

*Федеральное государственное бюджетное учреждение «Новосибирский
научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л.
Цивьяна» Министерства здравоохранения Российской Федерации*

На правах рукописи



Анастасиева
Евгения Андреевна

**ЗАМЕЩЕНИЕ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ
ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ
НА ОСНОВЕ ДЕПРОТЕИНИЗИРОВАННОЙ ГУБЧАТОЙ КОСТИ
(ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ)**

3.1.8 – травматология и ортопедия

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Кирилова Ирина Анатольевна

Новосибирск

2023

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ЗАМЕЩЕНИЕ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ ...	10
1.1 Общие сведения.....	10
1.2 Материалы для замещения костных дефектов.....	11
1.2 Ауто- и аллотрансплантаты костной ткани.....	14
1.3 Ксеногенные и синтетические костно-пластические материалы.....	18
1.4 Клеточный компонент регенерации костной ткани. Использование жировой ткани	19
1.5 Тканеинженерные конструкции в костной пластике	20
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	23
2.1 Планирование исследования.....	23
2.2 Материал исследования.....	25
2.3 Физические методы исследования	28
2.3 Культуральные методы исследования	29
2.4. Метод оперативного вмешательства в эксперименте <i>in vivo</i>	33
2.5. Метод лучевой диагностики в эксперименте <i>in vivo</i>	37
2.6. Метод гистологического исследования операционного материала в эксперименте <i>in vivo</i>	39
2.7 Статистические методы оценки результатов экспериментальной работы ...	40
ГЛАВА 3. ДЕПРОТЕИНИЗИРОВАННАЯ ГУБЧАТАЯ КОСТЬ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ ДЛЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ <i>IN VITRO</i>	42
3.1. Структурные характеристики и элементный состав, <i>in vitro</i> цитотоксичность губчатой костной ткани головки бедренной кости человека	42

3.2. Влияние депротеинизированной губчатой кости человека на адгезию, миграцию и пролиферацию МСК ЖТ в эксперименте <i>in vitro</i>	46
3.3. Способ создания тканеинженерной конструкции для стимуляции регенерации кости	52
ГЛАВА 4. ВОССТАНОВЛЕНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ <i>IN VIVO</i> ПРИ ЗАМЕЩЕНИИ КОСТНОГО ДЕФЕКТА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ.....	56
4.1 Оценка восстановления костной ткани в контрольной группе № 1, без замещения костного дефекта	56
4.2 Оценка восстановления костной ткани в группе № 2 с замещением костного дефекта депротеинизированной губчатой костью.....	63
4.3 Оценка восстановления костной ткани в группе № 3 с замещением костного дефекта тканеинженерной конструкцией.....	71
4.4 Сравнение показателей при замещении костных дефектов в эксперименте <i>in vivo</i> с применением ДПК-ГБК и тканеинженерной конструкции на ее основе	80
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	90
ОТ АВТОРА.....	101
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	102
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	103
Приложение А	134

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Количество операций с использованием остеопластических материалов ежегодно возрастает, что объясняется увеличением числа высокотехнологичных операций, реконструктивных вмешательств при костной патологии, деформациях костей, а также дефектах тканей, полученных в результате боевых травм [1, 17, 33, 38, 45, 66, 77, 83]. Под утраченным объемом костной ткани следует понимать не только фактическое отсутствие участка кости, но и изменение ее плотности – уплотнение, например, вследствие импрессионного перелома, требующего реконструктивной коррекции, а также несоответствие структурно-функциональных характеристик костной ткани – например, в области ложного сустава [210]. Трудность замещения костных дефектов может возникать как в случае ограниченных, так и неограниченных дефектов, что имеет особое значение при сочетании патологического процесса с нарушением нормальной биомеханики [18, 73, 129]. Важным аспектом восстановления костной ткани в зоне дефекта или дефицита костной ткани является правильный выбор костно-пластического материала (КПМ) для восстановления структурно-функциональных свойств кости.

Развитие тканеинженерных технологий и ортобиологии, как отдельного направления медицины позволяет создавать конструкции для костной пластики с заданными свойствами. Тканеинженерная конструкция представляет собой биомедицинский продукт, который состоит из клеток (клеточных линий), биосовместимого материала и вспомогательных веществ [88]. Биосовместимый материал может быть как биологического (например, депротеинизированные и децеллюляризованные носители), так и небиологического происхождения (полимеры, металлы и сплавы). Структурно-функциональные свойства биосовместимого материала, имитация структуры, биологических и механических характеристик влияют на пролиферацию, адгезию и миграцию активного клеточного компонента. Таким образом биосовместимые материалы перестают

быть статическими конструкциями, а присущая им ранее инертность меняется на функциональную активность [77, 214].

Степень разработанности темы исследования

При восстановлении костной ткани наиболее близким по отношению к аутокости по своим структурно-функциональным характеристикам является аллокость. Однако следует учесть, что ее свойства могут изменяться в зависимости от вида обработки [14, 99]. При этапной подготовке образцов путем их депротеинизации удаляются все иммуногенные агенты из тканей и органов, включая клетки и остаточную ДНК, сохранив при этом естественный минеральный состав и архитектуру [33, 87]. Для воздействия на вышеперечисленные механизмы остеогенеза КПМ может быть дополнен клетками после изучения, однако для этого должны быть изучены свойства основы (матрицы) как ниши для клеточного материала [33, 54]. «Ниша стволовой клетки» — термин, предложенный в 1978 г. Schofield для микроокружения стволовой клетки, необходимого для ее жизнедеятельности и координации ее поведения с нуждами организма [202]. Микроокружение, так называемая ниша, обуславливает дифференцировку, пролиферацию и миграцию клеток [46, 54, 150]. Наиболее приемлемыми для его создания являются аутологичные факторы роста и/или клеточные элементы. Для стимуляции остеорегенерации могут быть использованы мезенхимальные стволовые клетки костного мозга или жировой ткани [79, 149]. Выбор может быть обусловлен тем, что большинство методик получения клеточного материала, например, культивирование клеток на матрице в биореакторе, являются трудоемкими и ресурсоемкими, что ограничивает применение в повседневной клинической практике [64, 66, 93].

Таким образом, разработка наиболее эффективной тканеинженерной конструкции для восстановления костной ткани является востребованным направлением. Наиболее перспективным можно считать разработку и использование комбинированных тканеинженерных конструкций на основе аллокости и мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани в качестве

активного компонента с целью активации механизмов репаративного остеогенеза. Анализ литературы по теме исследования позволяет сделать заключение, что тканеинженерные конструкции для замещения костных дефектов на основе депротенизированной губчатой кости в экспериментах на животных ранее не изучались, что обуславливает актуальность данного исследования.

Цель исследования: совершенствование метода замещения костных дефектов путем использования тканеинженерной конструкции на основе депротенизированной губчатой кости.

Задачи исследования

1. Изучить структурные характеристики и элементный состав депротенизированной губчатой кости и оценить ее цитотоксичность для тестовой культуры фибробластов в эксперименте *in vitro*.

2. Изучить влияние депротенизированной губчатой кости на адгезию, миграцию и пролиферацию мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани в эксперименте *in vitro*.

3. Разработать способ создания тканеинженерной конструкции на основе депротенизированной губчатой кости для замещения костных дефектов и изучить восстановление костной ткани при её использовании по данным рентгеновской плотности в эксперименте *in vivo*.

4. Изучить замещение костного дефекта кортикальной пластины тканеинженерной конструкцией в эксперименте *in vivo*.

Научная новизна исследования

- Изучены структурные характеристики, элементный состав и цитотоксичность депротенизированной губчатой кости (способ обработки в соответствии с патентами RU 2232585 С2, RU 2223104 С2, RU 2640932 С2 в лаборатории заготовки и консервации тканей ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна»)

- Впервые изучено влияние депротенизированной губчатой кости на адгезию, миграцию и пролиферацию мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани человека в эксперименте *in vitro*.

- Разработан способ создания тканеинженерной конструкции на основе депротенизированной губчатой кости для стимуляции регенерации кости (Патент №2801471 от 09.08.2023).

- Впервые в эксперименте *in vivo* изучено замещение дефекта кортикального слоя кости тканеинженерной конструкцией.

Теоретическая и практическая значимость исследования

В ходе работы сформирован фундаментально-прикладной задел, который может быть использован для создания тканеинженерной конструкции со стромально-васкулярной фракцией жировой ткани, которая относится к минимально-манипулированным клеточным продуктам (согласно консенсусу «Минимально манипулированные клеточные продукты» от 2021г), и исключает длительный процесс выделения и обработки клеточного материала. Данные настоящего исследования в перспективе могут быть внедрены в клиническую практику (травматолого-ортопедические отделения многопрофильных больниц, клиник).

Положения, выносимые на защиту

1. Депротенизированная губчатая кость является перспективной основой для формирования тканеинженерной конструкции.

2. Использование разработанной тканеинженерной конструкции на основе депротенизированной губчатой кости со стромально-васкулярной фракцией позволяет усовершенствовать метод замещения костных дефектов за счет восстановления кости в более ранние сроки.

Апробация основных положений диссертации

Основные положения настоящего диссертационного исследования представлены и обсуждены на 9 российских конференциях и научных форумах, в том числе с международным участием:

- на международной конференции «Physics of cancer: interdisciplinary problems and clinical applications» (Томск, 2017);
- на XI Всероссийском съезде травматологов-ортопедов (Санкт-Петербург, 2018);
- на XI Всероссийской научно-практической конференции «Цивьяновские чтения» с международным участием (Новосибирск, 2019);
- на X Всероссийском съезде трансплантологов (Москва, 2020г);
- на III конгрессе «Ортобиология 2022 – От исследования к клинической практике» (Москва, 2022);
- на VI съезде травматологов-ортопедов Сибирского федерального округа (Барнаул, 2022);
- на XII Всероссийском съезде травматологов-ортопедов (Москва, 2022);
- вебинар на открытом образовательном портале для обучения врачей различных специальностей Doctor.school в системе НМО (2022);
- на IV конгрессе «Ортобиология 2023 – Patient Cases – от теории к практике» (Москва, 2023)

Публикация результатов исследования и сведения о внедрении в практику

По теме диссертационного исследования опубликовано 14 научных работ, в том числе – 4 в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, из них 4 в журналах, индексируемых в международной базе данных WoS. Получен патент на изобретение РФ №2801471 от 09.08.2023 «Способ создания

тканеинженерной конструкции для стимуляции регенерации кости». Опубликовано 1 учебное пособие.

Полученные результаты исследования используются в лекционных курсах для аспирантов и ординаторов ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, кафедры травматологии и Новосибирского государственного медицинского университета Минздрава России.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 134 страницах машинописного текста, состоит из введения, 4 глав, заключения, выводов, списка сокращений и условных обозначений, списка использованной литературы, приложения. Работа иллюстрирована 45 рисунками, 19 таблицами. Библиографический список использованной литературы представлен 232 источниками, из них 81 отечественных и 151 иностранных.

Личный вклад автора состоит в формулировке цели, задач исследования и основных положений, выносимых на защиту. Автором проанализированы зарубежные и отечественные источники литературы по проблеме исследования, методикам проведения экспериментов и обработке данных, статистического анализа. Автором выполнены хирургические вмешательства на 24 (100 %) животных, разработано объемное соотношение элементов для формирования тканеинженерной конструкции (Патент №2801471 от 09.08.2023 «Способ создания тканеинженерной конструкции для стимуляции регенерации кости»).

Диссертационная работа выполнена в процессе обучения в аспирантуре при ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России в рамках государственного задания на проведение научных исследований и разработок на тему «Разработка биомедицинских регенерирующих имплантатов для травматологии и ортопедии», номер государственной регистрации АААА-А18-118030690022-4.

ГЛАВА 1. ЗАМЕЩЕНИЕ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Общие сведения

Замещение костных дефектов в данный момент остается одной из наиболее серьезных задач травматологии и ортопедии. Причинами формирования костных дефектов могут являться как сегментарные резекции костей по поводу онкологических процессов, реэндопротезирование суставов, травмы и последствия их лечения, так и дефекты тканей, полученные в результате боевой травмы [7, 8, 11, 17, 28, 38, 55, 66, 71, 77, 96, 162, 172, 184, 188, 194, 203, 224]. Существуют различные классификации дефектов костной ткани, каждая из которых применяется в рамках конкретной патологии [11, 31, 39, 40, 63, 65, 70, 76, 77, 81, 119, 120, 123, 125, 154, 163, 193, 211, 212].

Трудность замещения костных дефектов может возникать как в случае отграниченных, так и неотграниченных дефектов, что имеет особое значение при сочетании патологического процесса с нарушением нормальной биомеханики [10, 18, 37, 73, 75, 76, 129]. Дефекты, возникшие как следствие травмы на этапе неотложной помощи, замещаются по мере экстренной необходимости с целью наименьшей травматизации пострадавшего [10, 38, 45]. Таким образом, в большинстве случаев пластика костного дефекта относится к плановому хирургическому вмешательству. При этом плановое хирургическое лечение, например с целью резекции костных новообразований, относится к особенной категории, поскольку объем и планирование данных вмешательств обусловлено жесткими требованиями норм абластичности [74, 142, 195]. Применение костной пластики в данных условиях выполняет не только функцию биомеханической стабилизации, но и способно послужить носителем фармацевтических препаратов [62]. В данных условиях применение технологий регенеративной медицины с применением стромальных клеток крайне ограничено и многие исследователи рекомендуют воздержаться от их применения [153, 187]. Однако в ближайшие десятилетия именно применение клеточных технологий может способствовать

созданию направленных клеточных линий или производства экзосом, которые бы способствовали ликвидации новообразований на дотканевом уровне [60, 69, 104, 109, 165, 208].

Под утраченным объемом костной ткани следует понимать не только фактическое отсутствие участка кости, но и изменение ее плотности – уплотнение, например, вследствие импрессионного перелома, или же несоответствие структурно-функциональных характеристик костной ткани – например, в области ложного сустава [17, 210].

