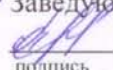


М 16/5

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение
высшего образования
«СИБИРСКИЙ ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»
Институт Фундаментальной Биологии и Биотехнологии
Базовая кафедра микробиологии


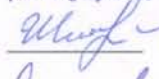
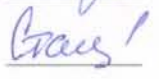
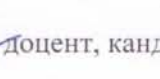
УТВЕРЖДАЮ
Заведующий кафедрой
 Т.Г. Волова
подпись
«20» июня 2016 г.

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ВЛИЯНИЯ ХИМИЧЕСКОГО СОСТАВА ПГА И ГЕОМЕТРИИ КЛЕТОЧНЫХ
НОСИТЕЛЕЙ НА ИХ ОСНОВЕ НА АДГЕЗИЮ И РОСТ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ
ОСТЕОБЛАСТОВ.

06.04.01 Биология

06.04.01.01 Микробиология и биотехнология

Научный руководитель	 17.06.2016	канд. биол. наук.	Е.Д. Николаева
Научный руководитель	 17.06.2016		А.А. Шумилова
Выпускник	 17.06.2016		М.В. Стаценко
Рецензент	20.06.16 	доцент, канд. биол. наук.	Н.Г. Мензянова

Красноярск 2016

РЕФЕРАТ

Выпускная квалификационная работа по теме «Влияния химического состава ПГА и геометрии клеточных носителей на их основе на адгезию и рост культивируемых остеобластов» содержит 78 страниц текстового документа, 138 использованных источников, 15 листов графического материала.

ПОЛИГИДРОКСИАЛКАНОАТЫ, ММСК, ТКАНЕВАЯ ИНЖЕНЕРИЯ, КЛЕТОЧНЫЕ НОСИТЕЛИ, БИОСОВМЕСТИМОСТЬ, ОСТЕОБЛАСТЫ

Цель:

исследовать влияние химического состава ПГА и геометрия клеточных носителей на их основе на адгезию и рост дифференцированных ММСК костного мозга и жировой ткани

Задачи:

1. Сконструировать клеточные носители на основе ПГА разного химического состава и разной геометрии.
2. Исследовать свойства поверхности клеточных носителей.
3. Изучить физико-механические свойства полимерных клеточных носителей в зависимости от химического состава.
4. Исследовать способность клеточных полимерных носителей поддерживать рост и дифференцировку ММСК костного мозга и жировой ткани.

В работе были исследованы поверхностные, физико-механические свойства, а также способность поддерживать рост и дифференцировку ММСК костного мозга и жировой ткани, сконструированных матриц на основе ПГА.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ	5
1. Обзор литературы	7
1.1. Материалы, используемые для реконструкции костной ткани	7
1.2. Клеточные технологии в костной пластике	17
1.3. Способы получения клеточных носителей (scaffolds)	22
1.4. Перспективы полигидроксиалканоатов в качестве клеточных носителей для восстановления костной ткани.....	28
2 Материалы и методы исследования	33
2.1 Материалы исследования.....	33
2.2 Методы исследования.....	34
2.2.1 Конструирование матриц	34
2.2.2 Исследование свойств поверхности.....	35
2.2.3 Исследование физико-механических свойств	36
2.2.4 Суммарная пористость и влагопоглощение.....	36
2.2.5 Исследование способности клеточных носителей поддерживать рост и дифференцировку ММСК костного мозга и жировой ткани в остеобласты.....	37
2.2.5.1 Выделение ММСК –КМ и –ЖТ и их дифференцировка в остеобласты	37
2.2.5.2 Посев клеток.....	37
2.2.5.3 МТТ-тест.....	38
2.2.5.4 Апоптоз.....	38
2.2.5.5 Подтверждение дифференцировки ММСК в остеобласты	39

2.2.5.5.1 Щелочная фосфатаза	39
2.2.5.5.2 Окрашивание по von Kossa.....	39
2.2.5.5.3 Окрашивание ALIZARIN RED.....	40
2.2.6 Микроструктура поверхности	40
2.2.8 Статистическая обработка результатов.....	40
3. Результаты.....	40
3.1 Характеристика полимерных матриц.....	41
3.1.1 Исследование топографии поверхности сконструированных матриц	Ошибка! Закладка не определена.
3.1.1.1 РЭМ-поверхности сконструированных матриц	Ошибка! Закладка не определена.
3.1.1.2 Шероховатость пленочных матриц.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.1.1.3 Свойства поверхности полимерных матриц	Ошибка! Закладка не определена.
3.1.2 Физико-механические характеристики полимерных матриц.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.2 Исследование способности клеточных пленочных носителей поддерживать рост и дифференцировку ММСК костного мозга и жировой ткани в остеобласты.....	Ошибка! Закладка не определена.
3.3 Исследование способности клеточных носителей разной геометрии поддерживать рост и дифференцировку ММСК жировой ткани в остеобласты	41
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	44
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	45

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ	46
--	----

ВВЕДЕНИЕ

С развитием тканевой инженерии одним из перспективных направлений для костной пластики является создание клеточных графтов из биodeградируемых материалов в сочетании с донорскими клетками, способных восстанавливать поврежденный орган или ткань. Однако для успешной индукции остеогенеза в месте имплантации необходимо создать высокую начальную концентрацию клеток, поэтому возникает необходимость поиска адекватного носителя для закрепления трансплантируемых клеток в организме реципиента. Среди материалов, разрабатываемых и исследуемых применительно к этим задачам, - полигидроксиалканоаты (ПГА), линейные полиэфиры микробиологического происхождения, являются наиболее перспективными. ПГА представляют большой интерес для ортопедии в связи с их высокой биосовместимостью, медленной биodeградацией и механической прочностью. Однако остается не ясным как химический состав, структура и свойства полимеров (кристалличность, механическая прочность, температурные характеристики, скорости биораспада) могут повлиять на рост и адгезию остеобластов

Цель работы – исследовать влияние химического состава ПГА и геометрия клеточных носителей на их основе на адгезию и рост дифференцированных ММСК костного мозга и жировой ткани

Для достижения цели сформулированы следующие задачи:

1. Сконструировать клеточные носители на основе ПГА разного химического состава и разной геометрии
2. Исследовать свойства поверхности клеточных носителей
3. Изучить физико-механические свойства полимерных клеточных носителей в зависимости от химического состава
4. Исследовать способность клеточных полимерных носителей поддерживать рост и дифференцировку ММСК костного мозга и жировой ткани

Работа выполнена в Биомедицинском центре на базе «Сибирского
Федерального Университета»

1. Обзор литературы

1.1. Материалы, используемые для реконструкции костной ткани

Реконструкция дефектов костной ткани остается одной из основных задач, как фундаментальной медицинской науки, так и клинической практики. Что обусловлено высоким уровнем травм опорно-двигательного аппарата и распространенностью стоматологических и других социально значимых заболеваний костной ткани [25]. В настоящее время благодаря междисциплинарному подходу биологии, химии и медицины, восполнить объем утраченной костной ткани возможно путем внедрения новых методик реконструктивных операций с использованием современных материалов и факторов, улучшающих репаративные свойства поврежденного участка кости.

Для замещения врожденных или приобретенных дефектов костной ткани при реконструктивных операциях используются различные материалы как биологического, так и не биологического происхождения; которые можно разделить на следующие группы:

- аутогенные трансплантаты (донором является сам пациент);
- аллогенные имплантаты или аллоимплантаты (донором является другой человек);
- ксеногенные имплантаты или ксеноимплантаты (донором является животное);
- аллопластические материалы (получают из минерального сырья).

По современным представлениям «идеальный» материал для костного замещения должен обладать рядом свойств:

- остеогенностью (содержать клеточные источники для остеогенеза);
- остеоиндукцией (запускать остеогенез);

- остеокондукцией (служить матрицей для образования новой кости в ходе репаративного остеогенеза, обладать способностью направлять ее рост);
- остеопротекцией (заменять кость по механическим свойствам) [4].

Длительное время оптимальным материалом для больных с костной патологией не без основания считали аутокость. Аутогенная губчатая кость из-за отсутствия иммуногенности обладает непосредственно остеогенными и остеоиндуктивными свойствами и имеет идеальную структуру для остеокондукции, является идеальным пластическим материалом с биологических позиций, хотя ограничена в объеме и в механической прочности. Именно на аутогенную губчатую кость, как на эталон анатомо-функциональных свойств, ориентируются производители искусственных костезамещающих материалов [11]. Кортикальная аутокость имеет высокие прочностные характеристики, но уступает губчатой по остеоиндуктивным и остеокондуктивным свойствам, а в случае изолированного использования не содержит остеопрогенаторных клеток. Однако забор васкуляризованного и не васкуляризованного аутооттрансплантатов влечет за собой дополнительный разрез, увеличение болезненности и дефицит кости в области донорского места, что так же сопряжено с опасностью возникновения переломов в месте забора аутооттрансплантатов или инфицирования при их взятии. По данным некоторых авторов, частота различных осложнений после манипуляций с аутооткрянками достигает 20,6% [9; 45].

Альтернативой аутопластическому материалу могут стать биологические неаутогенные имплантаты, которые после помещения в область костных дефектов постепенно замещались бы собственными тканями реципиента, а процессы перестройки в них протекали бы в основном так же, как в аутооткрянке. Костные аллоимплантаты все чаще используются из-за своей доступности. Их применяют в виде малых

фрагментов, целых подпорок, сегментарных, костно-хрящевых трансплантатов и композиционных материалов на их основе, которые могут быть получены от живых или умерших доноров [12]. От живых доноров могут быть забраны головки бедра во время артропластики тазобедренного сустава, которые в последующем могут использоваться как аутоимплантаты у пациента при ревизионном вмешательстве или при приготовлении аллоимплантатов для ревизионного эндопротезирования. От умерших доноров обычно забирают большие сегменты кости или целые костно-хрящевые комплексы для последующего изготовления различных типов аллоимплантатов [10].

В зависимости от способа предварительной химической обработки костной ткани аллоимплантаты делятся на три вида:

- нативные, с сохраненной костной структурой и соотношением органического и минерального компонентов;
- деминерализованные (органический матрикс кости) лишенные минерального компонента;
- депротеинизированные (минеральный компонент или кристаллическая решетка гидроксиапатита, биологического происхождения) лишенные органического компонента.

Проблемы этического и юридического характера в некоторых странах при получении и обработке аллоимплантатов от человека, а также широкая доступность тканей животных стимулировали использование ксенокости как альтернативы ауто- и аллокости, поскольку потребность в костно-пластическом материале стремительно увеличивается [27]. Первым исследованиям препятствовала высокая иммуногенность тканей животных. Однако новые методы обработки ксенокости, например частичная депротеинизация, выделение составляющих со сниженной антигенностью и механическими свойствами подобными человеческой кости, расширили возможности ее использования. Иммуногенность ксенокости может быть снижена разнообразными процедурами подготовки, включая замораживание,

лиофилизацию, гамма-излучение и обработку химическими средствами. Полученные трансплантаты, хотя низкоиммуногенны, имеют минимальный остеогенный потенциал или совсем его не имеют. Они действуют в основном как микропористый остов или каркас, на основе которого хорошо формируется новая кость путем аппозиционного роста.

Ксеногенные имплантаты представляют собой ткани, взятые от различных животных, в частности особый интерес представляют два источника – природный коралл и бычья кость. Преимущественно на их основе изготавливают различные ксеноимплантаты для клинического использования как в травматологии и ортопедии, так и в стоматологии и костной онкологии.

Значительную роль в ортопедии и травматологии играют металлы. Одним из подходов к терапии переломов костей является фиксация костных отломков (спицы, пластинки, винты, проволока), а также изготовления эндопротезов суставов и костей, материалом для подобных конструкций служили железо, медь, алюминий, серебро, золото, платина, никель различные сплавы [14, 2]. Новые перспективы в импланталогии открылись благодаря разработке и внедрению в клиническую практику конструкций из высокочистого титана, обладающего ценными физико-химическими и физико-механическими характеристиками — биологической инертностью, коррозионной устойчивостью, отсутствием токсичности, высокой механической прочностью, пластичностью и малым удельным весом [58]. Однако применение металлических конструкций сопряжено с рядом осложнений (металлозы, аутоиммунные реакции, асептическое воспаление, выделение из металлической конструкции токсических лигирующих компонентов).

Наиболее удачными считались сплавы на основе кобальта, никеля, хрома, молибдена, но и они со временем разрушаются в биологических системах. Кроме того, эти металлы недостаточно пластичны, сложны в обработке и очень дороги. Один из этапов в развитии применения металлоконструкций для замещения костных дефектов — нанесение на поверхность металлов слоя гидроксиапатита с целью улучшить скрепление

поверхности имплантата с окружающими тканями организма за счет врастания их в гидроксипатитный слой [131]. Наряду с использованием гидроксипатита наносятся дополнительные слои органических соединений, усиливающих регенераторно-репаративные процессы. К таким соединениям относятся коллаген и факторы роста.

Перспективными соединениями для реконструктивной хирургии костной ткани является коллаген, который составляет до 90% органического вещества кости. Коллаген – это фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани организма и обеспечивающий ее прочность и эластичность. В костной ткани представлен только коллаген типа I, который имеет меньше поперечных связей, чем в других видах соединительной ткани. В качестве материала для костной пластики используют как нативный коллаген, так и денатурированный, в виде желатина. Очевидными достоинствами коллагена как природного полимера для костной пластики являются: отсутствие иммунной, аллергической, воспалительной реакции на имплантацию [53, 100]. К главным недостаткам коллагена следует отнести скорость его биорезорбции т.к. она значительно выше, чем восстановления костной ткани, хотя это устраняется введением сшивок между полипептидными цепями, а также плохие механические свойства. Однако коллаген не подходит для восстановления больших костных дефектов, как самостоятельный материал, и в настоящее время разработан ряд коммерческих биокomпозитных материалов на основе коллагена и гидроксипатита (фирмы «Collagen Corp.», «Palo Alto», США) преимущественно только для стоматологии.

Природные материалы на основе хитина и хитозана распространены в костной пластике благодаря биосовместимости, биорезорбируемости, высокой сорбционной емкости и умеренным антибактериальным свойствам. Хитин – природное соединение, полимер, построенный из остатков N-ацетил-β-D-глюкозамина связанных между собой (1 → 4) гликозидными связями. Его получают извлечением из панцирей морских ракообразных, насекомых и губок. Хитозан – линейный полисахарид, производный хитина, который получают в

результате ферментативного N-деацетилирования. Основными преимуществами хитина и хитозана является легкость переработки в разные типы клеточных носителей, такие как гранулы, гели, микрочастицы, наночастицы, нановолокна, и др; пористая структура с взаимосвязанными порами, способность стимулировать остеогенез [46].

