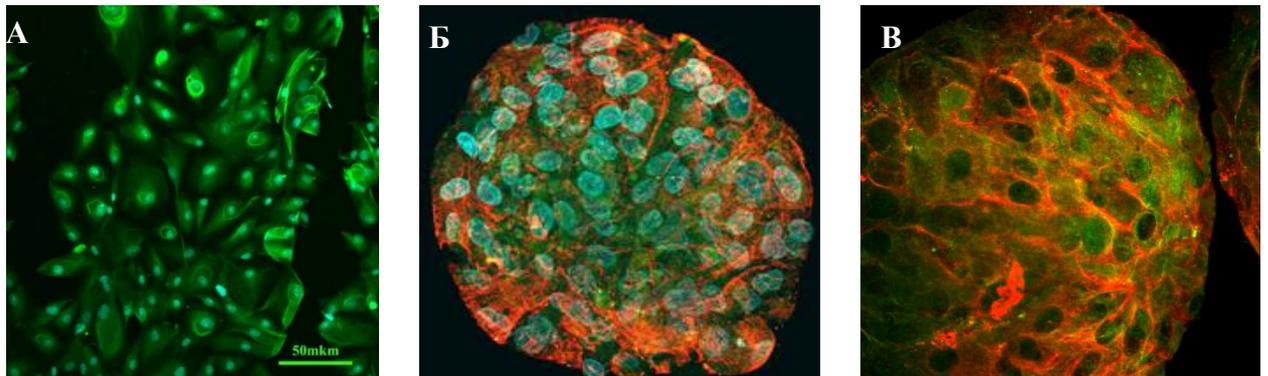


Рисунок 10 - Индукция остеогенной дифференцировки СКЖТ в монослойной культуре и в сфероидов в присутствии остеоиндуктивной матрицы БАК-100. А – экспрессия остеокальцина в СКЖТ крыс, культивированных в монослое. Б – экспрессия остеокальцина (красный) и виментина (зеленый) в СКЖТ крыс, выращенных в 3D культуре (сфероид); В – экспрессия остеопонтина (красный) и виментина (зеленый) в СКЖТ крыс, в 3D культуре (сфероид). Ядра клеток окрашены Hoechst 33258 (синий). Лазерная сканирующая конфокальная микроскопия

Исследования показали остеогенную дифференцировку СКЖТ, культивированных в присутствии остеоиндуктивной матрицы БАК-100 как в монослое, так и в сфероидов (Рис.10). В 2D культуре клеток, синтез остеокальцина

наблюдали преимущественно в околоядерной области и диффузно по цитоплазме клеток, тогда как в 3D культуре клетки образовывали длинные выросты, обогащенные остеокальцином. При этом остеопонтин локализовался вдоль мембран клеток. Все клетки синтезировали виментин.

2.4. Протокол экспериментальной операции

По наружной поверхности бедра производили разрез кожи длиной до 3,0 см. Далее острым и тупым путем осуществляли доступ к бедренной кости и бором производили две поперечные остеотомии (Рис. 11) с удалением фрагмента кости $0,3 \times 0,5$ см во всех экспериментальных группах. В первой группе дефект заполняли заранее подготовленным апатитосиликатным имплантационным материалом «БАК-1000» в виде цилиндрических блоков соответствующего размера (Рис. 12). Во второй группе дефект кости заполняли биоинженерной 3D-конструкцией, состоящей из ангиоиндуцированных МСК на апатитосиликатной матрице («БАК-1000»). Во всех группах костные отломки бедра стягивали при помощи микропластин с фиксацией титановыми микровинтами ($L=5$ мм, $D=1,2$ мм) и компрессией 1 – 2 Н/см (Рисунок 13). Зону перелома покрывали листом коллагеновой мембраны «Bio-Gide Geistlich» размерами $1,5 \times 1,0$ см (Рис. 14). Мышцы возвращали на место. Послойно ушивали рану с использованием шовного материала «Викрил», №5. Гемостаз производили методом лигирования сосудов. Средняя продолжительность каждой операции составляла 30 минут.

2.5. Послеоперационные мероприятия



Рисунок 11 – Воспроизведение дефекта диафиза бедренной кости. Желтыми стрелками отмечены культы костных отломков

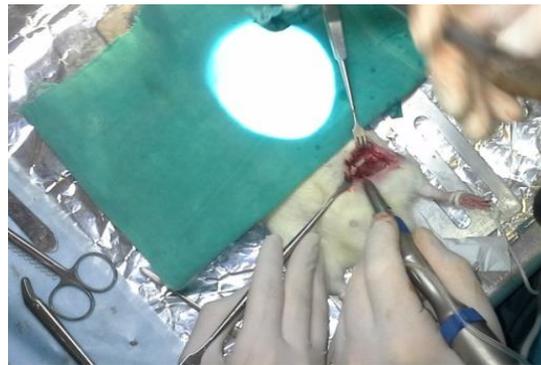


Рисунок 12 – Инокуляция имплантационного материала в костный дефект (стрелка).



Рисунок 13 – Момент наложения металлического фиксатора на отломки диафиза бедренной кости; стрелкой указан имплантационный материал в костном дефекте.

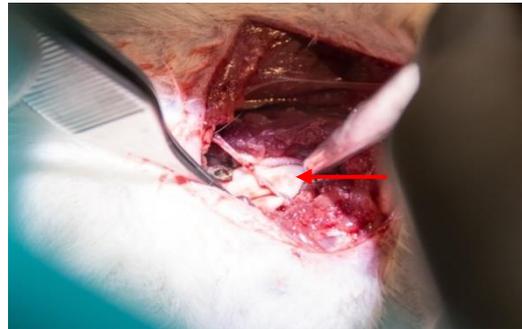


Рисунок 14 – Имплантационный материал покрыт коллагеновой мембраной (стрелка).

Операционную рану ушивали (Рис. 15), обрабатывали аэрозолем с антисептическими, противовоспалительными и ранозаживляющими свойствами («Алюминий спрей», Permixon Pharma Kft) (Рис. 16). Результаты фиксировали на рентгеновских прицельных снимках (Рис. 17) Животных помещали в клетку на стерильной ткани с несколькими гранулами корма, смоченными водой. Наблюдение за животными осуществляли до их выхода из наркоза. В послеоперационном периоде применяли противовоспалительный препарат кетафен 2 мг/кг в течение 5 дней и противомикробный препарат энрофлоксацин (2,5%; «Байтрил», Bayer; Германия) 5 мг/кг в течение 5 суток.



Рисунок 15 – Завершение операции, наложение швов.



Рисунок 16 – Операционная рана покрыта дезинфицирующим аэрозолем.

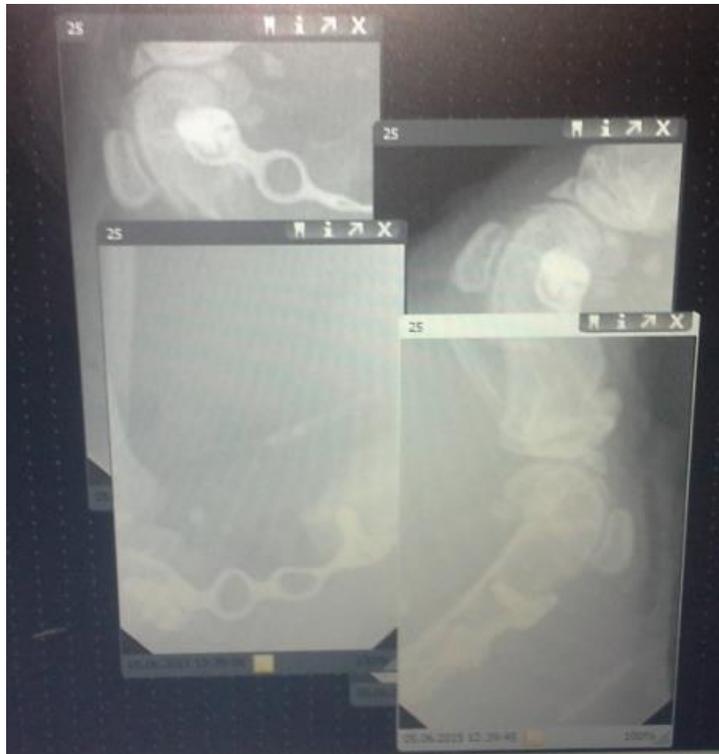


Рисунок 17 – Фиксация результатов двух этапов операции на рентгеновских снимках.

2.6. Методика гистологического исследования

В экспериментальной области иссекали фрагменты, включающие имплантат с фиксаторами и окружающие ткани, и помещали их в нейтральный формалин на 24 часа, затем его обновляли и промывали материал в проточной воде при комнатной температуре в течение 24 часов. Производили декальцинацию в

25% растворе трилона Б. Металлические элементы устройств (фиксаторы) удаляли по мере декальцинации костных участков тканевых фрагментов. Затем готовили серийные срезы (толщиной 2 – 3 мкм), окрашивали гематоксилином и эозином, а также по Ван-Гизону (фуксин-пикриновый метод окраски).

В процессе анализа подразделяли исследуемые структуры на две основные зоны:

- a. «тело» имплантата, включавшее в себя, его матрикс;
- b. периимплантационная зона, включавшая в себя тканевые структуры, окружающие имплантационный материал.

2.7. Статистические методы

Для всех количественных данных проводили проверку на нормальность. При нормальном распределении вычисляли групповое среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (SD) с использованием пакета анализа данных программы Microsoft Excel (версия 14.0.4760.1000, 32-разрядная).

Статистическую обработку данных проводили с использованием программного обеспечения SPSS Statistics 17.0 (версия 17.0.0.236), построение графиков выполняли в Statsoft Statistica 12 для Windows 10 (версия 12.5.192.0) с привлечением возможностей программы «STATGRAPH 5.1» («Microsoft», США).

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. I группа – контрольная, имплантация «Бак-1000»

30 сутки эксперимента

При гистологическом исследовании в области дефекта обнаружены единичные костные трабекулярные структуры, у краев которых наблюдали скопление гигантских многоядерных остеокластов, что говорит о начальных стадиях остеогистогенеза (Рис. 18).

Периимплантационное ложе образовано преимущественно рыхлой волокнистой соединительной тканью с участками интенсивного остеогистогенеза: формирование остеогенных трабекулярных структур (Рис. 19, Рис. 20). Особое внимание обращает на себя интенсивный ангиогенез в межтрабекулярных пространствах новообразованной костной ткани (Рис. 21, Рис. 22, Рис. 23). Кроме того, обнаружили фокальную лимфоцитарно-макрофагальную инфильтрацию с единичными сегментоядерными лейкоцитами.

Таким образом, на 30 сутки эксперимента отмечали достоверные признаки интенсивного ангиогенеза и слабо выраженного остеогистогенеза с формированием аркадно-трабекулярных структур, сопровождающиеся умеренной воспалительной реакцией в области инокуляции имплантационного материала.

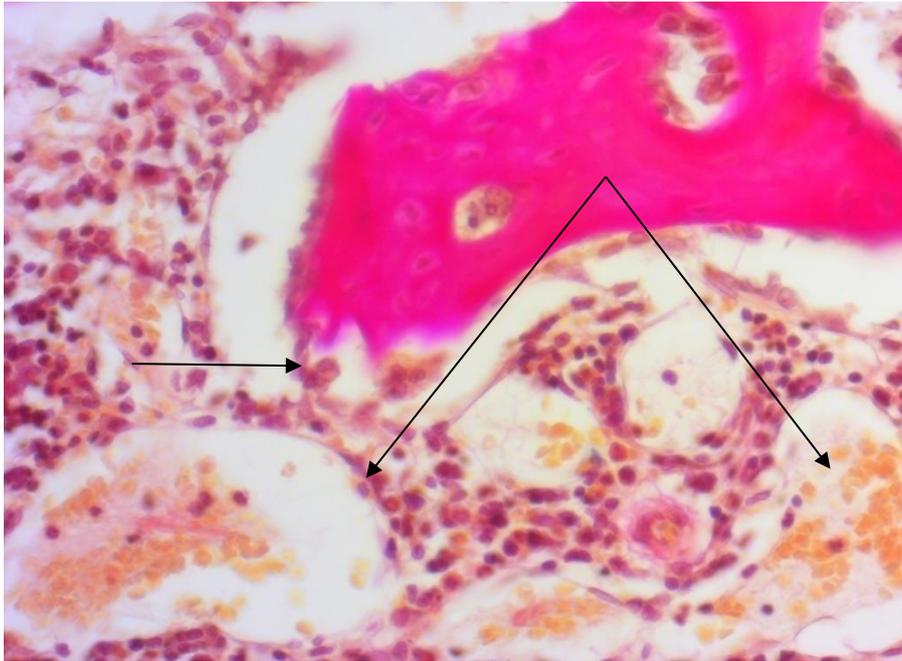


Рисунок 18 – Фрагмент кости на 30 сутки эксперимента во I группе. Интенсивный ангиогенез в области формирования костной ткани (стрелки углом). Эндотелиальные клетки с хорошо развитой цитоплазмой. У костных краев, местами, обнаружены гигантские многоядерные остеокласты (одинарная стрелка). Окраска по Ван-Гизону, увелич. $\times 400$.

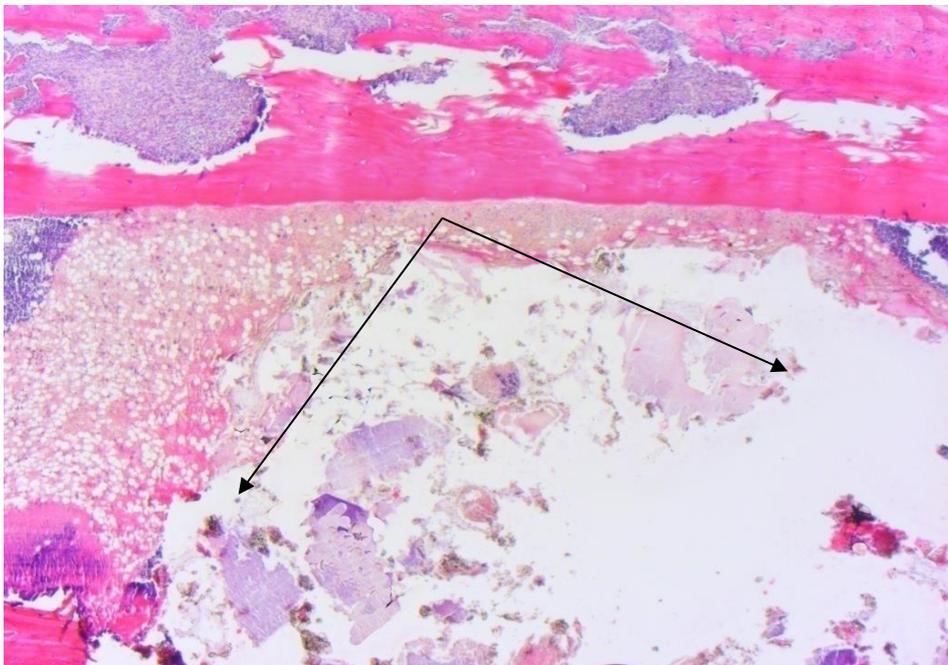


Рисунок 19 – Фрагмент имплантационного материала (стрелки углом) на 30 сутки эксперимента во I группе. Окружающая ткань преимущественно рыхлая, местами с очагами нагноения. Внизу виден вход в костномозговую полость, через которую инокулировали имплантационный материал (одинарная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 25$.

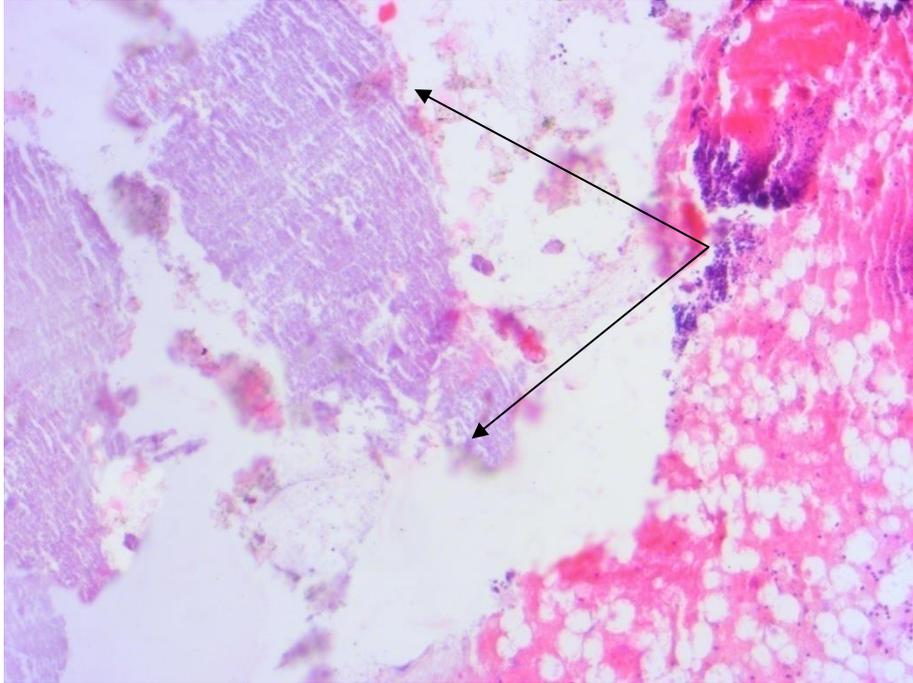


Рисунок 20 – Фрагмент имплантационного материала на 30 сутки эксперимента во I группе. Имплантат имеет ячеисто-каналикулярную структуру (стрелки углом). Окружающая ткань преимущественно рыхлая, местами с очагами нагноения. Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 100$.

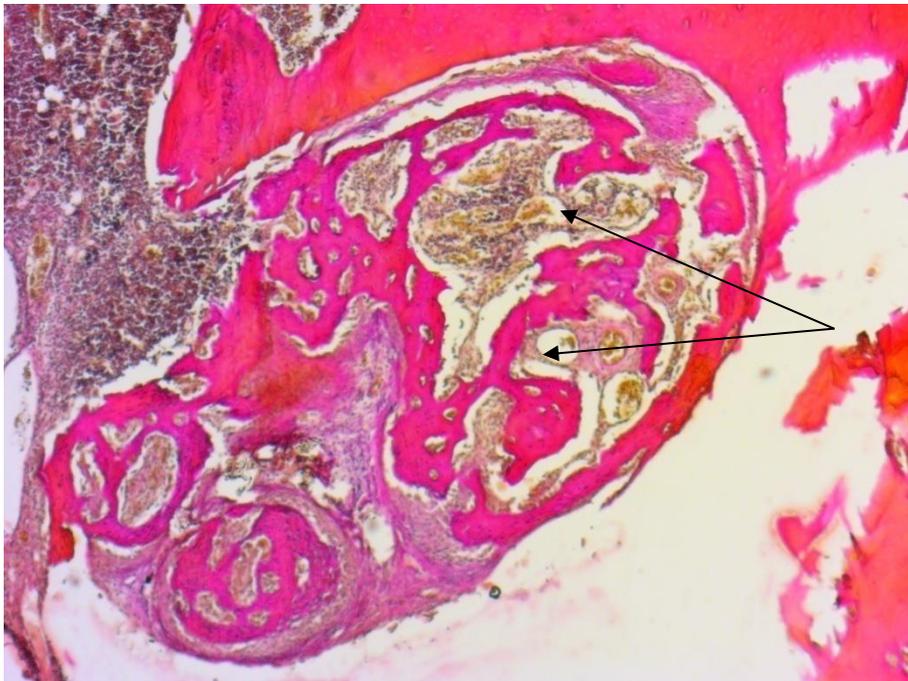


Рисунок 21 – Фрагмент кости на 30 сутки эксперимента во I группе. Умеренный остеогистогенез в периимплантационной ткани (стрелки углом). Окраска по Ван-Гизону, увелич. $\times 50$.

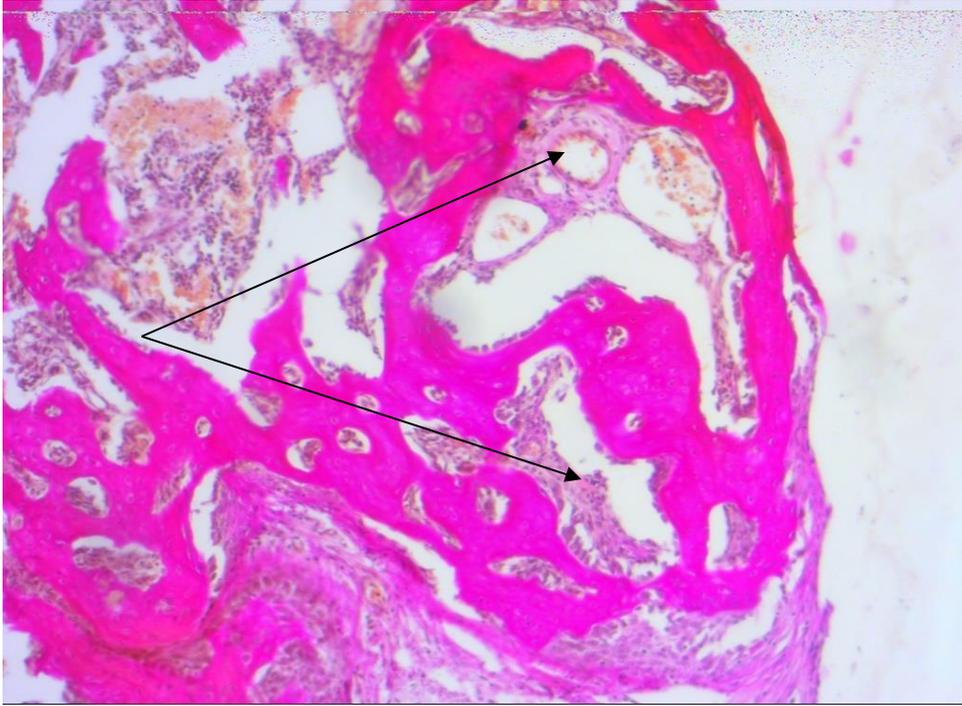


Рисунок 22 – Фрагмент кости на 30 сутки эксперимента во I группе. Osteогистогенез в периимплантационной ткани сопровождается активным ангиогенезом (стрелки углом). Окраска по Ван-Гизону, увелич. ×50.