Длительность лечения пациентов с костными дефектами варьирует от 6–8 месяцев до двух-трех лет, а в 6–8 % случаев заканчивается стойкой инвалидностью, что влечет за собой экономические затраты. Соответственно проблема замещения дефектов костной ткани имеет не только медицинскую, но и социальную значимость [31, 33]. Применение костной пластики для восстановления дефекта костной ткани приводит к восстановлению биомеханических векторов распределения нагрузки, влияет на реваскуляризацию поврежденной области и способствует скорейшему восстановлению костной ткани [31, 33, 77, 230].

Таким образом, важным аспектом регенерации в зоне дефекта или дефицита костной ткани является правильный выбор КПМ для восстановления структурно-функциональных свойств кости. Планирование реконструктивных вмешательств предполагает выбор необходимых материалов и технологий замещения дефекта, в том числе с использованием технологий регенеративной медицины [26, 27, 29, 36, 38, 56, 92, 95, 104, 112, 124, 141].

1.2 Материалы для замещения костных дефектов

Разнообразие представленных на территории России материалов для костной пластики отечественного и зарубежного производства ставит перед хирургами вопрос выбора материала, оптимального для определенной клинической ситуации. Существует большое количество публикаций с

характеристиками отдельных материалов, но зачастую они подготовлены сотрудниками фирм-производителей и носят рекламный характер. При этом следует заметить, что материал для костной пластики при реконструктивно-восстановительных операциях в травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии, костной онкологии отличается по происхождению [32, 33, 128, 230, 213, 221, 231]. На сегодняшний день ведущими КПМ являются ауто- и аллотрансплантаты костной ткани, также могут использоваться ксеногенные и синтетические материалы [33, 63, 77, 221].

В качестве золотого стандарта для замещения дефектов используют аутоотрансплантат [28, 33, 77]. Кость как объект трансплантации является предпочтительной, поскольку применение костной ткани и материалов, изготовленных на ее основе, создает необходимые условия для биологического восстановления кости как органа [77]. Однако при потребности замещения дефектов более 4см³ уже возникают затруднения, поскольку аутологичная костная ткань может быть недоступна в необходимом количестве [3, 98, 163]. Более того, при заборе аутоотрансплантата, помимо послеоперационного болевого синдрома, с разной вероятностью могут возникать осложнения в месте забора трансплантата, такие как хронический болевой синдром (3,1 %) в области донорского места, нарушение походки после операции (45,7 %) и в отдаленном периоде (1,5 %), гематома (2,2 %), серома (2,0 %), риск инфицирования (1,0 %), формирование гипертрофических и болезненных рубцовых нарушений кожи (9,1 %), острые (17,8 %) и хронические (1,4 %) неврологические нарушения, в том числе возможны осложнения в виде перелома донорской кости (1,2 %) [94, 102, 133, 196, 215].

В настоящее время исследователями предпринимаются попытки решения проблем восстановления костной ткани посредством использования костно-замещающих материалов как биологического, так и небιологического происхождения, композиционных и 3D-материалов. Характер процессов регенерации в значительной мере определяется свойствами материалов, используемых для заполнения дефектов кости [33, 72, 113]. На данный момент

регенеративная медицина предлагает создание КПМ, различающихся по своему физическому состоянию: твердые и жидкие (в том числе, гели).

Репаративный остеогенез – многокомпонентный процесс, основными составляющими которого являются дифференцирование клеток, их пролиферация, резорбция погибшей кости и новообразуемой кости при ее ремоделировании, формирование органического внеклеточного матрикса, его минерализация [25, 26, 29, 50, 147, 218]. Одной из важных проблем замещения костной ткани, как уже отмечено, является необходимость васкуляризации всего трансплантата, поскольку из-за отсутствия соответствующей микроциркуляции не происходит восстановления кости. Таким образом, размер КПМ и его васкуляризация имеют решающее значение для жизнеспособности тканей, функции окружающих сухожилий и нервов [31, 33, 116, 134, 180]. Помимо стандартных параметров, необходимых для остеогенеза, существует не менее важный фактор – влияние нервной системы. Симпатическая нервная система радикальным образом влияет на регенерацию костной ткани, обуславливая ее плотность, скорость репаративных процессов, активность остеобластов и остеокластов [57, 116]. Частично такой эффект объясняется гипотезой о наличии у клеток β_2 -адренорецепторов [116]. Поэтому наличие аутологичного клеточного материала может также влиять на эффективность восстановления костной ткани.

В дополнение к свойствам, описанным ранее, огромную роль играет стабильность установленного КПМ. Поскольку стабильность установки прямо влияет на частоту возникновения инфекционных осложнений и скорость репаративных процессов. В случае нестабильности конструкции возникает раздражение окружающих тканей, вызывающее воспалительный процесс, болевой синдром и другие клинические симптомокомплексы [28, 85, 201]. Возникающий воспалительный процесс может привести к полной резорбции КПМ, нарушению его целостности и, как следствие, биомеханической нефункциональности целого сегмента.

Современной тенденцией развития медицины является развитие технологий регенеративного направления и разработка модифицированных материалов с

улучшенными и заданными свойствами — остеопластические материалы перестали быть статическими конструкциями, а присущая им ранее инертность сменилась функциональной активностью [77]. Таким образом, возникает понятие «тканеинженерная конструкция». К основным требованиям, которыми должны обладать такие конструкции, относят способность имитировать структуру и биологические функции утраченного органа или его части [41]. Любая тканеинженерная конструкция имеет в своем составе клеточный материал или продукт и материал основы [88]. Основание тканеинженерной конструкции, так называемая матрица, в контексте регенеративной медицины означает любой материал как биологического (например, депротенинизированные и децеллюляризированные носители), так и небιологического происхождения (биосовместимые полимеры, металлы и сплавы). Структурно-функциональные свойства основы тканеинженерной конструкции, в свою очередь, определяют пролиферацию, адгезию и миграцию клеточного материала, используемого в качестве активного компонента. Именно поэтому для достижения целей реконструктивной хирургии важно использовать наиболее подходящий материал с описанными характеристиками.

1.2 Ауто- и аллотрансплантаты костной ткани

Золотым стандартом для выполнения костной пластики является аутоотрансплантат. Он считается наиболее приемлемым материалом по причине полного соответствия тканям пациента, задействует максимальное количество механизмов регенерации. Тем не менее возможность применения аутоотрансплантата ограничена его максимальным объемом и индивидуальными особенностями пациента в плане психологической подготовки, выраженностью болевого синдрома в области донорского места, наличием сопутствующей патологии, влияющей на качество костной ткани [77, 31, 94, 194].

В качестве альтернативы костным аутоотрансплантатам наиболее подходящими по своим свойствам и происхождению являются

аллотрансплантаты после различных видов обработки. Депротеинизация, в некоторых научных школах децеллюляризация, является методом, позволяющим удалить все иммуногенные агенты из тканей и органов, включая клетки и остаточную ДНК, сохранив при этом естественный состав и архитектуру минерального компонента внеклеточного матрикса для наиболее эффективного применения аллогенной костной ткани [77, 13, 31, 92]. Аллогенный материал сочетает оптимальные свойства для регенерации костной ткани, однако при его изолированном использовании не задействованы два процесса регенерации кости: остеобластический и стимулированный остеогенез [77, 31]. Воздействие на эти процессы позволило бы полноценно имитировать аутогенную костную ткань, а также избежать ограничений по объему доступного материала.

Костные аллотрансплантаты используются по причине своей доступности: их применяют в виде малых фрагментов, целых подпорок, сегментарных участков, костно-хрящевых трансплантатов и композиционных материалов на их основе. Аллотрансплантаты могут быть получены от живых или умерших доноров. Регенерация костной ткани и перестройка КПМ осуществляются при участии костного ложа реципиента и окружающих мягких тканей, за счет оппозиционного роста костных балок от периферии к центру дефекта путем так называемого «ползучего замещения».

Результаты многих исследований подтверждают, что механические свойства костной ткани зависят не только от плотности ткани, но и от структурных параметров, которые определяют организацию костной ткани [46 82]. Так, губчатое вещество кости представляет собой трехмерную сеть костных балок различной формы, размера и ориентации. Поэтому при выполнении костной пластики КПМ из губчатой костной ткани применяются наиболее часто.

Кортикальные аллотрансплантаты в основном используются в качестве костной соломки, структура трансплантата предполагает большую механическую прочность, что важно при попытке восстановить опороспособность и проприорецепцию всего сегмента.

Для аллогенной костной ткани структурные отличия от аутокости также обусловлены процессом ее заготовки [61]. Для исключения аллергических реакций и реакций несовместимости у реципиента костная ткань донора подвергается предварительной химической обработке: деминерализации или депротеинизации. Данные процедуры позволяют получить деминерализованную костную ткань, лишенную минерального компонента, и депротеинизированную костную ткань, не содержащую органический компонент [77, 13, 31, 61]. Соответственно предварительная химическая обработка и стерилизация могут привести к изменению структуры и свойств нативной аллогенной костной ткани. Это может повлиять на прогноз восстановления костной ткани в зоне дефекта после имплантации материала в живой организм.

С целью сравнения ауто- и аллотрансплантатов костной ткани в соответствии с их структурой исследователями были оценены их свойства [32]. Основными параметрами для сравнения были выбраны остеоиндуктивность, остеокондуктивность и устойчивость к механическим нагрузкам (прочность) (Таблицы 1, 2).

Таблица 1 – Свойства аутологичных костных трансплантатов [32]

Свойства	Губчатая аутокость	Неваскуляризированная кортикальная аутокость	Васкуляризированная кортикальная аутокость
Остеокондукция	++++	+	+
Остеоиндукция	++	+/-	+/-
Остеопрогениторные клетки	+++	-	++
Прочность сразу после операции	-	+++	+++
Прочность через 6 мес.	++	++/+++	+++
Прочность через 12 мес.	+++	+++	+++

Таблица 2 – Свойства аллогенных костных имплантатов [32]

Аллоимплантаты	Механические свойства	Остеокондуктивность	Остеоиндуктивность
Губчатый	+/-	++	+
Кортикальный	+++	++	+/-
Деминерализованный	--	+	+++

Gharedaghi в своих исследованиях показал, что применение аллотрансплантатов для замещения массивных костных дефектов практически не отличается от применения аутокости [126]. К схожим выводам пришли и другие авторы [90, 105, 115, 121, 131, 136, 137, 143, 166, 219, 223]. Сообщается об удовлетворительных результатах применения аллокости в ортопедической онкологии у пациентов детского возраста, при этом описывается случай массивной резорбции всего трансплантата [131, 132, 166].

В случае замещения нагружаемого участка кости аллотрансплантат показал себя недостаточно прочным, а его выживаемость в диапазоне от 5 до 10 лет составила 75–83 % [90].

В случае тяжелого поражения кости с включением в процесс сустава вместе с его тотальной резекцией показано выполнение эндопротезирования [28, 48, 72, 84, 156, 159, 179, 198, 199]. Müller et al. в таких случаях предлагают дополнительно использовать аллокость, которая восполняет утраченный объем костной ткани [179]. Имеются данные, подтверждающие эффективность методики Müller et al., приведены положительные результаты такого лечения. Nakamura описывает применение комбинированной с аллокостью техники эндопротезирования с успешным восстановлением пациентов после операции [182].

Некоторые авторы пишут о преимуществах комбинированного использования ауто- и аллотрансплантата, объясняя положительные результаты исследования тем, что ауто-трансплантат уже имел в своей структуре остеогенные и стромальные клетки, обеспечивающие эффект стимуляции остеорегенерации, что особенно важно при заполнении больших дефектов [89, 115, 158].

Gouron в своем исследовании показал, что особенно деликатного подхода требуют пациенты детского возраста, в этих случаях четко должны быть определены показания для использования трансплантата того или иного типа [131]. А при лечении крупных дефектов кости, особенно при поражении области, подверженной высокой нагрузке, важным является применение методики с использованием поддерживающей и отграничивающей структуры по типу

мембраны. Такой подход позволяет моделировать форму будущего регенерата. Анализируя результаты другого исследования, Gouron et al. отметили осложнения в качестве несращения дефекта у 35 % больных, которые в дальнейшем были корригированы [132]. Среди пациентов детского возраста авторы описали единичный случай тотальной резорбции аллотрансплантата.

О возможностях использования аллогенного материала при восполнении костных дефектов позвоночника единым блоком сообщают Glennie et al. [130]. При реконструкции дефекта более чем на одном уровне авторы рекомендуют использование аллотрансплантата или его комбинацию с кейджем — полый каркасной вставкой между телами позвонков, относящейся к металлоконструкциям.

При невозможности использования алло- и аутогенных трансплантатов некоторые авторы предпочитают аппаратное вытяжение конечности, нежели использование каких-либо КПМ. Основными положительными факторами такого метода являются его доказанная временем эффективность, стабильность и регулируемость процесса регенерации кости [6, 155]. Остеосинтезу с металлоконструкциями отдают предпочтение Bus et al., несмотря на собственные удовлетворительные результаты использования аллокости, объясняя это тем, что при использовании аллогraftов для замещения дефекта более 15 см³ возрастает частота осложнений [103].

1.3 Ксеногенные и синтетические костно-пластические материалы

Одними из самых доступных являются ксеногенные и синтетические материалы, за счет чего их используют в качестве медицинского изделия в клиниках по всему миру.

Ксеногенные КПМ представляют собой ткани, взятые от других видов. В настоящий момент для реконструктивных вмешательств при заполнении дефектов кости используют материалы на основе бычьей или свиной кости, природного коралла. КПМ на основе бычьей или свиной кости получают путем

удаления из нее органических веществ. Структура такой кости схожа с человеческой и в стерильных готовых медицинских изделиях представляет собой скелетный гидроксиапатит с наличием естественной пористой структуры, что важно для восстановления костной ткани [33, 100]. КПМ на основе природного коралла представляют собой кремнийсодержащий костный заменитель на основе кораллового гидроксиапатита [22, 47, 207, 209, 222]. Данный материал обладает высокой пористостью, но архитектура и прочностные свойства отличаются от таковых у человека [32, 47, 209].