Однако, получение хитозана это трудоемкий и затратный процесс комплексного очищения от белковой и минеральной составляющей панциря членистоногих, при этом процесс не совершенен, требует улучшений. Еще одним недостатком является ограниченная растворимость в органических растворителях. Хитозан не обладает хорошими механическими свойствами, что ограничивает его использование как самостоятельного материала для клеточных носителей. Однако, химические модификации хитозана и применение его в качестве композитов с другими природными и синтетическими полимерами направлены на преодоления этого ограничения [87].

Биокерамика – большой класс неорганических неметаллических материалов. По химическому составу делится на две группы: фосфаты кальция и другие материалы, включающие в том числе циркониевую керамику, стабилизированную иттрием, и алюминиевую керамику, силикаты и фосфаты, относящиеся к стеклами кристаллическим стеклам (стеклокерамике). В настоящее время большинство биорезорбируемых керамических материалов получают на основе искусственных и натуральных кальций-фосфатов, таких как гидроксиапатит (ГАП) $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ и трикальцийфосфат (ТКФ) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Температура обжига таких материалов составляет 1200 - 1300 °С, их прочность при изгибе не превышает 30 МПа, прочность на сжатие – 1 - 2 МПа (для высокопористых структур). Биокерамика сочетает в себе как биологическую активность, так и достаточную механическую прочность. Биокерамические материалы используются для изготовления зубов, костей, суставов [135, 9].

Гидроксиапатит (ГАП) – полный химический и кристаллохимический

эквивалент минерального вещества кости млекопитающих. Это обуславливает его уникальные биологические свойства: абсолютную иммунную совместимость и способность стимулировать остеогенез (экспериментально доказано для некоторых изделий), срачиваться с костью - данное свойство послужило применению гидроксиапатита для улучшения изделий из металлов; служить строительным материалом для синтеза кости и входить в состав костной ткани, замещающей имплантат из гидроксиапатита. А также ГАП не изменяет кислотно-щелочной баланса в месте имплантации. Препараты синтетического гидроксиапатита для медицинского применения известны с конца 60-х гг., а исследования в области технологии и синтеза не прекращаются до настоящего времени [120].

Биокерамика, сделанная из непористого ГАП, — хороший пример биоактивного материала, в то время как пористая биокерамика, состоящая из двухфазных ортофосфатов кальция (т. е. композитов β -ТКФ + ГАП или α -ТКФ + ГАП) либо из гидроксиапатита с дефицитом кальция (ГАДК) или аморфного фосфата кальция (АФК), - пример биорассасывающихся материалов [50].

Стеклокерамика применяется в меньшей степени и классифицируется на биоактивное стекло (состоящее преимущественно из 24,5 % Na_2O , 24,5 % CaO , 45,0 % SiO_2 , 6 % P_2O_5) и биоактивную стеклокерамику. Изделия на основе биостекла и стеклокерамика при имплантации в кость не капсулируются, а находятся в непосредственном контакте с костной тканью. Биологическая активность этих материалов объясняется образованием апатитового слоя на поверхности биостекла в биологической среде. Способность регенерации костной ткани определяется составом биостекла, что продемонстрировано на крысах с дефектом свода черепа в исследовании [33]. На мировом рынке представлены следующие материалы на основе биостекла и биокерамики: «Biogran», «Perio Glas», «Vitoss», «Interpore-200», «Interpore-500», «Calcitite-2040», «Ostrix NR» (США), «Ceros-80» (Швейцария), «Ospro-vit 1,2» (Германия), «БАК-1000», «Гидроксиапол», «Биальгин» (Россия), «Bioapatite» (Франция) [4, 9]. К сожалению, ограничивающим фактором в использовании

биоактивных стекол является их низкая прочность, что не позволяет их использовать для создания крупных нагружаемых изделий. Недавние исследования показали, что данная проблема решается за счет оптимизации состава и условий переработки материала [52; 78]. Следующими ограничивающими факторами являются хрупкость, ударная вязкость.

Альгинат – это один из самых распространенных элементов, который выделяют в основном из красных и бурых водорослей. Альгинат содержит блоки мономеров β -D-маннуриновой и α -L-гулуриновой кислот. В присутствии двухвалентных катионов, таких как Mg^{2+} , Ca^{2+} , Ba^{2+} и Sr^{2+} , альгинат подвергается ионотропному гелеобразованию. Многие исследователи сообщили о формировании костной ткани при имплантации матриц на основе альгината, в виде гидрогелей или микросфер, с ММСК [106; 55]. В целом материал показывает хорошую биосовместимость, пористость, оптимальную для клеточной миграции и доставки питательных веществ. Однако биодegradация альгината является довольно медленным и мало контролируемым процессом. В ряде исследований продемонстрировано, что данный материал можно использовать в качестве системы доставки факторов роста для индукции дифференцировки в остеобласты [51; 70].

В тканевой инженерии костной ткани также нашли применение бистабильные полимерные материалы: полистирол, политетрафторэтилен, полиоксиметилен, полиметилметакрилат, силиконы, поливинилхлориды, некоторые полиуретаны и полиамиды

Полиметилметакрилат – прозрачный термопластик его плотность около $1,17-1,30 \text{ г/см}^3$, имеет хорошую ударную прочность выше, чем стекла и полистирола, растворяется во многих органических растворителях, его биостабильность превосходит большинство других пластмасс, таких как полистирол и полиэтилен. Также полиметилметакрилат имеет хорошую совместимость с тканями человека. В ортопедической хирургии, данный полимер используется в качестве костного цемента для прикрепления имплантатов и реконструкции утраченной кости. Недостатком данного

костного цемента является то, что происходит нагрев до 82,5°C и при установке, это может вызвать тепловой некроз смежных тканей [76; 72].

Полимерный материал политетрафторэтилен (ПТФЭ) обладает потенциалом в области биомедицины благодаря высокой гибкости и упругости, химической инертности, высокой термической стабильностью, низкой теплопроводностью, а также био- и гемосовместимостью. Следует отметить такие недостатки ПТФЭ в качестве имплантационного материала, как его низкие гидрофильные свойства, низкую адгезию клеток организма и полное отсутствие способности устанавливать связь с клетками костной ткани и обеспечивать остеоинтеграцию без образования соединительнотканной прослойки [3]. Однако в литературе встречаются работы, в которых данные недостатки решены с помощью модификации конструкций из ПТФЭ путем нанесения на них покрытия из различных материалов [5].

В настоящее время важная роль в инженерии костной ткани отведена полимерным материалам, способным к биодegradации – природным полиэфирам молочной, гликолевой и других кислот.

Одними из первых стали использовать биодegradируемые синтетические биоматериалы на основе полимеров монокарбоновых кислот – молочной (полилактиды) и гликолевой (полигликолиды), а также и продукты их сополимеризации [4].

Полилактид – биодegradируемый, термопластичный, алифатический полиэфир, который может быть получен ферментативным брожением сахаров или химическим синтезом. Лактид обладает оптической активностью и может существовать в виде стереоизомеров L-лактида, D-лактида и рацемических форм LD-лактида. L-лактид применяют в тех случаях, когда требуется высокая механическая прочность и ударная вязкость, например как материал для различных ортопедических изделий [89]. Следует отметить и недостатки данного полимера, что продукт его распада (молочная кислота) вызывает локальное закисление. При применении данного материала не исключены местные воспалительные и остеолитические реакции. Также этот материал

показывает недостаточную прочность при сжатии [81]. Полилактид применяется для реконструкции костей без клеток [69], и в качестве тканноинженерных конструкций с клетками, например, показана способность стволовых клеток, образовывать костную ткань на матриксе из данного материала [32; 38].

Полигликолид – это простой линейный алифатический полиэфир гликолевой кислоты. От полилактида он отличается более высокой степенью кристалличности из-за отсутствия в структуре боковых метильных групп и низкой скоростью деградации.

В регенерации костных тканей обычно используют сополимер полилактида и полигликолида – полилактогликолид. Данный сополимер является довольно привлекательным материалом для тканевой инженерии кости по причине хорошей биосовместимости, возможности регулирования скорости биodeградации [57]. В ряде исследований было показано возможность применения конструкций из сополимера полилактида/полигликолида в лицевой хирургии: в качестве фиксаторов переломов нижней челюсти [49] и пластин для орбитальных переломов [108].

В последнее время внимание исследователей стали привлекать биополимеры гидроксипроизводных алкановых кислот (полигидроксиалканоаты), полученные в условиях биотехнологического биосинтеза. Скорость биорезорбции данных полимеров *in vivo* существенно ниже, чем у известных биоразрушаемых биоматериалов (полилактида, полигликолида), а прочностные характеристики выше, и имеется принципиальная возможность использования этих полиэфиров для длительно текущей регенерации крупных и сложных костных дефектов и повреждений [4].

За последние годы, полигидроксиалканоаты используются для разработки многочисленных конструкций в различных областях медицины, включая шовный материал, шовные крепежные детали, костные пластины и их системы, хирургические сетки, заплатки, стропы, ортопедические штифты,

стенты, управляемые устройства регенерации тканей, клапаны вен, связки и сухожильные трансплантаты, заменители костные дюбеля, перевязочный и кровоостанавливающий материал и др. [40].

Многочисленные исследования показали, что материал на основе полигидроксиалканоатов способствует новообразованию костной ткани, а также деградирует со скоростью адекватно приближенной к росту новой ткани, постепенно замещается ею, обеспечивая нормальное протекание репаративного остеогенеза [20; 41].

1.2. Клеточные технологии в костной пластике

В 1960 г. советский ученый Александр Фриденштейн, обнаружил популяцию клеток в костном мозге среди обычных кроветворных стволовых клеток небольшое количество еще более пластичных. В опытах Фриденштейна и его сотрудников эти клетки, которые в последующем были названы мультипотентными мезенхимными стромальными клетками (ММСК), превращались в хрящевую, костную, жировую ткань. Такие клетки были обнаружены в небольших количествах в нескольких тканях по всему телу [35]. ММСК характеризуются наличием иммуносупрессивных свойств, способностью к продукции цитокинов с противовоспалительным и антиапоптотическим действием и хемокинов участвующих в поддержании гемопоэза и факторов роста, дифференцировке в различные тканеспецифические типы клеток, в частности остеобластическом направлении. Из-за способности к дифференцировке данные клетки нашли широкое применение в клеточных технологиях для терапии пациентов с костными дефектами, что может быть реализовано как локальным введением суспензий клеток, так и применением их в комбинации с носителями, что более эффективно. Используя современные знания о способности ММСК получены многообещающие результаты в направлении инженерии тканей для замены хряща, костной, костно-хрящевой и других тканей опорно-двигательного

аппарата с помощью данного типа клеток.

ММСК полученные из различных типов тканей также имеют разный потенциал дифференциации. Так исследование Sakaguchi с соавторами, по сравнению свойств ММСК выделенных из костного мозга, синовиальной оболочки, надкостницы, скелетных мышц и жировой ткани, продемонстрировало существенные различия в потенциалах дифференциации клеток. Высоким потенциалом дифференциацией в осеогенном направлении обладают производные костного мозга, синовиальной оболочки и надкостницы. Однако ММСК из синовиальной оболочки проявляли самый высокий потенциал в хондрогенном направлении [107].

ММСК экспрессируют классические маркеры CD105, CD90, и CD73 [90], при этом отсутствует экспрессия CD34, CD45, CD14 или CD11b, CD79a или CD19 и молекул МНС-II, главным образом, HLA-DR [117]. Также для ММСК выделенных из различных источников есть дополнительные иммунофенотипические маркеры например, CD29, CD44, CD146, CD166, CD271 и т.д., которые могут использоваться для характеристики этих популяций [65; 98].

Потенциал дифференциации ММСК можно изменить, применяя различные факторы. Добавление в культуральную среду дексаметазона, - глицерофосфата, аскорбиновой кислоты и 1,25-дигидроксивитамина D3 способствует дифференциации клеток в остеобластическом направлении [56]. Установлено, что гидрокортизон воздействует на ММСК, увеличивая экспрессию маркеров жировой и снижая уровень экспрессии маркеров костной дифференцировки, одновременно частично ингибируя их способности к пролиферации [16]. Типичными маркерами дифференциации в остеобласты являются активная экспрессия щелочной фосфатазы (ЩФ) на начальных этапах, а также кальцификация внеклеточного матрикса на более зрелых этапах культивирования. Имеются данные, что активность ЩФ и минерализацию можно повысить *in vitro*, используя следующие факторы роста: инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1), эпидермальный фактор роста (EGF)

и фактор роста эндотелия сосудов (VEGF). В тоже время тромбоцитарный фактор роста (PDGF), оказывает меньший индуктивный эффект на остеогенез ММСК [122]. Кроме того, остеогенез *in vitro* также можно стимулировать различными физическими факторами, включая механические, например, импульсными электромагнитными полями (PEMF) и гидростатическим давлением [132; 59].

Клеткам «преемникам» ММСК присуща некоторая пластичность. Например, хондроциты могут стать остеоцитами, и адипоциты можно преобразовать в остеобласты, так как все эти клетки уже зрелые преобразование между клетками, отражает пластичность самих ММСК. В своем исследовании Song L. и Tuan R.S. показали, что такие трансформации возможны в ответ на индуктивные внеклеточные сигналы [115; 123].

Предпочтительными источниками ММСК являются костный мозг (КМ) и жировая ткань (ЖТ). В челюстно-лицевой хирургии для восстановления костной ткани чаще других типов клеток используют ММСК-КМ. Регенеративный потенциал ММСК-КМ был продемонстрирован как в экспериментальных исследованиях, так и в клинических испытаниях. Важной особенностью ММСК является иммуносупрессивное воздействие на Т- и В-клетки и натуральные клетки-киллеры, которые могут быть полезными при лечении патологий мезенхимальной ткани, а также для подавления возможной воспалительной реакции на компоненты тканеинженерного продукта [117].

Однако выделение ММСК из костного мозга имеет свои недостатки данная процедура представляет собой инвазивную болезненную операцию, которая ведет к образованию нового дефекта в донорском участке при этом сохраняется риск заражения инфекционными агентами [7]. Также, некоторые исследования отмечают, что ММСК из костного мозга имеют более низкий пролиферативный потенциал и более высокий коэффициент старения, чем ММСК жировой ткани, более того данный тип клеток не имеет генетическую и морфологическую стабильность в долгосрочной культуре.