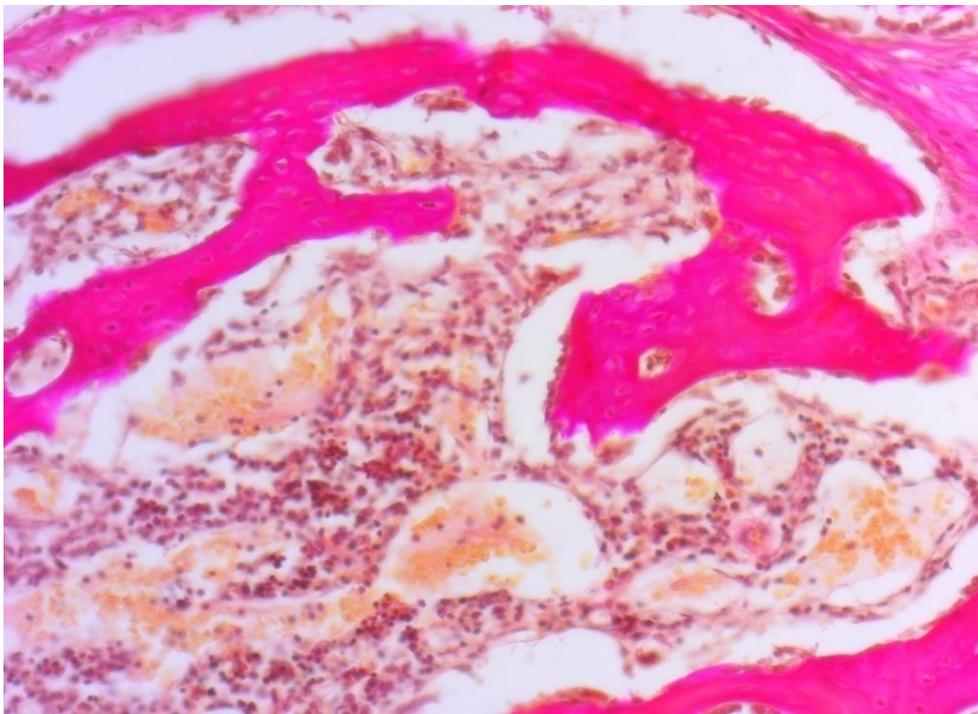


Рисунок 23 – Фрагмент кости на 30 сутки эксперимента во I группе. Osteогистогенез сопровождается интенсивным ангиогенезом в межтрабекулярном пространстве. Окраска по Ван-Гизону, увелич. ×50.

60 сутки эксперимента

На этом сроке происходит резкое изменение тканевых структур. По периферии имплантационный материал представлен ячеисто-каналикулярной структурой с единичными гигантскими многоядерными остеокластами. Здесь преобладает грубоволокнистая соединительная ткань с очагами фиброза, бедная клеточными элементами. Также наблюдали резкое снижение интенсивности ангиогенеза: единичные кровеносные сосуды, преимущественно артерии и вены малого и среднего калибров (Рис. 24).

Таким образом, в этой группе на 60 сутки эксперимента сохранялась ячеисто-каналикулярная структура имплантационного материала, однако резко снижалась интенсивность ангиогенеза и остеогистогенеза.

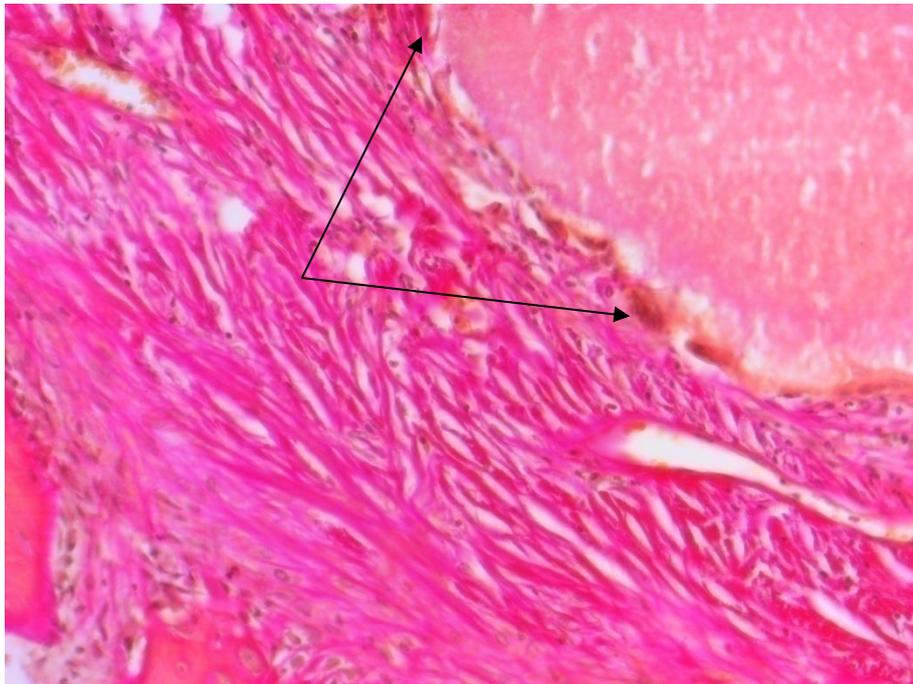


Рисунок 24 – Фрагмент кости на 60 сутки эксперимента во I группе. Имплантационный материал окружен грубоволокнистой фиброзной соединительной тканью. По краю имплантационного материала располагаются единичные гигантские многоядерные остеокласты (стрелки углом). Хорошо видна каналикулярно-ячеистая структура имплантационного материала. Окраска по Ван-Гизону, увелич. $\times 100$.

120 сутки эксперимента

На 120 сутки эксперимента во I группе наблюдали картину умеренного остеогистогенеза с формированием костной ткани губчатого строения, с признаками ремоделирования, по краям костных структур умеренное количество гигантских многоядерных остеокластов. Снижение количества клеток в периимплантационной ткани. Встречаются участки с дефектами, заполненными разреженной полупрозрачной субстанцией. В прилежащей к имплантационному материалу ткани отмечали выраженный отек и, местами, выраженную макрофагальную инфильтрацию на фоне гомогенизирующегося межклеточного матрикса (Рис. 25, Рис. 26, Рис. 27).

В некоторых микропрепаратах ячеисто-каналюлярный матрикс сохранен (Рис. 28), однако в других – модифицирован в микрочастицы желтого цвета с разрушением его структуры (Рис. 29).

Таким образом, во I группе на протяжении всего эксперимента отмечали снижение интенсивности ангиогенеза и остеогистогенеза. К концу эксперимента в микропрепаратах наблюдали разрушение имплантационного материала с его частичной трансформацией в микрочастицы ярко-желтого цвета.

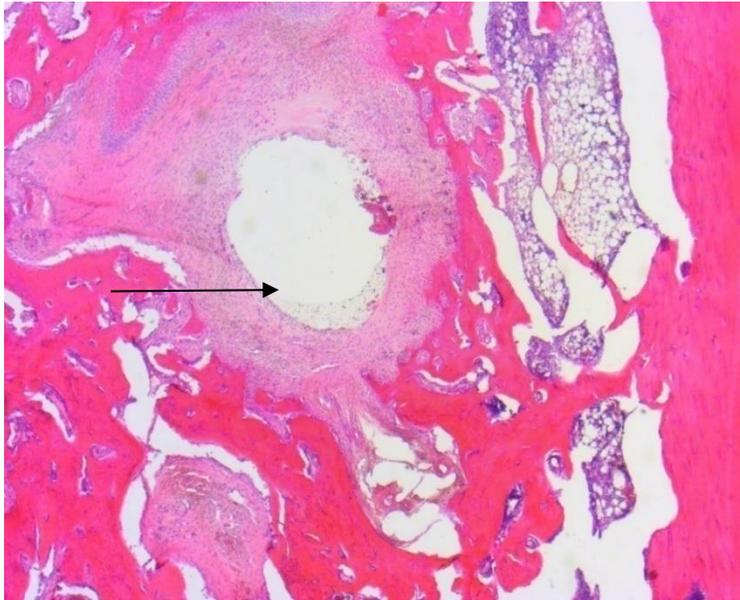


Рисунок 25 – Фрагмент кости на 120 сутки эксперимента во I группе. Вокруг полости на месте инокуляции обнаружены остатки имплантационного материала (одинарная стрелка), клеточно-волоконистая соединительная ткань и единичные зрелые костные структуры. Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 50$.

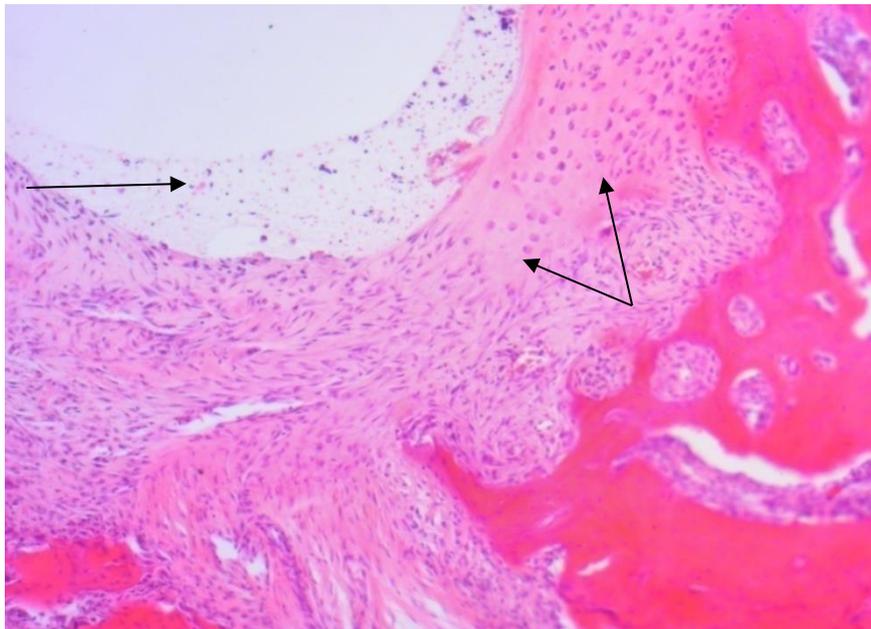


Рисунок 26 – Фрагмент кости на 120 сутки эксперимента во I группе. Артифициальный дефект (одинарная стрелка) окружен отеочной рыхлой межзубочной соединительной тканью, инфильтрированной макрофагами (стрелки углом). Единичные кровеносные сосуды в поле зрения. Кнаружи расположена преимущественно губчатая зрелая костная ткань, в костномозговых пространствах которой фиброзная соединительная ткань (сдвоенные стрелки) с элементами красного костного мозга. Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 100$.

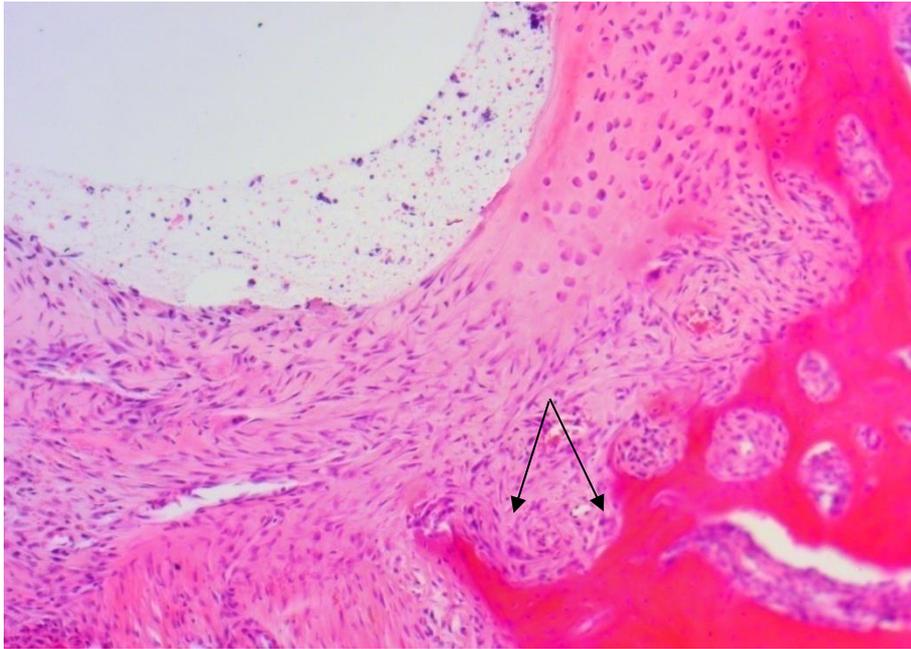


Рисунок 27 – Фрагмент кости на 120 сутки эксперимента во I группе. Дефект на месте имплантата заполнен слабо окрашенной мелкозернистой субстанцией с примесью округлых клеток. Окружающая рыхлая соединительная ткань содержит единичные кровеносные сосуды. Кнаружи расположена губчатая костная ткань с единичными гигантскими многоядерными остеокластами (стрелки углом). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 100$.

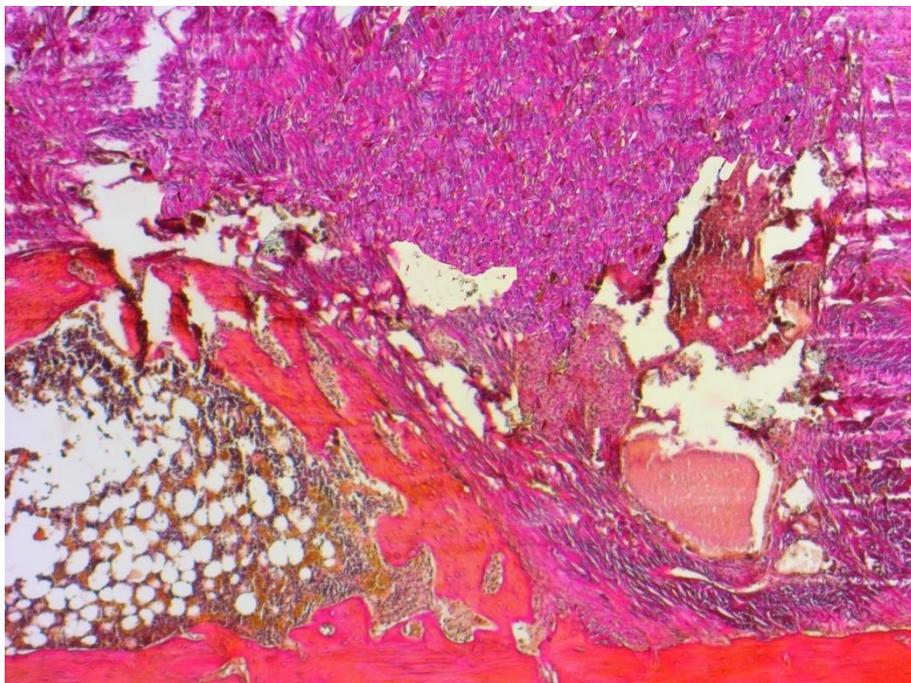


Рисунок 28 – Фрагмент кости на 120 сутки эксперимента во I группе. Имплантационный материал ячеисто-каналикулярной структуры (одинарная стрелка), частично окружен грубоволокнистой соединительной тканью. Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 25$.

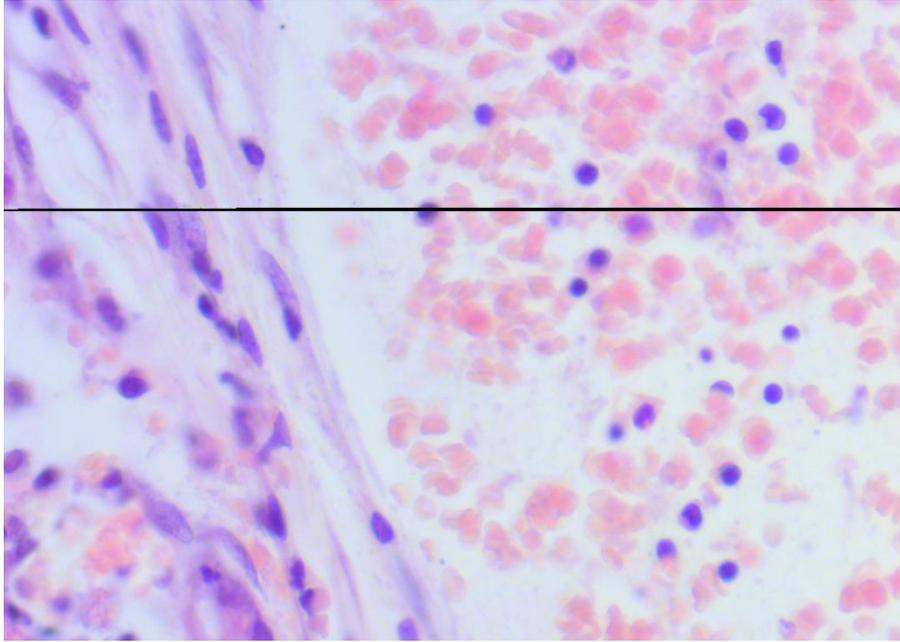


Рисунок 29 – Фрагмент кости на 120 сутки эксперимента во I группе. Многочисленные макрофаги (стрелки углом) в матрице имплантата, окруженного тонкой фиброзной капсулой (одинарная стрелка). Цитоплазма этих клеток имеет желтоватый оттенок ввиду активного фагирования микрочастиц ярко-желтого цвета (сдвоенные стрелки). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 200$.

Таблица 3 - Динамика изменения гистологической картины в контрольной группе.

Группа	контрольная		
Количество животных	24		
Сутки	30	60	120
описываемое явление			
Клеточный состав	Костная ткань трабекулярной структуры, рыхлая волокнистая соединительная ткань, многоядерные остеокласты	Преобладает фиброзная грубоволокнистая ткань, единичные многоядерные остеокласты	Формирование костной ткани губчатого строения с фиброзной соединительной тканью и многоядерными остеокластами

Ангиогенез	Рост ангиогенеза	Снижение ангиогенеза	Снижение ангиогенеза
Остеогенез	Не выражен	Слабо выражен	Слабо выражен
Воспалительная реакция (отек, лимфо-макрофагальная реакция, нагноение)	Отсутствует	Незначительное проявление	Незначительное проявление
Проявление кристаллов кремния	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует
Панваскулит	Отсутствует	Отсутствует	Отсутствует

3.2. II группа – опытная, имплантация «БАК-1000» в комбинации с ангиоиндуцированными МСК

30 сутки эксперимента.

Через 30 суток после завершения второго этапа операции в II группе в области имплантации на малых увеличениях отмечали обширный дефект костной стенки, через который была произведена инокуляция имплантационного материала в костномозговую полость, где отмечали скопления полиморфноядерных лейкоцитов (признаки гнойного воспаления) и деструкции (Рис. 30).

В некоторых микропрепаратах были обнаружены фрагменты имплантата, окруженные рыхлой волокнистой соединительной тканью и единичными гигантскими многоядерными остеокластами (Рис. 31). Причем, отчетливо определялась ячеисто-каналикулярная структура имплантационного материала. Наблюдали большое количество зон интенсивного ангиогенеза, выраженность которого зависела от их локализации (Рис. 32).

Следует отметить, что уже на 30 сутки эксперимента в этой группе, местами, наблюдали начальные признаки восстановления костной ткани, по периферии которых преобладали гигантские многоядерные остеокласты (Рис. 33).

Таким образом, в результате проведенного гистологического исследования в II группе были обнаружены следующие патоморфологические признаки в области имплантации и периимплантационной ткани: умеренная воспалительная реакция, явления интенсивного ангиогенеза, умеренно выраженный остеогистогенез.

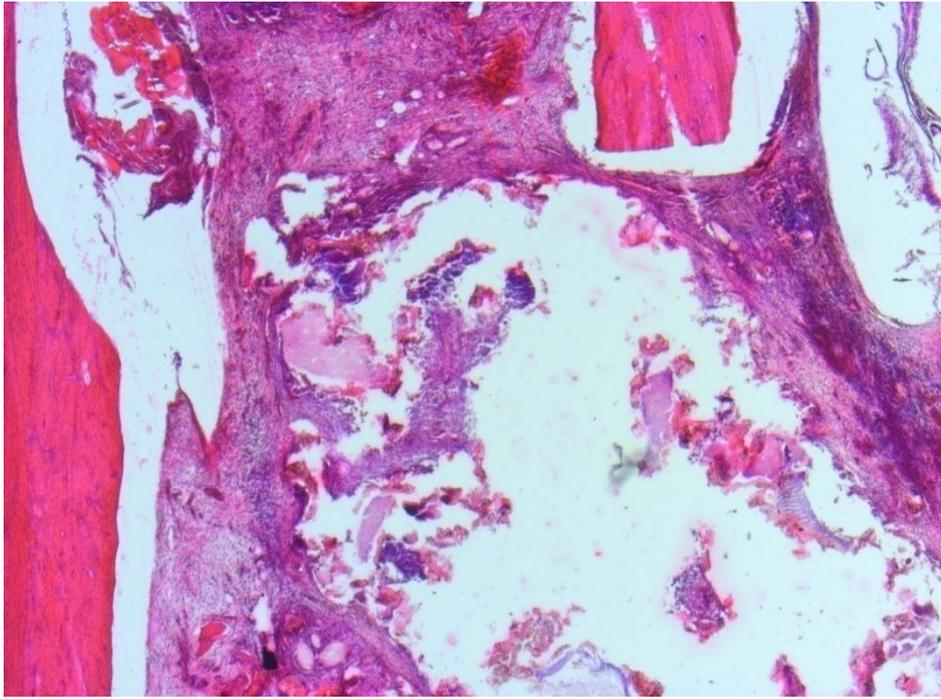


Рисунок 30 – Фрагмент кости на 30 сутки эксперимента в II группе. В поле зрения – вход в костномозговое пространство (одинарная стрелка), через который была произведена инокуляция имплантационного материала (стрелки углом). Отмечается развитие умеренная воспалительная реакция в области оперативного вмешательства. Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 25$.