Синтетические КПМ являются химическим аналогом костного минерала и представляют собой материалы на основе синтетического гидроксиапатита, биостекла, стеклокерамики и др. Однако их монолитные образцы способствуют формированию вокруг себя соединительно-тканной капсулы, а пористые формы имеют неконтролируемые сроки рассасывания или инкапсулирования [32, 47, 209].

Ксеногенные, синтетические КПМ воздействуют на остеокондуктивный остеогенез, поэтому для расширения регенеративных возможностей многие производители ввели форму в виде их смеси с аллотрансплантатом, в том числе в виде пасты или цемента [33, 62, 169]. Так создают композиционные КПМ.

1.4 Клеточный компонент регенерации костной ткани. Использование жировой ткани

В качестве наиболее перспективного клеточного компонента для регенерации костной ткани на протяжении двух последних десятилетий активно изучаются стромальные клетки [1, 49, 52, 57, 147, 151, 218]. Мезенхимальные стромальные клетки (МСК) из костного мозга и из жировой ткани остаются в центре внимания большинства исследований из-за врожденного потенциала этих клеток дифференцироваться в различные типы тканей [43, 147]. При этом учитывается то, что для восстановления костной ткани основное значение имеет остеогенный потенциал данных клеточных культур [50, 139, 147, 189, 218]. По

данным одних специалистов, остеогенный потенциал МСК костного мозга (МСК КМ) и МСК жировой ткани (МСК ЖТ) практически не отличаются [111, 167, 176], по данным других – остеогенный потенциал МСК КМ и МСК надкостницы выражены значительно, чем МСК ЖТ [140, 148]. При этом в сравнительном исследовании указывается на то, что выход стволовых клеток и способность к пролиферации у МСК ЖТ выше, чем у МСК КМ [147, 152]. Многие авторы также приводят данные выраженной вариабельности культур МСК КМ в зависимости не только от места, но и от гормональных и стрессовых факторов, вводимых препаратов, изменения биохимических параметров крови [106, 147, 220, 232]. Также при использовании МСК обязательно стоит учитывать, что процедуры культивирования материала на скаффолде в специальном биореакторе являются относительно трудоемкими и дорогостоящими [64, 189, 190].

Kozłowska et al. установили, что для МСК ЖТ проангиогенные свойства оказались выше, чем для МСК КМ, однако данные свойства со временем значительно снижаются для всех МСК. В результате исследователи пришли к выводу, что с целью сохранения терапевтической эффективности клеток МСК не должно быть периода культивации, а клеточный материал должен быть использован сразу после его выделения [160]. При этом в некоторых исследованиях отмечены предпосылки МСК ЖТ к большей коррекции воспалительных процессов [146, 216, 226].

Авторами описано, что жесткость конструкции может определять направление дифференцировки МСК. На мягких субстратах преимущественно происходят адипогенная и нейрогенная дифференцировка, на жестких – миогенная, хондрогенная и остеогенная [46, 54].

1.5 Тканеинженерные конструкции в костной пластике

К основным требованиям, которыми должны обладать любые материалы для восстановления тканей, относят способность имитировать структуру и биологические функции утраченного органа или его части, способность

обеспечения механической поддержки, дифференцировки и пролиферации клеток для управления структурой и функцией формирующейся ткани [41]. Необходимо соответствие костно-замещающего материала биомеханическим параметрам в зоне хирургической реконструкции кости. Под предпочитаемыми биомеханическими свойствами трансплантата подразумевается устойчивость к нагрузкам. Так, например, проблему представляет замещение сегментарных костных дефектов, когда нормальная биомеханика нарушена, и структурная стабильность кости как органа может быть поставлена под угрозу [129, 134, 139].

Запросы практической хирургии эффективности восстановления костной ткани и ее надежности потребовали создания принципиально новых конструкций. Это изделия, относящиеся к регенеративным технологиям, а именно тканеинженерные конструкции, полноценно имитирующие аутогенную костную ткань в необходимом объеме [27, 113, 229]. Изделия, пригодные для замещения значительных по площади костных дефектов, – современный и последовательный этап в развитии реконструктивно-пластических материалов. Такие конструкции должны обладать следующими свойствами: сохранением физических и анатомических особенностей донорской кости, высокой прочностью, быстрой фиксацией в зоне имплантации и регенераторным потенциалом [36, 41]. Этим требованиям может удовлетворять тканеинженерная конструкция на основе жесткой и относительно упругой матрицы, содержащая клеточный материал в виде собственных клеток реципиента, которые способны делиться, дифференцироваться и синтезировать межклеточный матрикс для поддержания их жизнеспособности [36, 41, 79, 229].

Важным и перспективным направлением в настоящее время можно считать разработку и использование комбинированных тканеинженерных конструкций на основе аллокости в качестве матрицы для МСК с целью моделирования регенеративного потенциала патологически измененной костной ткани [36, 38, 92, 112, 141, 147, 173, 200, 217, 225, 228]. В случае использования тканеинженерной конструкции возможно задействовать все механизмы процесса регенерации

костной ткани: остеобластический, остеоиндуктивный, остеокондуктивный и стимулированный остеогенез [33, 107, 108, 118, 127, 138, 161, 171, 183, 192].

Анализ литературы по теме исследования позволяет сделать заключение, что тканеинженерные конструкции для замещения костных дефектов на основе депротенизированной губчатой кости (ДПК) в экспериментах на животных ранее не изучались, что обуславливает актуальность данного исследования.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Планирование исследования

Все процедуры и манипуляции, выполняемые в ходе данного исследования, рассмотрены и утверждены этическим комитетом ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России на предмет соответствия этическим принципам, протокол исследования *in vitro* одобрен локальным этическим комитетом и утвержден ученым советом ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России. Для проведения настоящей работы использован мультиметодный подход, исследование было запланировано и проведено в три этапа (Таблица 3).

На первом этапе при помощи набора физических и оптических методик определили структуру, микроэлементный состав ДПК человека. При помощи стандартных методик определяли цитотоксичность костных образцов. В качестве тестовых культур использовали стерильные культуры дермальных фибробластов человека (ДФЧ).

На втором этапе в эксперименте *in vitro* использовали комплекс культуральных методик для изучения влияния ДПК на адгезию, миграцию и пролиферацию МСК ЖТ человека на образцах. Были использованы 24 блока КПМ.

На третьем этапе смоделировали эксперимент *in vivo* с использованием лучевых инструментальных методов и морфологических методов. Исследование осуществляли на кроликах линии NZW. Все исследования были проведены в соответствии с международными принципами Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (1964 г.) и Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 19.03.2003 г. № 226).

Таблица 3 – Планирование и построение дизайна исследования

Дизайн экспериментального исследования		
I	II	III
– изучение структуры и микроэлементного состава ДПГК человека; – изучение цитотоксичности ДПГК	– изучение <i>in vitro</i> адгезии, миграции и пролиферации МСК ЖТ человека на ДПГК человека; – изучение <i>in vitro</i> жизнеспособности МСК ЖТ человека на губчатой ДПГК человека	– изучение <i>in vivo</i> восстановления костной ткани при использовании ДПГК человека в качестве основы тканеинженерной конструкции, и стромально-васкулярной фракцией жировой ткани кролика в качестве клеточного материала
Комплекс используемых методов		
– физические методы: <ul style="list-style-type: none"> • методики определения структуры КПМ; • методики определения микроэлементного состава; – культуральные методы: <ul style="list-style-type: none"> • метод культивирования клеточного материала для МТТ-теста; • МТТ-тест на цитотоксичность 	– культуральные методы: <ul style="list-style-type: none"> • методики культивирования клеточного материала; • методики окраски и визуализации клеток; • морфометрические методики 	– метод лучевой диагностики: <ul style="list-style-type: none"> • МСКТ; – экспериментальный метод <i>in vivo</i> <ul style="list-style-type: none"> • методики оперативного вмешательства; – морфологический метод исследования: <ul style="list-style-type: none"> • методики окраски и визуализации материала; • морфометрия
Статистическая обработка полученных результатов		

Все исследования на животных проводили в помещениях, разрешенных для этих целей компетентными национальными учреждениями и соответствующих требованиям обращения с лабораторными животными. Исследование соответствует международным стандартам проведения лабораторных исследований и требованиям ISO 10993-2 [2, 191].

2.2 Материал исследования

Материалом исследования являлись фрагменты губчатой костной ткани головки бедренной кости (ДПК-ГБК) человека, резецированной по медицинским показаниям и после комплексного обследования на гемотрансмиссивные инфекции, с согласия пациента. Каждый образец был подвергнут многоэтапной последовательной обработке — механической и физико-химической децеллюляризации и депротеинизации с последующей радиационной стерилизацией (RU 2232585 С2, RU 2223104 С2, RU 2640932 С2) в лаборатории заготовки и консервации тканей ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» (Рисунок 1).



Рисунок 1 – Образец костного блока ДПК-ГБК

В работе использовали 20-ть срединных смежных распилов площадью $1,0 \text{ см}^2 \pm 5\%$ и толщиной $0,4 \text{ см} \pm 5\%$ - для исследования пористости костной ткани и ее элементного состава, и по 10-ть фрагментов кубической формы, $1,0 \text{ см}^3$ - для проведения МТТ-теста на цитотоксичность и исследования свойств МСК-ЖТ. По 4 фрагмента для разработки способа создания тканеинженерной конструкции.

Для изучения замещения дефекта костной ткани в эксперименте *in vivo* КПМ использовали в виде фрагментов в соответствии с размерами костного

дефекта. Фрагменты составляли 2×5 мм по ГОСТу ISO 10993-6-2011, действующему до 01.03.2022 г., и 10993-6-2021 (принятому) приложение С, актуальному на момент проведения экспериментальной работы. Форма фрагмента ДПК-ГБК — цилиндрическая, обеспечивает его стабильное неподвижное расположение в участке имплантации.

Исследование выполнено на 24 кроликах линии NZW (New Zeland White). Сформировано 3 группы исследования: группа № 1 (контрольная) — хирургическое моделирование в участках диафиза контралатеральной бедренной кости костных дефектов без замещения, аналогичных группам исследования; группа № 2 — хирургическое моделирование костного дефекта диафиза бедренной кости с замещением фрагментами депротенизированной губчатой кости; группа № 3 — хирургическое моделирование костного дефекта диафиза бедренной кости с его замещением фрагментами депротенизированной губчатой костью совместно со стромально-васкулярной фракцией жировой ткани согласно технологии ACP SVF (Патент US10512659B2). Животных выводили из эксперимента способом передозировки эфирного наркоза на 2, 4 и 6-й неделе послеоперационного периода. В стандартных условиях осуществляли забор операционного материала для последующей лучевой диагностики (МСКТ) и гистологической оценки местного влияния костно-замещающих материалов на живые ткани и реализацию репаративного остеогенеза в области замещения костных дефектов.

Материал для лучевой диагностики и гистологического исследования при ортопедической имплантации образцов в эксперименте in vivo: участок бедренной кости области заполнения костных дефектов в сроки 2, 4 и 6-й недели после операции. Для ***гистологического исследования*** образцы фиксировали в 10 % нейтральным забуференным раствором формалина в течение 72 ч, с последующей декальцинацией в растворе Рихмана – Гельфанда – Хилла в течение 10 суток при температуре 20 °С.

В качестве тестовой культуры для оценки цитотоксичности ДПК-ГБК с помощью МТТ-теста использовали стерильную культуру дермальных

фибробластов человека (ДФЧ) полученную методом тканевых эксплантатов [78, 178]. Каждый пациент, предоставивший свой материал для подготовки клеточных культур, дал информированное добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Использовали биоптаты патологически неизменной кожи (фрагменты неостребованной после косметических операций кожи размером до 1 см²) от пациентов с отрицательными результатами исследований на RW, гепатиты В и С, и ВИЧ-инфекцию и отсутствием в анамнезе онкологических заболеваний, туберкулеза и заболеваний кожи. В качестве тестовой культуры использовали культуру ДФЧ 4-5 пассажа, полученную в лаборатории биотехнологий университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. Культура была стерильна, микоплазмами и вирусами не контаминирована. Жизнеспособность клеток в культуре перед вводом в эксперимент составляла 97 %.

С целью изучения адгезии, миграции и пролиферации МСК-ЖТ человека на образцах ДПК-ГБК в эксперименте *in vitro* использовали стерильную культуру 3 пассажа. Для получения МСК-ЖТ использовали образцы подкожно-жировой клетчатки человека, неостребованные после косметических операций. Каждый пациент, предоставивший свой материал для подготовки клеточных культур, дал информированное добровольное информированное согласие на участие в исследовании. Пациенты имели отрицательные результаты исследований на RW, гепатиты В и С, и ВИЧ-инфекцию, в анамнезе отсутствовали онкологические заболевания и туберкулез. В эксперименте *in vitro* использовали суспензию МСК-ЖТ 3-го пассажа в концентрации 2×10^6 /мл

В эксперименте *in vivo* в качестве клеточного компонента тканеинженерной конструкции получали стромально-васкулярную фракцию (SVF) из жировой ткани дорсальной поверхности шеи кролика породы NZW. Описано, что количество клеток SVF, которые могут быть выделены из подкожной жировой ткани, составляет приблизительно $0,5-2,0 \times 10^6$ клеток на грамм жировой ткани, при этом процентное содержание стволовых клеток колеблется от 1 до 10 % [91, 185]. Жировую ткань кролика породы NZW,

забирали из области дорсальной поверхности шеи животного, паравертебрально между лопатками и параллельно линии остистых отростков позвонков в объеме 2 мл. Выделенная из жировой ткани и обработанная по стандартной методике SVF жировой ткани использовалась для создания тканеинженерной конструкции на основе ДПК-ГБК с последующей ортотопической имплантацией.