По данным Strem В.М. жировая ткань наиболее интересна т.к. процедура

получения клеток из данного источника менее болезненна для пациента и количество клеток в липоаспирате выше в 5-50 раз., чем в КМ [116]. Проведенное исследование по сравнению человеческих ММСК, полученных из различных источников (КМ, ЖТ и пуповинной крови) показало, что из жировой ткани и костного мозга можно выделить 100% ММСК тогда как из пуповинной крови около 63%. Однако, ММСК выделенные из пуповинной крови способны к длительному культивированию, а также обладают самым высоким потенциалом пролиферации но данный тип клеток не показал способности дифференциации в адипогенном направлении, в тоже время ММСК костного мозга показали самый низкий потенциал пролиферации и низкий период культивирования. ММСК-ЖТ имеют низкий коэффициент старения [67].

Применение ММСК в терапии костных дефектов началось с исследования, в котором ученые показали, что культивированные ММСК формируют костную ткань и хрящ в облученных мышцах [96], это привело к дальнейшему исследованию по терапии несовершенного остеогенеза с помощью аллогенных ММСК [62].

Получены данные, что ММСК из жировой ткани и костного мозга позитивно влияют на функциональное восстановление разных дефектов, например неврологических, костных и аутоиммунных [16].

Успешное лечение больших костных дефектов, например утраты костной массы, около 4 см. приведено в работе Marcacci et al., в которой данный дефект устранялся имплантацией объемного матрикса с культурой клеток ММСК-КМ. В результате долгосрочное наблюдение (6-7 лет) показало постепенную интеграцию имплантата с костью хозяина, прогрессивное формирование новой костной ткани, а также вращание сосудов в область имплантата [83].

Исследование, основанное на введение ММСК-ЖТ мышам с артритом на разных стадиях болезни, показало парадоксальные эффекты. Введение клеток на начальной стадии болезни существенно подавляло артрит, в тоже время как введение на более поздних этапах не выявило улучшений, а гистопатологические показатели усугублялись [68]. Данные результаты

свидетельствуют, что одни и те же клетки действуют по-разному в зависимости от прогресса болезни, и требуется дальнейшее изучение использования ММСК как самостоятельного метода лечения болезней для безопасного и эффективного использования данного типа клеток.

В мировой литературе распространено использование аутологических ММСК для костной пластики. Например, в работе Sunay O. et al. использовали аутологические ММСК-ЖТ и ММСК-ЖТ подверженные дифференцировки в остеобласты для заживления дефекта в большеберцовой кости кроликов [119]. Также продемонстрировано лечение дефектов бедренной кости критического размера с помощью ММСК полученных из жировой ткани на животной модели [110]. Не смотря на наличие в мировой литературе данных, что применение аутологический ММСК ограничено состоянием донора: наличие болезней и возраст, ухудшают пролиферативную способность, потенциал дифференциации и число изолируемых ММСК [93; 105]. Также встречаются исследования, в которых приводятся доказательства опровергающие данные утверждения [109; 44].

Также остается открытым вопрос о безопасности ММСК. Интересно, что многие исследования демонстрируют противоречивые результаты. Некоторыми исследователями приходят к выводу, что ММСК способствуют росту опухоли, например, совместное введение ММСК-КМ с опухолевыми клетками увеличивают *in vivo* рост рака толстой кишки, лимфомы [29] и меланомы клеток [48], а совместное введение ММСК-ЖТ вызывает прогрессирование рака молочной железы [91], легких и глиомы [134]. В тоже время как другие сообщают, что ММСК подавляют рост опухоли, при совместном введении ММСК и опухолевых клеток зарегистрировано уменьшение размера опухоли и снижение метастазов неходжкинской лимфомы [111] гепатомы [80], рака поджелудочной железы [43] и миелолейкоза [138].

В уже описанных исследованиях по применению ММСК на клеточных носителях для терапии костных дефектов отмечается необходимость поиска оптимального носителя, как эквивалента костной ткани, в виду несовершенства

уже изученных и применяемых в настоящее время [83].

1.3. Способы получения клеточных носителей (scaffolds)

Тканевая инженерия костной ткани находится на передовых позициях, уступая лишь онкогематологии. Под тканевой инженерией в настоящее время понимают раздел биотехнологии, подразумевающий трансплантацию культивированных клеток на биосовместимом носителе (матриксе) с целью восстановления поврежденной ткани, органа или создания их *de novo*. Матрикс представляет собой синтетический или биологический комплекс для обеспечения механической прочности 3D конструкции с заданными параметрами, нанесенной на него клеточной культурой [4].

Выбор оптимального носителя для культуры клеток остеобластического ряда является одним из ключевых этапов создания тканеинженерного эквивалента костной ткани. При создании нового клеточного носителя, следует учитывать, то что:

1) Матрикс должен иметь структуру, аналогичную строению кости, чтобы стимулировать новый рост ткани в трех заданных направлениях.

2) Клеточный носитель должен иметь поры, которые соединены в пространстве друг с другом по всему матриксу. Взаимосвязь пор необходима для того, чтобы обеспечить клеткам способность мигрировать по матриксу и способствовать росту ткани на протяжении всего матрикса. В условиях культуры клеток *in vitro* и роста ткани поры должны обеспечивать доставку питательных компонентов среды ко всем клеткам, а после имплантации стимулировать рост кровеносных сосудов (ангиогенез) внутри сети пор. При этом размер пор не должен быть меньше, чем размер клеток в суспензии [129]. Так, оптимальный диаметр пор для ангиогенеза около 5 мкм [36] и для остеогенеза 200 – 350 мкм [127].

3) Для создания оптимального матрикса, помимо структуры, аналогичной строению кости и пористости, следует обеспечить поверхностные свойства.

Функционирующие клетки прикрепляются к матриксу, чтобы далее формировать свой внеклеточный матрикс.

4) Матрикс должен постепенно разрушаться. Продукты распада материала матрикса должны представлять собой нетоксичные элементы, которые выводятся из организма или включаются в естественные метаболические пути. Скорость распада матрикса должна быть контролируемой и соответствовать скорости образования новой ткани в месте дефекта [31].

5) Материал матрикса, как и сам матрикс должны стимулировать клетки к саморегенерации. В материал матрикса можно включать биологически активные соединения, факторы роста клеток, лекарственные препараты, которые генерируют химические сигналы, активирующие регенерацию клеток [37].

6) Физико-механические свойства матрикса должны соответствовать параметрам ткани организма-хозяина. Структура и прочность рассасывающихся матриксов должны также сохраняться до тех пор, пока не будет регенерировано достаточно новой ткани.

7) Возможность стерилизации матрикса без изменения его.

Требования, предъявляемые к исходным материалам, из которых могут быть изготовлены матриксы, достаточно стандартны: это должен быть нетоксичный биodeградируемый материал, который обладал бы способностью к остеокондукции, остеоиндукции, остеопротекции, а заселение его клетками наделяло бы его и свойством остеогенности [6].

Показано, что для реализации остеогенного потенциала культивированные клетки должны быть фиксированы определенное время к носителю, это может быть связано с цитогенетическим свойством данных клеток проявлять свои остеогенные свойства, будучи организованными в сложные трехмерные структуры. Механизм индукции дифференцировки остеогенном направлении в этом случае реализуется через усиление экспрессии остеобласт-специфичных белков, представляя, таким образом, классический

вариант механо-трансдукции при дифференцировке клеток остеогенной линии, воспроизведенный в культуре [6; 104].

Важным шагом является принятие решения об использовании того или иного метода получения клеточных носителей с заданными свойствами. В настоящее время существует множество технологий, позволяющих получать матрицы нужной формы, размера и свойств.

Один из простых и универсальных матриксов это пленка, плоская поверхность которой представляется приемлемым носителем для культивирования клеток *in vitro*. Получают данный тип матрикса литьем из раствора. Материалом для матрикса служат различные полимеры. В данном способе, полимер растворяют в подходящем растворителе для получения вязкого раствора, который затем выливают на ровную обезжиренную поверхность. Чтобы упростить данную процедуру, растворитель должен обладать оптимальной летучестью и испаряется с адекватной скоростью при комнатной температуре. При этом, растворитель не должен быстро испаряться; в противном случае, это приводит к формированию пузырьков или образованию полукристаллического осадка. Быстрое улетучивание также вызывает охлаждение пленки, которые затем приводит к образованию трещин или конденсации воды из атмосферы. Для получения хороших пленок, как правило, используют растворители, которые имеют температуру кипения от 60 до 100°C [71].

Для получения более объемных матриксов используют процесс прессование. Измельченный материал в виде порошка при определенном давлении прессуют в пресс-форме, которая определяет форму будущего изделия. По своей структуре готовый матрикс очень плотный, при этом плотность матрикса определяют: применяемое давление, время прессования, а также размер частиц порошка и наличия воздуха между частицами. Для получения пористой структуры используют различные порообразователи (водорастворимые соли, кристаллы сахара и т.д.). Также наряду с прямым прессованием применяют и горячее прессование, при данном способе

используются достаточно высокие температуры [25].

На данный момент существуют три метода получения пористых матриц на основе нановолокон: разделения фаз, самосборка (self-assembly) и электроспиннинг [61; 77].

Наиболее универсальным методом из выше перечисленных является электроспиннинг. При данном методе формирование матриц происходит под действием электро-статических сил, которые вытягивают непрерывные волокна нужного диаметра из жидкости или расплава [30]. Использование метода позволяет управлять толщиной волокон и их ориентацией, а также геометрией пор. Однако, механическая прочность таких матриц не высока, а размер пор ограничивается диаметром волокон [75].

Суть метода разделения фаз заключается, что при соблюдении определенных температурных условий можно получить две диффузно распределенные по отношению друг к другу фракции (полимеробедной и полимербогатой). На заключительном этапе происходит процесс удаления растворителя, после удаления, которого раствор полимера приобретает пористую структуру. Процесс удаления растворителя может быть выполнен с помощью сублимационной сушки или сублимационной экстракции [74; 60].

Недостатками данного метода являются мало контролируемый диаметр получаемых волокон, не возможность ориентировать волокна в пространстве, затратный по времени метод и полученные матрицы обладают плохими механическими свойствами. Однако у метода разделение фаз есть и преимущества: его использования позволяет контролировать форму и размер пор, а также его легко комбинировать с другими методами.

В последние два десятилетия, метод сублимационной сушки широко исследован для изготовления трехмерных пористых матриц для тканевой инженерии. Принцип метода лиофилизации (сублимационная сушка) основан на извлечении в вакууме и определенном давлении жидкости (растворителя) из предварительно замороженного при низкой температуре (около -80°C) полимерного раствора [118]. Преимуществами данного метода служит

возможность регулирования размера пор изменением скорости замораживания раствора полимера и рН, а также отсутствие высоких температур и отдельной стадии выщелачивания. Длительное время обработки и относительно малый размер пор ограничивают использование метода лиофилизации [7].

Самый простой метод получения пористых матриц основан на использовании порообразователей с последующим их вымыванием. Чаще всего порообразующими элементами служат водорастворимые соли, кристаллы сахара, а также воск или парафин в виде шариков. В данном методе можно контролировать размер пор с помощью размера порообразующих частиц [99] и пористость матрикса соотношением полимер/порообразователь, однако форма пор, также как и связь пор между собой не поддается контролю [79].

Метод газового вспенивания может быть использован для изготовления высокопористых полимерных матриц без применения органических растворителей и высоких температур. В таком подходе, диоксид углерода (CO₂), как правило, используется в качестве образователя полимерной пены. Полимерный материал насыщается CO₂ под высоким давлением, затем создается рост пузырьков газа путем быстрого сброса CO₂ из полимерной системы [64]. С помощью данного метода можно получать полимерные губки с диаметром пор 100 мкм и пористость до 93%.. Недостатком этого метода является, что полученные полимерные губки не содержат на своей поверхности пор, а структура матрикса состоит из закрытых пор, и лишь около 10-30% пор сообщаются друг с другом [79].

Аддитивные технологии производства (АМ) появились еще в середине 1980-х годов, тем не менее, применение таких методов для создания биомедицинских изделий было достаточно медленным из-за строгих требований, связанных с воспроизводством и качеством деталей, в особенности когда новые технологии находятся в зачаточном состоянии. Однако использование аддитивных технологий производства в инженерии костной ткани растет в последние годы. Для реконструкции костной ткани существуют множество различных видов аддитивных технологий: 3D черчение (3D

Plotting/direct ink writing), лазерная стереолитография (SLA), селективное лазерное спекание (SLS), 3D-печать (3DP), моделировании методом наплавления (FDM) и некоторые другие. Аддитивные технологии позволяют конструировать точные копии сложных анатомических частей человеческой ткани благодаря использованию системы автоматизированного проектирования (CAD), снимков компьютерной томографии (КТ) и магнитно-резонансной томографии (МРТ) данных сканирования, а также как системы оцифровки 3D [121; 92].

Стереолитография стала ценным инструментом для создания биосовместимых матриц для тканевой инженерии из-за своей способности точно повторить геометрию человеческой ткани (определенный размер пор, пористость, распределение пор, взаимосвязь пор и др. микроструктуры). Метод лазерной стереолитографии в основном состоит из процесса фотополимеризации. Процесс формирования объемной структуры происходит послойно, первый слой конструкции прикреплен к подвижной платформе, которая после каждого цикла полимеризации перемещается на высоту одного слоя для дальнейшей обработки [113]. В качестве материалов, подходящих для лазерной стереолитографии, могут быть использованы только некоторые полимеры, способные затвердевать под воздействием УФ-лазера, что делает данный процесс очень дорогим [34].

Метод селективного лазерного спекания, как и предыдущий метод используется для изготовления сложных анатомических структур, точно повторяющих ткань, но основан на послойном спекании полимерного порошка с помощью концентрированного пучка инфракрасного излучения. Для селективного лазерного спекания используют термопластичные материалы [86].

Технология 3D-печати заключается в послойном нанесении на порошок тонкой струи связующего вещества с помощью печатающей головки. Затем на готовый участок наносится новый пласт полимера и процесс повторяется пока необходимый 3D-объект не будет готов. Связующее вещество действует как

клея, скрепляя между собой частицы порошка, в таком качестве могут выступать как органические (хлороформ), так и неорганические вещества (нитрат алюминия, серебро). Объекты, полученные методом 3D-печати, требуют постобработки, что может служить в некоторых случаях недостатком. Данный метод ограничен размерами струи, делает его трудно применимым для изготовления матриц с тонкими микроструктурами.