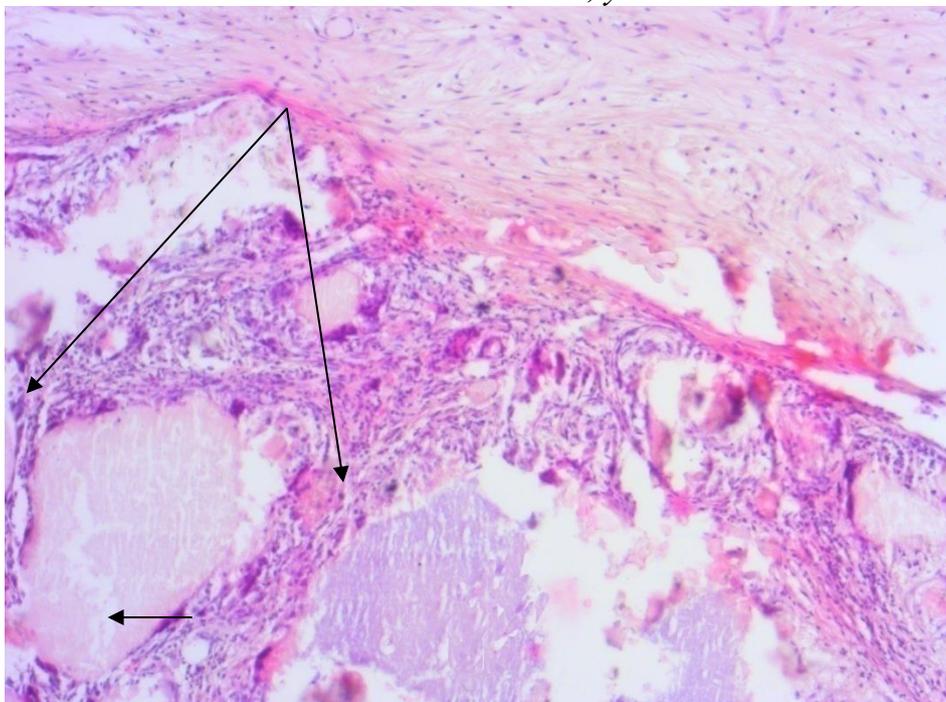


Рисунок 31 – Фрагмент кости на 30 сутки эксперимента в II группе. Имплантационный материал (стрелки углом) с прослойками рыхлой волокнистой соединительной ткани. По периферии фрагментов имплантата, имеющих отчетливую ячеисто-каналикулярную структуру, располагаются гигантские многоядерные клетки (одинарная стрелка).

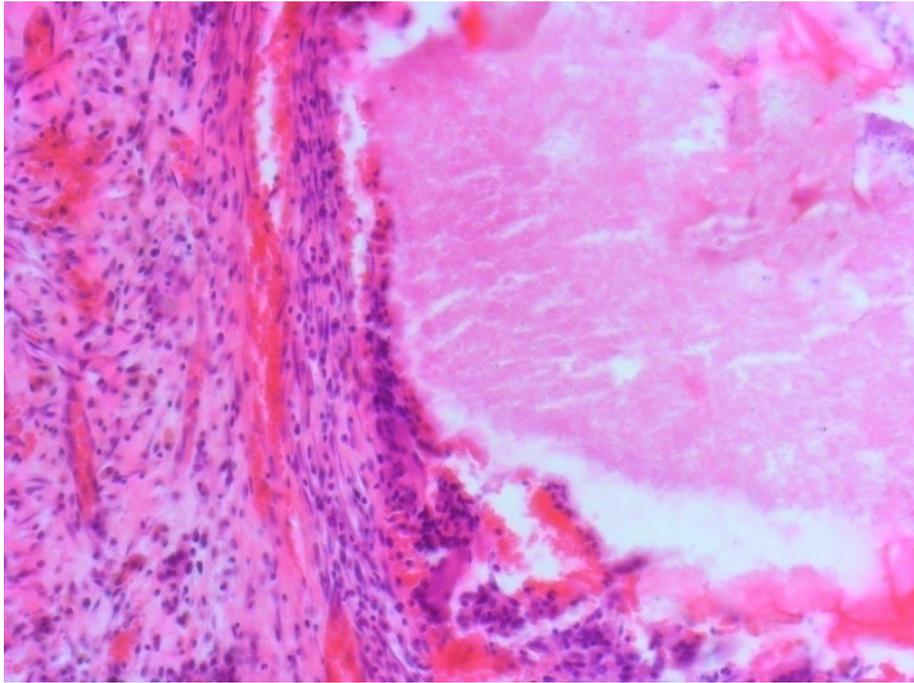


Рисунок 32 – Фрагмент кости на 30 сутки эксперимента в II группе. Интенсивный ангиогенез в соединительной ткани, окружающей имплантат, имеющий ячеисто-каналикулярную структуру. Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 200$.

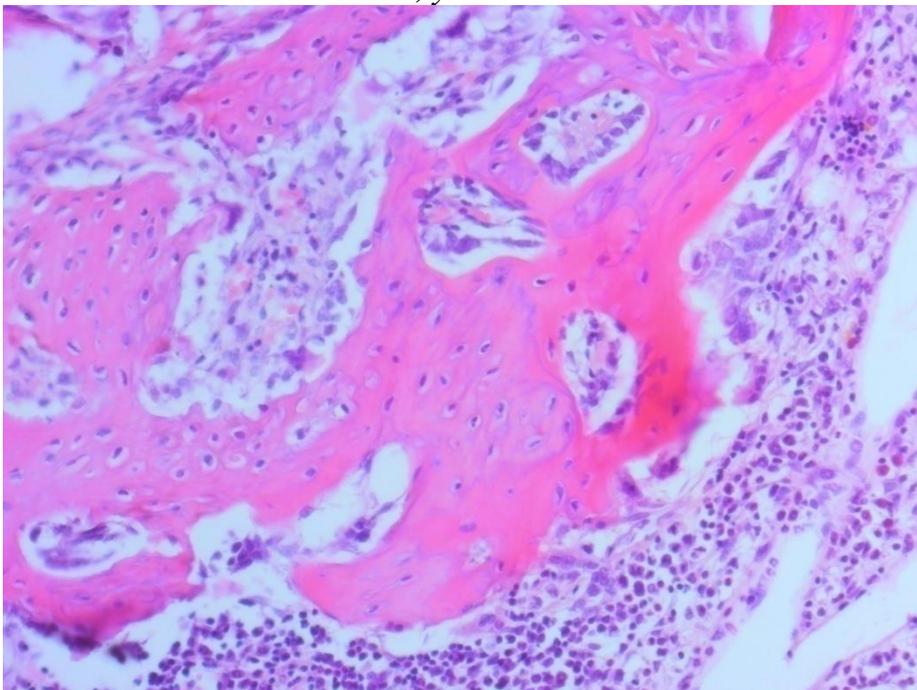


Рисунок 33 – Фрагмент кости на 30 сутки эксперимента в II группе. Начальные признаки остеогистогенеза с умеренной лимфомакрофагальной реакцией. На периферии костных трабекул многочисленные гигантские многоядерные остеокласты (стрелки углом). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 200$.

60 сутки эксперимента.

На этом сроке эксперимента на малых увеличениях в гистологических препаратах сохранялась инциссура костномозговой полости. В периимплантационной области – диффузная лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация (Рис. 34).

Следует отметить, что в большинстве образцов наблюдается редукция ячеисто-каналикулярной структуры импланта, который замещается мелкозернистыми частицами желтого цвета. Вокруг материала – тонкая соединительнотканная капсула. Периимплантационная ткань во всех микропрепаратах интенсивно инфильтрирована микрочастицами ярко-желтого цвета (Рис. 35). При увеличении $\times 200$ обнаружили микрокристаллическую структуру этих частиц или их конгломераты. Нередко они располагались в просветах кровеносных сосудов (Рис. 36).

Тем не менее, процесс остеогенеза в этой группе продолжался, а формирующаяся костная ткань была представлена в виде плотного компактного ободка, отделенного от скоплений частиц желтого цвета тонким слоем фиброзной капсулы (Рис. 37, Рис. 38). В некоторых микропрепаратах отмечали умеренную макрофагальную инвазию в структуру имплантата (Рис. 39).

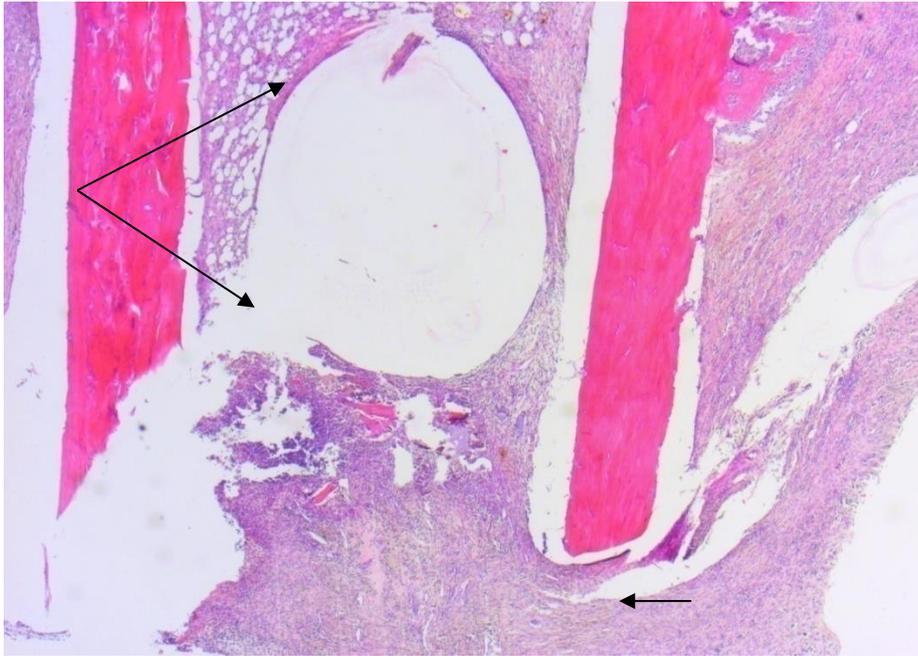


Рисунок 34 – Фрагмент кости на 60 сутки эксперимента в II группе. «Вход» в костномозговую полость (одинарная стрелка), через который был инокулирован имплантат. Диффузная лимфомакрофагальная инфильтрация соединительной ткани перимплантационной области. На месте имплантата – искусственная полость (стрелки углом). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 25$.

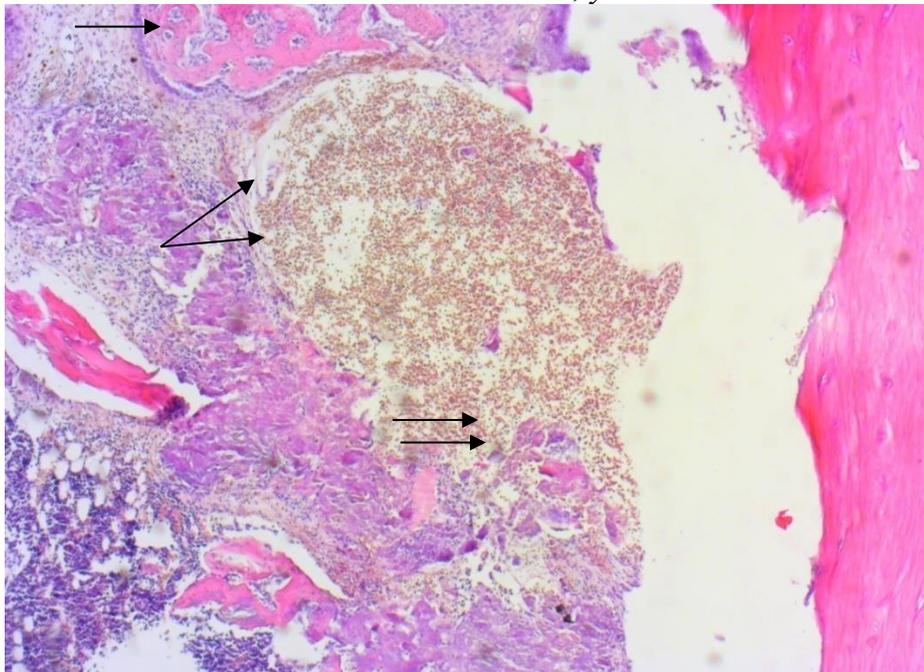


Рисунок 35 – Фрагмент кости на 60 сутки эксперимента в II группе. Имплантат гранулярной структуры, окружен тонким слоем коллагеновых фибрилл, формирующих соединительнотканную капсулу (стрелки углом). В поле зрения микроскопа – участок проникновения гранулярного материала за пределы капсулы (сдвоенные стрелки). На периферии имплантата костные трабекулы (одинарная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 50$.

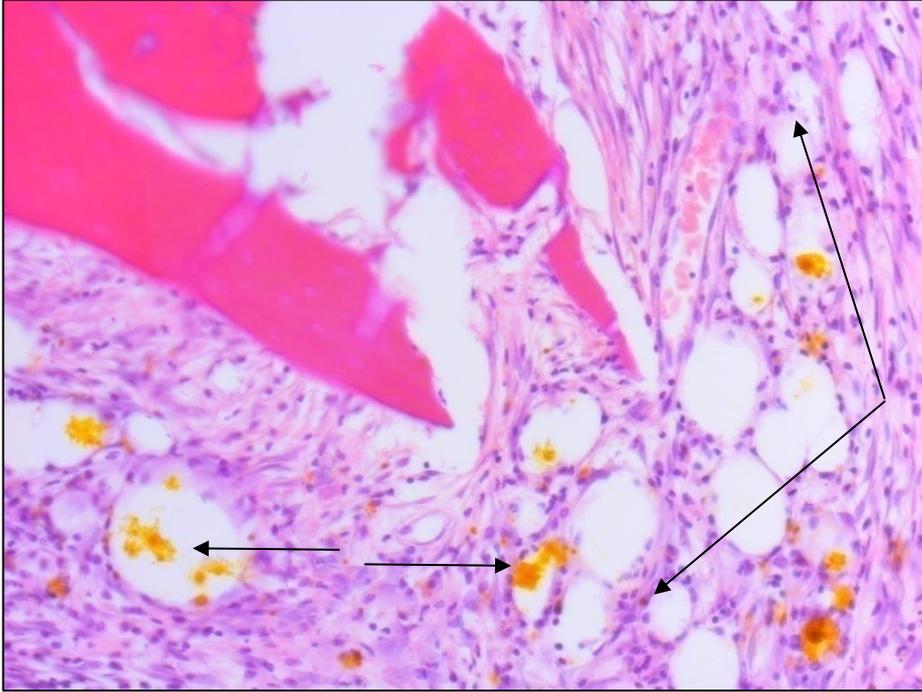


Рисунок 36 – Фрагмент кости на 60 сутки эксперимента в II группе. В микропрепарате – многочисленные кровеносные сосуды, преимущественно капиллярного типа (стрелки углом). По всему периметру препарата обнаружены ярко-желтые частицы микрокристаллической структуры (одинарные стрелки). В некоторых полях зрения микроскопа они локализованы в просветах капиллярных кровеносных сосудов. Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 200$.

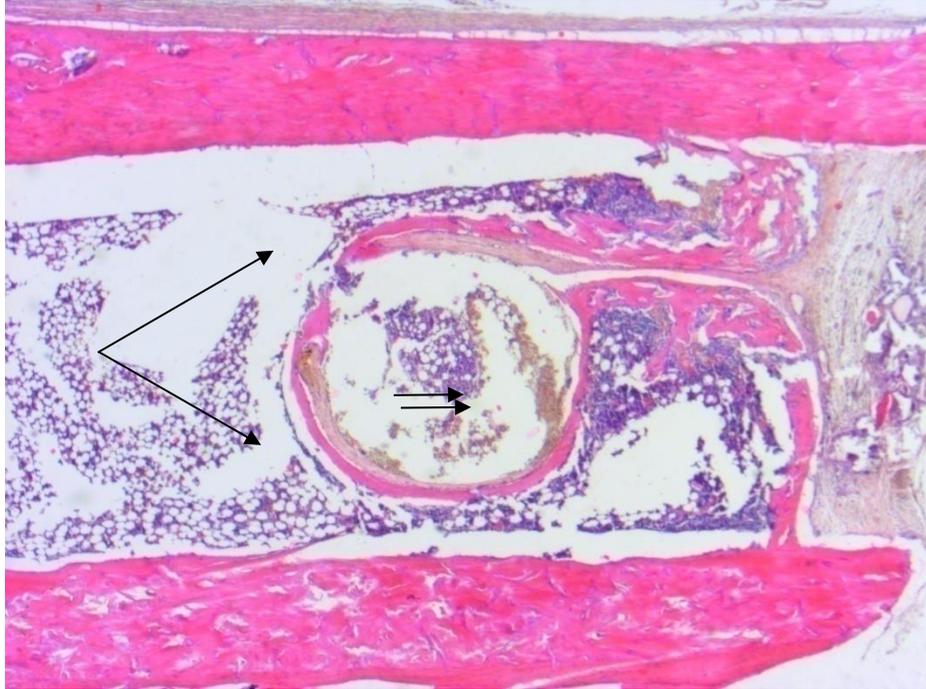


Рисунок 37 – Фрагмент кости на 60 сутки эксперимента в II группе. Сформированный костный ободок (стрелки углом) выстлан слоем фиброзной соединительной ткани. Вокруг имплантационного материала (сдвоенные стрелки) скопление частиц ярко-желтого цвета. Также виден «вход» в костномозговую полость (одинарная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 50$.

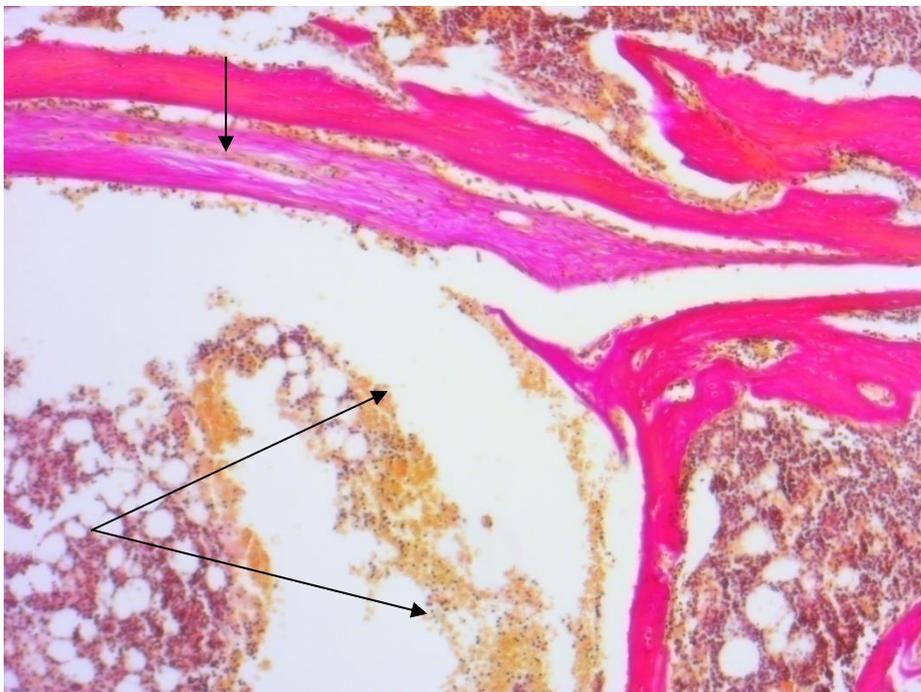


Рисунок 38 – Фрагмент кости на 60 сутки эксперимента в II группе. Скопления желтого кристаллического гранулярного материала (стрелки углом). Слой фиброзной соединительной ткани, отделяющий костную пластину от скоплений частиц преформированного имплантационного материала (одинарная стрелка). Окраска по Ван-Гизону, увелич. $\times 100$.