2.3 Физические методы исследования

Изучение структуры и микроэлементного состава ДПК-ГБК

Оценку структурных характеристик образцов ДПК-ГБК осуществляли на металлографическом инвертированном микроскопе «Альтами МЕТ 1МТ» (Россия, Санкт-Петербург) в светлом и темном полях, а также методом поляризации. Определяли параметры пор всех образцов ДПК-ГБК по фотоизображениям, полученным посредством макрофотосъемки при различной глубине фокуса и рассчитывали общую пористость (раздел работы выполнен в лаборатории физики наноструктурных биоконпозитов ФГБУН «Институт физики прочности и материаловедения» СО РАН). Общая пористость (P) рассчитывается как отношение суммарной длины отрезков, попадающих на поры, к общей длине секущих линий и выражается следующей формулой (1):

$$P = \frac{\sum l}{\sum L_1} 100\%, \quad (1),$$

где L_1 – общая длина секущих в условных единицах измерительного прибора, l – длина отрезков секущих, попадающих на поры.

Для определения элементного состава образцов ДПК-ГБК использовали последовательный волнодисперсионный рентгенофлуоресцентный спектрометр Lab Center XRF-1800 (Япония).

2.3 Культуральные методы исследования

Методика выделения и культивирования культуры ДФЧ для проведения МТТ-теста на цитотоксичность

Для получения клеточной культуры ДФЧ использовали метод тканевых эксплантатов [78, 178]. Биоптаты патологически неизменной кожи забирали в стерильных условиях операционной во флаконы со стерильной ростовой средой 199 с добавлением 1 % раствора антибиотиков (пенициллин/стрептомицин). Работа с исходным материалом и клеточными культурами проходила в культуральном боксе в условиях ламинара. Образцы кожи промывали средой с антибиотиками (среда 199; 1 % пенициллина/стрептомицина для культур клеток), очищали от подкожно-жировой клетчатки и подвергали ферментативной обработке. Использовали холодовую трипсинизацию (трипсин 0,25 %) в течение 18ч при температуре 4 °С. После ферментативной обработки кусочки кожи механически измельчали до размеров 0,1 см² и в шахматном порядке раскладывали в культуральные флаконы Costar 25 см².

В качестве культуральной среды использовали среду ДМЕМ с добавлением 1 % антибиотиков, 2 % глутамина и 10 % телячьей эмбриональной сыворотки. Все реактивы и среды, использованные в работе, фирмы ООО «НПО ПанЭко» (Россия); разовый стерильный культуральный пластик Costar (США). Культивирование проходило в условиях СО₂-инкубатора при 5 % СО₂, температуре 37 °С, абсолютной влажности. По достижении субконфлюэнтного монослоя (80 %) осуществляли пересев клеток. Ежедневный контроль формирования монослоя и стерильности культуры клеток осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI 3000 В (Германия). Контрольное исследование культуры клеток на контаминацию микоплазменную и вирусную (вирусы герпеса, цитомегаловирус, вирус Эпштейн-Барр) осуществляли методом полимеразой цепной реакции (ПЦР) с использованием системы Rotor-Gene 6000 (Австралия) и наборов реагентов ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора. Для проведения МТТ-теста на цитотоксичность использовали культуры ДФЧ на 4–5 пассаже.

Методика определения цитотоксичности материала

Для оценки цитотоксичности материала использовали стандартный *MTT-тест* [178]. Испытуемые образцы заливали средой ДМЕМ с 1 % антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) и 2 % телячьей эмбриональной сыворотки на 1 и 7 суток для получения экстракта и помещали в CO₂ инкубатор при стандартных условиях. Через 1 или 7 суток экстракт над образцами отбирали. Клетки дермальных фибробластов человека 4–5 пассажа в концентрации 1×10^5 /мл засеивали на лунки плоскодонного 96 луночного планшета в среде ДМЕМ с 1 % антибиотиков и 10 % инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки и культивировали при 37 °С, 5 % CO₂ и абсолютной влажности в течение 3 дней. После 3 дней культивирования ростовая среда над клетками заменялась экстрактом от образцов в различной концентрации (1:1; 1:2; 1:4) по 8 лунок для каждой.

Через 24 ч культивирования с экстрактом среда в лунках заменялась раствором МТТ и клетки инкубировались с МТТ еще 4 ч. Раствор МТТ готовился в концентрации 1 мг/мл в сбалансированном растворе Хенкса. Через 4 ч инкубации супернатант отбирали, добавляли ДМСО (200µl), после чего регистрировали оптическую плотность при 540 нм на анализаторе Sunrise (Австрия). Относительную интенсивность роста (ОИР) клеток определяли по следующей формуле (2):

$$\text{ОИР (\%)} = \frac{\text{средняя ОП в тестовой культуре}}{\text{средняя ОП в контроле}} \times 100 \quad (2),$$

где ОП – оптическая плотность.

Полученные данные выражали ОП в условных единицах, ОИР в процентах. Затем данные оценивали, ориентируясь на ранговую шкалу оценки цитотоксичности (Таблица 4). Ранговая оценка проводилась в соответствии со стандартом ГОСТ ISO 10993-5-2011, а также со стандартом GB/T 16886.5-2003 (2017), на который ссылаются зарубежные источники [178, 204]. Таким образом,

уровень цитотоксичности 0 и 1 соответствует нетоксичным материалам, 2–5 – цитотоксичным.

Таблица 4 – Шкала оценки цитотоксичности

Относительная интенсивность роста (ОИР), %	Уровень цитотоксичности (GB/T 16886.5-2003)	Значение	Уровень цитотоксичности (ГОСТ ISO 10993-5-2011)	Значение
100	0	Не цитотоксичный	0	Не цитотоксичный
75–99	1	Минимальная цитотоксичность		
50–74	2	Легкая цитотоксичность	1	Легкая цитотоксичность
25–49	3	Умеренная цитотоксичность	2	Средняя цитотоксичность
1–24	4	Значительная цитотоксичность	3	Значительная цитотоксичность
0	5	Выраженная цитотоксичность		

Методика выделения и культивирования мультипотентных МСК ЖТ

Образцы подкожно-жировой клетчатки получали в стерильных условиях с последующей тщательной многократной обработкой стерильным раствором Хенкса с антибиотиками (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) для удаления примеси крови и помещали в стерильные пробирки объемом 50 мл. В качестве транспортной среды использовали фосфатно-солевой буфер (PSB, Gibco) и при температуре +4 °С. Клетки из жировой ткани выделяли с помощью механической дезагрегации и тепловой ферментативной обработки 0,2 % раствором коллагеназы 1 типа (Sigma) в течение часа. Культивирование проводили в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С и абсолютной влажности. В качестве ростовой среды использовали среду α -MEM (Sigma, США) с добавлением антибиотиков (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина), 2 % глутамина и 20 % ТЭС (Gibco), культуральные флаконы Costar (США). После формирования субконфлюэнтного монослоя (70–80 %) культуру пересеивали. В эксперименте использовали культуру клеток 3 пассажа.

Методика визуализации нативной культуры

Визуализацию нативной и окрашенной культуры проводили с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI 3000B (Leica Microsystems, Германия) с программным обеспечением визуализации изображений LAZ. V. 3.4 (Leica Microsystems, Германия) и возможностью фотофиксации и видеоархивирования. Для оценки характера монослоя использовали увеличение 5x10x. Для исследования морфофункционального состояния клеток использовали увеличение 10x10x, 20x10x и метод фазового контрастирования.

Методика определения концентрации клеток и количества жизнеспособных клеток в культуре

Концентрацию клеток подсчитывали в камере Горяева. В каждой серии использовали данные, полученные при подсчете не менее чем в четырех камерах. Кроме того, подсчет концентрации клеток дублировали с помощью счетчика клеток Countess II FL Automated Cell Counter (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Долю мертвых клеток в культуре определяли с использованием исключающей окраски трипановым синим.

Методика определения дифференцировочного потенциала МСК

Дифференцировочный потенциал клеток оценивали на культурах клеток 3-го пассажа. Для проведения дифференцировки применяли набор Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R and D systems, США). В качестве специфических красителей использовали Oil Red (Sigma, США) – для окраски липидных вакуолей, ализариновый красный (Sigma, США) – для выявления солей кальция в процессе дифференцировки в остеобласты, хондрогенную дифференцировку оценивали по образованию в среде специфических шариков (pellet) и отложению коллагена 2-го типа с помощью антител к коллагену 2-го типа (polyclonal antibody to Collagen II, Abcam, ab34712).

Методика определения фенотипа МСК

Фенотип клеток определяли с использованием панели моноклональных антител CD 90 Fitc, CD 105PE, CD 73PE, CD 44 Fitc, CD 10 PC7, CD 45 PC5, CD 14PC5, CD HLA-DRPC7 (Becton Coulter, США) с соответствующими

изотипическими контролями. Исследования проводили на цитофлуориметре BD FACS CANTO II, (Becton Dickinson, США). Результаты выражали в процентах, как долю клеток экспрессирующих соответствующий маркер от общего количества клеток.

Методика определения адгезии клеток и жизнеспособности МСК ЖТ при культивировании на образцах ДПК-ГБК

Для определения адгезии и жизнеспособности клеток на поверхности образцов суспензию МСК ЖТ 3-го пассажа в концентрации 2×10^6 /мл засеивали на поверхность образцов в небольшом объеме среды. Через 2–3 мин после введения клеточной суспензии добавляли ростовую среду до общего объема 2 мл с целью полного погружения образцов с клетками в среду и инкубировали в CO₂-инкубаторе при стандартных условиях. Контроль роста культуры осуществляли в течение 96 ч с видеоархивированием каждые 24 ч. Смену ростовой среды проводили каждые 48 ч. Культивирование и контроль роста культуры клеток осуществляли в течение 96 ч с видеоархивированием каждые 24 ч. Через 24, 48 и 96 ч культивирования часть образцов отбирали для исследования методом флуоресцентной микроскопии, который был реализован на многофункциональном фотометре-имиджере Cytation 5 (BioTek, США), позволяющем визуализировать клетки не только на гладкой поверхности, но и в структуре пористого материала.

Прижизненное окрашивание ядер клеток и маркировку живых клеток, адгезировавшихся на образцах, характеристику их морфологии проводили с применением флуорохрома Hoechst 3334 (BD Pharmingen™) и кальцеина (Calcein AM, BD Pharmingen™) в соответствии с протоколами производителя.

2.4. Метод оперативного вмешательства в эксперименте *in vivo*

Все экспериментальные исследования на животных проводили в условиях специализированной ветеринарной операционной в условиях анестезии, с соблюдением правил асептики и антисептики (раздел работы выполнен на базе

ФГБУН «Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова» СО РАН).

Методика забора крови для последующей обработки SVF жировой ткани: до начала анестезии у животных забирали 2 мл венозной крови из *v. marginalis* с последующим двукратным центрифугированием в течение 10 мин при частоте оборотов 2800/мин [145].

Анестезиологические пособия осуществляли 1 % раствором тиопентала натрия с предшествующей местной инфильтрационной анестезией тканей 2 % раствором лидокаина, 2 мл с 6 мл – 0,9 % раствора NaCl, для каждого этапа операции.

Методика хирургического вмешательства

Кожные покровы в области экспериментального хирургического вмешательства освобождали от шерсти и маркировали по стандартной методике [168]. С целью минимизации объема оперативного вмешательства использовали единственный небольшой хирургический доступ по дорсальной поверхности шеи животного, паравертебрально между лопатками и параллельно линии остистых отростков позвонков и осуществляли забор бежевой жировой ткани кремово-белого цвета в объеме 2 мл (Рисунок 2А). Именно для этой локализации у взрослых особей кроликов характерно наибольшее количество светло-коричневых жировых клеток (Beige AT), схожих по свойствам с хорошо васкуляризированной бурой жировой тканью [101]. По принципам современной физиологии для человека при выполнении операций с использованием SVF жировой ткани забор жировой ткани осуществляется из аналогичных анатомических областей тела и параумбиликальной зоны [206].

Полученную жировую ткань укладывали в стерильную чашку Петри с добавлением 4 мл раствора Кляйна (оригинального состава) с последующим измельчением (Рисунок 2Б).