1.4. Перспективы полигидроксиалканоатов в качестве клеточных носителей для восстановления костной ткани

Полигидроксиалканоаты (ПГА) это семейство не цитотоксических, биоразлагаемых микробных полиэфигов, включающее полимеры - и γ -гидроксимасляной кислот и сополимеры -гидроксимасляной кислоты с другими монокарбоновыми кислотами (валериановой, гексановой).

Полигидроксиалканоаты по физико-химическим свойствам сходны с широко применяемыми и выпускаемыми в огромных количествах и не разрушающимися в природе синтетическими полимерами (полипропиленом, полиэтиленом). Помимо термопластичности, полигидроксиалканоаты обладают оптической активностью, антиоксидантными свойствами, пьезоэлектрическим эффектом и, что самое главное, они биоразрушаемы и биосовместимы. Полигидроксиалканоаты различаются между собой по структуре и свойствам в зависимости от таксономического положения и физиолого-биохимических свойств микроорганизмов-продуцентов, условий биосинтеза и типа углеродного субстрата. Более того, возможности получения на основе ПГА композитов с различными природными и синтетическими материалами, позволяющие направленно изменять их структуру, состав и, следовательно, базовые свойства материала – пластичность, механическую прочность, температурные и другие характеристики, еще более усиливает привлекательность ПГА и расширяет возможные сферы применения. ПГА представляют все больший интерес в области биомедицины, из-за их

способности к биологическому разложению, и способности поддерживать клеточную адгезию и пролиферацию как *in vitro* и *in vivo*, и, не имея, риска канцерогенеза. [95] доказано, что пролиферация крысиных остеобластов, которые выращивали на матриксах из ПГА разного химического состава, не приводит к индукции раковых клеток.

Для производства ПГА используют микробную ферментацию, начиная с 1980-х годов. В мире известно несколько десятков продуцентов ПГА, наиболее распространённые бактерии семейства *Pseudomonas*, *Ralstonia eutropha* (прежнее название *Alcaligenes eutrophus*, *Wautersia eutropha* или *Cupriavidus necator*) и рекомбинантная *E. Coli* [40; 101]. Полигидроксиалканоаты синтезируются прокариотами в виде включений в цитоплазме как резервные источники энергии и углерода при условиях несбалансированного роста с избыточным источником углерода и одновременным ограничением питательных веществ, таких как кислород, азот, сера, магний и фосфор. Источником углерода служат различные вещества, которые определяются из физиолого-биохимических свойств продуцентов, это могут быть простые соединения (углеводы, спирты кислоты и т.д.) или комплексные вещества такие как отходы сельского хозяйства.

В зависимости от количества атомов углерода в мономерном составе, ПГА подразделяются на ПГА с короткой длиной цепи (*scl*-PHAs) содержащие 3-5 атомов углерода, например поли-3-гидроксибутират (ПЗГБ); ПГА со средней длиной цепи (*mc*l-PHAs), которые содержат 6-14 атомов углерода, например, поли-3-гидроксигексаноат (ПЗГГ); и длинноцепочечные ПГА (*lc*l-PHAs) содержат свыше 14 атомов углерода, например 3-гидроксигексадеканоеат [112]. Зарегистрировано более 150 видов мономеров ПГА.

Среди семейства ПГА, большинство исследований сосредоточено вокруг гомополимера поли-3-гидроксибутирата (ПЗГБ) и сополимеров поли-3-гидроксибутират и поли-3-гидроксивалерат (ПЗГБ/ПЗГВ), поли-3-гидроксибутирата и поли-3-гидроксигексаноата (ПЗГБ/ПЗГГ), поли-3-гидроксибутирата и поли-4-гидроксибутирата (ПЗГБ/П4ГБ), а также тройным

сополимером поли-3-гидроксипропаноата, поли-3-гидроксипропаноата и поли-3-гидроксигексаноата (ПЗГБ/ПЗГВ/ПЗГГ).

В последние годы область применения ПЗГБ стала разнообразной: от медицинских имплантатов, мембран, пластин, клеточных носителей для тканевой инженерии к активному развитию новых систем доставки лекарственных препаратов.

Доказано, что ПЗГБ обладает выраженными остеобластическими свойствами, медленно разрушается адекватно росту новой костной ткани *in vivo*, постепенно замещается ею [22]. В своей работе [103] показали, что имплантат из ПЗГБ может выступать в качестве временной матрицы для пролиферации и дифференцировки клеток в остеогенном направлении. Иранские ученые отметили, что различия в поддержании пролиферации мышечных ММСК между матриксами на основе ПЗГБ полученными методами выщелачивания и электроспиннинга не наблюдалось [85]. В исследовании, проведенном на крысах с дефектами черепа, в которые имплантированы матрицы на основе ПЗГБ, показано, что через 8 недель после имплантации матриц у 50% животных наблюдается регенерация костной ткани, а через 12 недель образование костной ткани наблюдалось у всех животных [54].

Чтобы улучшить свойства матрикса, ПЗГБ используется также как композитный материал. Композиты на основе ПЗГБ и биоактивного стекла (45 wt% SiO₂, 24.5 wt% Na₂O, 24.5 wt% CaO, 6 wt% P₂O₅) способствуют пролиферации остеобластов MG-63 *in vitro* и васкуляризации при подкожной имплантации в течение 7 дней, включения биоактивного стекла снижает бактериальную активность [88]. При имплантации матрикса из ПЗГБ с покрытием коллагена I типа на более длительный срок (96 дней) в крыс (*the athymic mu/rn*) наблюдалось формирование костной ткани, и более выраженная минерализация ткани, однако с увеличением срока имплантации формирование кости уменьшалось [82]. В другой работе продемонстрирована полная интеграция композитного имплантата ПЗГБ с гидроксиапатитом, а также регенерация костного дефекта с отсутствием воспалительного

инфильтрата [102].

ПЗГБ используют не только в качестве композитного материала, но и как самостоятельный материал с различными модификациями. Обработывая NaOH мембраны на основе ПЗГБ, исследователи добились увеличения гидрофильности мембран и пролиферации остеобластов, а также ингибирование развития золотистого стафилококка [66].

В мировой литературе применение сополимера поли-3-гидроксипропаната и поли-3-гидроксивалерата как материала для клеточного носителя в основном направлено на включение его в качестве композитного составляющего. Так матрикс на основе ПЗГБ/ПЗГВ, хитозана и гидроксиапатита демонстрирует лучшую пролиферацию и большую минерализацию, чем матрикс на основе ПЗГБ/ПЗГВ [136]. Также как и матриксы полученные методом электроспиннинга на основе ПЗГБ и ПЗГБ/ПЗГВ с соотношением компонентов 50/50 [114]. В другом исследовании композитные матриксы на основе ПЗГБ/ПЗГВ, аспарагиновой кислоты и гидроксиапатита характеризуются повышенной пролиферацией остеобластов, а также остеоиндуктивностью и остеокондуктивностью, чем сополимер [137].

Сополимер поли-3-гидроксипропаната и поли-4-гидроксипропаната менее востребован в области реконструкции костных дефектов, в отличие от регенерации дефектов хряща [73] и сердечно сосудистой инженерии. ПЗГБ/П4ГБ имеет потенциал развития в качестве клинической альтернативы существующим методам лечения регенерации кардиомиоцитов у больных с инфарктом миокарда [94].

Поли-4-гидроксипропанат характеризуется очень хорошей переносимостью в *in vivo*, так как гидролиз П4ГБ дает 4ГБ, естественный человеческий метаболит, присутствующий в мозге, сердце, легких, печени, почек и мышц. Этот метаболит имеет период полураспада около 35 мин, и, таким образом, быстро выводится из организма (через цикл Кребса). При этом исследования показали, что П4ГБ деградирует быстрее чем полилактид и ПЗГБ, но медленнее чем полигликолид [84].

Сополимер поли-3-гидроксибутирата и поли-3-гидроксигексаноата также представляет интерес для тканевой инженерии. Так в исследовании показана деградация *in vitro* этого сополимера с содержанием гексаноата в разных концентрациях (0%, 5%, 12% 20%). Сополимер, содержащий 12% гексаноата, показал самую быструю деградацию *in vitro*. Уже через 50 дней, снижение веса составила 7%, и на протяжении всего эксперимента наблюдалась устойчивая потеря веса. В то время как снижение веса остальных образцов сополимера достигли лишь около 3% после 50 дней [28].

По физико-механическим свойствам пленочных матриц складывается следующая закономерность: с увеличением включения гексаноата в сополимер от 0 до 17%, уменьшается предел прочности с 43 до 20 МПа, а растяжение при разрыве наоборот увеличивается. Это характеризует ПЗГБ/ПЗГГ как мягкий и гибкий материал [42].

Матрицы на основе ПЗГБ/ПЗГГ показали отличную совместимость с разными типами клеток: ММСК-КМ [133], ММСК-ЖТ [130], остеобластами, клетками хряща [47] и фибробластами, при этом наилучшим для остеобластов был сополимер с включением гексаноата 12%, а для фибробластов сополимер с включением гексаноата 20% [124].

В последние годы в области инженерии костной ткани с использованием ПЗГБ/ПЗГГ были сделаны следующие достижения. В своем исследовании Jing X. с сотрудниками продемонстрировали для композитных пористых 3D матриц полученных методом разделения фаз с последующей сублимационной сушкой из ПЗГБ/ПЗГГ и гидроксиапатита наилучшую биосовместимость и остеокондуктивность, чем для пористых 3D матриц из ПЗГБ/ПЗГГ [128]. Однако Wang Y.W. с сотрудниками показал противоположные результаты, при этом композитные матрицы были получены методом выщелачивания [126]. Противоречивые результаты демонстрируют важность применения оптимального метода конструирования клеточных носителей.

В последнее время особое внимание уделяют другим представителям

этого семейства – сополимерам с включениям валерата и гексаноата. В работе [63] показано, что ПЗГБ/ПЗГВ/ЗГГ имеет более грубую поверхность, более гидрофобен чем полилактид и ПЗГБ/ЗГГ, а также положительное влияние на рост и адгезию клеток. Однако ученый Yang Wang в своей работе получил данные о том, что ПЗГБ/ПЗГВ/ЗГГ характеризуется более низкой адгезией, а клетки на его поверхности характеризуются более высокой скоростью апоптоза [125].

На сегодняшний день литература, которая имеется в мире по ПГА, в основном направлена на исследование процессов биосинтеза, изучения структуры, температурных характеристик и кристаллизации. Процессы конструирования изделий для костной пластики на основе ПГА описаны в меньшей степени. Для вопросов, связанных с физико-химическими и физико-механическими свойствами различных по составу и структуре ПГА, по способам изготовления из них специализированных изделий, требуются детальные и современные исследования. Кроме того, противоречивость демонстрируемых результатов исследований по цитотоксичности и способности ускорять регенерацию костных дефектов гомо- и гетерополимерами оставляют эти вопросы актуальными для изучения.

2 Материалы и методы исследования

2.1 Материалы исследования

В работе использовали образцы высокоочищенных ПГА различного химического состава, полученные в Биомедицинском центре: гомополимер поли-3-гидроксibuтират, и сополимеры поли-3-гидроксibuтирата и поли-3-гидроксивалерата (ПЗГБ/ ПЗГВ) с включением ПЗГВ 12,8 и 22,8%, поли-3-гидроксibuтирата и поли-3-гидроксигексаноата (ПЗГБ/ПЗГГ) с включением гексаноата 13,6%, поли-3-гидроксibuтирата и поли-4-гидроксibuтирата (ПЗГБ/П4ГБ) с включением 4ГБ 9,5 и 23,1%.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Конструирование матриксов

На основе высокоочищенных образцов ПГА были получены изделия разной формы: пленочные матриксы, 3D-пористые и прессованные таблетированные матриксы.

2.2.1.1 Конструирование пленочных матриксов

Пленочные матриксы были получены методом полива 2% раствора полимера в хлороформе (0,4г навески полимера/20мл растворителя) на обезжиренную поверхность чашек Петри. Высушивали пленки в беспылевом боксе-ламинаре (Labconco, США) при комнатной температуре в течение нескольких суток.

2.2.1.2 Конструирование пленочных матриксов

Пористые матриксы получали с использованием метода выщелачивания. Кусочки сахара (0,5 × 0,5 × 0,5см) пропитывали 3% раствором полимера в хлороформе, далее высушивали, при комнатной температуре. После испарения растворителя образцы промывали в дистиллированной воде до полного удаления сахарозы.

2.2.1.3 Конструирование прессованных таблетированных матриксов

Для получения прессованных матриксов образцы высокоочищенного ПГА измельчали на лабораторной мельнице. Методом холодного прямого прессования на лабораторном автоматизированном прессе Carver Auto Pellet

3887 («Carver», США) при условиях силы равной 8 000 F, получали таблетированные формы.

2.2.2 Исследование свойств поверхности

Свойства поверхности пленочных образцов рассчитывали с помощью прибора для измерения краевых углов DSA-25E (Krüss, Германия), с использованием программного обеспечения DSA-4 для Windows. Для изучения свойства поверхности на вырезанную из пленочных образцов полоску (1 × 4 см) поочередно наносили капли жидкости с разной полярностью (вода, дийодметан). Момент взаимодействия жидкости и поверхности фиксировали на видеокамеру, и далее обрабатывался в программном обеспечении. Для каждой поверхности проводили не менее 5 измерений; рассчитывали краевой угол смачивания воды/дийодметана IFT и rIFT, определяли среднее значение и стандартное отклонение.

Микроструктуру поверхности пленок исследовали растровый микроскоп HITACHI TM-3000 с системой микроанализа BRUKER XFlash 430 H (Япония).

Способность пленочных матриц к адсорбции белка – бычьего альбумина проводили по методу Лоури. Образцы культивировали в течение 3-х часов в растворе бычьего альбумина с концентрацией 50 мкг/мл при температуре 37°C. Остаточную концентрацию белка определяли в растворе. Раствор концентрировали в 10 раз: в 1мл аликвоты добавляли 10% трихлоруксусной кислоты, инкубировали в течение ночи в холодильнике, далее центрифугировали 15 мин при 4500 rpm. Дважды отмывали осадок 96% этанолом и растворяли в 100 мкл 1N NaOH.

Для характеристики шероховатости поверхности образцов вычисляли среднюю шероховатость (Ra) как среднее арифметическое абсолютных значений отклонений высоты от базовой линии профиля поверхности, используя профилограф модели 201.