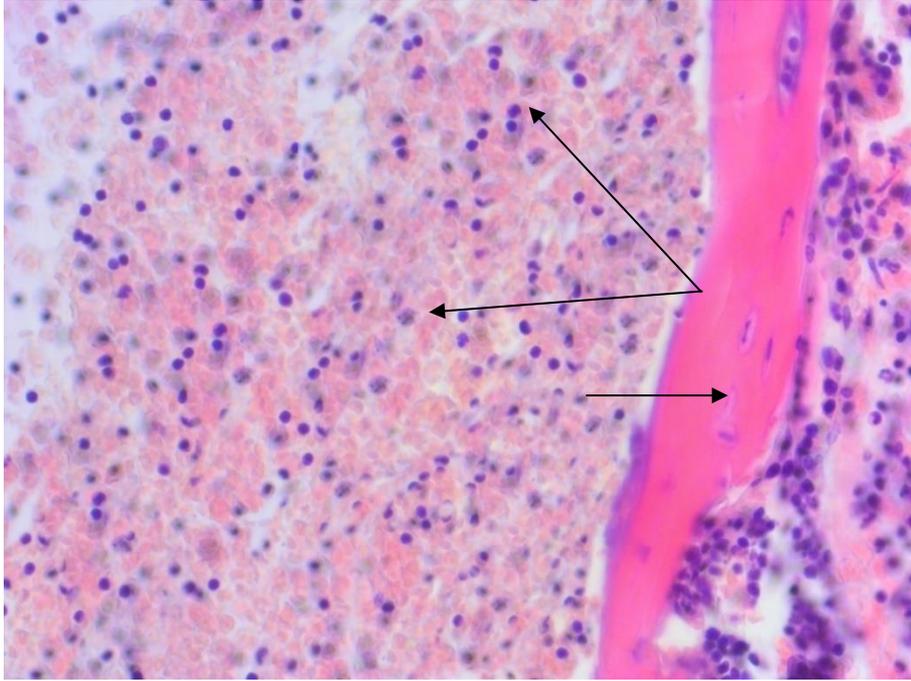


Рисунок 39 – Фрагмент кости на 60 сутки эксперимента в II группе. Преформированный материал имплантата, окаймленный костной пластиной (одинарная стрелка), имеет мелко-гранулярное строение, образован частицами ярко-желтого цвета. Отмечается интенсивная инвазия лимфомакрофагальных элементов (стрелки углом). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 200$.

Во всех микропрепаратах в периимплантационной ткани отмечали признаки интенсивного ангиогенеза преимущественно за счет пролиферации гемокапилляров (Рис. 40).

Стенки кровеносных сосудов местами отечны, со стертым рисунком волокнистой основы и лизисом части клеток, однако без воспалительной инфильтрации. Такие изменения, вероятно, связаны с их апоптозом. В просветах и стенках большинства кровеносных сосудов и в межсосудистом пространстве наблюдали микрокристаллические частицы желтого цвета (Рис. 41).

Одновременно с интенсификацией ангиогенеза, в периимплантационной зоне наблюдали активный остеогистогенез, интенсивность которого варьировала: от образования остеοидного вещества и юной трабекулярной ткани по типу ретикулофиброзной формации, и до дифференцированной костной ткани, подвергающейся ремоделированию (Рис. 42). В соединительной ткани между трабекулами большое количество остеобластов (Рис. 43).

Таким образом, в II группе уже на 60 сутки эксперимента были выявлены гистологические признаки интенсивных ангиогенеза и остеогистогенеза (Рис. 44). Причем, местами, у костных краев выявили участки гиперплазии остеобластов (Рис. 45).

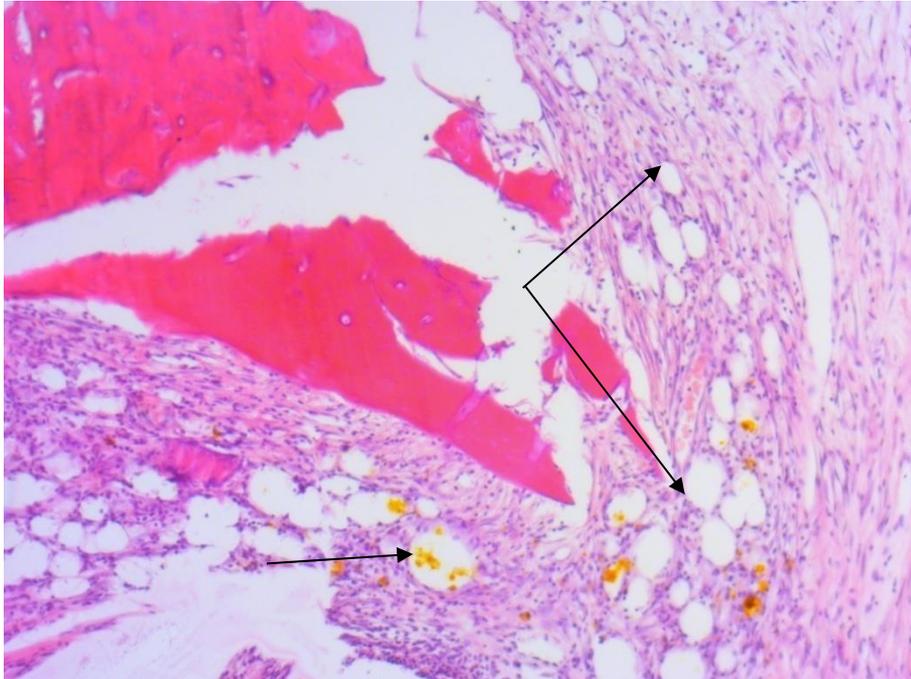


Рисунок 40 – Фрагмент кости на 60 сутки эксперимента в II группе. В периимплантационной ткани выраженный ангиогенез с преобладанием кровеносных сосудов капиллярного типа (стрелки углом). Некоторые микрокристаллические частицы желтого цвета располагаются в просвете сосудов (одинарная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 100$.

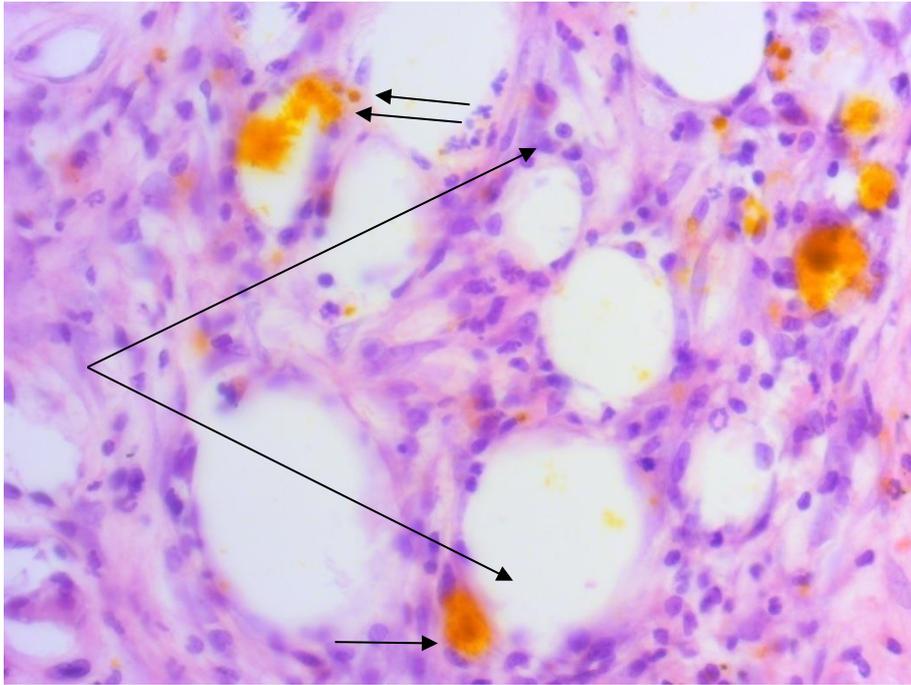


Рисунок 41 – Фрагмент кости на 60 сутки эксперимента в II группе. Диффузная лимфомакрофагальная инфильтрация в сочетании с интенсивным формированием кровеносных сосудов капиллярного типа (стрелки углом). В просвете некоторых из них обнаружены микрокристаллы желтого цвета, которые, местами, разрушают сосудистую мембрану (сдвоенные стрелки). Некоторые микрокристаллы фагированы (одинарная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 400$.

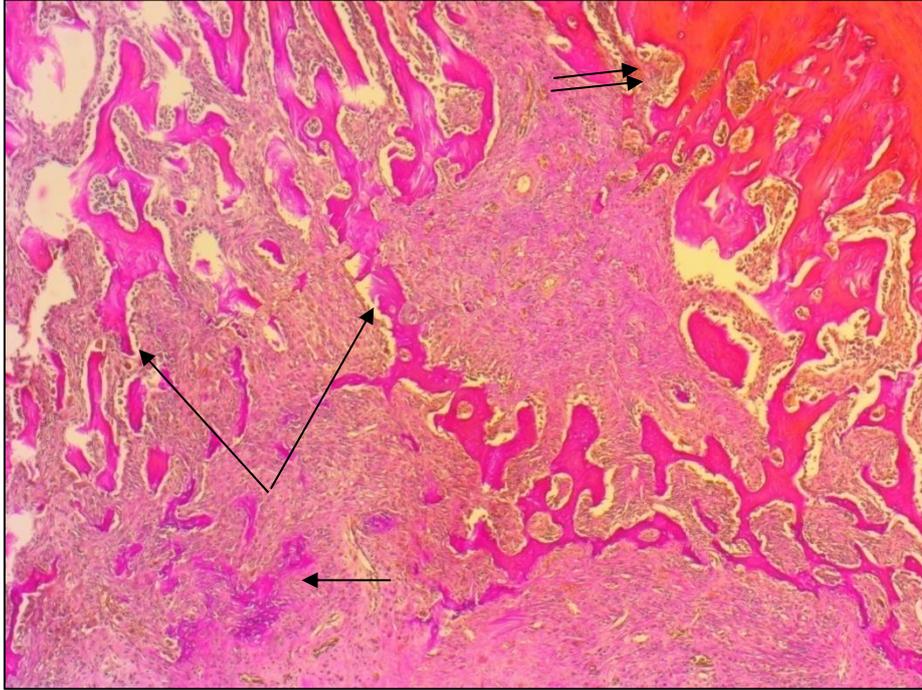


Рисунок 42 – Фрагмент кости на 60 сутки эксперимента в II группе. Остеогистогенез трабекулярных структур по периферии имплантационного материала (стрелки углом). Степень дифференцировки клеток остеобластического ряда варьирует в широких пределах: от остеоида (одинарная стрелка) до зрелой костной ткани пластинчатого типа, с последующим ее ремоделированием. Об этом свидетельствуют расположенные на периферии гигантские многоядерные остеокласты (сдвоенные стрелки). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 50$.

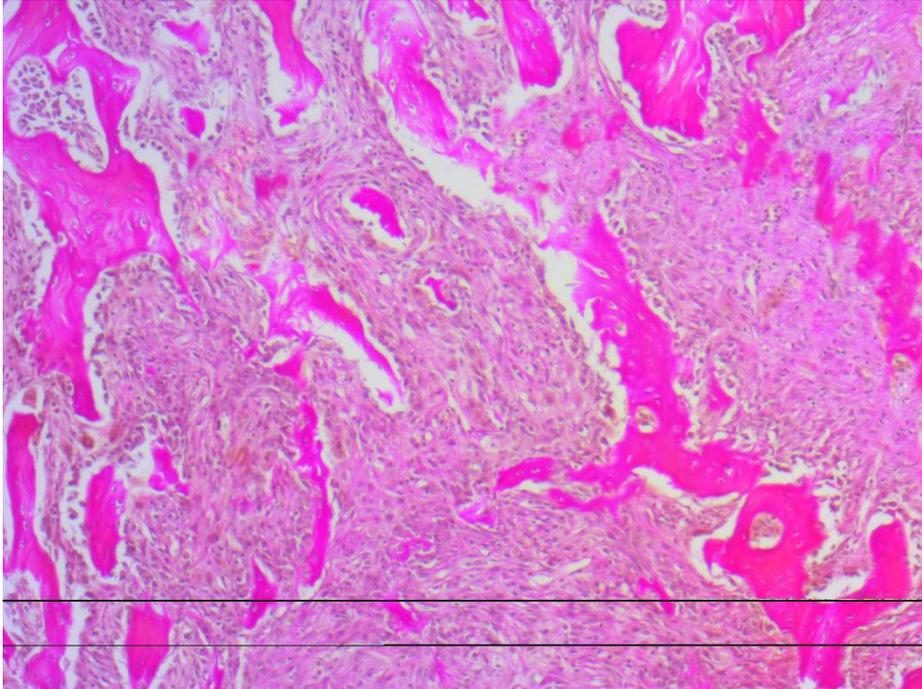


Рисунок 43 – Фрагмент кости на 60 сутки эксперимента в II группе. Формирующаяся кость представлена трабекулярными аркадами, или имеет фиброретикулярную структуру (одинарные стрелки). Отмечали признаки интенсивной пролиферация остеогенных предшественников в межтрабекулярных пространствах (стрелки углом). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 50$.

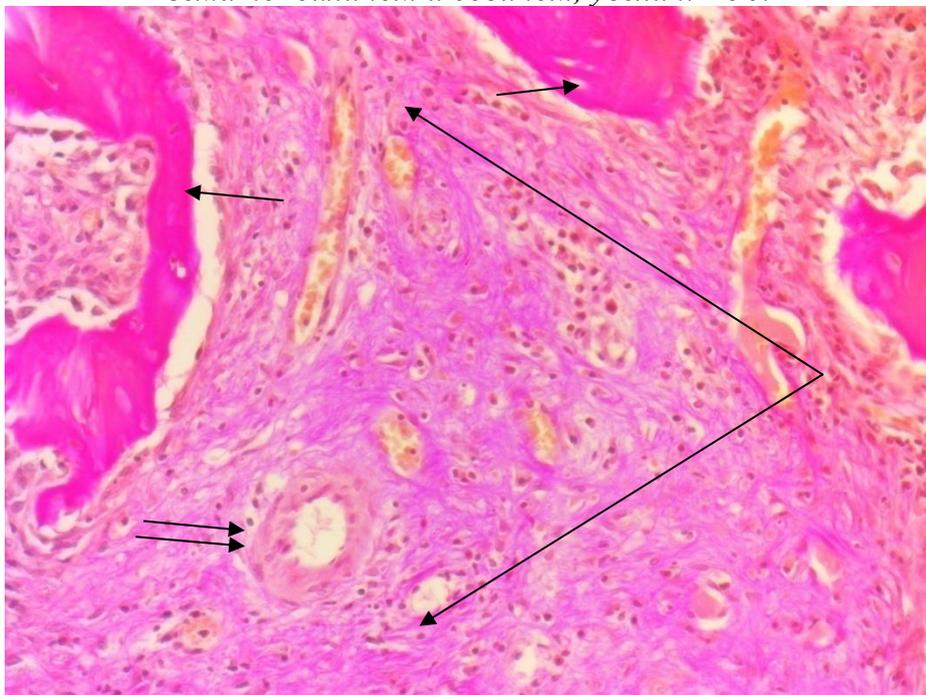


Рисунок 44 – Фрагмент кости на 60 сутки эксперимента в II группе. Выраженный ангиогенез (стрелки углом) в межтрабекулярных пространствах с признаками остеогенеза (одинарные стрелки). Кровеносные сосуды различного калибра, большое количество артериол с выраженным слоем гладкомышечной ткани (сдвоенные стрелки). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 200$.

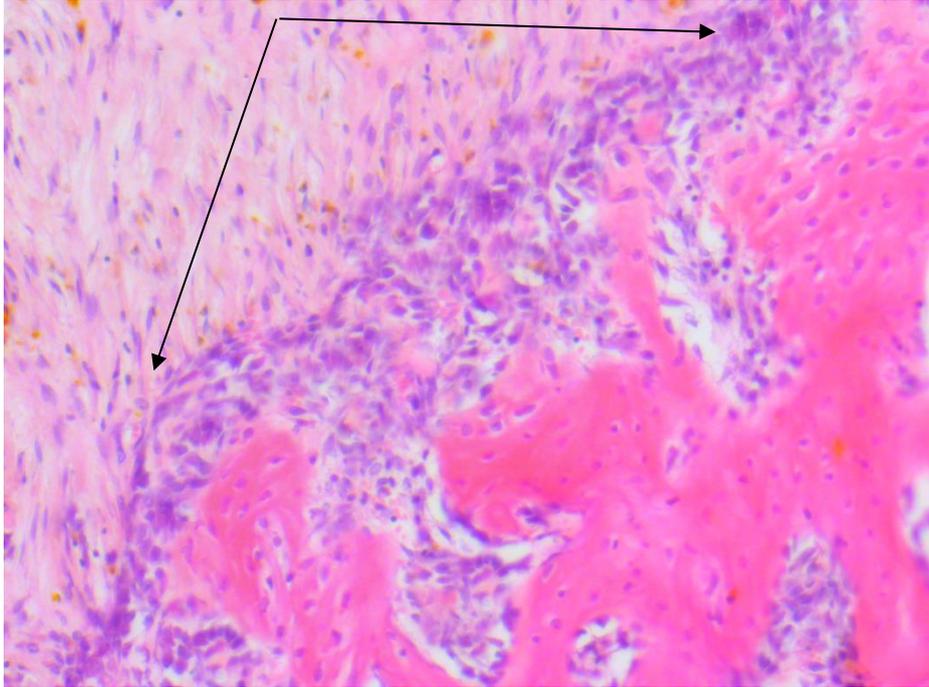


Рисунок 45 – Фрагмент кости на 60 сутки эксперимента в II группе. Утолщение слоя клеток остеобластического ряда на периферии формирующейся костной ткани (стрелки углом). Окраска гематоксилином и эозином, увеличение. $\times 200$.

В «теле» преформированного имплантационного материала наблюдали интенсивную макрофагальную инфильтрацию (Рис. 46). В межсосудистых пространствах располагались фибробласты и единичные лимфоциты, и макрофаги.

В просвете кровеносных сосудов часто обнаруживали микрокристаллы желтого цвета или их скопления с частичным разрушением сосудистой мембраны. Повсеместно расположены многочисленные иммунокомпетентные клетки, фагировавшие эти частицы (Рис.47). Однако, ведущим в эти сроки оставалось превалирование ангиогенеза.

Таким образом, на 60 сутки эксперимента в II группе наблюдали сложный комплекс разнонаправленных процессов, которые включали в себя следствие воздействия двух факторов:

- а. стимулирующее ангиогенез действие МСК;
- б. образование костных структур *de novo*;
- в. повреждающее действие кристаллических частиц на мембранные структуры сосудистых стенок.

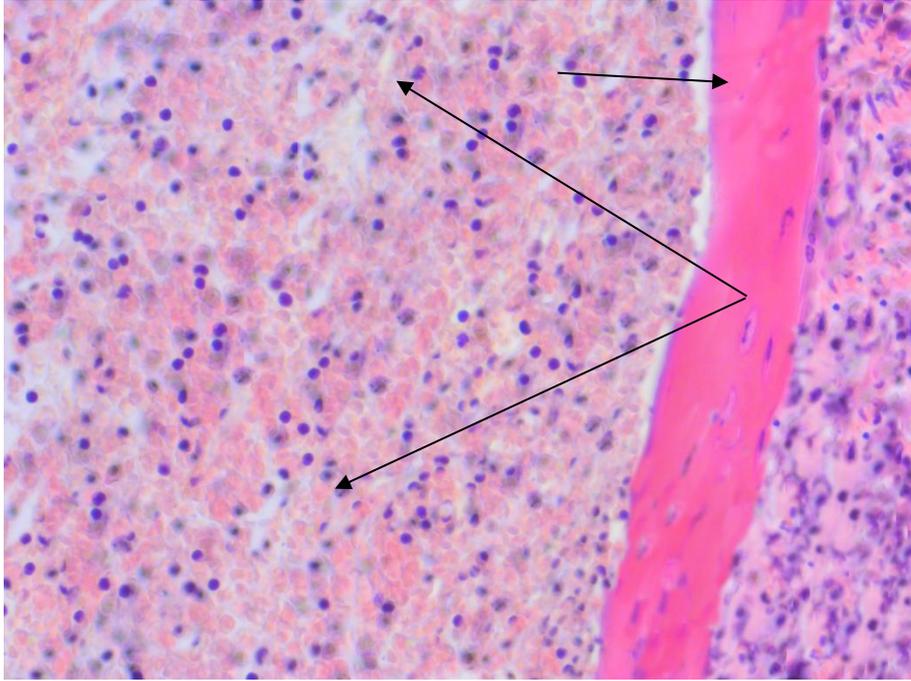


Рисунок 46 – Фрагмент кости на 60 суток эксперимента в II группе. Макрофагальная инвазия в матрицу имплантата, который ограничен костной пластиной (одинарная стрелка). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 100$.

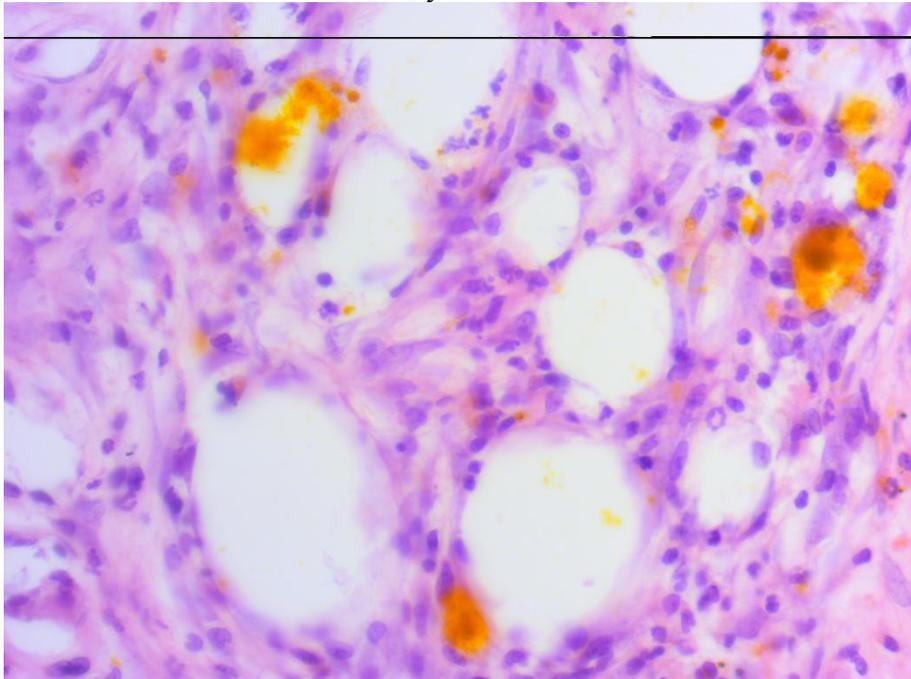


Рисунок 47 – Фрагмент кости на 60 суток эксперимента в II группе. Резкое увеличение количества кровеносных сосудов капиллярного типа (стрелки углом). Многочисленные клетки, фагировавшие кристаллические частицы (одинарные стрелки). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 200$.