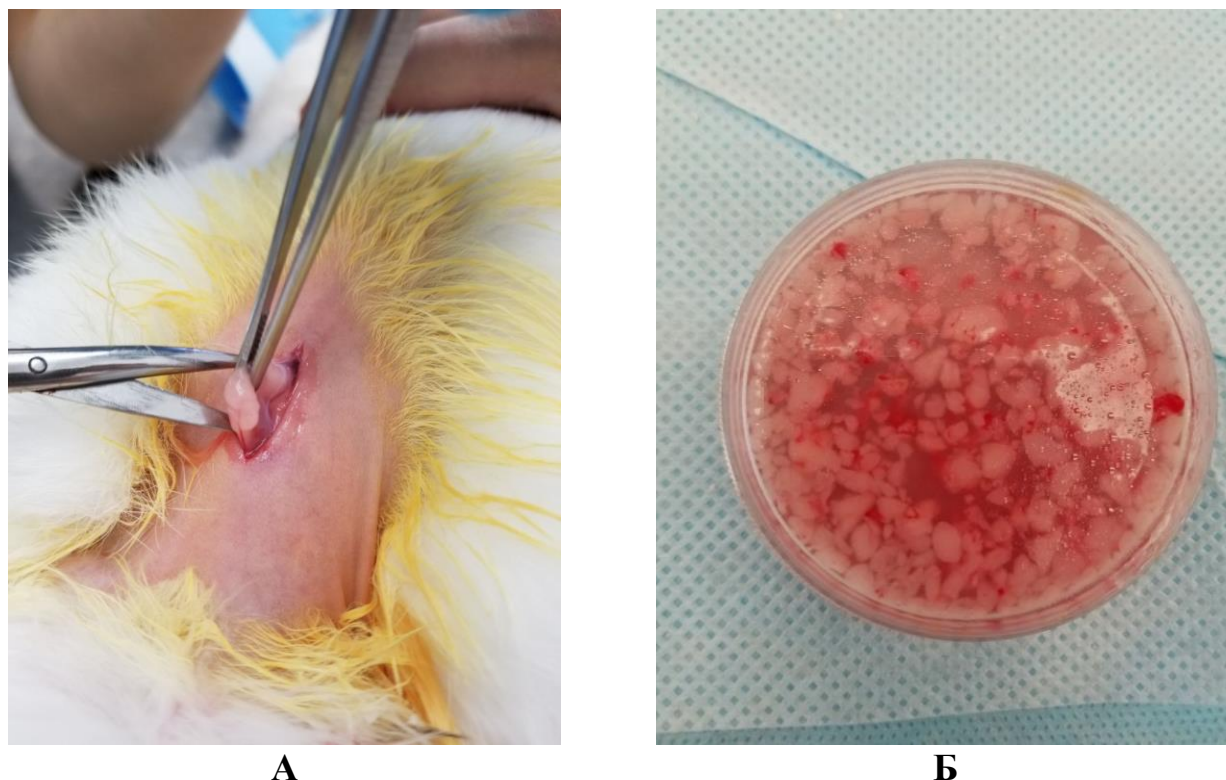


Рисунок 2 – Хирургический доступ с забором жировой ткани (bAT) у экспериментального животного (А); жировая ткань межлопаточной области кролика линии NZW в процессе обработки согласно стандартной методике (Б)

Полученный материал обрабатывали посредством трансфера в системе из двух стерильных инъекционных шприцев до получения однородной массы с последующим распределением по четырем пробиркам типа эппендорф объемом 2 мл и двукратно центрифугировали в течение 10 мин при частоте оборотов 2800/мин, с этапным очищением (дополнительным центрифугированием) и соответственно сокращением объема субстрата. Следующий этап выделения и обработки SVF жировой ткани был проведен по стандартной методике, с добавлением центрифугированной крови, выделенной из нее обогащенной тромбоцитами плазмой [170, 227].

Осуществляли переход к моделированию костных дефектов и их замещению. Для оценки эффективности репаративного остеогенеза при замещении костных дефектов разными вариантами костно-замещающих материалов осуществляли имплантацию фрагментов ДПК-ГБК ткани и

тканеинженерной конструкции на ее основе в моделированные костные дефекты согласно выбранным группам исследования. С этой целью и согласно действующим стандартам в стерильных условиях под общей комбинированной анестезией выполняли хирургический доступ по латеральной стороне дистальной части бедра. Мягкие ткани разводили тупо по ходу мышечных волокон, надкостницу отслаивали при помощи распатора.

В диафизарной части бедренной кости обеих задних лап каждого животного формировали по 3 костных дефекта специализированным стерильным хирургическим инструментарием. Два из трех костных дефектов, расположенных в диафизе правой бедренной кости, заполняли образцами костнопластического материала (КПМ) в соответствии с группой исследования — группы № 2 и 3 (Рисунок 3).

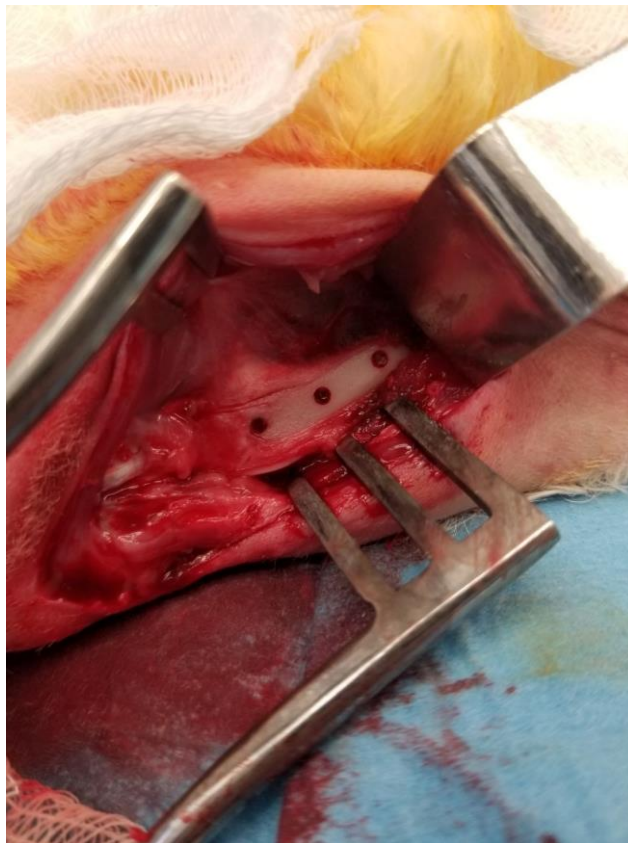


Рисунок 3 – Изображение этапа хирургического моделирования дефектов костной ткани в диафизе бедренной кости кролика линии NZW

Симметричные костные дефекты контрлатеральной бедренной кости не заполняли КПМ, использовали в качестве контроля. Для подтверждения отсутствия вариативности морфологических проявлений репаративной регенерации костной ткани в условиях каждой отдельной особи были сформированы дополнительные дефекты — по одному в диафизарной части бедренной кости на каждой конечности. После этого осуществляли гемостаз и послойное ушивание операционной раны. Осуществляли обработку послеоперационного шва раствором антисептика и порошком антибактериального комбинированный препарата с активными веществами бацитрацином, неомицином.

2.5. Метод лучевой диагностики в эксперименте *in vivo*

Восстановление костной ткани отслеживали путем определения костной плотности на каждом сроке наблюдения с использованием методики мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ). В исследовании использовался аппарат Aquilion Prime, 2018 (Toshiba, Canon Medical Systems, Япония). Плотность тканей оценивали по показателю Hounsfield Unit (HU) [4, 23, 42, 68]. С помощью этого инструмента определяется ослабление объектом рентгенологического излучения по отношению к дистиллированной воде.

Используя пакет программ K-Pacs v 1.6.0 (RADiQ IMAGE Information Systems, Германия) для работы с DICOM, применяли инструмент ROI (англ. Region of interest, зона интереса), производили измерение плотности путем статистической оценки усредненных показателей для каждой группы исследования в трех областях, где первая соответствовала области костного дефекта со стороны костномозгового канала, вторая – области дефекта со стороны надкостницы, третья – области интактной кортикальной пластинки (Рисунок 4). В соответствии со значениями HU костную ткань классифицировали по Misch (Таблица 5), где:

- D1 – толстая компактная кость;
- D2 – толстая кость с равномерной выраженностью компактного и губчатого вещества;
- D3 – тонкая кость с пористой компактной пластинкой или рыхлое губчатое вещество;
- D4 – рыхлое, тонкое компактное вещество кости или слой очень рыхлой губчатой кости.

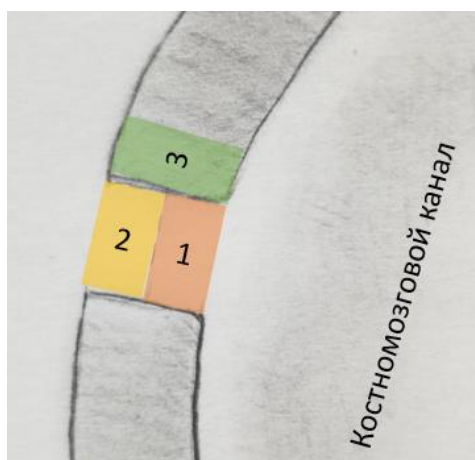


Рисунок 4 – Схематичное изображение области измерения рентгенологической плотности костной ткани: 1 – область дефекта со стороны костно-мозгового канала; 2 – область костного дефекта со стороны надкостницы; 3 – область интактной кортикальной пластинки

Таблица 5 – Шкала Misch (1988) оценки костной плотности в соответствии со значениями Hounsfield [4, 68, 175, 177]

Тип костной ткани	Нижняя граница HU	Верхняя граница HU
D1	1250	–
D2	850	1249
D3	350	849
D4	–	349

2.6. Метод гистологического исследования операционного материала в эксперименте *in vivo*

Для изучения восстановления костной ткани использовали участки бедренной кости области хирургического моделирования замещения костных дефектов. Образцы фиксировали в 10 % нейтральном забуференном растворе формалина в течение 72 ч с последующей декальцинацией в растворе Рихмана – Гельфанда – Хилла 10 суток при температуре 20 °С.

После стандартной гистологической проводки в серии спиртов возрастающей концентрации и ксилоле образцы костной ткани заливали в парафиновые блоки с последующим изготовлением серийных срезов толщиной 4–5 мкм и их окрашиванием гематоксилином и эозином. С целью дифференцированной количественной оценки зрелой и формирующейся соединительной ткани в образцах исследования гистологические срезы окрашивали по Ван Гизону и подвергали импрегнации серебром. После окраски препараты заключали в монтирующую среду под покровное стекло и высушивали в течение 7 дней при комнатной температуре.

Обзорную световую микроскопию с получением обзорных микрофотографий осуществляли на лабораторном микроскопе OLYMPUS CX 43 с фотокамерой OLYMPUS UC 90 (Olympus Medical Systems Corp, Япония). Морфометрическое исследование гистологических образцов проводили с помощью программного обеспечения программного обеспечения (ImageJ – version 1.53o, 2022, Wayne Rasband and contributors National Institutes of Health, USA, <http://inagej.nih.gov/ij>) при увеличении 200. В гистологических срезах оценивали численную плотность сосудов (N_{ai}), из них процент полнокровных сосудов в зоне имплантации (%), объемную плотность зрелых коллагеновых волокон (V_v , %), объемную плотность аргирофильных соединительно-тканых волокон (V_v , %), объемную плотность костной ткани зрелой и новообразованной (V_v , %).

2.7 Статистические методы оценки результатов экспериментальной работы

Результаты исследования *in vitro* обрабатывали методами непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона при помощи пакета программ STATISTICA 6.0.

Статистическую обработку полученных морфометрических данных *in vivo* осуществляли в программе RStudio (version 2022.02.1 Build 461– © 2009–2022 RStudio, Inc., США) на языке R (version 4.1.3 (2022-03-10), Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org>). Дескриптивные статистики непрерывных показателей рассчитывали в виде медиан [первый квартиль; третий квартиль], среднее \pm стандартное отклонение и (минимальное – максимальное) значения; у категориальных показателей определялось количество пациентов (частота) для каждой категории. Сравнение непрерывных показателей между группами проводилось непараметрическим непарным U-критерием Манна–Уитни. Производился расчет смещения распределений с построением 95% доверительного интервала (ДИ) для смещения. Категориальные показатели сравнивали точным двусторонним критерием Фишера. Коррекция ошибки множественного тестирования при сравнении категорий проводилась методом Бенджамини–Хохберга. Проверка статистических гипотез проводилась при критическом уровне значимости $p = 0,001$, т.е. различие считалось статистически значимым при $p < 0,001$.

Для полученных данных лучевой диагностики описательные статистики непрерывных показателей дефекта рассчитывались в виде медианы [первый квартиль; третий квартиль] (МЕД [Q1; Q3]), среднее \pm стандартное отклонение (СРЕД \pm СО), минимальное и максимальное значение (МИН-МАКС). Для сравнения показателей областей дефекта с зоной интактной кортикальной пластинки использовали непараметрический критерий Вилкоксона, статистически значимым считалось различие при $p < 0,05$.

Для выявления парных числовых зависимостей между непрерывными показателями рассчитывались коэффициенты корреляции Спирмена r с оценкой

достигнутого уровня значимости p . Проверка статистических гипотез проводилась при критическом уровне значимости $p = 0.05$, т.е. различие считалось статистически значимым, если $p < 0.05$. Все использованные критерии были двусторонними.

ГЛАВА 3. ДЕПРОТЕИНИЗИРОВАННАЯ ГУБЧАТАЯ КОСТЬ В КАЧЕСТВЕ ОСНОВЫ ДЛЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИИ. РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЧАСТИ *IN VITRO*

3.1. Структурные характеристики и элементный состав, *in vitro* цитотоксичность губчатой костной ткани головки бедренной кости человека

Морфология всех образцов костной ткани была представлена пористой структурой, поры располагались по всему объему образцов. На рисунках 5 и 6 представлены макроскопические и оптические изображения фрагмента ДПКГ ткани при различной глубине фокуса, позволяющие оценить внутренние поры образца.



Рисунок 5 – Макроскопическое изображение поверхности распила образца костной ткани головки бедренной кости

Анализ распределения пор в срединных распилах ГБК показал, что поры имеют вытянутую форму, а средний продольный размер пор превышает поперечный на 30 %. При сравнении минимального размера пор разница достигает 56 % (0,16 и 0,09). Сравнение максимального размера пор также выявило значительное преобладание продольного размера над поперечным 2,48 и 1,55 %. Общая пористость образца в целом варьирует от 32 до 37 % (Таблица 6).