2.2.3 Исследование физико-механических свойств

Физико-механические исследования на прочность и деформацию проводили с помощью универсальной электромеханической испытательной машине Инстрон 5565 (Великобритания). Измеряли модуль Юнга (МПа), предел прочности (МПа), нагрузку при разрушении (Н) и деформацию при разрушении (%).

2.2.4 Суммарная пористость и влагопоглощение

Образцы взвешивают с точностью до 0,001 г, переносят в коническую колбу емкостью 250 мл и заливают 100 мл дистиллированной воды. Содержимое тщательно перемешивается на магнитной мешалке для более интенсивного заполнения пор в течение 15 мин. На дно воронки Бюхнера укладывают бумажный фильтр и смачивают водой. После этого в системе создают разрежение 80 мм вод.ст. Испытуемый образец переносят в воронку Бюхнера и начинают отсасывание. Через 3 мин прекращают отсасывание и взвешивают образец.

Влагопоглощение образцов рассчитывают по следующей формуле

$$EWC = (W_s - W_d) / W_s * 100, \quad (1)$$

где W_s - вес образца после экспозиции в жидкости.

W_d - вес высушенного образца,

А суммарную пористость по формуле

$$V_{\Sigma} = (G_{B.M} - G_{C.M}) / G_{C.M} * \rho_B, \quad (2)$$

где $G_{C.M}$ – вес сухого матрикса, г;

$G_{B.M}$ – вес влажного матрикса, г;

ρ_B – плотность воды, г/см. Плотность воды принята равной 1 г/см

2.2.5 Исследование способности клеточных носителей поддерживать рост и дифференцировку ММСК костного мозга и жировой ткани в остеобласты

2.2.5.1 Выделение ММСК –КМ и –ЖТ и их дифференцировка в остеобласты

ММСК получали из бедренных костей и липосата крыс линии Wistar, выведенных передозировкой эфирным наркозом.

Костный мозг выделяли в стерильных условиях после удаления обоих эпифизов бедренной кости; из открытого костномозгового канала с помощью шприца со средой DMEM и 10% гепарина вымывали костный мозг и тщательно суспендировали, затем дважды центрифугировали, суспензию клеток переносили в чашку Петри с питательной средой (DMEM+20%FBS) и помещали в CO₂-инкубатор.

Выделение ММСК из липосата производили в асептических условиях. Извлеченную из области живота крыс жировую ткань измельчали на небольшие фрагменты, промывали от крови и инкубировали в 5мл 0,25% раствора коллагеназы I в течение 60 минут при 37⁰ C, непрерывно встряхивая. После надосадочную жидкость (жир и адипоциты) удаляли, а оставшиеся клетки промывали с помощью буфера (PBS+2%FBS+1мМЭДТА), полученную суспензию отфильтровывали через 70мкм Cell Strainer. Далее клетки осаждали центрифугированием при 400g (1200rpm) в течение 10 минут, удаляли супернатант, а осадок ресуспендировали в 1-2мл буфера. Суспензию клеток переносили в чашку Петри со средой (DMEM/F12+10%FBS+1%PS) и помещали в CO₂-инкубатор.

2.2.5.2 Посев клеток

Для культивирования клеток пленки нарезали в виде дисков с использованием специальной формы диаметром 10 мм. Стерилизацию образцов проводили H₂O₂-плазмой в стерилизаторе Sterrad NX (Johnson&Johnson, США).

Адгезивные свойства матриксов разного химического состава и геометрии исследовали в культуре мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга и жировой ткани (ММСК-КМ, ММСК-ЖТ), полученных ранее описанным способом. Клетки, дифференцированные на остеогенной среде, после 2 пассажей рассеивали в 12-луночные планшеты в количестве: $1 \cdot 10^5$ Кл/мл на пленку (ММСК-КМ, ММСК-ЖТ), 3D матрикс (ММСК-ЖТ). Культивирование проводили по стандартной методике в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональную бычью сыворотку, раствор антибиотиков (стрептомицин 100 мкг/мл, пенициллин 100 ЕД/мл) в CO₂-инкубаторе при 5% CO₂ в атмосфере и 37°C, в течение 14 суток с заменой среды на каждый третий день.

2.2.5.3 МТТ-тест

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста на 3-и, 7-е и 14-е сутки. Для этого в лунку с каждым образцом полимера было добавлено по 50 мкл 5% раствора МТТ и 950 мкл полной питательной среды. Через 3,5 ч культивирования среду с растворов МТТ заменяли DMSO для растворения образовавшихся кристаллов МТТ-формаза. Через 30 мин супернатант был перенесен в 96-луночный планшет. Измерение оптической плотности проводилось при длине волны 540 нм на микропланшетном фотометре Bio-Rad 680 (Bio-Rad LABORATORIES Inc.). Количество живых, метаболически активных клеток оценивали по калибровочному графику

2.2.5.4 Апоптоз

В первые трое суток культивирования проводили тест на апоптоз

культивируемых клеток с использованием набора «Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit» (Sigma).

2.2.5.5 Подтверждение дифференцировки ММСК в остеобласты

Для подтверждения дифференцировки ММСК в остеобласты использовали следующие показатели: активность щелочной фосфатазы и окрашивание по von Kossa.

2.2.5.5.1 Щелочная фосфатаза

Активность щелочной фосфатазы культивируемых клеток регистрировали с использованием набора «Alkaline Phosphatase Detection Kit» (Sigma) на 3-и, 7-е и 14-е сутки. Измерение интенсивности флуоресценции на мультимодальном микропланшетном люминометре Mithras LB 940 (BERTHOLD TECHNOLOGIES, Германия) при λ_{exc} 360 нм и λ_{em} 440 нм. Активность ЩФ оценивали по заранее подготовленному калибровочному графику.

2.2.5.5.2 Окрашивание по von Kossa

Окрашивание по von Kossa проводили для определения отложения кальция по протоколу «Von Kossa Stain for calcium» с использованием реагентов Sigma на 3-и, 7-е и 14-е сутки. Описание метода:

Для этого культивируемые клетки на образцах промывали в стерильной воде. На матрикс добавляли 1% раствор нитрата серебра и оставляли на 30 минут под ультрафиолетовым светом, далее в дистиллированной воде. Непрореагировавшее серебро отмывали 3% раствором тиосульфата натрия в течение 3-5 минут. Снова промывали дистиллированной водой и для окрашивания добавляли реактив Nuclear Fast Red на 5 минут, далее промывали

этанолом. Образцы рассматривали под микроскопом. Отложения кальция окрашиваются в черный цвет, а ядра в красный.

2.2.5.5.3 Окрашивание ALIZARIN RED

Окрашивание ALIZARIN RED (Sigma) проводили для определения кальция в клетках. Фиксированные клетки инкубировали с ALIZARIN RED, pH которого равна 4,1-4,3, в течение нескольких минут (от 30 секунд до 5 минут). Далее удаляли реактив и промывали образцы дистиллированной водой. Образцы рассматривали под микроскопом. Отложения кальция окрашивались в красный цвет.

2.2.6 Микроструктура поверхности

Микроструктуру поверхности пленок исследовали после 14 суток культивирования на растровом микроскопе HITACHI TM-3000 с системой микроанализа BRUKER XFlash 430 H (Япония).

2.2.8 Статистическая обработка результатов

Статистическую обработку результатов проводили общепринятыми методами с использованием стандартного пакета программ Microsoft Excel. Результаты представлены как средние арифметические со стандартными отклонениями. Достоверность различий результатов между исследуемыми группами использовали критерий Стьюдента при уровне доверительной вероятности $p=0.05$.

3. Результаты

3.1 Характеристика полимерных матриц

Получена серия полимерных матриц в виде пленок размером $d=10$ мм на основе гомополимера поли-3-гидроксибутирата, а также сополимеров поли-3-гидроксибутирата и поли-3-гидроксиивалерата с включением ЗГВ 12,8 и 22,8%, поли-3-гидроксибутирата и поли-3-гидроксигексаноата с включением ЗГГ 13,6 %, поли-3-гидроксибутирата и поли-4-гидроксибутирата с включением 4ГБ 9,5 и 23,1% в виде пленок. Для сравнения получены матрицы разной геометрии на основе поли-3-гидроксибутирата в виде 3D-пористых и прессованных таблетированных форм.

[Результаты стр.41- стр.45 вырезаны]

3.3 Исследование способности клеточных носителей разной геометрии поддерживать рост и дифференцировку ММСК жировой ткани в остеобласты

Влияние геометрии клеточных носителей на поддержание роста и дифференцировку в клетки костной природы проверяли в культуре ММСК жировой ткани на остеогенной среде в течение 14 суток.

При исследовании влияния геометрии матриц на жизнеспособность и количество культивируемых ММСК-ЖТ дифференцированных в остеобласты по данным МТТ-теста наибольшее количество клеток зарегистрировано на пористых матрицах, полученных методом выщелачивания ($1,79 \cdot 10^5 / \text{см}^2$). На матрицах, полученных методом прессования зарегистрировано в 1,3 раза меньше жизнеспособных клеток ($1,37 \cdot 10^5 / \text{см}^2$).

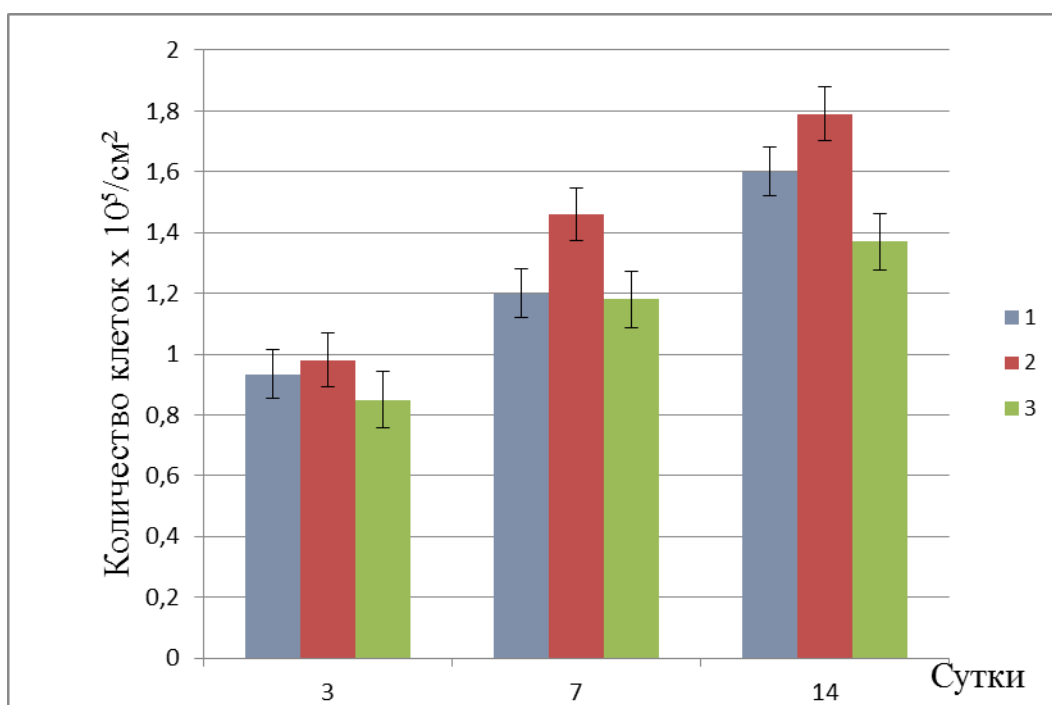


Рисунок 15 – МТТ-тест. Количество жизнеспособных клеток в зависимости от геометрии клеточных носителей на основе ПЗГБ:

1 - плёночные матриксы, 2 - пористые матриксы, 3 - прессованные матриксы

Для подтверждения дифференцировки ММСК жировой ткани, которые культивировали на клеточных носителях разной геометрии, использовали тест на активность щелочной фосфатазы и окрашивание Von Kossa. Между показателями активности щелочной фосфатазы дифференцированных ММСК-ЖТ на матриксах разной геометрии не зарегистрировано достоверных отличий, наблюдается общее увеличение к концу культивирования, но на таблетированных прессованных матриксах щелочная фосфатаза менее активна чем на пористых. Как можно видеть из рисунка 17, преципитаты кальция присутствуют в виде гранул на обоих типах матрикса, что также подтверждает дифференцировку ММСК-ЖТ в остеобласты.

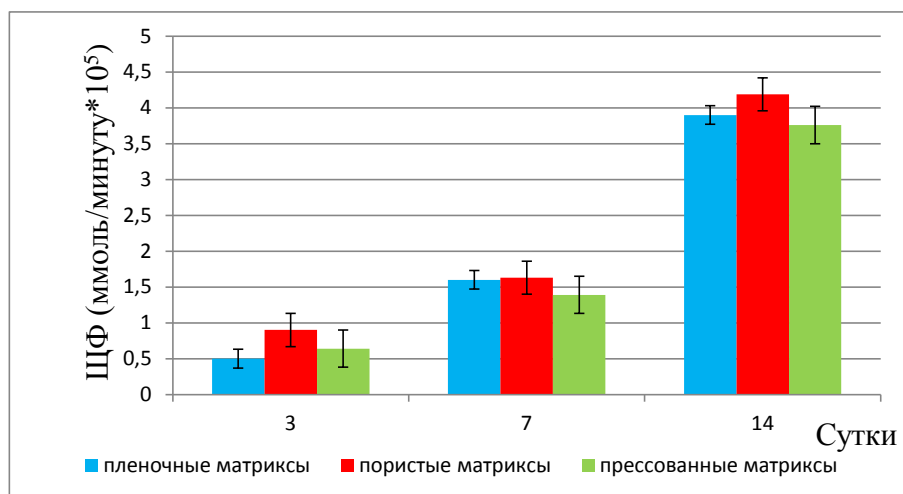


Рисунок 16 – Активность щелочной фосфатазы дифференцированных ММСК-ЖТ на матрицах разной геометрии

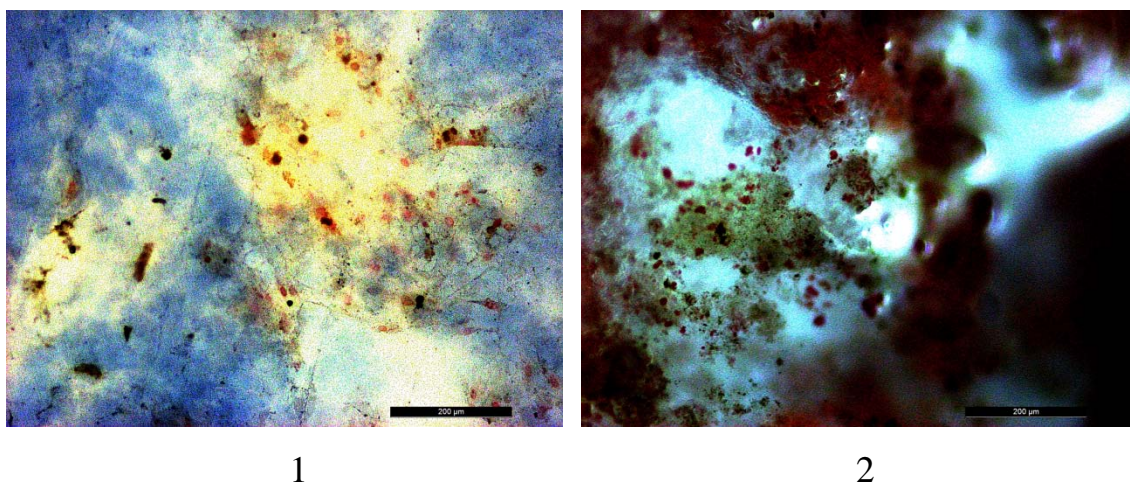


Рисунок 17 – Окрашивания по von Kossa 7-е сутки:
1 – прессованные матрицы, 2- пористые матрицы

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. На основе ПГА различного химического состава получена и исследована серия клеточных носителей разной геометрии в виде: гладких наливных пленок, пористых матриксов и таблетированных форм.