120 сутки эксперимента.

На этом сроке в II группе сохранялись явления интенсивного ангиогенеза в периимплантационной зоне. По всей ее площади по-прежнему наблюдали иммунокомпетентные клетки, фагировавшие микрокристаллические желтые частицы и мигрирующие за пределы имплантационного материала (Рис. 48).

Микрокристаллы ярко-желтого цвета и их конгломераты обнаружили в стенках и просветах гемокапилляров. Клеточные элементы их стенок и сосудистые мембраны, находящиеся в контакте с микрокристаллами, частично подвергались лизису (Рис.49).

Во всех образцах этой группы на 120 сутки эксперимента наблюдали признаки панваскулита: резкое утолщение стенок кровеносных сосудов в результате гиперплазии клеточных элементов и воспалительной инфильтрации (Рис. 50, Рис.51).

Таким образом, в результате проведенного гистологического исследования материала области имплантации, в II группе к концу четвертого месяца эксперимента, как и прежде, обнаружили признаки интенсивного ангиогенеза, сопровождающиеся повреждением сосудистой стенки микрокристаллами и развитием в ней изменений по типу некробиоза и некроза. На фоне выявленных изменений отмечали гистологическую картину панваскулита с гиперплазией и воспалительной инфильтрацией стенки гемокапилляров.

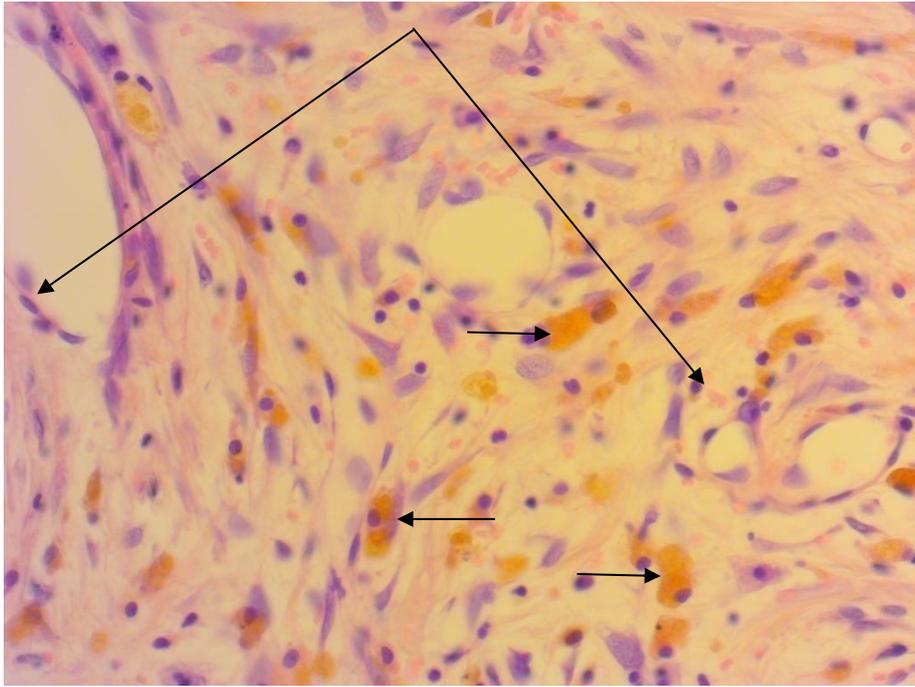


Рисунок 48 – Фрагмент кости на 120 сутки эксперимента в II группе. Микрористаллы захватываются макрофагами (одинарные стрелки), которые мигрируют за пределы имплантационного материала. В поле зрения микроскопа – многочисленные кровеносные сосуды капиллярного типа (стрелки углом). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 200$.

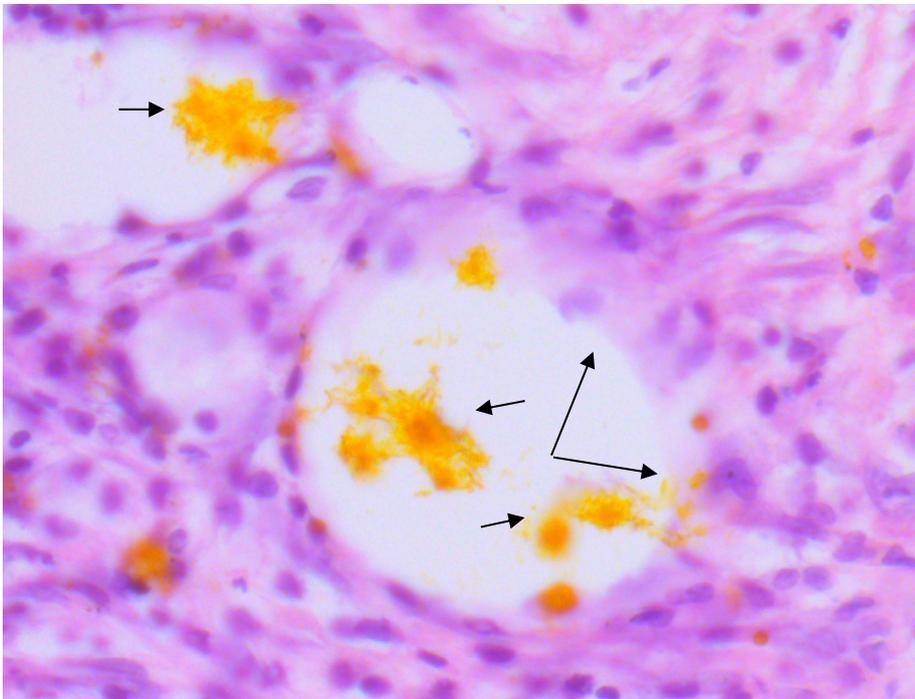


Рисунок 49 – Фрагмент кости на 120 сутки эксперимента в II группе. Микрористаллы желтого цвета (одинарные стрелки) в просвете капилляра. Клетки стенки гемокapилляра и сосудистая мембрана частично лизированы (стрелки углом). Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 1000$.

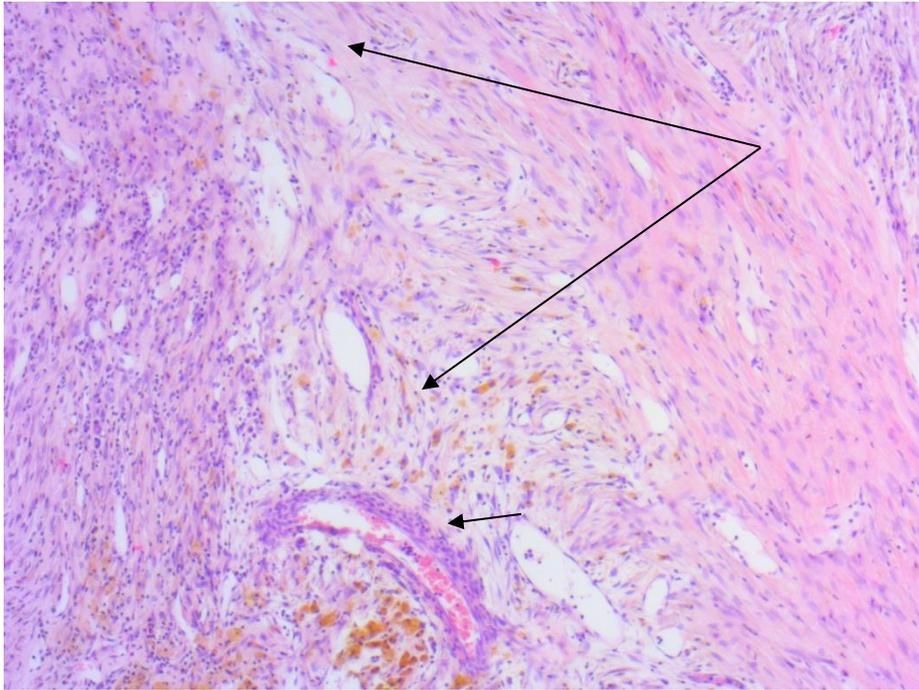


Рисунок 50– Фрагмент кости на 120 сутки эксперимента в II группе. Гистологическая картина панваскулита (одинарная стрелка). Сохраняются явления сосудистой гиперплазии (стрелки углом). В микропрепарате многочисленные микрокристаллы и их конгломераты беспорядочно расположены по площади среза. Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 100$.

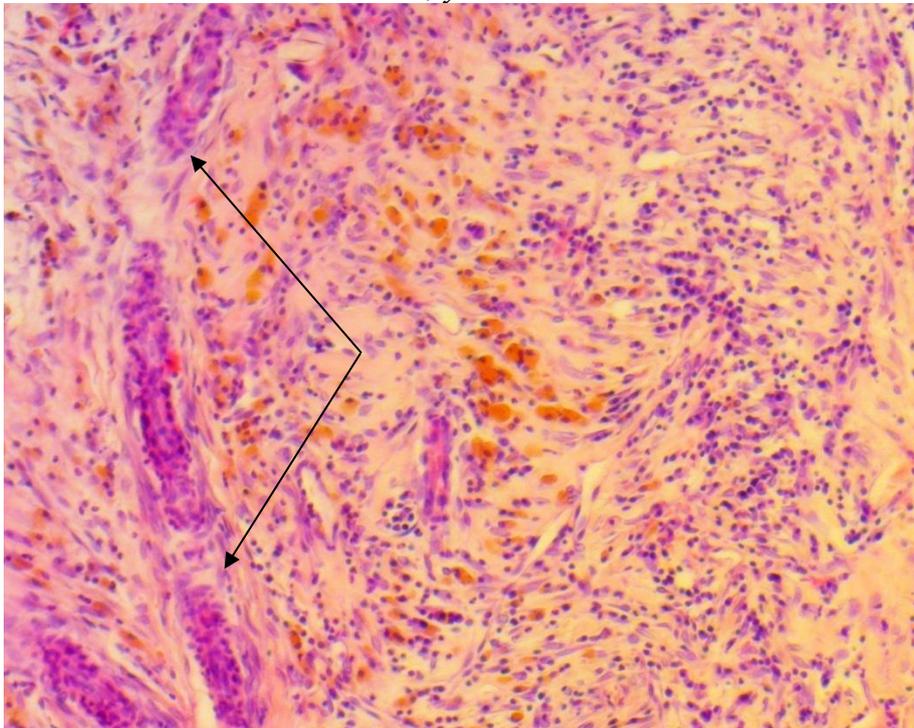


Рисунок 51 – Фрагмент кости на 120 сутки эксперимента в II группе. Диффузная лимфоцитарно-макрофагальная инфильтрация, выраженный ангиогенез. Стенки некоторых кровеносных сосудов утолщены в результате панваскулита (стрелки углом). Скопление большого количества макрофагов, которые содержат желтые микрокристаллы. Окраска гематоксилином и эозином, увелич. $\times 200$.

Таблица № 4 - Динамика изменения гистологической картины в опытной группе.

Группа	опытная		
Количество животных	24		
Сутки	30	60	120
описываемое явление			
Клеточный состав	Рыхлая волокнистая соединительная ткань, многоядерные остекласты.	Фиброзная соединительная ткань, коллагеновые фибриллы, плотная компактная костная ткань	Плотное компактное костное вещество, наличие остеобластов
Ангиогенез	Выраженный ангиогенез	Выраженный ангиогенез, увеличение количества сосудов капиллярного типа	Выраженный ангиогенез, увеличение количества сосудов капиллярного типа
Остеогенез			
Воспалительная реакция (отек, лимфо-макрофагальная реакция, нагноение)	Незначительное проявление	Отсутствует	Незначительное проявление
Проявление кристаллов кремния	Отсутствует	Появление кристаллов	Появление кристаллов
Панваскулит	Отсутствует	Отсутствует	Выражен

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

В объеме настоящей научной работы впервые разработана и апробирована на животных методика имплантации 3D-биоинженерной конструкции, включавшей в себя ангиоиндуцированные МСК на апатитосиликатной матрице, в модели диастаза кости, с последующим комплексным морфофункциональным исследованием ангиогенеза и остеогистогенеза.

Исследование проводилось в нескольких ключевых направлениях: морфологическая оценка ангиостимулирующего действия аутологичных МСК в костной ткани и их взаимодействия с апатитосиликатным матриксом стоматологического материала «БАК-1000»; изучение интенсивности остеогистогенеза в модели дефекта кости в результате имплантации материала, содержащего 3D-культивированные ангиоиндуцированные МСК; раскрытие механизмов выведения продуктов разрушения имплантационного материала из области инокуляции; уточнение границ практического применения разработанной биоинженерной 3D-конструкции в имплантологии с учетом полученных результатов.

По информации в специализированной литературе, ангиогенез и остеогистогенез в норме и при большинстве форм патологии являются тесно связанными и взаимодействующими процессами.

В контексте выбранной тематики по-прежнему остаются актуальными вопросы изучения:

1. факторов, влияющих на остеогистогенез на различных этапах онтогенеза и crucialной роли сосудистого фактора в этом процессе.
2. факторов трофического обеспечения остеогистогенеза и поддержания адекватного окислительно-восстановительного баланса в процессе остеогистогенеза;
3. механизмов взаимодействия ангиогенеза и остеогистогенеза.

Последний пункт в контексте настоящего исследования особенно актуален, поскольку его изучение является одной из задач, поставленных при планировании данной работы.

Именно на стадии формирования плотной мозоли, гипертрофированные хондроциты (HCs) и остеобластические прогениторы оказываются в гипоксической среде, что обуславливает инициацию фактора, индуцируемого гипоксией (HIF), который экспрессирует гены, контролирующие ангиогенез, новообразование протеинов межучного вещества и их метаболизм.

Анализ механизмов, лежащих в основе костной репаративной регенерации (при рассмотрении этого процесса в качестве комплексной системы), указывает на то, что в их основе зачастую лежат синергические по своему действию факторы, в частности, два важнейших регуляторных фактора – VEGF и BMP. Помимо фактора роста эндотелия сосудов (VEGF), другие факторы, такие как ангиопоэтин-1 и фактор роста тромбоцитов (PDGF), способствуют инвазии сосудов в новообразованную кость.

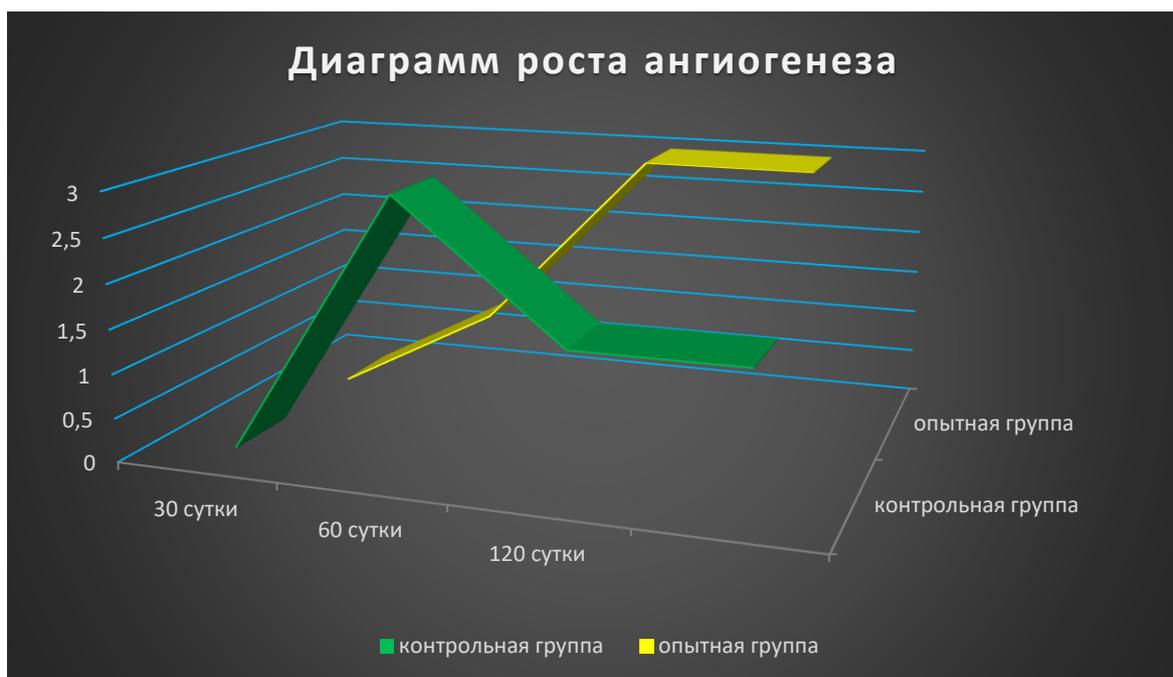


Рисунок 52 - Данная диаграмма показывает какой вектор развития имел ангиогенез. Рост капилляров в количественном отношении увеличивался к 120 суткам в опытной группе (см. Рис. 41, 47,51.)

Поскольку в настоящей работе при создании 3D-конструкции на поверхности имплантационного стоматологического материала («БАК-1000») в II группе были адгезированы аутологичные МСК, обладающие специфическим ангиостимулирующим действием, одна из ключевых задач состояла в

морфологической оценке активности ангиогенеза в периимплантационной области. Проведенное исследование позволило установить, что в сроки 60 и 120 суток, в тканевом субстрате, окружающем имплантат, действительно имело место резкое возрастание количества кровеносных сосудов (см. диаграмму ангиогенеза), преимущественно капиллярного типа, вплоть до «сосудистой гиперплазии». Патологические изменения стенок кровеносных сосудов (некробиоз, некроз) топически были связаны с кристаллическими микрочастицами и, поэтому, могут расцениваться, как основной этиологический фактор, вызвавший этот деструктивный процесс.

Вероятно, это связано со специфическим действием ангиоиндуцированных МСК, механизмы которого по-прежнему остаются малоизученными. В целом в указанных наблюдениях было продемонстрировано существование корреляционной связи между процессами ангиогенеза и остеогистогенеза, как одного из механизмов новообразования костной ткани.

В II группе нами были обнаружены признаки интенсивного остеогистогенеза вокруг имплантационного материала (Рис. 53), причем после имплантации наблюдалось совпадение этого эффекта с проявлениями ангиогенетической активности – на 60 и 120 сутки после имплантации. В частности, в некоторых фрагментах уже на 60 сутки эксперимента обнаружено формирование компактной костной пластинки, имевшей вид костного ободка вокруг имплантационного материала. Следует отметить, что в эти сроки у костного края отмечали участки расширения слоя остеобластов (гиперплазия), что являлось отражением эффекта индукции остеогистогенеза путем мультипликации продуцирующих костное вещество клеток.

Следует отметить, что в имплантационном материале и окружающих его тканях наблюдались изменения, которые были связаны с особенностями химического состава и структурой выбранного имплантационного материала и могут быть объяснены повреждающим воздействием продуктов деградации апатитосиликатного матрикса.

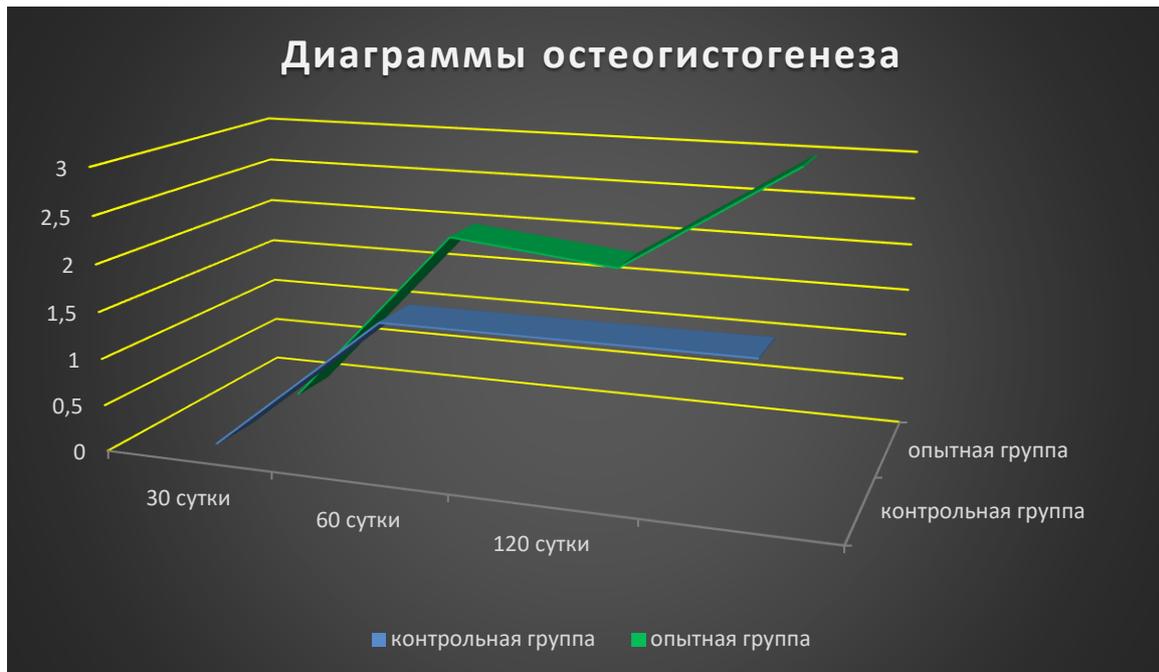


Рисунок 53 - Диаграмма демонстрирует в опытной группе вырожженный остеогистогенез к 120 суткам

Осложнения, связанные с продуктами взаимодействия материала имплантатов (либо скаффолдов) с прилежащими к ним тканями – одна из ключевых проблем в современной имплантологии. Это напрямую связано с токсичностью этих веществ в результате их взаимодействия с биологической основой, механизмы которого до сих пор не были полностью изучены.