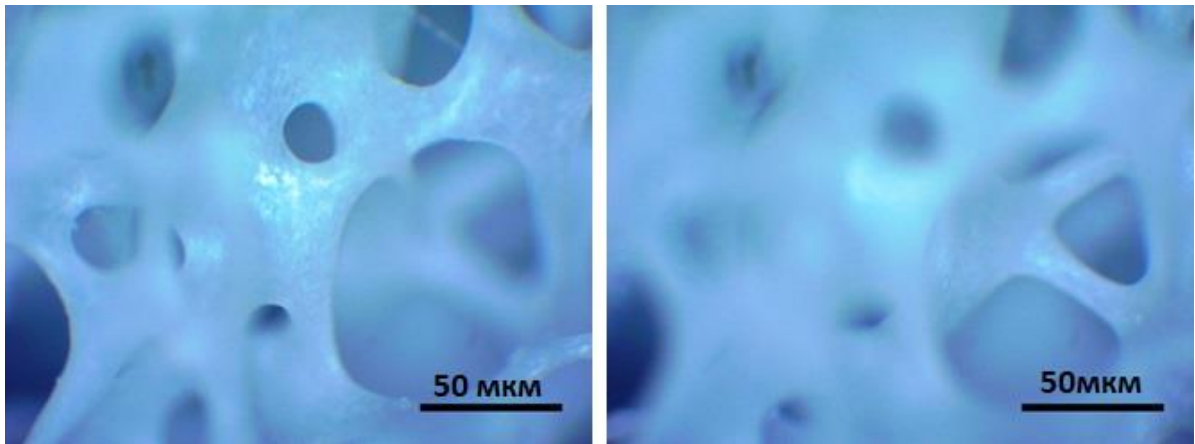


Рисунок 6 – Оптические изображения образца костной ткани, полученные при различной глубине резкости

Таблица 6 – Размеры пор и пористость образцов губчатого костного материала головки бедренной кости

Сечение	Средний размер пор, мм	Минимальный размер пор, мм	Максимальный размер пор, мм	Пористость, %
Продольное	0,62	0,16	2,48	37
Поперечное	0,41	0,09	1,55	32

Для большей наглядности представления о распределении размеров пор при наложении контуров расчета вдоль и поперек распилов костного материала ГБК, построены гистограммы распределения пор по размерам (Рисунок 7).

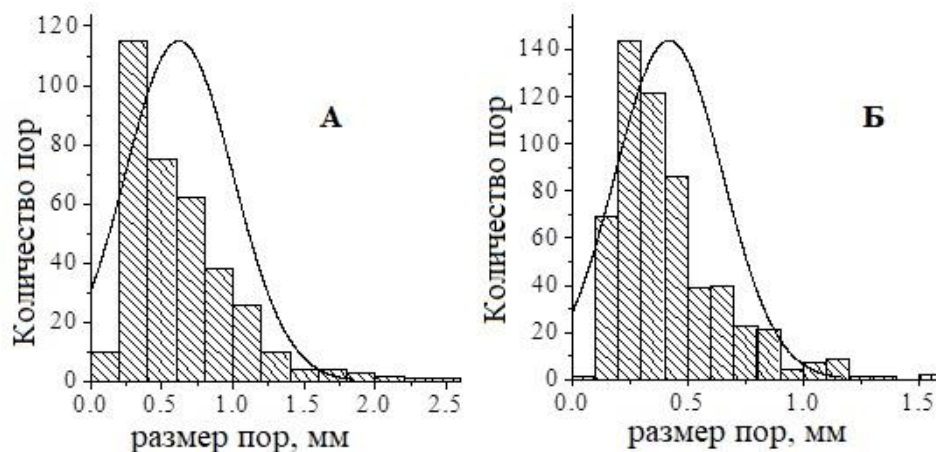


Рисунок 7 – Гистограммы распределения пор по размерам, полученным по контурам расчета, расположенным вдоль (А) и поперек (Б) срединных распилов образцов костной ткани головки бедренной кости

Как видно из рис. 7, более 50 % пор в направлении, продольном линиям контуров расчёта, имеют средний разброс значений 0,2-0,8 мм. Около 25 % пор имеют размер в диапазоне 0,8-1,8 мм, а 10 % пор – более 1,8 мм. Средний разброс размера пор в поперечном направлении контуров расчёта – 0,1-0,5 мм (более 70 %), 25 % – 0,5-1,2 и менее 5 % 1,2-1,55 мм.

Исследование элементного состава костной ткани выявило наличие следующих элементов: Ca, P, O, Na, Mg, а также Sn, S, Fe, Cr, C в микроколичествах (таблице 7).

Таблица 7 – Содержание основных элементов в костной ткани головки бедренной кости человека

Элемент	Ca	P	O	Na	Mg	Sn	S	Fe	Cr	C
Содержание, ат. %	34,85 ± 0,15	22,45 ± 0,12	39,69 ± 0,17	1,36 ± 0,08	0,85 ± 0,04	0,36 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01

Данные по содержанию элементов в атомных процентах приведены в Из данных элементного анализа определено соотношение Ca/P в костной ткани, оно составило 1,55.

Для оценки цитотоксичности материала использовали стандартный МТТ-тест. Для чего предварительно готовили экстракты образцов ДПК-ГБК после 1 и 7 суток экстракции. Анализ результатов исследования абсорбции гранул формазана не выявил статистически значимых отличий величин параметра взаимодействия фибробластов дермы человека с экстрактами образцов ДПК-ГБК, полученных после 1-х и 7-х сут. экстракции в сравнении с показателем соответствующего контроля ($p > 0,05$), что свидетельствует об отсутствии снижения жизнеспособности клеток выбранной для исследования клеточной линии (Таблица 8).

Таблица 8 – Выраженность цитотоксичности ДПК-ГБК с оценкой относительной интенсивности роста клеток, оптической плотности

Группа	Единицы измерения	Период экстракции ДПК-ГБК	
		1 день	7 дней
Контроль (n = 8)	ОП, М ± m	0,345 ± 0,016	0,563 ± 0,146
	ОИР, %	100	100
	Ранг цитотоксичности (GB/T 16886.5-2003)/(ГОСТ ISO 10993-5-2011)	0/0	0/0
Экстракт (n = 8)	ОП, М ± m	0,332 ± 0,032	0,459 ± 0,177
	ОИР, %	96	81
	Ранг цитотоксичности (GB/T 16886.5-2003)/(ГОСТ ISO 10993-5-2011)	1/0	1/0
Экстракт 1:1 (n = 8)	ОП, М ± m	0,326 ± 0,021	0,544 ± 0,189
	ОИР, %	94	97
	Ранг цитотоксичности (GB/T 16886.5-2003)/(ГОСТ ISO 10993-5-2011)	1/0	1/0
Экстракт 1:2 (n = 8)	ОП, М ± m	0,315 ± 0,039	0,554 ± 0,189
	ОИР, %	91	98
	Ранг цитотоксичности (GB/T 16886.5-2003)/(ГОСТ ISO 10993-5-2011)	1/0	1/0
Экстракт 1:4 (n = 8)	ОП, М ± m	0,341 ± 0,045	0,551 ± 0,19
	ОИР, %	99	98
	Ранг цитотоксичности (GB/T 16886.5-2003)/(ГОСТ ISO 10993-5-2011)	1/0	1/0

Из представленных данных видно, что экстракты ДПК-ГБК не токсичны, т.к. уровень (ранг) цитотоксичности соответствует 1 согласно ранговой шале оценки цитотоксичности (табл. 2). Уровень цитотоксичности 0 и 1 соответствует нетоксичным материалам, 2–5 — цитотоксичным.

Резюме

Изучены структурные характеристики и микроэлементный состав ДПК-ГБК для использования ее в качестве основы тканеинженерной конструкции. Депротенинизированная губчатая кость имеет пористую структуру с общей пористостью от 32% до 37%, сохранением микроэлементного состава и показателем атомного соотношения Ca/P - 1,55, без проявлений цитотоксичности в тестовой культуре фибробластов человека *in vitro*.

3.2. Влияние депротеинизированной губчатой кости человека на адгезию, миграцию и пролиферацию МСК ЖТ в эксперименте *in vitro*

Перед началом исследования клетки были охарактеризованы. Морфологически в течение всего времени наблюдения клетки представляли собой типичные фибробластоподобные клетки с выраженными отростками, четкими контурами, гомогенной цитоплазмой. Жизнеспособность клеток в культуре составляла 97–98 %. Фенотип соответствовал фенотипу мезенхимальных стромальных клеток: CD90+, CD105+, CD73+, CD44+, CD45-, CD14-, CD34-, CD HLA DR-. Клетки были способны дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях.

Исследование характера адгезии МСК ЖТ на образцах ДПГК-ГБК в полях зрения при разном увеличении выявили отчетливую визуализацию ядер клеток как через 48 ч, так и через 144 ч (Рисунок 8А), в то время как на образцах контрольных серий (только костный образец ДПГК-ГБК) клетки отсутствовали ($p < 0,05$) (Рисунок 8Б).

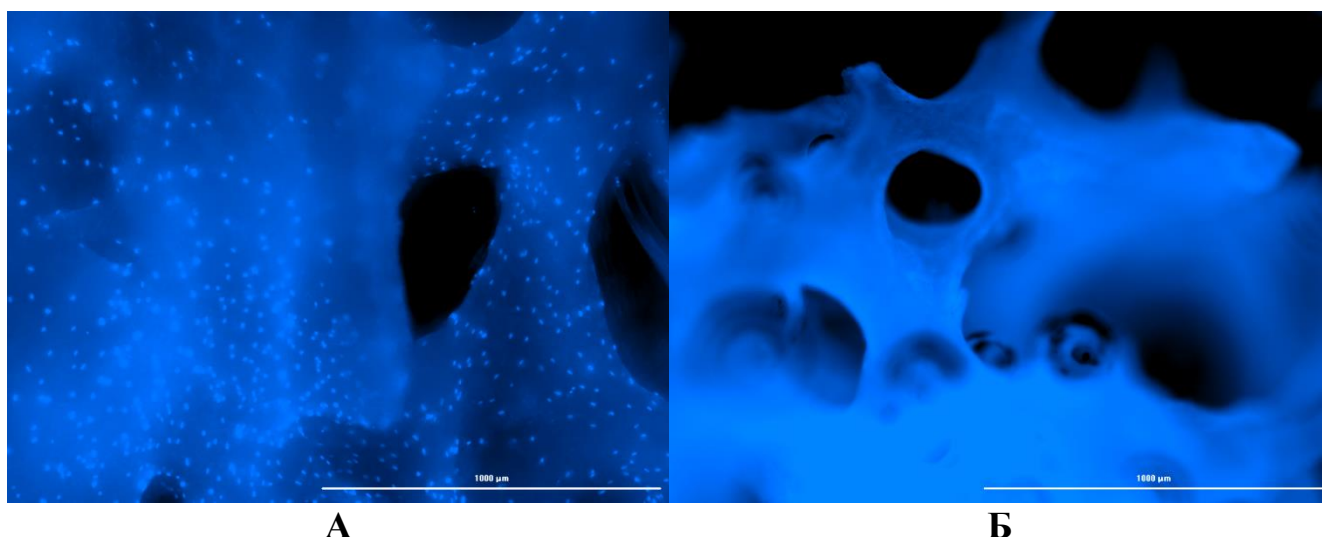


Рисунок 8 – А: ядра клеток на образце ДПГК-ГБК, сшитая Z-stack фотография; Б: образец ДПГК-ГБК без клеток (флуоресцентная микроскопия, флуорохром Hoechst 33342, $\times 40$)

При исследовании депротеинизированных губчатых костных фрагментов (Рисунки 9, 10) при увеличении $\times 40$ было проанализировано 413 ядер клеток, средний размер ядер – 11,5 мкм (от 5,2 до 29,2 мкм), средняя площадь ядер клеточных элементов – 129 мкм (от 13,0 до 600 мкм), средний периметр ядер – 40,7 мкм (от 15,6 до 120,9 мкм).

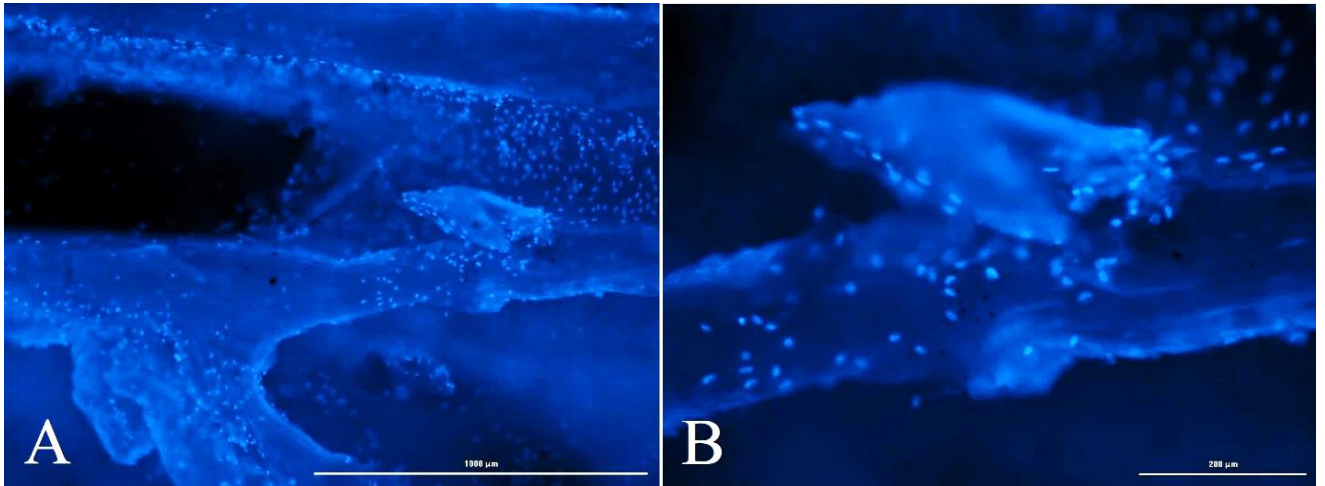


Рисунок 9 – Адгезия клеток на ДПГК-ГБК (внутренняя поверхность распила): А – $\times 40$; В – $\times 100$ (флуорохром Ноеchst 33342)

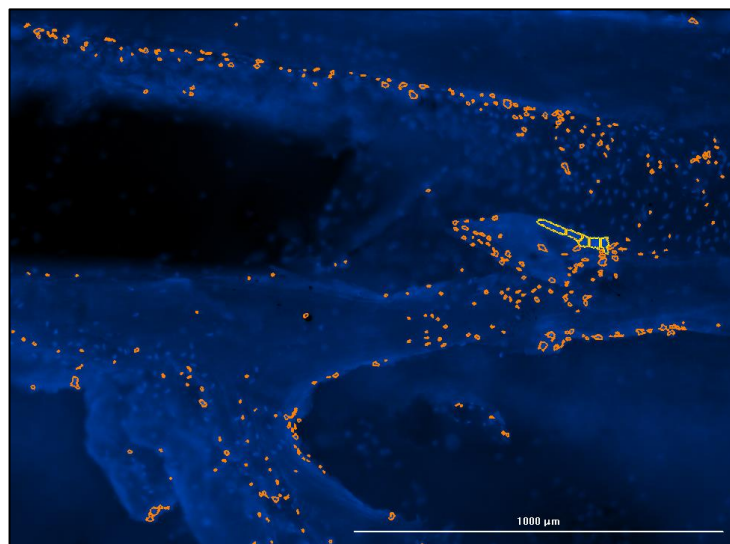


Рисунок 10 – Визуализация клеток при подсчете на образцах ДПГК-ГБК; флуоресцентная микроскопия, флуорохром (флуорохром Ноеchst 33342, $\times 40$)

Для подтверждения жизнеспособности клеток на образцах исследуемого материала образцы были докрашены флуорохромом (Calcein AM, BD Pharmingen™) (Рисунки 11, 12).