2. Доказано, что сконструированные клеточные носители в виде пленок в зависимости от химического состава обладают различной структурой поверхности и пористостью, шероховатостью от 0,54 до 0,95 мкм и краевым углом смачивания водой от 66,05° до 77,05°. Сконструированные пористые матриксы с развитой системой пор обладают суммарной пористостью равной 2,29 см³/г и влагопоглощением 70,87%

3. Установлено, что химический состав ПГА непосредственно, влияет на прочностные характеристики клеточных носителей, включение в состав матрикса 4ГБ делает его значительно мягче и при этом эластичнее (деформация при разрушении 11,17 %, Модуль Юнга 152,2 МПа), в то время как ПЗГБ жесткий и хрупкий (деформация при разрушении 2,17%, Модуль Юнга 2956,77 МПа).

4. Доказано что клеточные носители в виде пленок на основе ПЗГБ и ПЗГБ/П4ГБ 23,1%, лучше других поддерживают рост и дифференцировку ММСК жировой ткани и ММСК-КМ в остеобласты, что подтверждено данными МТТ-теста, РЭМ, окрашиваниями ALIZARIN RED и по Von Kossa, а также определением активности щелочной фосфатазы.

5. Установлено, что геометрия используемых клеточных носителей, а именно наличие пористой структуры и системы взаимосвязанных пор влияет на адгезию дифференцированных ММСК жировой ткани и ММСК-КМ в клетки остеобластического ряда. Для культивирования остеобластов подходят клеточные носители в виде пленок (размер пор до 30 мкм) и пористых блоков (размер пор 20 -200 мкм) на основе ПЗГБ и ПЗГБ/4ГБ 23,1%.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ГАП - гидроксиапатит ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$)

ДМК - деминерализованный костный матрикс

ЖТ - жировая ткань

КМ - костный мозг

ММСК-КМ - мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга.

МТТ - 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразол бромид.

ПЗГБ - поли-3-гидроксибутирата.

ПЗГБ/ЗГВ - сополимер поли-3-гидроксибутирата и поли-3-гидроксивалерата.

ПЗГБ/ЗГГ - сополимер поли-3-гидроксибутирата и поли-3-гидроксигексаноата

ПЗГБ/4ГБ - сополимер поли-3-гидроксибутирата и поли-4-гидроксибутирата.

ПЗГБ/ПЗГВ/ЗГГ - сополимер поли-3-гидроксибутирата, поли-3-гидроксивалерата и поли-3-гидроксигексаноата.

ПГА - полигидроксиалканоаты.

ПТФЭ - политетрафторэтилен

РЭМ – растровая электронная микроскопия

ТКФ - трикальцийфосфат ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

ЩФ – щелочная фосфатаза.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Бобринецкий, И. И. Перспективы использования углеродных нанотрубок в качестве каркасного материала в инженерии биологических тканей / И. И. Бобринецкий, Р. А. Морозов, А. С. Селезнёв, Р. Я. Подчерняева, О. А. Лопатина, // Гены и клетки. – 2011. – Т. 6. – №1. – С. 85–90.
2. Бохловитова, Е. Н. Применение металлов в хирургии / Е. Н. Бохловитова, В. Г. Шахметов //Медицинская промышленность в СССР. – 1966. – №. 6. – С. 7-11.
3. Винокур, А. А. Сравнительное исследование физико-механических свойств новых заплат из политетрафторэтилена / А. А. Винокур, В. Е. Дьяков, О. А. Алуханян //Кубанский научный медицинский вестник. – 2010. – №. 8.
4. Волова, Т.Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии [Электронный ресурс]: электрон. учеб. пособие / Т.Г. Волова, Е.И. Шишацкая, П.В. Миронов. – Красноярск: СФУ, 2009. – Электрон. дан. (6 Мб)
5. Григорьян, А. С. Новый тип тканеинженерной конструкции на основе политетрафторэтилена с наноструктурированным многофункциональным биосовместимым нерезорбируемым покрытием / А. С. Григорьян, Е. В. Киселёва, Д. В. Штанский, М. Р. Филонов, Т. К. Хамраев, А. К.Топоркова, Ш. Фаркашди //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 3. – С. 71-6.
6. Деев Р. В. Клеточные технологии в травматологии и ортопедии / Р.В. Деев, А.А. Исаев, А. Ю. Кочиш, Р. М. Тихилов //Травматология и ортопедия России. – 2007. – №. 46. – С. 18-30.
7. Загайнова Е. В. и др. Костные имплантаты на основе скаффолдов и клеточных систем в тканевой инженерии (обзор)/ Е. В. Загайнова, В. Н. Баграташвили, П. С. Тимашев, Д. С. Кузнецова //Современные технологии в медицине. – 2014. – Т. 6. – №. 4.
8. Иванов, С. Ю. Разработка биоматериалов для остеопластики на основе коллагена костной ткани / С. Ю. Иванов, Е. В. Ларионов, А. М. Панин В. М.

Кравец, С. И. Анисимов, Д. Н. Володина //Институт стоматологии. – 2005. – Т. 4. – №. 29. – С. 108-111.

9. Кирилова, И. А. Сравнительная характеристика материалов для костной пластики: состав и свойства / И. А. Кирилова, М. А. Садовой, В. Т. Подорожная //Хирургия позвоночника. – 2012. – №. 3. – С. 72–83.

10. Кирилова, И.А. Костно-пластические биоматериалы и их физико-механические свойства / И. А. Кирилова, В. Т. Подорожная, Е. В. Легостаева, Ю. П. Шаркеев, П. В. Уваркин, А. М. Аронов, // Хирургия позвоночника. 2010. № 1. С. 81–87

11. Корж, Н.А. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль биологической фиксации и остеоинтеграции в реконструкции кости / Н. А. Корж, Л. А. Кладченко, С. В. Малышкина, И. Б. Тимченко // Ортопед., травматол. и протезир. 2005. № 4. С. 118–127.

12. Королев, С.Б. Новая медицинская технология подготовки костных трансплантатов для костной пластики / С.Б. Королев А.Н. Абраменков // М-лы II Московского междунар. конгр. травматологов и ортопедов. М., 2011.

13. Лябин, М. П. Совершенствование технологии получения хитозана / М. П. Лябин, П. С. Семенов //Вестник Волгоградского государственного университета. Сер.11. Естественные науки. – 2011. – №. 2.

14. Музыченко П. Ф. Проблемы биоматериаловедения в травматологии и ортопедии / П. Ф. Музыченко //Травма. – 2012. – №. 1. – С. 94-98.

15. Николаева, Е. Д. Сравнительное исследование клеточных носителей, полученных из резорбируемых полигидроксиалканоатов различного химического состава/ Е.Д. Николаева, Е.И. Шишацкая, К.Е. Мочалов, Т.Г. Волова, Э.Д. Сински //Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6. – №. 4. – С. 54–63.

16. Половников, Е. В. Влияние мезенхимальных стромальных клеток костного мозга и жировой ткани человека на эффективность воотановления неврологического дефицита в модели черепно-мозговой травмы у крыс / Е. В. Половников, В. В. Ступак, А. Г. Самохин, И. А. Васильев, О. Б. Добрякова, Е.

Я. Шевела, Е. Р. Черных // бюллетень восточно-сибирского научного центра СО РАМН. – 2012. – №. 3-2.

17. Решетов, И. В. Новые материалы для реконструктивной черепно-челюстнолицевой хирургии и онкологии / И. В. Решетов, Д. В. Штанский, Е. А. Левашов, М. М. Филюшин, В. Н. Васильев, С. С. Сухарев // Онкохирургия. – 2011. – Т. 3. – №. 3. – С. 12-20.

18. Рожнова, О. М. Биологическая совместимость медицинских изделий на основе металлов, причины формирования патологической реактивности (обзор иностранной литературы) / О. М. Рожнова, В. В. Павлов, М. А. Садовой // Бюллетень сибирской медицины. – 2015. – Т. 14. – №. 4. – С. 110-118.

19. Шипунова, И. Н. Влияние гидрокортизона на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки человека / И.Н. Шипунова, Н.А. Петинати, Н.И. Дризе // клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013. – №. 1. – С. 42–46.

20. Шишацкая, Е. И. Исследование пленочных матриксов из резорбируемых полигидроксиалканоатов различного химического состава in vivo: реакция тканей и кинетика биоразрушения / Е. И. Шишацкая, Е. Д. Николаева, А. В. Горева, К. Д. Бригкхам, Т. Г. Волова, Э. Д. Синкси // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – Т. 7. – №. 1.

21. Шишацкая, Е. И. Культивирование мультипотентных мезенхимных стромальных клеток костного мозга на носителях из резорбируемого Биопластотана. / Е.И. Шишацкая, Е.Д. Николаева, А.А. Шумилова, А.В. Шабанов, Т.Г. Волова // Гены и клетки. – 2013. – Т. 8. – №. 1. – С. 57–65.

22. Шишацкая, Е. И. Полигидроксиалканоаты как матрикс в клеточных технологиях / Е. И. Шишацкая, Т. Г. Волова // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2010. – Т. 5. – №. 3.

23. Штанский, Д. В. Сравнительное исследование структуры и цитотоксичности политетрафторэтилена после ионного травления и ионной имплантации / Д. В. Штанский, Н. А. Глушанкова, Ф. В. Кирюханцев-Корнеев, А. Н. Шевейко, А. А. Сигарев // Физика твердого тела. – 2011. – Т. 53. – №. 3.

24. Шумилова А. А. и др. Материалы для восстановления костной ткани/ А.А. Шумилова, Е. И. Шишацкая // Журнал СФУ. Биология. – 2014. – Т. 7. – №. 2.

25. Шумилова, А. А. Потенциал биоразрушаемых полигидроксиалканоатов в качестве костнопластических материалов: диссертация ... кандидата биологических наук: 03.01.06 / Шумилова Анна Алексеевна. – Красноярск, 2015. – 145 с

26. Щепкина, Е.А., Трансплантация аутологичных мезенхимальных стволовых клеток на деминерализованном костном матриксе при пластике ложных суставов и костных дефектов / Е.А. Щепкина, П.В. Кругляков, Л.Н. Соломин и др. // Мат. III Всероссийского симп. с межд. уч.: "Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии" – М., 2007. – С. 113-120.

27. Эппле, М. Биоматериалы и биоминерализация / М. Эппле //Томск: Ветер. – 2007.

28. Abe, H. Crystallization behavior and thermal properties of melt-crystallized poly [(R)-3-hydroxybutyric acid-co-6-hydroxyhexanoic acid] films / H. Abe, Y. Kikkawa, H. Aoki, T. Akehata, T. Iwata, Y. Doi //International journal of biological macromolecules. – 1999. – Т. 25. – №. 1. – С. 177-183.

29. Amé-Thomas, P. Human mesenchymal stem cells isolated from bone marrow and lymphoid organs support tumor B-cell growth: role of stromal cells in follicular lymphoma pathogenesis/ P. Amé-Thomas, H. Maby-El Hajjami, C. Monvoisin, R. Jean, D. Monnier, S. Caulet-Maugendre, K. Tarte //Blood. – 2007. – Т. 109. – №. 2. – С. 693-702.

30. Bambole, V. Tissue engineering: Use of electrospinning technique for recreating physiological functions / V. Bambole, J. V. Yakhmi // Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials. – Elsevier, 2016 Гл. 14. – С. 387–455

31. Batorsky, A. Encapsulation of adult human mesenchymal stem cells within collagen-agarose microenvironments/ A. Batorsky, J. Liao, A. W. Lund, G. E.

Plopper, J. P. Stegemann //Biotechnology and bioengineering. – 2005. – T. 92. – №. 4. – C. 492-500.

32. Behonick, D. J. Role of matrix metalloproteinase 13 in both endochondral and intramembranous ossification during skeletal regeneration / D. J. Behonick, Z. Xing, S. Lieu, J. M. Buckley, J. C. Lotz, R. S. Marcucio, C. Colnot//PLoS One. – 2007. – T. 2. – №. 11. – C. e1150.

33. Bi, L. Evaluation of bone regeneration, angiogenesis, and hydroxyapatite conversion in critical-sized rat calvarial defects implanted with bioactive glass scaffolds / L. Bi, S. Jung, D. Day, K. Neidig, V. Dusevich, D. Eick, L. Bonewald //Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2012. – T. 100. – №. 12. – C. 3267-3275.

34. Bose, S. Bone tissue engineering using 3D printing/ S. Bose, S. Vahabzadeh, A. Bandyopadhyay //Materials Today. – 2013. – T. 16. – №. 12. – C. 496-504.

35. Boxall, S. A. Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells / S. A. Boxall, E. Jones //Stem cells international. – 2012. – T. 2012.

36. Brauker, J. H. Neovascularization of synthetic membranes directed by membrane microarchitecture / J. H. Brauker, V. E. Carr-Brendel, L. A. Martinson, J. Crudele, W. D. Johnston, R. C Johnson //Journal of biomedical materials research. – 1995. – T. 29. – №. 12. – C. 1517-1524.