В проведенном исследовании в качестве остеопластического материала для создания 3D-конструкции был выбран апатитосиликатный стоматологический материал «БАК-1000», который разрешен к применению, однако данных о его взаимодействии с окружающими тканями недостаточно. Мы задались вопросом о способности этого материала к резорбции, ее сроках, а также о его взаимодействии с периимплантационными тканями.

В процессе исследования была обнаружена выраженная миграция макрофагов в зону имплантации, фагировавших указанные кристаллические частицы. Этот факт объясняет транслокацию продуктов деградации имплантационного материала из области имплантации в окружающие ткани и кровеносные сосуды. В II группе этот процесс был наиболее выражен, а миграцию макрофагов к МСК можно объяснить хемотаксисом. В последнее время появляется все больше работ, посвященных этой проблеме. Так, ряд исследований

свидетельствует о том, что МСК, секретировавшие соответствующие гуморальные факторы, рекрутируют макрофаги и обуславливают их аттракцию и повышенную фагоцитарную активность [135,79].

Наблюдаемая в представленной работе морфологическая картина свидетельствует о способности ангиоиндуцированных МСК в составе 3D-конструкции не только стимулировать ангиогенез и формирование костных структур, как два тесно связанных процесса, но и побуждают к активности макрофаги с целью защиты от продуктов деградации матрикса имплантата. В нашем эксперименте связь поведения макрофагов с активностью МСК можно считать доказанной, так как их активность особенно была выражена только в II группе несмотря на то, что МСК в нашем случае культивировались именно в ангиогенном направлении.

Вторым и ключевым феноменом, который следует рассматривать как важнейший эффект воздействия ангиоиндуцированных МСК, является интенсивный ангиогенез с образованием большого числа кровеносных сосудов вплоть до гиперплазии в некоторых препаратах уже на 60 сутки эксперимента.

Помимо сосудистой реакции наблюдали активный остеогистогенез. В отдельных случаях отмечалось значительное расширение слоя остеобластов, прилежащих к «новой» кости, что указывает на активную пролиферацию этих клеток.

Эти процессы развивались вне «тела» имплантационного материала, где, тем не менее, наблюдали большое число макрофагов с микрокристаллическими частицами в цитоплазме, окрашивающими ее в желтый цвет. Известно, что в природе встречается разновидность кварца (кремния), кристаллы которого окрашены в лимонно-желтый цвет.

Этот материал образуется в результате воздействия на частицы четырехвалентного кварца трехвалентного железа (высокое содержание которого, к примеру, в гемоглобине), либо замены четырехвалентного кварца на трехвалентный алюминий. В последнем случае одна валентность остается свободной, что может обуславливать высокий окислительно-восстановительный

потенциал системы. Учитывая ее высокую мобильность, можно предположить, что оба механизма действуют синергически.

В представленной работе было проведено морфологическое исследование эффектов разрешенного к широкому применению в клинической практике имплантационный стоматологический материал «БАК-1000» в составе разработанной 3D-конструкции. Этот материал представляет собой апатитосиликатный комплекс, задающий ячеисто-каналикулярную структуру данному материалу в целом. В матричные пространства материала добавлен гидроксиапатит с различными значениями отношения кальций-фосфатных групп.

Как показало проведенное гистоморфологическое исследование, под воздействием аутогенных ангиоиндуцированных МСК апатитосиликатный матрикс подвергался разрушению. Этот процесс осуществлялся в результате активной деструктирующей деятельности макрофагов, которые под влиянием МСК подвергаются мобилизации и аттракции в область расположения силикатных частиц, каковыми, как показало проведенное исследование, и в соответствии с данными литературы, являются кристаллические микрочастицы кварца.

Проведенное исследование продемонстрировало превращение апатитосиликатного материала в результате воздействия МСК и активации макрофагальных элементов в массу («тело») кристаллических частиц, которые частью подвергались фагированию и рассредоточению за счет мотальной активности макрофагов, а частью оставались в виде преципитатов в межучном веществе соединительной ткани, вызывая в ней воспалительные реакции, переходящие в хроническую форму и вызывающие фиброзирование соединительнотканной основы. На первом месяце эксперимента в II группе умеренная воспалительная реакция, вероятно, была связана травмой тканей в области имплантации в результате оперативного вмешательства.

Вне «тела» 3D-биоинженерной конструкции на втором и четвертом месяце эксперимента отмечали признаки интенсивного ангиогенеза и формирования костных структур *de novo*. Важно отметить, что обнаруженные на 120 сутки явления панваскулита в II группе, вероятно, были связаны с накоплением в стенке

и просвете кровеносных сосудов микрокристаллических силикатных частиц (разновидности кварца), приобретающего ярко-желтый цвет благодаря примесям диоксида железа, который, например, в высоких концентрациях содержится и в гемоглобине.

Проведенное нами гистоморфологическое исследование показало, что:

1. Стоматологический апатитосиликатный композит «БАК-1000», входивший в состав разработанной нами биоинженерной 3D-конструкции обладает высокой степенью биорезорбции. Применение ангиоиндуцированных МСК эффективно в отношении индукции остеогистогенеза, ангиогенеза и метаболизма клеток периимплантационных тканей.

2. В результате проведенного исследования был выявлен механизм биогенного превращения одного материала в другой («феномен трансдукции»).

3. В нашей работе ячеисто-каналюлярная структура апатитосиликатного матрикса «БАК-1000» была переформирована и представляла собой массу силикатных микрокристаллов, плотно упакованную и частично окруженную тонким слоем фиброзной соединительной ткани (капсула) и инвазированную макрофагами.

Этот феномен, вероятно, связан с активностью ангиоиндуцированных МСК, и расценивается нами как биогенный механизм превращения инородного материала (апатитосиликатный матрикс 3D-конструкции), в новый вид субстрата. Ключевую роль здесь играет способность МСК активировать макрофаги, осуществляющие защитную функцию, фагируя чужеродный или токсический материал [119, 115].

В настоящее время, многие авторы при создании новых биоактивных остеопластических материалов все чаще применяют различные комбинации, состоящие из нескольких субстратов разнонаправленного биостимулирующего действия: пористые матриксы в виде сфероидов, включающих Si или Ag в роли структурного элемента с антимикробным действием в комбинации с факторами роста и МСК. Авторы таких исследований утверждают, что комплексное действие перечисленных факторов обуславливает совместный ангиогенетический эффект и

формирование новой костной ткани, при этом ограничивая развитие воспалительной реакции [60].

Использование разработанной нами методики по созданию 3D-биоинженерной конструкции с адгезированными на ней МСК может быть положено в основу разработки перспективной модели для изучения интимных механизмов местных защитно-приспособительных реакций в ответ на чужеродные материалы в экспериментальных исследованиях *in vivo*.

Таким образом, по результатам проведенного исследования следует, что разработанная методика имплантации биоинженерной 3D-конструкции, включающая в свой состав ангиоиндуцированные МСК, позволяет эффективно замещать дефекты костной ткани и стимулировать метаболизм периимплантационной ткани с интенсификацией остеогистогенеза и ангиогенеза.

ВЫВОДЫ

1. Разработана техника устранения дефекта кости при помощи 3D-биоинженерной конструкции на основе индуцированных в ангиогенном направлении мезосфероидов МСК на апатитосиликатной матрице биосовместимого стоматологического композита «БАК-1000».

2. «БАК-1000» обладает высокой степенью биорезорбции, на 60,120 сутки после имплантации в 16 макропрепаратах, что составляет $\pm 67\%$ от общего количества животных контрольной группы, теряет свою ячеисто-каналикулярную структуру и замещается апатит силикатными микрокристаллами на фоне низкой степени остеогистогенеза и ангиогенеза.

3. Разработанная 3D-биоинженерная конструкция подвергается резорбции на 30 сутки с частичным сохранением ячеисто-каналикулярной структуры матрицы, в 8 макропрепаратах, что составляет $\pm 33\%$ определяются признаки воспалительной реакции сопровождающиеся умеренным остеогистогенезом, ангиогенезом.

4. После имплантации 3D-биоинженерной конструкции «БАК-1000» и ангиоиндуцированных МСК в экспериментальной группе в $\pm 67\%$ макропрепаратах образуется костная ткань *de novo* (от остеоидной субстанции до зрелой костной ткани с последующим ее ремоделированием) в сочетании с интенсивным ангиогенезом.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Настоящая научная работа проведена на экспериментальных животных и относится к доклиническим исследованиям.

Полученные результаты по воздействию разработанной 3D-биоинженерной конструкции на остеогистогенез и ангиогенез в модели обширного дефекта кости можно экстраполировать на человека, учитывая их тождественность в клинической практике.

При условии выбора 3D-биоинженерной конструкции с включенными в ее состав ангио индуцированных МСК, данная модель может быть высокоэффективна и рекомендована в клинической практике при лечении дефекта костной ткани критического размера.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- БАК 1000 – апатит силикатный композит
- ММСК - мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки
- МСК - мезенхимальные стромальные клетки
- СКЖТ - стромальные клетки жировой таани
- HUVEC - клеток эндотелия пупочной вены
- BMP2 морфогенетический белок 2
- VEGF фактор роста эндотелиальных клеток
- HyClone - эмбриональная телячья сыворотка
- bFGF – основной фактор роста фибробластов
- PBS - фосфатно-солевом буфере
- CD – специфический маркер
- Flk-1, von Willebrand – маркеры эндотелиальных клеток

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. АО “ЦНИИАГ” <http://cniia.ru/product-civil/>.
2. Результаты исследования костезамещающих материалов на основе гибридной конструкции из поли-3-оксибутирата и симвастатина для индукции репаративного остеогенеза //Актуальные вопросы клинической медицины. -2022. С.246-248
3. Баринов С.М., Комлев В.С. Остеоиндуктивные керамические материалы для восстановления костных тканей: октакальциевый фосфат (обзор) // Материаловедение. - 2009.- №10.- С.34-40.
4. Бонарцев А.П., Воинова В.В., Волков А.В., Мураев А.А., Бойко Е.М., Венедиктов А.А., Диденко Н.Н., Долгалев А.А. Скафолды на основе поли -3-оксибутирата и его сополимеров для инженерии костной ткани (обзор)//Современные технологии в медицине. – 2022. Т.14, №5. С.78-91.
5. Vukanov V.V. Russian Gemstones Encyclopedia. -Praha, Granit Publishing House, 2006. 450 pages (engl).
6. Виноградова Т.П., Лаврищева Г.И. Регенерация и пересадка костей - М.:// Медицина, 1994. - 247 с.
7. Гарунов М.М., Григорьянц Л.А., Степанов А.Г. Апресян С.В. Симонян Д.В. Клиническая эффективность применения гидроксиапатита и трикальцийфосфата, модифицированных гиалуроновой кислотой в лечении пациентов с периимплантитом. //Стоматология. -2022. Т.101, №2.-С.42-46
8. Гаскин Д.В. Клинико-экспериментальное обоснование показаний к применению остеопластических материалов Bio-Oss и Ceracorb в комплексном лечении хронического генерализованного пародонтита. Автореф. канд. мед. наук., 2006.
9. Гнатюк Н.Д., Сетдикова Г.Р., Сипкин А.М., Еремеева Е.Р. Морфологические особенности костного регенерата при использовании костнопластического материала на основе коллагенового гидрогеля в

эксперименте. // Российский стоматологический журнал. – 2024. Т.28 №3. - С.243-251.

10. Григорьян А.С., Топоркова А.К. Проблемы интеграции имплантатов в костную ткань (теоретические аспекты), Москва. Техносфера, 2007.

11. Григорьянц Л.А., Сирак С.В., Гарунов М.М., Кочкарлова З.М., Андреев А.А., Степанов А.Г., Апресян С.В. Оценка состояния костной ткани вокруг дентальных имплантатов до и после операции по ремоделированию периимплантной зоны //Институт стоматологии. -2022.-№2- С. 30-32.

12. Гурин А.Н., Комлев В.С., Фадеева И.В., Баринов С.М. Октакальций фосфат — Прекурсор биологической минерализации, перспективный остеопластический материал // Стоматология. — 2010.— №4.— С.57–61.

13. Гурин А.Н., Петрович Ю.А., Комлев В.С., Фадеева И.В., Баринов С.М. Октакальций фосфат. Метастабильная фаза генерализации биологических апатитов // Российский стоматологический журнал. — 2012.— №3.- С.4-8.

14. Диденко Н.Н., Бобрышев Д.В., Долгалев А.А., Адешелидзе А.Р., Чониашвили Д.З., Гезуев Г.К., Омаров Р.М., Тлябичева Б.Х. Биосовместимость клеточных культур с новыми образцами титанового сплава для дентальной имплантологии //Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2024.-Т.19 №3. - С.260-261.

15. Диденко Н.Н., Бойко Е.М., Болатчиев А.Д., Бобрышев Д.В., Долгалев А.А. Влияние экзосом мезенхимных стволовых клеток и дефензина на биосовместимость материала для замещения костно-хрящевых дефектов. // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2023. Т.18 №4. - С.406-408.

16. Долгалев А.А., Чониашвили Д.З., Юсупов Р.Д., Амбарцумов М.Г., Диденко Н.Н., Сергеев Ю.А. Оценка пролиферативной активности клеточных структур на наноструктурированных покрытиях для дентальных имплантатов. //Медицинский алфавит – 2022. - №22. С.7-11.

17. Долгалев А.А., Диденко Н.Н., Коваль Н.Н., Иванов Ю.Ф., Воробьев М.С., Хрипунова А.А., Гезуев Г.К. Адешелидзе С.Р. Исследование цитотоксичности и биосовместимости покрытий для имплантационной хирургии на основе титана на клеточных культурах *in vitro*. // Медицинский вестник Северного Кавказа. – 2025. Т.20 №1. - С.49-50.

18. Дурново Е.А., Галкина Е.С., Орлинская Н.Ю., Квашнина М.С., Сопина А.Ю. Синергия аутогенных и ксеногенных трансплантатов при устранении дефицита прикрепленной кератинизированной десны: гистологическое и иммуногистохимическое исследование// Пародонтология. - 2024. – 29 №1-С.36-44 DOI: 10.33925/1683-3759-2023-843

19. Дурново Е.А., Беспалова Н.А., Ичекарева., Терина Т.А. Опыт применения резорбируемых коллагеновых мембран для восстановления уровня кератинизированной прикрепленной десны (пилотное исследование) // DENTAL FORUM. - 2020. - №4 (79) С. 17-18

20. Дурново Е.А., Шаленкова И.В., Корсакова А.И., Кузьмин Н.П., Биологические аспекты применения тромбоцитарной аутоплазмы при хирургических вмешательствах в полости рта // DENTAL FORUM. - 2020. - №4 (79) С. 24-26

21. Елдашев Д.С.А., Долгалев А.А., Диденко Н.Н., Бобрышев Д.В., Мусаев М.Г., Саакян К.С., Глябичева Б.Х. Сравнительный анализ репарации и регенерации костной ткани в условиях сформированных критических дефектов в зависимости от уровня содержания коллагена в ксеноматериалах для направленной костной регенерации. //Вестник молодого ученого. – 2023. Т.12, №2. – С.57 – 63.

22. Курдюков Е.Е., Пронин И.А., Водопьянова И.А., Темников В.А., Фриндак К.А. «Ускорение заживление заживления переломов костной ткани с помощью стимуляции неоангиогенеза» Выпуск: № 12 (126), 2022 стр. 2.

23. Захарян Г.К., Степанов А.Г., Апресян С.В., Берсенев С.В. Исследование остеопластических потенциалов отечественных

биорезорбируемых мембран для направленной регенерации в эксперименте in vivo //Институт стоматологии. -2024.-2.-С.80-83

24. Иванов С.Ю., Милюкова Д.Ю., Свириденко А.Д., Мураев А.А., Гусаров А.М., Бороздкин Л.Л., Кузнецов А.М., Седов И.А. Функциональный анализ программного 3D-обеспечения, применяемого в челюстно-лицевой хирургии //Клиническая стоматология. -2025.-Т.28. №1.-С.130-142

25. Кедров А. В., Рамирез А. А., Белецкий Б. И. и соавт. Журнал Хирургия позвоночника Выпуск № 2 /2007 <http://cyberleninka.ru/article/n/vnutrikostnyie-osteokonluktivnyie-implantaty-alya-pередney-stabilizatsii-sheynogo-otdela-pozvonochnika-pri-ego-povrezhdeniyah#ixzz3jLWTPfQ7>

26. Лысенко Л.Н. Остеоинтеграция: молекулярные, клеточные механизмы //Клиническая имплантология и стоматология. 1997.- №1.- сс.48-59.

27. Мураев А.А., Волков А.В., Полевой В.В., Трещук С.В., Гусаров А.М., Солошенко П.П., Иванов С.Ю. Экспериментальная модель для изучения репаративной костной регенерации при реконструкции нижней челюсти//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2023. Т.175, №2.- С.256-260

28. Никитин А.А., Косяков М.Н., Белецкий Б.И. и соавт. Применение композиционного апатитсиликатного материала БАК-1000//Российский стоматологический журнал. 2002. N 5.-С.34-37

29. Полупан П.В., Сипкин А.М., Бондаренко Е.В. Биологические аспекты костной пластики в полости рта. //Медицинский алфавит – 2024. №24. – С.27 – 33

30. Решетников А.П., Трезубов В.Н., Розов Р.А., Апресян С.В., Гуревич К.Г., Ураков А.Л., Гаврюшова Л.В., Копылов М.В. Особенности трансплантации биоматериалов и имплантации титановых имплантатов при атрофии твердых и мягких тканей челюстей //Клиническая стоматология. - 2023.-Т.26, №2 – С.132-142

31. Салех К.М., Волков А.В., Мураев А.А., Бонарцев А.П., Воинова В.В., Дымников А.Б., Долгалев А.А., Иванов С.Ю. Экспериментальное исследование воздействия нового костнопластического материала на основе поли-3-оксибутирата и симвастатина на процессы костеобразования // Российский медицинский журнал. - 2025.-Т.31 №2.-С.159-167
32. Салех К.М., Мураев А.А., Долгалев А.А., Бонарцева А.П., Воинова В.В., Дымников А.Б., Махина Т.К., Чеснокова Д.В., Мокренко М.Е., Бонарцев А.П., Иванов С.Ю. Эффективность поли-3-оксибутирата, насыщенного симвастатином, в регенерации костной ткани при удалении зубов (экспериментальное исследование)//Современные технологии в медицине.-2024.- 16.-№5, С.27-34
33. Садовников Ф.А. Патогенез. – 2023. – Т. 21, №3 – С. 58-61
34. Сипкин А.М., Модина Т.Н., Гнатюк Н.Д., Окшин Д.Ю. Коллаген содержащие остеопластические материалы: обзор литературы //Клиническая стоматология – 2023. – Т. 26, №4 – С. 152 – 159.
35. Степанов А.Г., Апресян С.В., Начарьян Э.Г., Копылов М.В., Маркина В.А. Влияние покрытия костным морфогенетическим белком 2 поверхности дентального имплантата на его остеоинтеграцию //Проблемы стоматологии. -2025. Т.21, №1-С.142-147
36. Степанов А.Г., Апресян С.В., Начарьян Э.Г., Копылов М.В., Казарян Г.Г., Джуманиязова Э.Д., Карягина В.Е. Оценка цитотоксичности ВМР-2 в составе покрытия дентальных иплантатов в эксперименте *in vitro* // Российский стоматологический журнал. -2025. Т.29, №3.- С.210-218
37. Степанов А.Г., Апресян С.В., Аликов М.Х., Юдин Л.П., Канцерова Л.Р. Влияние хондроитина сульфата при внутримышечном введении на репаративный остегенез в эксперименте *in vivo* //Клиническая стоматология. -2024.-Т.27, №4-С.122-130
38. Топольницкий О. З. Костная пластика нижней челюсти у детей и подростков композитным материалом на основе акрилатов: Автореф. дис. д-ра мед. наук. — М., 2002.

39. Стоматов Д.В., Долгалев А.А., Стоматов А.В., Макарова Н.И., Еремина Н.В., Бойко Е.М. Экспериментальное моделирование костного дефекта для исследования регенераторного потенциала остеопластических материалов в условиях приближенных к альвеолярной кости человека. //Вестник Волгоградского медицинского университета. – 2024. Т. 21, №4. – С.75 – 82
40. Фриденштейн А.Я., Чайлахян Р. К. Герасимов “Пролиферативный и дифференцировочный потенциал склетогенных колонеобразующих клеток костного мозга”. //Цитология 1986.- Т. 28.- №3.- сс.341-349.
41. Acar M., Kocherlakota, K. S., Murphy, M. M., et al. “Deep imaging of bone marrow shows non-dividing stem cells are mainly perisinusoidal”. *Nature*, 2015, 526,126-130. doi:10.1038/nature15250.
42. Albrektsson T, Eur Spine J., 2001 Oct;10 Suppl 2: S96-101. doi:10.1007/s005860100282Johansson C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration.
43. Richard J Miron, Marc Bohner, Yufeng Zhang, Dieter D Bosshardt “Osteoinduction and osteoimmunology: Emerging concepts” //Periodontol 2000, 2024 Feb;94(1):9-26. doi:10.1111/prd.12519. Epub 2023 Sep 1.
44. Amanulla Mohammed Fayaz, Kulandaivelu Balaji, Morukattu Girilal, Ruchi Yadav et al. “Biogenic synthesis of silver nanoparticles and their synergistic effect with antibiotics: a study against gram-positive and gram-negative bacteria” *Nanomedicine*, 2010, Vol. 6, iss. 1, p. 103-109. doi <http://dx.doi.org/10.1016/j.nano.2009.04.006>.
45. A.N. GURIN, A.S. GRIGORYAN, A.YU. FEDOTOV, V.S. KOMLEV Влияние октакальциевого фосфата на динамику формирования костного матрикса в экспериментально воспроизведенных костных дефектах СТОМАТОЛОГИЯ 3, 2016. Anada T., Kumagai T., Honda Y. et al. Dose-dependent osteogenic effect of octacalcium phosphate on mouse bone marrow stromal cells // *Tissue Engineering Part A.*– 2008.– Vol.14.– P.965-978.