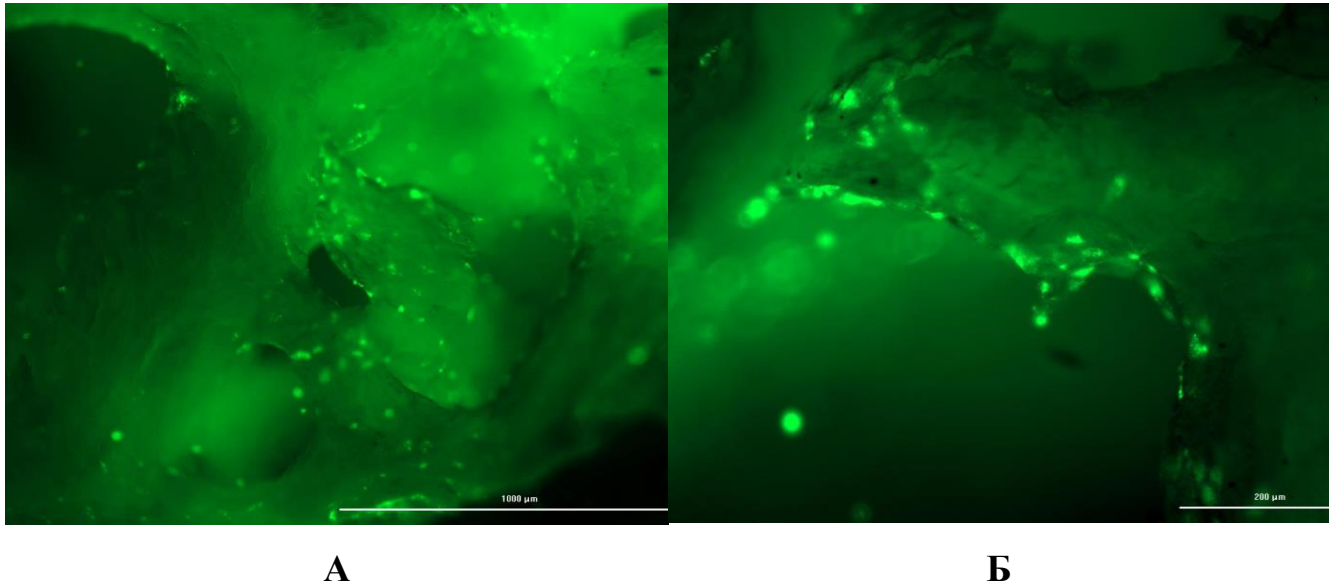


Рисунок 11 – Жизнеспособные клетки на образцах ДПГК-ГБК; флуоресцентная микроскопия, флуорохром Calcein AM: А – $\times 40$; Б – $\times 100$

Флуорохром специфически окрашивает цитоплазму только жизнеспособных клеток.

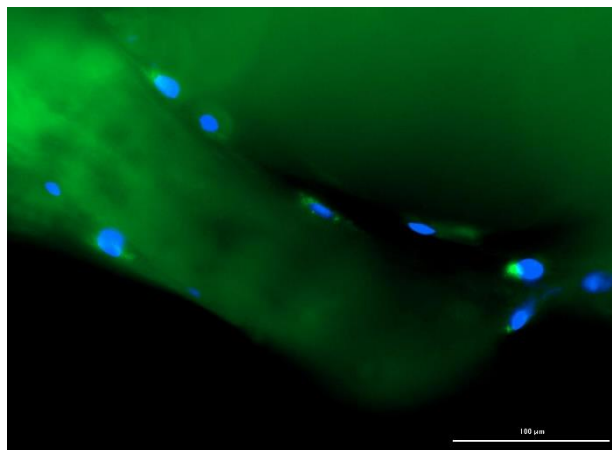


Рисунок 12 – Подсчет жизнеспособных клеток на образцах ДПГК-ГБК, флуоресцентная микроскопия, флуорохром Calcein AM; $\times 200$

На поверхности материала хорошо визуализировались клетки с зеленым сигналом свечения в цитоплазме. Это свидетельствует о сохранении МСК жизнеспособности на образцах материала на протяжении всего срока наблюдения (144 ч/6 суток).

На следующем этапе исследования изучили миграцию клеток в толщу костного матрикса в 1–7-е сутки (Таблица 9).

Таблица 9 – Миграция клеток в структуру образцов ДПК -ГБК

Показатель	Время культивирования		
	24 ч	96 ч	168 ч
Глубина проникновения клеток в материал по оси Z (мкм)	273,10 ± 13,93	381,70 ± 20,62*	702,91 ± 28,11*/**
Скорость миграции клеток (мкм/ч)	11	4	4

Примечание: * $p < 0,001$ – сравнение с 24 ч; ** $p < 0,001$ – сравнение с 96 ч, критерий Вилкоксона.

Местами ядра клеток располагались очень скученно, что может служить косвенным признаком процессов деления. При этом в 1–3-е сутки выявили смещение ядер клеток по плоскости, что при сшивке изображений, выполненных в разных плоскостях, сопровождалось увеличением количества ядер в одном поле зрения (Рисунок 13).

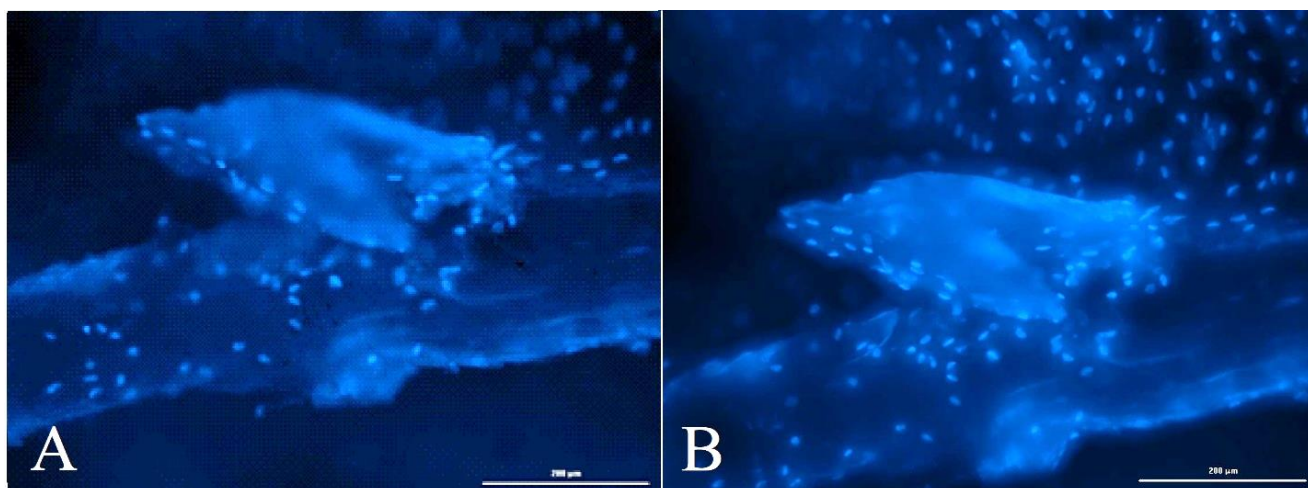


Рисунок 13 – Оценка миграции клеток в толщу ДПК-ГБК (внутренняя поверхность распила); $\times 100$: А – до сшивки; В – после сшивки изображений (флуорохром Hoechst 33342)

Анализ миграции клеток в 1–7-е сутки (144 ч) на образцах материала продемонстрировал, что клетки мигрировали в структуру материала в процессе культивирования на образцах, проникая во внутренние пространства (Рисунки 14–16).

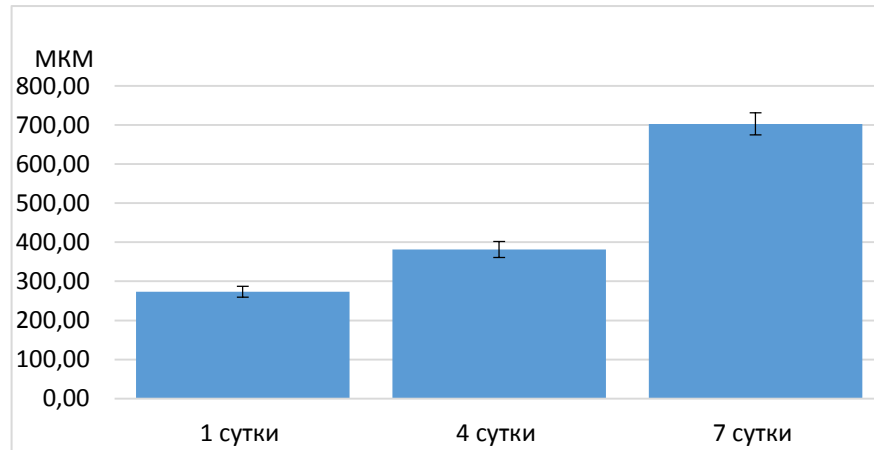


Рисунок 14 – Оценка миграции клеточного материала в толщу образцов ДПГК-ГБК

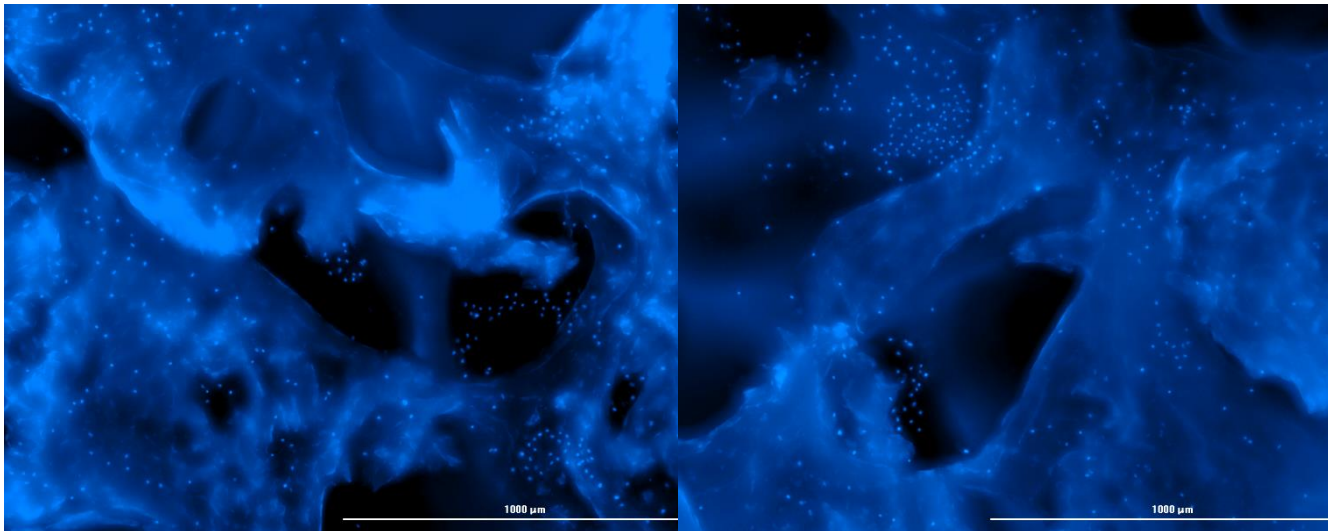


Рисунок 15 – Оценка миграции клеток в толщу ДПГК-ГБК, 24 ч исследования (после сшивки изображений). Флуорохром Hoechst 33342, $\times 40$

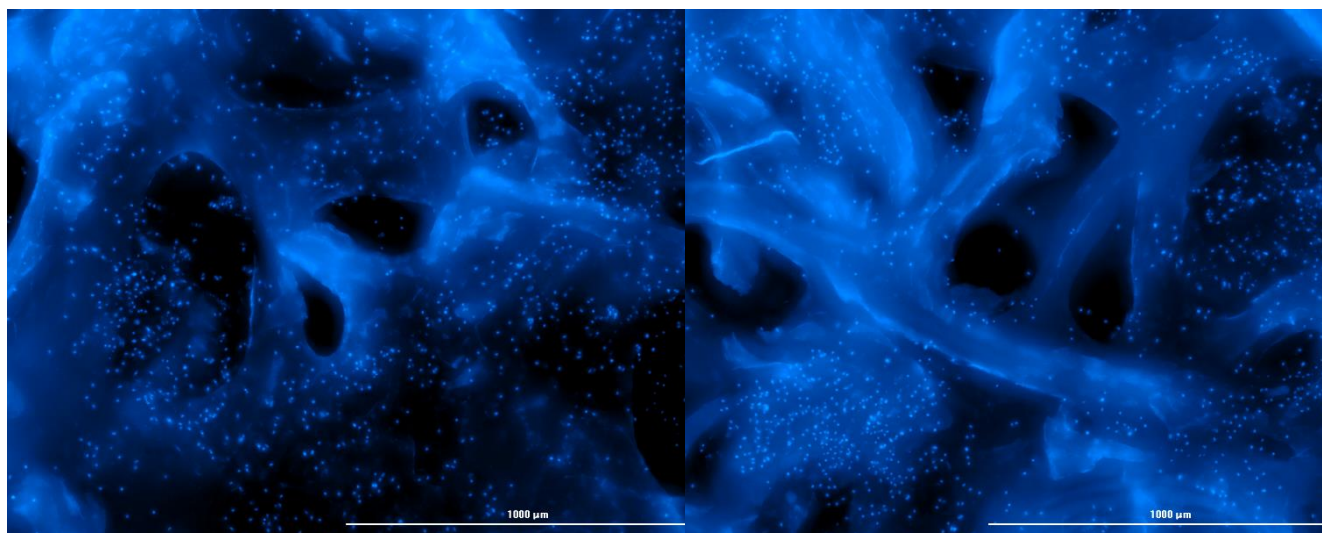


Рисунок 16 – Оценка миграции клеток в толщу ДПГК-ГБК, 168 ч исследования (после сшивки изображений), $\times 40$: А (слева) – 1-е сутки исследования; Б (справа) – 7-е сутки исследования (флуорохром Hoechst 33342, $\times 40$)

В процессе культивирования на образцах и миграции во внутренние структуры клетки сохраняли жизнеспособность и пролиферативную активность (Таблица 10), о чем свидетельствовало статистически значимое увеличение количества клеток на образцах ($p < 0,001$).