37. Brodie, J. C. Osteoblast interactions with calcium phosphate ceramics modified by coating with type I collagen /J. C. Brodie, E. Goldie, G. Connel, J. Merry, M. H. Grant//Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2005. – T. 73. – №. 4. – C. 409-421.

38. Caplan, A. I. New era of cell-based orthopedic therapies / A. I. Caplan //Tissue Engineering Part B: Reviews. – 2009. – T. 15. – №. 2. – C. 195-200.

39. Chang, H. M. Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)-based scaffolds for tissue engineering / H.M. Chang, Z.H. Wang, H.N. Luo, M. Xu, X.Y. Ren, G.X. Zheng, B.J. Wu, X.H. Zhang, X.Y. Lu, F. Chen, X.H. Jing, L. Wang

//Brazilian Journal of Medical and Biological Research. – 2014. – T. 47. – №. 7. – C. 533-539.

40. Chen G. Q. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio-and materials industry / G. Q. Chen //Chemical Society Reviews. – 2009. – T. 38. – №. 8. – C. 2434-2446.

41. Chen, G. Q. The application of polyhydroxyalkanoates as tissue engineering materials / G. Q. Chen, Q. Wu //Biomaterials. – 2005. – T. 26. – №. 33. – C. 6565-6578.

42. Chen, Z. Synthesis, characterization and cell compatibility of novel poly (ester urethane) s based on poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) prepared by melting polymerization / Z. Chen, S. Cheng, Z. Li, K. Xu, G.Q. Chen //Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2009. – T. 20. – №. 10. – C. 1451-1471.

43. Cousin, B. Adult stromal cells derived from human adipose tissue provoke pancreatic cancer cell death both in vitro and in vivo/ B. Cousin, E. Ravet, S. Poglio, F. De Toni, M. Bertuzzi, H. Lulka, J. P. Chavoin//PloS one. – 2009. – T. 4. – №. 7. – C. e6278.

44. De Bari, C. Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane/ C. De Bari, F. Dell'Accio, P. Tylzanowski, F. P. Luyten //Arthritis & Rheumatism. – 2001. – T. 44. – №. 8. – C. 1928-1942.

45. De Long WG, Einhorn TA, Koval K, et al. Bone grafts and bone graft substitutes in orthopaedic trauma surgery / W.G. De Long, T. A. Einhorn, K. Koval, M. McKee, W. Smith, R. Sanders, T. Watson // Journal of bone and joint surgery. American volume. – 2007. – T. 89. – №. 3. – C. 649-658

46. Deepthi, S.. An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering / S. Deepthi, J. Venkatesan, S. K. Kim, J. D. Bumgardner, R. Jayakumar //International journal of biological macromolecules. – 2016.

47. Deng Y. et al. Poly (hydroxybutyrate-co-hydroxyhexanoate) promoted production of extracellular matrix of articular cartilage chondrocytes in vitro / Y.

Deng, X. S. Lin, Z. Zheng, J. G. Deng, J. C. Chen, H. Ma, G. Q. Chen //Biomaterials. – 2003. – T. 24. – №. 23. – C. 4273-4281.

48. Djouad, F. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals/ F. Djouad, P. Ponce, C. Bony, P. Tropel, F. Apparailly, J. Sany, C. Jorgensen //Blood. – 2003. – T. 102. – №. 10. – C. 3837-3844.

49. Ferretti, C. A prospective trial of poly-L-lactic/polyglycolic acid copolymer plates and screws for internal fixation of mandibular fractures/ C. Ferretti //International journal of oral and maxillofacial surgery. – 2008. – T. 37. – №. 3. – C. 242-248.

50. Finkemeier, C. G. Bone-grafting and bone-graft substitutes / C. G. Finkemeier //J Bone Joint Surg Am. – 2002. – T. 84. – №. 3. – C. 454-464.

51. Florczyk, S. J. 3D porous chitosan–alginate scaffolds: a new matrix for studying prostate cancer cell–lymphocyte interactions in vitro / S. J. Florczyk, G. Liu, F. M. Kievit, A. M. Lewis, J. D. Wu, M. Zhang//Advanced healthcare materials. – 2012. – T. 1. – №. 5. – C. 590-599.

52. Fu, Q. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives / Q. Fu, E. Saiz, M. N. Rahaman, A. P. Tomsia//Materials Science and Engineering: C. – 2011. – T. 31. – №. 7. – C. 1245-1256.

53. Glowacki, J. Collagen scaffolds for tissue engineering / J. Glowacki S. Mizuno //Biopolymers. – 2008. – T. 89. – №. 5. – C. 338-344.

54. Gredes, T. Histological and molecular-biological analyses of poly (3-hydroxybutyrate)(PHB) patches for enhancement of bone regeneration/ T. Gredes, T. Gedrange, C. Hinüber, M. Gelinsky, C. Kunert-Keil//Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger. – 2015. – T. 199. – C. 36-42.

55. Grellier M. et al. The effect of the co-immobilization of human osteoprogenitors and endothelial cells within alginate microspheres on mineralization in a bone defect / M. Grellier, P. L. Granja, J. C. Fricain, S. J. Bidarra, M. Renard, R. Bareille, M. A. Barbosa//Biomaterials. – 2009. – T. 30. – №. 19. – C. 3271-3278.

56. Gupta, A. Osteo-maturation of adipose-derived stem cells required the combined action of vitamin D3, β -glycerophosphate, and ascorbic acid/ A. Gupta, D.

T. Leong, H. F. Bai, S. B. Singh, T. C. Lim, D. W. Hutmacher//Biochemical and biophysical research communications. – 2007. – T. 362. – №. 1. – C. 17-24.

57. Han, X. Analysis of degradation data of poly (l-lactide-co-l, d-lactide) and poly (l-lactide) obtained at elevated and physiological temperatures using mathematical models / X. Han, J. Pan, F. Buchanan, N. Weir, D. Farrar//Acta biomaterialia. – 2010. – T. 6. – №. 10. – C. 3882-3889.

58. Harloff, T. Titanium allergy or not? / T. Harloff, H. Wolfgang, U. Holzwarth, R. Bader, P. Thomas, A. Schuh//Health. – 2010. – T. 2. – №. 04. – C. 306.

59. Hess, R. Synergistic effect of defined artificial extracellular matrices and pulsed electric fields on osteogenic differentiation of human MSCs / R. Hess, A. Jaeschke, H. Neubert, V. Hintze, S. Moeller, M. Schnabelrauch, D. Scharnweber//Biomaterials. – 2012. – T. 33. – №. 35. – C. 8975-8985.

60. Ho, M. H. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods/ M. H. Ho, P. Y. Kuo, H. J. Hsieh, T. Y. Hsien, L. T. Hou, J. Y. Lai, D. M. Wang //Biomaterials. – 2004. – T. 25. – №. 1. – C. 129-138.

61. Holzwarth, J. M. Biomimetic nanofibrous scaffolds for bone tissue engineering/ J. M. Holzwarth, P. X. Ma //Biomaterials. – 2011. – T. 32. – №. 36. – C. 9622-9629.

62. Horwitz, E. M. Transplantability and therapeutic effects of bone marrow-derived mesenchymal cells in children with osteogenesis imperfecta / E. M. Horwitz, D. J. Prockop, L. A. Fitzpatrick, W. W. Koo, P. L. Gordon, M. Neel, M. K. Brenner//Nature medicine. – 1999. – T. 5. – №. 3. – C. 309-313.

63. Hu, Y. J. Biocompatibility of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) with bone marrow mesenchymal stem cells / Y. J. Hu, X. Wei, W. Zhao, Y. S. Liu, G. Q. Chen, //Acta biomaterialia. – 2009. – T. 5. – №. 4. – C. 1115-1125.

64. Huang Y. C., Mooney D. J. Gas foaming to fabricate polymer scaffolds in tissue engineering/ Y. C. Huang, D. J. Mooney //Scaffoldings in tissue engineering. – 2005. – C. 159.

65. Jarocha, D. Advantage of mesenchymal stem cells (MSC) expansion directly from purified bone marrow CD105+ and CD271+ cells / D. Jarocha, E. Lukasiewicz, M. Majka //Folia Histochemica et Cytobiologica. – 2008. – T. 46. – №. 3. – C. 307-314.

66. Karahaliloglu Z. et al. Antibacterial Nanostructured Polyhydroxybutyrate Membranes for Guided Bone Regeneration / Z. Karahaliloglu, B. Ercan, E. N. Taylor, S. Chung, E. B. Denkbaş, T. J. Webster //Journal of biomedical nanotechnology. – 2015. – T. 11. – №. 12. – C. 2253-2263.

67. Kern, S. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue / S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Klüter, K. Bieback //Stem cells. – 2006. – T. 24. – №. 5. – C. 1294-1301.

68. Kim, J. H. Paradoxical effects of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells on progression of experimental arthritis in SKG mice /J. H. Kim, Y. T. Lee, K. Oh, J. Cho, D. S. Lee, Y. I. Hwang//Cellular immunology. – 2014. – T. 292. – №. 1. – C. 94-101.

69. Kinoshita, Y. Reconstruction of jawbones using poly (L-lactic acid) mesh and transplantation of particulate cancellous bone and marrow: Long-term observation of 40 cases Y. Kinoshita, S. Yokoya, T. Amagasa //Int J Oral Maxillofac Surg. – 2003. – T. 32. – №. 2. – C. 117-120.

70. Kolambkar, Y. M. An alginate-based hybrid system for growth factor delivery in the functional repair of large bone defects / Y. M. Kolambkar, K. M. Dupont, J. D. Boerckel, N. Huebsch, D. J. Mooney, D. W. Hutmacher, R. E. Guldberg //Biomaterials. – 2011. – T. 32. – №. 1. – C. 65-74.

71. Kumbar, S. Natural and synthetic biomedical polymers./ S. Kumbar, C. Laurencin, M. Deng – Newnes. 2014. – 402 c.

72. Kutz, M. et al. (ed.). Handbook of materials selection. – J. Wiley, 2002. – C. 365-368.

73. Li G. et al. Poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) based electrospun 3D scaffolds for delivery of autogeneic chondrocytes and adipose-derived stem cells: evaluation of cartilage defects in rabbit/ G. Li, N. Fu, J. Xie, Y.

Fu, S. Deng, X. Cun, Y. Lin//Journal of biomedical nanotechnology. – 2015. – T. 11. – №. 1. – C. 105-116.

74. Li, S. Effect of some factors on fabrication of poly (L-lactic acid) microporous foams by thermally induced phase separation using N, N-dimethylacetamide as solvent / S. Li, X. Chen, M. Li //Preparative biochemistry & biotechnology. – 2010. – T. 41. – №. 1. – C. 53-72.

75. Liang, D. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications/ D. Liang, B. S. Hsiao, B. Chu //Advanced drug delivery reviews. – 2007. – T. 59. – №. 14. – C. 1392-1412.

76. Liu, L. Q. A comparison of the mechanical strength and stiffness of MWNT-PMMA and MWNT-epoxy nanocomposites / L. Q. Liu, H. D. Wagner //Composite Interfaces. – 2007. – T. 14. – №. 4. – C. 285-297.

77. Liu, X. H. Nanofibrous hollow microspheres self-assembled from star-shaped polymers as injectable cell carriers for knee repair/ X. H. Liu, X. Jin, P. X. Ma //Nature materials. – 2011. – T. 10. – №. 5. – C. 398-406.

78. Liu, X. Oriented bioactive glass (13-93) scaffolds with controllable pore size by unidirectional freezing of camphene-based suspensions: Microstructure and mechanical response / X. Liu, M. N. Rahaman, Q. Fu //Acta biomaterialia. – 2011. – T. 7. – №. 1. – C. 406-416.

79. Liu, X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering / X. Liu, P. X. Ma //Annals of biomedical engineering. – 2004. – T. 32. – №. 3. – C. 477-486.

80. Lu, Y. The growth inhibitory effect of mesenchymal stem cells on tumor cells in vitro and in vivo/ Y. R. Lu, Y. Yuan, X. J. Wang, L. L. Wei, Y. N. Chen, C. Cong, J. Zhang //Cancer biology & therapy. – 2008. – T. 7. – №. 2. – C. 245-251.

81. Lyons, F. Part 1: scaffolds and surfaces / F. Lyons, S. Partap, F. J. O'Brien //Technology and Health Care. – 2008. – T. 16. – №. 4. – C. 305-317.

82. Mai, R. Ectopic bone formation in nude rats using human osteoblasts seeded poly (3) hydroxybutyrate embroidery and hydroxyapatite-collagen tapes constructs/ R. Mai, M. G. Hagedorn, M. Gelinsky, C. Werner, D. Turhani, H. Späth,

T. Gedrange, G. Lauer //Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery. – 2006. – T. 34. – C. 101-109.

83. Marcacci, M. Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6-to 7-year outcome of a pilot clinical study/ M. Marcacci, E. Kon, V. Moukhachev, S. Lavroukov, A. Kutepov, R. Quarto, R. Cancedda//Tissue engineering. – 2007. – T. 13. – №. 5. – C. 947-955.

84. Martin, D. P. Medical applications of poly-4-hydroxybutyrate: a strong flexible absorbable biomaterial/ D. P. Martin, S. F. Williams //Biochemical Engineering Journal. – 2003. – T. 16. – №. 2. – C. 97-105.

85. Masaeli, E. Does the tissue engineering architecture of poly (3-hydroxybutyrate) scaffold affects cell–material interactions?/ E. Masaeli, M. Morshed, P. Rasekhian, S. Karbasi, K. Karbalaie, F. Karamali, D. Abedi, S. Razavi, A. Jafarian-Dehkordi, M. H. Nasr-Esfahani, H. Baharvand //Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2012. – T. 100. – №. 7. – C. 1907-1918.

86. Mazzoli, A. Selective laser sintering in biomedical engineering/ A. Mazzoli //Medical & biological engineering & computing. – 2013. – T. 51. – №. 3. – C. 245-256.

87. Mhurchu, C. N. Effect of chitosan on weight loss in overweight and obese individuals: a systematic review of randomized controlled trials / C. N. Mhurchu, C. Dunshea-Mooij, D. Bennett, A. Rodgers//Obesity reviews. – 2005. – T. 6. – №. 1. – C. 35-42.