46. Kakyung Kim , Yingchao Su, Allan J Kucine , Ke Cheng , Donghui Zhu Guided Bone Regeneration Using Barrier Membrane in Dental Applications.// A review-ACS Biomater Sci 202 Eng 202 3Oct9;9(10):54575478.doi:10.1021/acsbiomaterials.3c00690. Epub 2023 Aug 31.
47. Atala, A.; Forgacs, G. Three-Dimensional Bioprinting in Regenerative Medicine: Reality, Hype, and Future. *Stem Cells Transl. Med.* 2019, 8, 744–745.
48. Athirasala, A.; Tahayeri, A.; Thrivikraman, G.; França, C.M.; Monteiro, N.; Tran, V.; Ferracane, J.; Bertassoni, L.E. A dentin-derived hydrogel bioink for 3D bioprinting of cell laden scaffolds for regenerative dentistry. *Biofabrication* 2018, 10, 024101.
49. Azoidis I, Metcalfe J, Reynolds J, Keeton S, Hakki SS, Sheard J, Widera D. Three-dimensional cell culture of human mesenchymal stem cells in nanofibrillar cellulose hydrogels. *MRS Communications.* 2017;7(3):458–65.
50. Silvia Milita, Tal Zaquin, Simona Fermani, Devis Montroni, Iddo Pinkas, Luisa Barba, Giuseppe Falini, Tali Mass. Potentiality arguments and the definition of “human organism”. //AM J Bioeth 2013;13(1):33-4. doi: 10.1080/15265161.2012.747033.
51. Bo Li,Hai Wang, Guixing Qiu et al. “Synergistic Effects of Vascular Endothelial Growth Factor on Bone Morphogenetic Proteins Induced Bone Formation In Vivo: Influencing Factors and Future Research Directions” *BioMed Research International*; Volume 2016 (2016), Article ID 2869572, 11 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2016/2869572>. Review Article.
52. Jianhua Zhang, Esther Wehrle, Marina Rubert, Ralph Müller. 3D Bioprinting of Human Tissues: Biofabrication, Bioinks, and Bioreactors. // *Review Int J Mol Sci.* 2021 Apr 12;22(8):3971. doi: 10.3390/ijms22083971.
53. Borowski Maria, Giovino-Doherty Maria, Ji Lan, Shi Meng-Jiao, Smith Kelly P, Laning Joseph, 2012. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK133258/>
54. Branemark R. A biomechanical study of osseointegration (dissertation). Goteborg, 1996. Sweden. Goteborg University. 413 p.

55. Peng Liao, Long Chen, Hao Zhou, Jiong Mei, Ziming Chen, Bingqi Wang, Jerry Q Feng, Guangyi Li, Sihan Tong, Jian Zhou, Siyuan Zhu, Yu Qian, Yao Zong, Weiguo Zou, Hao Li, Wenkan Zhang, Meng Yao, Yiyang Ma, Peng Ding, Yidan Pang, Chuan Gao, Jialun Mei, Senyao Zhang, Changqing Zhang, Delin Liu, Minghao Zheng, Junjie Gao. Osteocyte mitochondria regulate angiogenesis of transcortical vessels. // *Nat Commun.* 2024 Mar 21;15(1):2529. doi: 10.1038/s41467-024-46095-0.

56. Busra, M.F.M.; Lokanathan, Y. Recent Development in the Fabrication of Collagen Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2019, 20, 992–1003.

57. Buza J. A., Einhorn T. «Bone healing in 2016» *Clin Cases Miner Bone Metab.* 2016 May-Aug; 13(2): 101–105. doi:10.11138/ccmbm/2016.13.2.101 PMID: PMC5119705

58. Callister Jr. WD, Rethwisch DG. *Materials Science and Engineering: An Introduction.* 8th ed. New York: John Wiley & Sons, Inc.; 2009.

59. Cao, Z.; Bian, Y.; Hu, T.; Yang, Y.; Cui, Z.; Wang, T.; Yang, S.; Weng, X.; Liang, R.; Tan, C. Recent advances in two-dimensional nanomaterials for bone tissue engineering. *J. Mater.* 2023, 9, 930–958.

60. Ajmal Ahmad, Mohd Imtiaz Nawaz. Molecular mechanism of VEGF and its role in pathological angiogenesis. // *Review- J Cell Biochem.* 2022 Dec;123(12):1938-1965. doi: 10.1002/jcb.30344. Epub 2022 Oct 26.

61. Carrel A, Burrows MT. “Cultivation of adult tissues and organs outside of the body”. *Journal of the American Medical Association*, 1910; 55:1379–1331.

62. Close B, Banister K, Baumans V, Bernoth EM, Bromage N, Bunyan J, Erhardt W, Flecknell P, Gregory N, Hackbarth H, Morton D, Warwick C. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1. DGXI of the European Commission. *Lab Anim.* 1996 Oct;30(4):293-316. doi: 10.1258/002367796780739871. PMID: 8938617.

63. Clin Implant Dent Relat Res. 2023 Апрель;25(2): 343-351. doi: 10.1111 / cid.13179. Epub 2023 от 11 января.

64. Cesarz Z, Tamama K. Spheroid culture of mesenchymal stem cells. Stem Cells Int. 2016; 2016:9176357.

65. Chevalier J, Gremillard L. Ceramics for medical applications: A picture for the next 20 years. Journal of the European Ceramic Society. 2009; 29:1245-1255

66. Chimene, D.; Miller, L.; Cross, L.M.; Jaiswal, M.K.; Singh, I.; Gaharwar, A.K. Nanoengineered Osteoinductive Bioink for 3D Bioprinting Bone Tissue. ACS Appl. Mater. Interfaces 2020, 12, 15976–15988.

67. Chuang Ma, Qin Wei, Bo Cao et al. «A multifunctional bioactive material that stimulates osteogenesis and promotes the vascularization bone marrow stem cells and their resistance to bacterial infection». PLOS. Published: March 30, 2017 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0172499>.

68. Coelho MJ, Cabral AT, Fernandes MH. Human bone cell cultures in biocompatibility testing. Part I: osteoblastic differentiation of serially passaged human bone marrow cells cultured in α -MEM and in DMEM. Biomaterials 21(11), 1087-1094 (2000)

69. Concise International Chemical Assessment Document 24

70. Cui, X.; Boland, T.; D’Lima, D.D.; Lotz, M.K. Thermal inkjet printing in tissue engineering and regenerative medicine. Recent Pat. Drug Deliv. Formul. 2012, 6, 149–155

71. <http://www.who.int/ipcs/publications/cicad/en/cicad24.pdf>.

72. Sumaiya Khan, Asif Peracha, Arslan Ahmed Abro, Muhammad Sufyan, Muhammad Kazim Rahim Najjad, Sobia Aziz, Muhammad Mairaj Khan. Clinical studies investigating the role of mesenchymal stem cells in healing of fracture non-unions: a systematic review. // J Pak Med Assoc. 2023 Feb;73(Suppl 1) (2): S26-S31. doi: 10.47391/JPMA.AKUS-05.

73. de Lima, C.O.; de Oliveira, A.L.M.; Chantelle, L.; Silva Filho, E.C.; Jaber, M.; Fonseca, M.G. Zn-doped mesoporous hydroxyapatites and their antimicrobial properties. / *Colloids Surf. // B Biointerfaces* 2021, 198, 111471.

74. Demers C, Hamdy CR, Corsi K et al. Natural coral exoskeleton as a bone graft substitute: a review. *Biomed. Mater. Eng.* 12(1), 15-35 (2002)

75. Quinn T Ehlen, Joseph P Costello, Nicholas A Mirsky, Blaire V Slavin, Marcelo Parra, Albert Ptashnik, Vasudev Vivekanand Nayak, Paulo G Coelho, Lukasz Witek. Treatment of Bone Defects and Nonunion via Novel Delivery Mechanisms, Growth Factors, and Stem Cells: A Review. // *Review- ACS Biomater Sci Eng.* 2024 Dec 9;10(12):7314-7336. doi: 10.1021/acsbiomaterials.4c01279. Epub 2024 Nov 11.

76. Donati D., Zolezzi C., Tomba P. & Viganò A. (2007) «Bone grafting: historical and conceptual review, starting with an old manuscript by Vittorio Putti», *Acta Orthopaedica*, 78:1, 19-25, doi:10.1080/17453670610013376

77. Dorozhkin S. V. «Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art». *J Funct Biomater.* 2010 Dec; 1(1): 22–107.2010. doi:10.3390/jfb1010022. PMID: PMC4030894

78. Dou, C.; Perez, V.; Qu, J.; Tsin, A.; Xu, B.; Li, J. A State-of-the-Art Review of Laser-Assisted Bioprinting and its Future Research Trends. *ChemBioEng Rev.* 2021, 8, 517–534.

79. Duarte Campos, D.F.; Zhang, S.; Kreimendahl, F.; Köpf, M.; Fischer, H.; Vogt, M.; Blaeser, A.; Apel, C.; Esteves-Oliveira, M. Hand-held bioprinting for de novo vascular formation applicable to dental pulp regeneration. *Connect Tissue Res.* 2020, 61, 205–215.

80. Dubey, N.; Ferreira, J.A.; Malda, J.; Bhaduri, S.B.; Bottino, M.C. Extracellular Matrix/Amorphous Magnesium Phosphate Bioink for 3D Bioprinting of Craniomaxillofacial Bone Tissue. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2020, 12, 23752–23763.

81. Dutta, S.D.; Bin, J.; Ganguly, K.; Patel, D.K.; Lim, K.T. Electromagnetic field-assisted cell-laden 3D printed poloxamer-407 hydrogel for enhanced osteogenesis. *RSC Adv.* 2021, 11, 20342–20354.
82. Eggenhofer Elke, Hoogduijn Martin J. “Mesenchymal stem cell-educated macrophages” *Transplant Res.* 2012; 1: 12. doi:10.1186/2047-1440-1-12. PMID: PMC3560988
83. Einhorn Thomas A., Gerstenfeld Louis C. Fracture healing: mechanisms and interventions *Nature Reviews Rheumatology* 11, 45–54 (2015).
84. El-Bassyouni, G.T.; Kenawy, S.H.; El-Aty, A.A.A.; Hamzawy, E.M.A.; Turkey, G.M. Influence of ZnO doped into hydroxyapatite: Structural, electrical, biocompatibility, and antimicrobial assessment. *J. Mol. Struct.* 2022, 1268, 133700.
85. Elliott D.S., Newman K.J.H., Forward D.P., et al. “A unified theory of bone healing and nonunion”. *BHN Theory.*, 2016;98-B (7):884–891. doi:10.1302/0301-620X.98B7.36061.
86. Erratum: Organ printing, computer-aided jet-based 3D tissue engineering *Trends in Biotechnology*, Volume 22, Issue 6, June 2004, Page 265
87. Coert Margadant Positive and negative feedback mechanisms controlling tip/stalk cell identity during sprouting angiogenesis//*Angiogenesis.* 2020 May;23(2):75-77. doi: 10.1007/s10456-020-09706-0.
88. Fiorellini J P., Howell T. H., Cochran D. et al., "Randomized Study Evaluating Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 for Extraction Socket Augmentation" //*Journal of Periodontology*IO April 2005, Vol. 76, No. 4, Pages 605-613
89. David E Maridas , Laura Gamer , Emily R Moore , Annemiek M Doedens , Yunqing Yu , Andreia Ionescu , Leila Revollo , Malcolm Whitman , Vicki Rosen Loss of VLK in Prx 1 + Cells delays the initial steps of endochondral bone formation and fracture repair in the Limb // *J Bone Miner Res.* 2022 Apr;37(4):764 – 775 doi: 10.1002/jbmr.4514. Epub 2022 Feb 16.

90. Froum Stuart, Sang-Choon Cho, Rosenberg Edwin et al "Histological Comparison of Healing Extraction Sockets Implanted With Bioactive Glass or Demineralized Freeze-Dried Bone Allograft: A Pilot Study" //Journal of Periodontology: 2002, Vol. 73, No. 1, Pages 94-102.
91. Gillman, C.E.; Jayasuriya, A.C. FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2021, 130, 112466.
92. Glicenstein J. History of bone reconstruction. *Ann. Chir. Plast. Esthet.* 45(3), 171-174 (2000).
93. Ghiasi Mohammad S., Chen Jason, Vaziri Ashkan et al. "Bone fracture healing in mechanobiological modeling: A review of principles and methods" *Bone Rep.* 2017 Jun; 6: 87–100. doi: 10.1016/j.bonr.2017.03.002.
94. Goudouri O.M., Theodosoglou E., Kontonasaki E. et al. "Development of highly porous scaffolds based on bioactive silicates for dental tissue engineering"; *Materials Research Bulletin: Volume 49, January 2014, Pages 399–404* <https://doi.org/10.1016/j.materresbull.2013.09.027>.
95. Groll, J.; Burdick, J.A.; Cho, D.W.; Derby, B.; Gelinsky, M.; Heilshorn, S.C.; Jüngst, T.; Malda, J.; Mironov, V.A.; Nakayama, K.; et al. A definition of bioinks and their distinction from biomaterial inks. *Biofabrication* 2018, 11, 013001.
96. Gu, M.; Li, W.; Jiang, L.; Li, X. Recent progress of rare earth doped hydroxyapatite nanoparticles: Luminescence properties, synthesis and biomedical applications. *Acta Biomater.* 2022, 148, 22–43.
97. Muhammad Qadir, Yuncang Li, Cuie Wen Ion-substitute calcium phosphates coatings by physical vapor deposition magnetron sputtering for biomedical applications: A review // *Acta Biomater.* 2019 Apr 15:89:14-32. doi: 10.1016/j.actbio.2019.03.006.
98. Samson Afewerki, Nicole Bassous, Samarah Harb, Carlos Palo-Nieto, Guillermo U Ruiz-Esparza, Fernanda R Marciano, Thomas J Webster, André Sales Aguiar Furtado, Anderson O Lobo Advances in dual

functional antimicrobial and osteoinductive biomaterial for orthopedic applications //Nanomedicine 2020 Feb;24:102143. doi: 10.1016/j.nano.2019.102143.

99. Harrison R.G. «Observations on the living developing nerve fiber». *Anat.Res.*, // 1907. 1:116-128; *Proc. Soc. Exp. Med, N.Y.* volume 4, 140-143. doi: 10.3181/00379727-4-98

100. Ika Dewi Ana, Gumilang Almas Pratama Satria, Anne Handrini Dewi, Retno Ardhani Bioceramics for clinical application in regenerative dentistry// *Adv Exp Med Biol* 2018:1077:309-316. doi: 10.1007/978-981-13-0947-2_16.

101. Hing Karin A. Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry. *International Journal of Applied Ceramic Technology*. Volume 2, Issue 3, pages 184–199, May 2005

102. Ho-Shui-Ling, A.; Bolander, J.; Rustom, L.E.; Johnson, A.W.; Luyten, F.P.; Picart, C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials* 2018, 180, 143–162.

103. Hossain, M.S.; Uddin, M.N.; Sarkar, S.; Ahmed, S. Crystallographic dependency of waste cow bone, hydroxyapatite, and β -tricalcium phosphate for biomedical application. *J. Saudi Chem. Soc.* 2022, 26, 101559.

104. Ho SS, Murphy KC, Binder BY, Vissers CB, Leach JK. Increased survival and function of mesenchymal stem cell spheroids entrapped in instructive alginate hydrogels. *Stem Cells Transl Med.* 2016;5(6):773–81.

105. Hotz G. Herr G. Bone substitute with osteoinductive biomaterials — Current and future clinical applications 1994 Volume 23, Issue 6, Part 2, Pages 413–417

106. Jaiswal Bruder, Scott P.; Ricalton Neelam, Nancy S.; et al. "Mesenchymal Stem Cells in Osteobiology and Applied Bone Regeneration". *Clinical Orthopaedics & Related Research*: October 1998 - Vol. 355 - Issue - pp S247-S256

107. Jones E, Yang X. Mesenchymal stem cells and bone regeneration: current status. *Injury*. 2011 Jun;42(6):562-8
108. Hongshi Ma¹, Chun Feng¹, Jiang Chang², Chengtie Wu 3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy // *Acta Biomater* 2018 Oct 1;79:37-59. doi: 10.1016/j.actbio.2018.08.026.
109. Kalinski Pawel «Regulation of Immune Responses by Prostaglandin E₂» *J Immunol* 1, 2012,188(1)21-28: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101029>
110. Kisiel MA, Klar AS. Isolation and Culture of Human Dermal Fibroblasts. *Methods Mol Biol*. 2019; 1993:71-78. doi: 10.1007/978-1-4939-9473-1_6. PMID: 31148079.
111. Kang, H.W.; Lee, S.J.; Ko, I.K.; Kengla, C.; Yoo, J.J.; Atala, A. A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity. *Nat. Biotechnol*. 2016, 34, 312–319.
112. Karsenty G Role of Cbfa1 in osteoblast differentiation and function. *Semin Cell Dev Biol*. 2000 Oct;11(5):343-6
113. Karunakaran, G.; Cho, E.-B.; Kumar, G.S.; Kolesnikov, E.; Govindaraj, S.K.; Mariyappan, K.; Boobalan, S. CTAB enabled microwave-hydrothermal assisted mesoporous Zn-doped hydroxyapatite nanorods synthesis using bio-waste *Nodipecten nodosus* scallop for biomedical implant applications. *Environ. Res*. 2023, 216, 114683.
114. Keren E. Dittmer, Elwyn C. “Mechanisms of bone response to injury”; *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* First published date: January-06-2017; doi:10.1177/1040638716679861.
115. Keriquel, V.; Oliveira, H.; Rémy, M.; Ziane, S.; Delmond, S.; Rousseau, B.; Rey, S.; Catros, S.; Amédée, J.; Guillemot, F.; et al. In situ printing of mesenchymal stromal cells, by laser-assisted bioprinting, for in vivo bone regeneration applications. *Sci. Rep*. 2017, 7, 1778.
116. Kérourédan, O.; Hakobyan, D.; Rémy, M.; Ziane, S.; Dusserre, N.; Fricain, J.C.; Delmond, S.; Thébaud, N.B.; Devillard, R. In situ prevascularization

designed by laser-assisted bioprinting: Effect on bone regeneration. *Biofabrication* 2019, 11, 045002.

117. Kim, D.; Lee, H.; Lee, G.H.; Hoang, T.H.; Kim, H.R.; Kim, G.H. Fabrication of bone-derived decellularized extracellular matrix/ceramic-based biocomposites and their osteo/odontogenic differentiation ability for dentin regeneration. *Bioeng. Transl. Med.* 2022, 7, e10317.

118. Kim Jaehyup, Hematti Peiman «Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages». *Exp Hematol.* 2009 Dec; 37(12):1445–1453 doi:10.1016/j.exphem.2009.09.004. PMID: PMC2783735.NIHMSID: NIHMS147659.

119. Kishor K. Sivaraj, Ralf H. Adams «Blood vessel formation and function in bone». *Development*, 2016:143:2706-2715; doi:10.1242/dev.136861.

120. Sheida Hashemi, Leila Mohammadi Amirabad, Fatemeh Dehghani Nazhvani, Payam Zarrintaj, Hamid Namazi, Abdollah Saadatfar, Ali Golchin Bilayer scaffolds for interface tissue engineering and regenerative medicine: A systematic reviews // *Adv Exp Med Biol* 2021:1347:83-113. doi: 10.1007/5584_2021_637.

121. Komlev V.S., Barinov S.M., Bozo I.I. et al. Bioceramics Composed of Octacalcium Phosphate Demonstrate Enhanced Biological Behavior // *ACS applied materials & interfaces.* – 2014.– Vol.6.– P.16610-16620.

122. Kungvarnchaikul I, Subbalekha K, Sindhavajiva PR, Suwanwela J. Deproteinized bovine bone and freeze-dried bone allograft in sinus floor augmentation: A randomized controlled trial. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2023 Apr;25(2):343-351. doi: 10.1111/cid.13179. Epub 2023 Jan 11. PMID: 36628938.

123. Kraus K.H., Kirker C. "Mesenchymal Stem Cells and Bone Regeneration" // *Veterinary Surgery*, 2006.-Vol. 35.- Iss 3.- pp. 232–242.

124. Kuss, M.A.; Harms, R.; Wu, S.; Wang, Y.; Untrauer, J.B.; Carlson, M.A.; Duan, B. Short-term hypoxic preconditioning promotes prevascularization in 3D bioprinted bone constructs with stromal vascular fraction derived cells. *RSC Adv.* 2017, 7, 29312–29320.

125. Latimer, J.M.; Maekawa, S.; Yao, Y.; Wu, D.T.; Chen, M.; Giannobile, W.V. Regenerative Medicine Technologies to Treat Dental, Oral, and Craniofacial Defects. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2021, 9, 704048.

126. Lee CY, Kim R, Ham O, Lee J, Kim P, Lee S, Oh S, Lee H, Lee M, Kim J, et al. Therapeutic Potential of Stem Cells Strategy for Cardiovascular Diseases. *Stem Cells Int.* 2016; 2016:4285938.