88. Misra, S. K. Comparison of nanoscale and microscale bioactive glass on the properties of P (3HB)/Bioglass® composites/ S. K. Misra, D. Mohn, T. J. Brunner, W. J. Stark, S. E. Philip, I. Roy, A. R. Boccaccini //Biomaterials. – 2008. – T. 29. – №. 12. – C. 1750-1761.

89. Mohammadi, M. S. Polylactic acid (PLA) biomedical foams for tissue engineering / M. S. Mohammadi, M. N. Bureau, S. N. Nazhat //Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications. – 2014. – C. 313-334.

90. Mosna, F. Human bone marrow and adipose tissue mesenchymal stem cells: a user's guide / F. Mosna, L. Sensebé, M. Krampera // Stem cells and development. – 2010. – T. 19. – №. 10. – C. 1449-1470.

91. Muehlberg, F. L. Tissue-resident stem cells promote breast cancer growth and metastasis/ F. L. Muehlberg, Y. H. Song, A. Krohn, S. P. Pinilla, L. H. Droll, X. Leng, W. Liu // Carcinogenesis. – 2009. – T. 30. – №. 4. – C. 589-597.

92. Mueller B. Additive manufacturing technologies—rapid prototyping to direct digital manufacturing/ B. Mueller // Assembly Automation. – 2012. – T. 32. – №. 2.

93. Murphy, J. M. Reduced chondrogenic and adipogenic activity of mesenchymal stem cells from patients with advanced osteoarthritis/ J. M. Murphy, K. Dixon, S. Beck, D. Fabian, A. Feldman, F. Barry // Arthritis & Rheumatism. – 2002. – T. 46. – №. 3. – C. 704-713.

94. Niu, H. Comparative study of three types of polymer materials co-cultured with bone marrow mesenchymal stem cells for use as a myocardial patch in cardiomyocyte regeneration / H. Niu, J. Mu, J. Zhang, P. Hu, P. Bo, Y. Wang // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2013. – T. 24. – №. 6. – C. 1535-1542.

95. Peng, S. W. An assessment of the risks of carcinogenicity associated with polyhydroxyalkanoates through an analysis of DNA aneuploid and telomerase activity / S. W. Peng, X. Y. Guo, G. G. Shang, J. Li, X. Y. Xu, M. L. You, G. Q. Chen // Biomaterials. – 2011. – T. 32. – №. 10. – C. 2546-2555.

96. Pereira, R. F. Cultured adherent cells from marrow can serve as long-lasting precursor cells for bone, cartilage, and lung in irradiated mice / R. F. Pereira, K. W. Halford, M. D. O'hara, D. B. Leeper, B. P. Sokolov, M. D. Pollard, D. J. Prockop // Proceedings of the national academy of sciences. – 1995. – T. 92. – №. 11. – C. 4857-4861.

97. Philippe, B. Culture and use of mesenchymal stromal cells in phase I and II clinical trials / B. Philippe, S. Luc, P. B. Valérie, R. Jérôme, B. R. Alessandra, C. Louis // Stem cells international. – 2010. – T. 2010.

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

99. Plikk, P. Design of resorbable porous tubular copolyester scaffolds for use in nerve regeneration/ P. Plikk, S. Målberg, A. C. Albertsson //Biomacromolecules. – 2009. – T. 10. – №. 5. – C. 1259-1264.

100. Purcel, G. Collagen-based nanobiomaterials: Challenges in soft tissue engineering/ G. Purcel, D. Meliță, E. Andronescu, A. M.Grumezescu // Nanobiomaterials in Soft Tissue Engineering: Applications of Nanobiomaterials. – Elsevier, 2016 Гл. 7. – C. 173–200

101. Rai, R. Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future / R. Rai, T. Keshavarz, J.A. Roether, A.R. Boccaccini, I. Roy //Materials Science and Engineering: R: Reports. – 2011. – T. 72. – №. 3. – C. 29-47.

102. Reis E. C. C. et al. Biocompatibility, osteointegration, osteoconduction, and biodegradation of a hydroxyapatite-polyhydroxybutyrate composite / E. C. C. Reis, A. P. B. Borges, C. C. Fonseca, M. M. M. Martinez, R. B. Eleotério, G. O. Morato, P. M. Oliveira //Brazilian Archives of Biology and Technology. – 2010. – T. 53. – №. 4. – C. 817-826.

103. Rentsch, C. Evaluation of the osteogenic potential and vascularization of 3D poly (3) hydroxybutyrate scaffolds subcutaneously implanted in nude rats / C. Rentsch, B. Rentsch, A. Breier, A. Hofmann, S. Manthey, D. Scharnweber, H. Zwipp //Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2010. – T. 92. – №. 1. – C. 185-195.

104. Riminucci, M. Building bone tissue: matrices and scaffolds in physiology and biotechnology/ M. Riminucci, P. Bianco//Brazilian journal of medical and biological research. – 2003. – T. 36. – №. 8. – C. 1027-1036.

105. Rodríguez, J. P. Abnormal osteogenesis in osteoporotic patients is reflected by altered mesenchymal stem cells dynamics / J. P. Rodríguez, S. Garat, H.

Gajardo, A. M. Pino, G. Seitz//Journal of cellular biochemistry. – 1999. – T. 75. – №. 3. – C. 414-423.

106. Rubert, M. Effect of alginate hydrogel containing polyproline-rich peptides on osteoblast differentiation / M. Rubert, M. Monjo, S. P. Lyngstadaas, J. M. Ramis //Biomedical Materials. – 2012. – T. 7. – №. 5. – C. 055003.

107. Sakaguchi, Y. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source / Y. Sakaguchi, I. Sekiya, K. Yagishita, T. Muneta //Arthritis & Rheumatism. – 2005. – T. 52. – №. 8. – C. 2521-2529.

108. Sakamoto, Y. Combined use of resorbable poly-l-lactic acid-polyglycolic acid implant and bone cement for treating large orbital floor fractures /Y. Sakamoto, Y. Shimizu, T. Nagasao, K. Kishi // Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. – 2014. – T. 67. – №. 3. – C. e88-e90.

109. Scharstuhl, A. Chondrogenic potential of human adult mesenchymal stem cells is independent of age or osteoarthritis etiology/ A. Scharstuhl, B. Schewe, K. Benz, C. Gaissmaier, H. J. Bühring, R. Stoop //Stem Cells. – 2007. – T. 25. – №. 12. – C. 3244-3251.

110. Schubert, T. Critical size bone defect reconstruction by an autologous 3D osteogenic-like tissue derived from differentiated adipose MSCs / T. Schubert, S. Lafont, G. Beaurin, G. Grisay, C. Behets, P. Gianello, D. Dufrane //Biomaterials. – 2013. – T. 34. – №. 18. – C. 4428-4438.

111. Secchiero, P. Human bone marrow mesenchymal stem cells display anti-cancer activity in SCID mice bearing disseminated non-Hodgkin's lymphoma xenografts / P. Secchiero, S. Zorzet, C. Tripodo, F. Corallini, E. Melloni, L. Caruso, G. Zauli //PloS one. – 2010. – T. 5. – №. 6. – C. e11140.

112. Singh, A. K. Enhanced production of SCL-LCL-PHA co-polymer by sludge-isolated Pseudomonas aeruginosa MTCC 7925/ A. K. Singh, N. Mallick //Letters in applied microbiology. – 2008. – T. 46. – №. 3. – C. 350-357.

113. Skoog, S. A. Stereolithography in tissue engineering/ S. A. Skoog, P. L. Goering, R. J. Narayan //Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2014. – T. 25. – №. 3. – C. 845-856.

114. Sombatmankhong K. et al. Electrospun fiber mats of poly (3-hydroxybutyrate), poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate), and their blends/ K. Sombatmankhong, O. Suwantong, S. Waleetorncheepsawat, P. Supaphol //Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics. – 2006. – T. 44. – №. 19. – C. 2923-2933.

115. Song, L. Transdifferentiation potential of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow / L. Song, R. S. Tuan //The FASEB Journal. – 2004. – T. 18. – №. 9. – C. 980-982.

116. Strem, B. M. Multipotential differentiation of adipose tissue-derived stem cells/ B. M. Strem, K. C. Hicok, M. Zhu, I. Wulur, Z. Alfonso, R. E. Schreiber, M. H. Hedrick //The Keio journal of medicine. – 2005. – T. 54. – №. 3. – C. 132-141.

117. Strioga, M. Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells / M. Strioga, S. Viswanathan, A. Darinskas, O. Slaby, J. Michalek //Stem cells and development. – 2012. – T. 21. – №. 14. – C. 2724-2752.

118. Sultana N., Wang M. Fabrication of tissue engineering scaffolds using the emulsion freezing/freeze-drying technique and characteristics of the scaffolds / N. Sultana, M. Wang //Integrated Biomaterials in Tissue Engineering. – 2012. – C. 63-89.

119. Sunay, O. Autologous rabbit adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of bone injuries with distraction osteogenesis / O. Sunay, G. Can, Z. Cakir, Z. Denek, I. Kozanoglu, G. Erbil, Y. Baran//Cytotherapy. – 2013. – T. 15. – №. 6. – C. 690-702.

120. Vallet-Regi, M. Calcium phosphates as substitution of bone tissues / M. Vallet-Regi, J. M. González-Calbet //Progress in Solid State Chemistry. – 2004. – T. 32. – №. 1. – C. 1-31.

121. Van Cleynenbreugel, T. Micro-CT-based screening of biomechanical and structural properties of bone tissue engineering scaffolds/ T. Van Cleynenbreugel, J. Schrooten, H. Van Oosterwyck, J. Vander Sloten //Medical and Biological Engineering and Computing. – 2006. – T. 44. – №. 7. – C. 517-525.

122. Vladimirov, B. S. Growth factors--importance and possibilities for enhancement of the healing process in bone fractures/ B. S. Vladimirov, S. A. Dimitrov //Folia medica. – 2003. – T. 46. – №. 2. – C. 11-17.

123. Wakao, S. Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts / S. Wakao, M. Kitada, Y. Kuroda, T. Shigemoto, D. Matsuse, H. Akashi, T. Nakahata//Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2011. – T. 108. – №. 24. – C. 9875-9880.

124. Wang Y. W. Effect of composition of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) on growth of fibroblast and osteoblast / Y. W. Wang, F. Yang, Q. Wu, Y. C. Cheng, H. F. Peter, J. Chen, G. Q. Chen //Biomaterials. – 2005. – T. 26. – №. 7. – C. 755-761.

125. Wang, Y. Induced apoptosis of osteoblasts proliferating on polyhydroxyalkanoates/ Y.Wang, X. L. Jiang, S. W. Peng, X. Y. Guo, G. G. Shang, J. C. Chen, G. Q. Chen //Biomaterials. – 2013. – T. 34. – №. 15. – C. 3737-3746.

126. Wang, Y. W. et al. Evaluation of three-dimensional scaffolds made of blends of hydroxyapatite and poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) for bone reconstruction / Y. W. Wang, Q. Wu, J. Chen, G. Q. Chen //Biomaterials. – 2005. – T. 26. – №. 8. – C. 899-904.

127. Whang, K. Engineering bone regeneration with bioabsorbable scaffolds with novel microarchitecture/ K. Whang, K. E. Healy, D. R. Elenz, E. K. Nam, D. C. Tsai, C. H. Thomas, S. M. Sprague//Tissue engineering. – 1999. – T. 5. – №. 1. – C. 35-51.

128. Xi, J. Preparation and Evaluation of Porous Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate)—Hydroxyapatite Composite Scaffolds / J. Xi, L. Zhang, Z. A. Zheng, G. Chen, Y. Gong, N. Zhao, X. Zhang//Journal of biomaterials applications. – 2008. – T. 22. – №. 4. – C. 293-307.

129. Yang, Q. The Properties of Poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) and its Applications in Tissue Engineering / Q. Yang, J. Wang, S. Zhang, X. Tang, G. Shang, Q. Peng, R. Wang, X. Cai //Current stem cell research & therapy. – 2014. – T. 9. – №. 3. – C. 215-222.
130. Ye, C. PHB/PHBHHx scaffolds and human adipose-derived stem cells for cartilage tissue engineering / C. Ye, P. Hu, M.X. Ma, Y. Xiang, R.G. Liu, X.W. Shang //Biomaterials. – 2009. – T. 30. – №. 26. – C. 4401-4406.
131. Yoon, S. T. Osteoinductive molecules in orthopaedics: basic science and preclinical studies / S. T. Yoon, S. D. Boden //Clinical orthopaedics and related research. – 2002. – T. 395. – C. 33-43.
132. Yourek, G. Shear stress induces osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells /G. Yourek, S. M. McCormick, J. J. Mao, G. C. Reilly//Regenerative medicine. – 2010. – T. 5. – №. 5. – C. 713-724.
133. Yu, B. Y. Effects of the surface characteristics of polyhydroxyalkanoates on the metabolic activities and morphology of human mesenchymal stem cells / B. Y. Yu, P. Y. Chen, Y. M. Sun, Y. T. Lee, T. H. Young//Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition. – 2010. – T. 21. – №. 1. – C. 17-36.
134. Yu, J. M. Mesenchymal stem cells derived from human adipose tissues favor tumor cell growth in vivo/ J. M. Yu, E. S. Jun, Y. C. Bae, J. S. Jung//Stem cells and development. – 2008. – T. 17. – №. 3. – C. 463-474.
135. Yuan, H. Bone induction by porous glass ceramic made from Bioglass®(45S5) / H. Yuan, J. D. de Bruijn, X. Zhang, C. A. van Blitterswijk, K. de Groot //Journal of biomedical materials research. – 2001. – T. 58. – №. 3. – C. 270-276.
136. Zhang S. et al. Biocomposite scaffolds for bone regeneration: Role of chitosan and hydroxyapatite within poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate on mechanical properties and in vitro evaluation/ S. Zhang, M. P. Prabhakaran, X. Qin, S. Ramakrishna//Journal of the mechanical behavior of biomedical materials. – 2015. – T. 51. – C. 88-98.

137. Zhang S. et al. Poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate containing scaffolds and their integration with osteoblasts as a model for bone tissue engineering / S. Zhang, M. P. Prabhakaran, X. Qin, S. Ramakrishna //Journal of biomaterials applications. – 2015. – T. 29. – №. 10. – C. 1394-1406.

138. Zhu, Y. Human mesenchymal stem cells inhibit cancer cell proliferation by secreting DKK-1/ Y. Zhu, Z. Sun, Q. Han, L. Liao, J. Wang, C. Bian, R. C. Zhao//Leukemia. – 2009. – T. 23. – №. 5. – C. 925-933.