127. Leeb C, Jurga M, McGuckin C, Moriggl R, Kenner L. «Promising new sources for pluripotent stem cells». *Stem Cell Rev.* 2010 Mar;6(1):15-26. doi: 10.1007/s12015-009-9102-0. Review.PMID:20091142

128. Dongqin Xiao, Jingwei Zhang, Chengdong Zhang, Davide Barbieri, Huipin Yuan, Lorenzo Moroni, Gang Feng The role of calcium phosphate surface structure in osteogenesis and the mechanisms involved // *Acta Biomater* 2020 Apr 1:106:22-33. doi: 10.1016/j.actbio.2019.12.034.

129. Laurence E Rustom, Michael J Poellmann, Amy J Wagoner Johnson Mineralization in micropores of calcium phosphate scaffolds // *Acta Bio Mater* 2019 Jan 1:83:435-455. doi: 10.1016/j.actbio.2018.11.003.

130. Lin, Y.T.; Hsu, T.T.; Liu, Y.W.; Kao, C.T.; Huang, T.H. Bidirectional Differentiation of Human-Derived Stem Cells Induced by Biomimetic Calcium Silicate-Reinforced Gelatin Methacrylate Bioink for Odontogenic Regeneration. *Biomedicines* 2021, 9, 929.

131. Liu Y., Cooper P.R., Barralet J.E. et al. Influence of calcium phosphate crystal assemblies on the proliferation and osteogenic gene expression of rat bone marrow stromal cells // *Biomaterials.* – 2007.– Vol.28.– P.1393-1403.

132. Levitt, M. & Chothia C. (1976), "Structural patterns in globular proteins", *Nature.* 261,552-558, doi:10.1038/261552a0.

133. Carola Millan, Juan F Vivanco, Isabel M Benjumedá-Wijnhoven, Suncica Bjelica, Juan F Santibanez «Msenchimal stem cells and calcium phosphate bioceramics: implication in periodontal bone regeneration» // *Adv Exp Med Biol* 2018:1107:91-112. doi: 10.1007/5584_2018_249.

134. Lund AW, Stegemann JP, Plopper GE. Mesenchymal stem cells sense three-dimensional type I collagen through discoidin domain receptor 1. *Open Stem Cell J.* 2009; 1:40–53.

135. Maggini J, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I, et al. (2010) Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Turn Activated Macrophages into a Regulatory-Like Profile. *PLoS ONE* 5(2): e9252. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009252>

136. Mandrycky, C.; Wang, Z.; Kim, K.; Kim, D.H. 3D bioprinting for engineering complex tissues. *Biotechnol. Adv.* 2016, 34, 422–434.

137. Mann S. *Biomaterialization: Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry.* United Kingdom: Oxford - University Press; 2005 Marsell R., Einhorn T. A. «The Biology of fracture healing» *Injury.* 2011; 42(6): 551–555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031.PMCID:PMC3105171.

138. Marcondes, G.M.; Paretsis, N.F.; Fülber, J.; Navas-Suárez, P.E.; Mori, C.M.C.; Plepis, A.M.G.; Martins, V.C.A.; Fantoni, D.T.; Zoppa, A.L.V. Evaluation of the Biocompatibility and Osteoconduction of the Carbon Nanotube, Chitosan and Hydroxyapatite Nanocomposite with or without Mesenchymal Stem Cells as a Scaffold for Bone Regeneration in Rats. *Osteology* 2021, 1, 118–131. <https://doi.org/10.3390/osteology1030013>

139. Marsell R., Einhorn T. A. «The Biology of fracture healing » *Injury.* 2011; 42(6): 551–555. doi:10.1016/j.injury.2011.03.031.PMCID:PMC3105171.

140. Martin Okrusch, Siegfried Matthes: *Mineralogie.* 7. Auflage. Springer, Berlin 2005, ISBN 3-540-23812-3.

141. Ma, Y.; Ji, Y.; Zhong, T.; Wan, W.; Yang, Q.; Li, A.; Zhang, X.; Lin, M. Bioprinting-Based PDLSC-ECM Screening for in vivo Repair of Alveolar Bone Defect Using Cell-Laden, Injectable and Photocrosslinkable Hydrogels. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2017, 3, 3534–3545.

142. Mimeault M, Hauke R, Batra SK. ««Stem cells: a revolution in therapeutics-recent advances in stem cell biology and their therapeutic applications

in regenerative medicine and cancer therapies». *Clin Pharmacol Ther.* 2007 Sep;82(3):252-64. Review.PMID:17671448.

143. Misch CE. *Contemporary Implant Dentistry* 2nd ed. St Louis: Mosby; 2006.

144. Mohd, N.; Razali, M.; Fauzi, M.B.; Abu Kasim, N.H. In Vitro and In Vivo Biological Assessments of 3D-Bioprinted Scaffolds for Dental Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 12881. <https://doi.org/10.3390/ijms241612881>

145. Mohd, N.; Razali, M.; Ghazali, M.J.; Abu Kasim, N.H. Current Advances of Three-Dimensional Bioprinting Application in Dentistry: A Scoping Review. *Materials* 2022, 15, 6398.

146. Moncal, K.K.; Gudapati, H.; Godzik, K.P.; Heo, D.N.; Kang, Y.; Rizk, E.; Ravnic, D.J.; Wee, H.; Pepley, D.F.; Ozbolat, V.; et al. Intra-Operative Bioprinting of Hard, Soft, and Hard/Soft Composite Tissues for Craniomaxillofacial Reconstruction. *Adv. Funct. Mater.* 2021, 31, 2010858.

147. Moncal, K.K.; Tigli Aydın, R.S.; Godzik, K.P.; Acri, T.M.; Heo, D.N.; Rizk, E.; Wee, H.; Lewis, G.S.; Salem, A.K.; Ozbolat, I.T. Controlled Co-delivery of pPDGF-B and pBMP-2 from intraoperatively bioprinted bone constructs improves the repair of calvarial defects in rats. *Biomaterials* 2022, 281, 121333.

148. Moore, W. R., Graves, S. E. and Bain, G. I. (2001), Synthetic bone graft substitutes. *ANZ Journal of Surgery*, 71: 354–361.

149. Xiaoxue Zhu, Dandan Xiang, Yiding Huo, Xiaotao He, Faming Chen, Beimin Tian, Xuan Li Progress in basic research and clinical strategies for cementum regeneration // *Int Dent J* 2025 Jun;75(3):1566-1584. doi: 10.1016/j.identj.2025.02.017.

150. Nicoara, A.I.; Alecu, A.E.; Balaceanu, G.-C.; Puscasu, E.M.; Vasile, B.S.; Trusca, R. Fabrication and Characterization of Porous Diopside/Akermanite Ceramics with Prospective Tissue Engineering Applications. *Materials* 2023, 16, 5548. <https://doi.org/10.3390/ma16165548>

151. Niemeyer K Fechner, Milz Stefan, Wiltrud Richter et al. "Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone

regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma"//Biomaterials 2010, Vol. 31, Iss. 13, pp 3572–3579

152. Nisar, A.; Iqbal, S.; Atiq Ur Rehman, M.; Mahmood, A.; Younas, M.; Hussain, S.Z.; Tayyaba, Q.; Shah, A. Study of physico-mechanical and electrical properties of cerium doped hydroxyapatite for biomedical applications. *Mater. Chem. Phys.* 2023, 299, 127511.

153. Niu, Y.; Chen, L.; Wu, T. Recent Advances in Bioengineering Bone Revascularization Based on Composite Materials Comprising Hydroxyapatite. *Int. J. Mol. Sci.* 2023, 24, 12492. <https://doi.org/10.3390/ijms241512492>

154. Olivier Malard, Florent Espitalier, Philippe Bordure, Guy Daculsi, Pierre Weiss, Pierre Corre. Biomaterials for tissue reconstruction and bone substitution of the ear, nose and throat, face and neck Expert Review of Medical Devices. Sept 2007 v4 i5 p729-740

155. Ollier LL. Des moyens chirurgicaux de favoriser la reproduction des os après les résections. *Gazette hebdomadaire de médecine et de chirurgie* 5, 899-905 (1858).

156. Oréfice RL, Pereira MM, Mansur HS. Biomaterais: Fundamentos & Aplicações. 1^a ed ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica; 2006.

157. Ouhayoun J. P., Shabana A. H. M., Issahakian S. et al. "Histological evaluation of natural coral skeleton as a grafting material in miniature swine mandible" *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* May 1992, Volume 3, Issue 3, pp 222-228

158. Papynov, E.K.; Shichalin, O.O.; Belov, A.A.; Buravlev, I.Y.; Mayorov, V.Y.; Fedorets, A.N.; Buravleva, A.A.; Lembikov, A.O.; Gritsuk, D.V.; Kapustina, O.V.; et al. CaSiO₃-HAp Metal-Reinforced Biocomposite Ceramics for Bone Tissue Engineering. *J. Funct. Biomater.* 2023, 14, 259. <https://doi.org/10.3390/jfb14050259>

159. Tungish Bansal, Vijay Sharma, Kamaran Farooque Short-term daily teriparatide improve postoperative functional outcome and fracture healing in

unstable intertrochanteric fractures //Injury// 2020 Apr;51(4):1137. doi: 10.1016/j.injury.2020.02.019. Epub 2020 Feb 26.

160. Perin C.E., Geng Y.J., Willerson J.T. Circulation, 2003,107,935-938. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000057526.10455.BD>

161. Phinney D. G., Prockop D. J. Concise review: mesenchymal stem/multipotent stromal cells: the state of transdifferentiation and modes of tissue repair—current views //Stem cells. – 2007. – T. 25. – №. 11. – C. 2896-2902.

162. Portal-Núñez S,Lozano D,Esbrit P. “Role of angiogenesis on bone formation” Histol Histopathol., 2012; May;27(5):559-66. doi: 10.14670/HH-27.559.

163. Pryor Landon S., Gage Earl, Langevin Claude-Jean et al. Review of Bone Substitutes Craniomaxillofac Trauma Reconstr.,2009 Oct; 2(3): 151–160.doi:10.1055/s-0029-1224777. PMID: PMC3052658

164. Qianbin Wang, Qiguang Wang, Changxiu Wan «The effect of porosity on the structure and properties of calcium polyphosphate bioceramics» //Ceramics – Silikáty 55 (1) 43-48 (2011)

165. Radovanović, Ž.; Jokić, B.; Veljović, D.; Dimitrijević, S.; Kojić, V.; Petrović, R.; Janačković, D. Antimicrobial activity and biocompatibility of Ag⁺ - and Cu²⁺-doped biphasic hydroxyapatite/ α -tricalcium phosphate obtained from hydrothermally synthesized Ag⁺ - and Cu²⁺-doped hydroxyapatite. Appl. Surf. Sci. 2014, 307, 513–519.

166. Radulescu, D.-E.; Vasile, O.R.; Andronescu, E.; Ficai, A. Latest Research of Doped Hydroxyapatite for Bone Tissue Engineering. Int. J. Mol. Sci. 2023, 24, 13157. <https://doi.org/10.3390/ijms241713157>

167. Recommendations for euthanasia of experimental animals: Part 1// Laboratory Animals 1996, vol. 30, No.4, P. 298-316; Part 2//Ibid. 1997. Vol. 31, No.1, P. 1-32

168. Redondo-Castro E, Cunningham CJ, Miller J, Brown H, Allan SM, Pinteaux E. Changes in the secretome of tri-dimensional spheroid-cultured human

mesenchymal stem cells in vitro by interleukin-1 priming. *Stem Cell Res Ther.* 2018;9(1):11.

169. William T Kim, Robert Woodruff, Niraj V Kalore, Madan M Vallem, John W Cyrus, John W Krumme, Nirav K Patel, Gregory J Golladay Hydroxyapatite – Coated femoral Stems in Primary total hipartroplasty: An update meta analisis//*J Artroplasty* 2024 Mar;39(3):846-850.e2. doi: 10.1016/j.arth.2023.08.071.

170. Rengier F., Mehndiratta A., von Tengge-Kobligk H. et al. "3D printing based on imaging data: review of medical applications" //International Journal of Computer Assisted Radiology and Surgery July 2010, Vol. 5,- Iss. 4, - pp 335-341. doi:10.1007/s11548-010-0476-x. 2016.

171. Sivaraj, Kishor K. Adams Ralf H. «Blood vessel formation and function in bone» *Development*, 2016,143: 2706-2715; doi:10.1242/dev.136861.

172. Street John, Bao Min, de Guzman Leo et al. (2002) «Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover» *PNAS*, vol. 99; no. 15, 9656–9661, doi: 10.1073/pnas.152324099.

173. Qilin Yu, Jianrong Li, Yueqi Zhang et al. “Inhibition of gold nanoparticles (AuNPs) on pathogenic biofilm formation and invasion to host cells” *Scientific Reports*: 6, Article number: 26667 (2016). doi:10.1038/srep26667.

174. Rongmao Shi, Gang Wang, Zhian Chen, Libo Yuan, Tianhua Zhou, Hongbo Tan Dual-tissue transplantation versus osteochondral autograft transplantation in the treatment of osteochondral defects:a porcine model study *J Orthop Surg Res* 2023 Jul 5;18(1):481 doi: 10.1186/s13018-023-03964-6.

175. Shahzadi Shamaila, Noshin Zafar, Saira Riaz, Rehana Sharif et al. “Gold Nanoparticles: An Efficient Antimicrobial Agent against Enteric Bacterial Human Pathogen” *Nanomaterials*, 2016, 6(4), 71; doi:10.3390/nano6040071.

176. Sheard JJ, Bicer M, Meng Y, Frigo A, Aguilar RM, Vallance TM, Iandolo D, Widera D. Optically transparent anionic nanofibrillar cellulose is cytocompatible with human adipose tissue-derived stem cells and allows simple imaging in 3D. *Stem Cells Int.* 2019;2019:3106929.

177. Suzuki O., Octa calcium fosfate: osteocunductivity and crystal chemistry. *Acta biomater* 2010 Sep;6(9):3379-87. doi: 10.1016/j.actbio.2010.04.002.
178. Simunovic, F.; Finkenzeller, G. Vascularization Strategies in Bone Tissue Engineering. *Cells* 2021, 10, 1749.
179. Sivaraj Kishor K., Adams Ralf H. “Blood vessel formation and function in bone Development” (2016);143:2706-2715; doi:10.1242/dev.136861.
180. Skeldon, G.; Lucendo-Villarin, B.; Shu, W. Three-dimensional bioprinting of stem-cell derived tissues for human regenerative medicine. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 2018, 373, 20170224.
181. Socolov, <https://sokolov.ru/blog/gems/Medovaja-redkost/>.
182. Siying Li, Hongyi Yang, Qinyu Duan, Hongyu Bao, Aodi Li, Wei Li, Junliang Chen, Yun He A comparative study of the effects of platelet-rich fibrin, concentrated growth factor and platelet-rich plasma on the healing of tooth extraction socket in rabbits. *BMC Oral Health.* 2022 Mar 23;22(1):87. doi: 10.1186/s12903-022-02126-0.
183. Sugiyama Toshihiro, Meakin Lee B., Browne William J. et al. «Bones' Adaptive Response to Mechanical Loading Is Essentially Linear Between the Low Strains Associated With Disuse and the High Strains Associated With the Lamellar/Woven Bone Transition» *J Bone Miner Res.* 2012 Aug; 27(8): 1784–1793. doi:10.1002/jbmr.1599. PMID: PMC3427886
184. Suzuki O., Shwaku Y., Hamai R. Octacalcium phosphate bone substitute materials. Comparison between properties of biomaterials and other calcium phosphate materials// *Dent Mater J.* 2020 Mar 31;39(2):187-199. doi:10.4012/dmj.2020-001.
185. Suzuki O., Susuma S., Hamai R. The material design of octacalcium phosphate bone substitute: increased dissolution and osteogenecity. *Acta Biomater.* 2023 Mar 1;158:1-11. doi: 10.1016/j.actbio.2022.12.046.
186. Suzuki O. Octacalcium phosphate: osteoconductivity and crystal chemistry // *Acta biomaterialia.* – 2010.– Vol.6.– P.3379-3387.

187. Suzuki O. Octacalcium phosphate (OCP)-based bone substitute materials // *Japanese Dental Science Review*. – 2013.– Vol.49.– P.58-71.
188. Tavangarian, F.; Zolko, C.A.; Sadeghzade, S.; Fayed, M.; Davami, K. Fabrication, Mechanical Properties and In-Vitro Behavior of Akermanite Bioceramic. *Materials* 2020, 13, 4887.
189. Malin Nilsson, Ming H Zheng, Magnus Tägil The composite of hydroxyapatite and calcium sulphate: a review of preclinical evaluation and clinical applications. 2013 Sep;10(5):675-84. doi: 10.1586/17434440.2013.827529.
190. Tian, Y.; Liu, M.; Liu, Y.; Shi, C.; Wang, Y.; Liu, T.; Huang, Y.; Zhong, P.; Dai, J.; Liu, X. The performance of 3D bioscaffolding based on a human periodontal ligament stem cell printing technique. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2021, 109, 1209–1219.
191. Touya, N.; Devun, M.; Handschin, C.; Casenave, S.; Ahmed Omar, N.; Gaubert, A.; Dusserre, N.; De Oliveira, H.; Kérourédan, O.; Devillard, R. In vitro and in vivo characterization of a novel tricalcium silicate-based ink for bone regeneration using laser-assisted bioprinting. *Biofabrication* 2022, 14, 024104.
192. Umrath, F.; Schmitt, L.-F.; Kliesch, S.-M.; Schille, C.; Geisgerstorfer, J.; Gurewitsch, E.; Bahrini, K.; Peters, F.; Reinert, S.; Alexander, D. Mechanical and Functional Improvement of β -TCP Scaffolds for Use in Bone Tissue Engineering. *J. Funct. Biomater.* 2023, 14, 427. <https://doi.org/10.3390/jfb14080427>
193. Unagolla, J.M.; Jayasuriya, A.C. Hydrogel-based 3D bioprinting: A comprehensive review on cell-laden hydrogels, bioink formulations, and future perspectives. *Appl. Mater. Today* 2019, 18, 100479.
194. Vance GS, Greenwell H, Miller R Let al. Comparison of an allograft in an experimental putty carrier and a bovine-derived xenograft used in ridge preservation: a clinical and histologic study in humans. *The International Journal of Oral and Maxillofacial Implants*. 2004; 19:491-497.

195. Vicenti G., Pesce V., Tartaglia N. et al. "Micromotion in the fracture healing of closed distal metaphyseal tibial fractures: A multicentre prospective study" //2014.-Vol. 45, Suppl. -№ 6, ppS27–S35.

196. Villa-Diaz L.G., Ross A.M., Lahann J., and Krebsbach P.H. "The evolution of human pluripotent stem cell culture: from feeder cells to synthetic coatings" *Stem Cells.*, 2013 Jan; 31(1): 1–7. doi:10.1002/stem.1260. PMID: PMC3537180

197. Wang, X.; Yan, Y.; Zhang, R. Recent trends and challenges in complex organ manufacturing. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2010, 16, 189–197.

198. Wilson C.J., Schuetz M.A., Epari D.R. "Effects of strain artefacts arising from a pre-defined callus domain in models of bone healing mechanobiology" 2015 Oct;14. *Biomech Model Mechanobiol.* 25:1129-41. doi: 10.1007/s10237-015-0659-z.

199. F. Högel, U. Schlegel, N. Südkamp, C. Müller Fracture healing after reamed and unreamed intramedullary nailing in sheep tibia. 2011 Jul;42(7):667-74. doi: 10.1016/j.injury.2010.10.004. Epub 2010 Nov 13.

200. Yamaguchi Y, Ohno J, Sato A, Kido H, Fukushima T. Mesenchymal stem cell spheroids exhibit enhanced in-vitro and in-vivo osteoregenerative potential. *BMC Biotechnol.* 2014; 14:105.

201. Yan-Qi Yang, Ying-Ying Tan, Ricky Wong et al. "The role of vascular endothelial growth factor in ossification" *International Journal of Oral Science* (2012) 4, 64–68.

202. Yongxiang Luo, Anja Lode, Chengtie Wu, Jiang Chang, and Gelinsky Michael Alginate/Nanohydroxyapatite Scaffolds with Designed Core/Shell Structures Fabricated by 3D Plotting and in Situ Mineralization for Bone Tissue Engineering //ACS Appl. Mater. Interfaces, 2015, 7 (12), pp 6541–6549.

203. Yu L, Wu Y, Liu J, Li B, Ma B, Li Y, Huang Z, He Y, Wang H, Wu Z, et al. 3D culture of bone marrow-derived mesenchymal stem cells (BMSCs) could improve bone regeneration in 3D-printed porous Ti6Al4V scaffolds. *Stem Cells Int.* 2018; 2018:2074021.

204. Yun YR, Jang JH, Jeon E et al. «Administration of growth factors for bone regeneration». *Regen Med.*, 2012 May;7(3):369-85. doi: 10.2217/rme.12.1.

205. Yu, Y.; Zhang, Y.; Martin, J.A.; Ozbolat, I.T. Evaluation of cell viability and functionality in vessel-like bioprintable cell-laden tubular channels. *J. Biomech. Eng.* 2013, 135, 91011.

206. Zorin V.L., Komlev V.S., Zorina A.I. et al. Octacalcium phosphate ceramics combined with gingiva-derived stromal cells for engineered functional bone grafts // *Biomedical Materials*. – 2014.– Vol.9.– P.1-12.

207. Zorlutuna, P.; Vrana, N.E.; Khademhosseini, A. The expanding world of tissue engineering: The building blocks and new applications of tissue engineered constructs. *IEEE Rev. Biomed. Eng.* 2013, 6, 47–62.