Таблица 10 – Пролиферативная активность и жизнеспособность мезенхимальных стромальных клеток при культивировании в структуре материала ДПГК-ГБК

Время культивирования	1-е сутки	4-е сутки	7-е сутки
Общее количество клеток в 1 мм^3	$302,27 \pm 22,79$	$664,31 \pm 32,10^*$	$1744,43 \pm 73,62^{**/**}$
Мертвые клетки в 1 мм^3 (%)	3,37	3,95	0,81

Примечание: * $p < 0,001$ – сравнение с 1-ми сутками, ** $p < 0,001$ – сравнение с 4-ми сутками, критерий Вилкоксона.

Заселение образцов ДПГК-ГБК клетками МСК происходило равномерно, что подтверждено количественными данными — количество адгезированных клеток на одно поле зрения к 144 ч значительно превалировало по сравнению с 1-ми сутками ($p < 0,001$). Общее количество клеток прогрессивно увеличивалось в соответствии со сроками наблюдения. Так на 4-е сутки количество клеток

возросло в 2,2 раза, а на 7-е сутки – в 5,8 раза. Клетки сохраняли свою жизнеспособность на протяжении всего срока наблюдения. Отмечали миграцию клеток в глубокие зоны образцов с некоторым увеличением ядер клеток, что может быть связано именно со структурными особенностями ДПК-ГБК. Глубина проникновения клеток в материал к 4-м суткам увеличилась в 1,4 раза ($p < 0,001$) и в среднем составила 381,7 мкм. К 7-м суткам нарастание глубины миграции клеток сохранило прежние темпы по отношению к результату на 96 ч с начала наблюдения ($p < 0,001$). При этом по окончании эксперимента глубина миграции клеток в ДПК-ГБК увеличилась в 2,6 раза по отношению к 24 ч с начала наблюдения.

Резюме

ДПК-ГБК позволяет реализовать свойства мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани:

- адгезию клеток подтверждает визуализация ядер клеток на поверхности кости;
- миграцию – наличие клеток в структуре материала на глубине от 273 мкм до 702 мкм от поверхности;
- пролиферацию – увеличение общего количества клеток от 302 до 1744 с 1 по 7 сутки эксперимента соответственно.

3.3. Способ создания тканеинженерной конструкции для стимуляции регенерации кости

Для совершенствования метода замещения костных дефектов разработан способ создания тканеинженерной конструкции, которая способствует восстановлению кости в более ранние сроки. Получено решение о выдаче патента №2022126705 от 03.07.2023 (Приложение А).

Поставленная задача решается тем, что способ создания тканеинженерной конструкции для стимуляции регенерации кости включает пропитку матрицы

(основы) клеточным материалом SVF. Согласно предлагаемому изобретению из губчатого депротеинизированного костного трансплантата изготавливают чипсы, которые используют в качестве матрицы. Выполняют забор жировой ткани и выделение из нее SVF, пропитывают чипсы из ДПК.

Предлагаемая последовательность операций позволяет увеличить регенераторный потенциал костной ткани пациента в зоне дефекта за счет использования наиболее биологически совместимых материалов, которые приближают полученную тканеинженерную конструкцию к характеристикам костного ауто трансплантата.

Экспериментально установлено оптимальное соотношение объемов костного трансплантата (1см^3) и SVF (1,7мл) (таблица 11). При таком соотношении ДПК пропитывается наиболее равномерно, а свойства полученной тканеинженерной конструкции наиболее приближены к характеристикам костного ауто трансплантата.

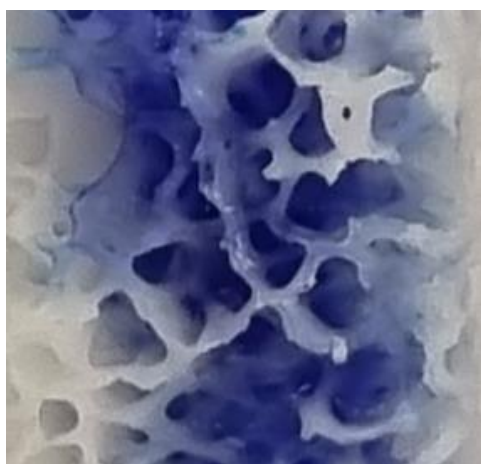
Таблица 11 – Определение соотношения компонентов тканеинженерной конструкции.

Серия эксперимента	Объем раствора (SVF) $1\text{см}^3=1\text{мл}$	Объем костного блока	Соотношение	Результат пропитывания
Серия 1	0,5мл	1см^3	1:2	Не полное
Серия 2	1мл	1см^3	1:1	Не полное
Серия 3	2мл	1см^3	2:1	Избыток
Серия 4	1,7мл	1см^3	1,7:1	Оптимальное

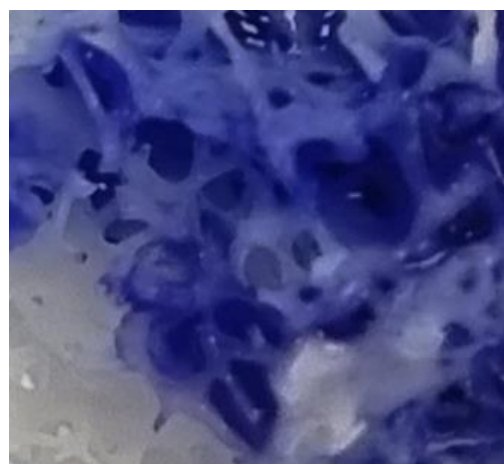
Для разработки способа создания тканеинженерной конструкции для стимуляции регенерации кости выполнен эксперимент в 4-х группах по выбору соотношения объема основы ТИК и клеточного компонента.

В 1-2 сериях предполагаемый результат не был получен, отмечалось неравномерное пропитывание образца ДПК-ГБК. В случае недостаточного объема SVF на идентичный объем ДПК свойства полученной конструкции не позволяют в полной мере задействовать регенераторный потенциал тканеинженерной конструкции. Для визуализации эксперимента приведен пример

с дополнительным окрашиванием клеточного компонента метиленовым синим. (Рисунок 17).



Серия 1 (соотношение 1:2)



Серия 2 (соотношение 1:1)



Серия 3 (соотношение 2:1)



Серия 4 (соотношение 1,7:1)

Рисунок 17 – Эксперимент по выбору соотношения объема основы ТИК и клеточного компонента, дополнительная окраска метиленовым синим

В 3-ей серии эксперимента образец пропитан полностью на весь поперечник, при этом отмечено избыточное количество объема за счет формирования избыточного остаточного количества клеточного компонента. В случае избыточного объема SVF на идентичный объем ДПК свойства полученной конструкции приближены к характеристикам аутотрансплантата, однако в этом случае избыточно забранный материал жировой ткани и крови оказывается невостребованным и утилизируется, а донорское место забора

жировой ткани оказывается больше, что не является целесообразным.

В 4 серии эксперимента получено равномерное пропитывание образца данного объема по всей площади, без признаков избытка SVF. Таким образом, выявлено оптимальное соотношение объемов костного материала и SVF для создания тканеинженерной конструкции.

Тканеинженерная конструкция со стромально-васкулярной фракцией жировой ткани может формироваться непосредственно перед операцией. При этом стромально-васкулярная фракция, которая относится к минимально-манипулированным клеточным продуктам (согласно консенсусу «Минимально-манипулированные клеточные продукты» от 2021г) исключает длительный процесс выделения и обработки клеточного материала.

ГЛАВА 4. ВОССТАНОВЛЕНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ *IN VIVO* ПРИ ЗАМЕЩЕНИИ КОСТНОГО ДЕФЕКТА ТКАНЕИНЖЕНЕРНОЙ КОНСТРУКЦИЕЙ

4.1 Оценка восстановления костной ткани в контрольной группе № 1, без замещения костного дефекта

При проведении МСКТ образцов животных, выведенных в сроки наблюдения 2, 4 и 6 недель, выявлено постепенное заполнение костного дефекта. На сроке 2 недели снимки были представлены в виде костного дефекта без его полноценного заполнения костной тканью. По данным МСКТ в срок 2 недели костная плотность соответствовала D4 по классификации Misch, тонкой кости с тонким компактным веществом, очень рыхлому губчатому веществу (Рисунок 18). Значения костной плотности в среднем составили $27,0 \text{ HU} \pm 6,32$ (14; 40) в области костного дефекта со стороны костномозгового канала и $202,92 \text{ HU} \pm 65,35$ (66; 296) в области костного дефекта со стороны надкостницы (Таблица 12). В зоне ненарушенной костной пластинки рентгеновская плотность кости составила $1880,88 \text{ HU} \pm 475,65$ (1258; 3200), отличия по отношению к остальным областям определены как значимые ($p < 0,05$).

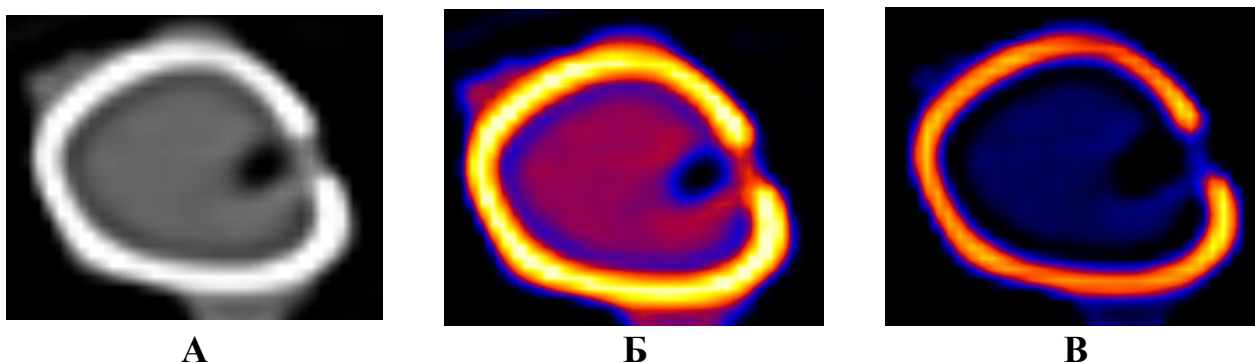


Рисунок 18 – Данные МСКТ на 2 неделе в группе №1 (А), без замещения костного дефекта (Б, В: обработка в программе К-Рас v 1.6.0; zoom factor x10)

Таблица 12 – Данные исследования рентгеновской плотности в группе № 1 исследования

Наименование показателя	1 группа (контрольная) Костный дефект без замещения		
	2 недели N=24 МЕД [Q1; Q3] СРЕД ±СО (МИН-МАКС)	4 недели N=24 МЕД [Q1; Q3] СРЕД ±СО (МИН-МАКС)	6 недель N=24 МЕД [Q1; Q3] СРЕД ±СО (МИН-МАКС)
Зона дефекта со стороны костномозгового канала, НУ (область 1)	26.5 [24.75; 29.25] 27 ± 6.32 (14 - 40)	14 [2.97; 27] 15.18 ± 17.21 (-12 - 47)	29 [-46.25; 81.25] 30.5 ± 78.01 (-84 - 197)
Зона дефекта со стороны надкостницы, НУ (область 2)	225 [155; 253.25] 202.92 ± 65.35 (66 - 296)	907 [628; 983] 824.92 ± 252.64 (349 - 1242)	1302.5 [696; 1459] 1103.25 ± 440.15 (421 - 1678)
Зона интактной кортикальной пластинки (ИКП), НУ (область 3)	1792 [1417.5; 2083] 1850.88 ± 475.65 (1258 - 3200)	2182.5 [2073.5; 2444] 2220.33 ± 311.95 (1508 - 2850)	2184.5 [2069; 2252] 2178.67 ± 268.51 (1726 - 2791)
Классификация по Misch (область1/ область2/ область3)	4/4/1	4/3/1	4/2/1
Сравнение зон дефекта и ИКП критерием Вилкоксона, р-уровень, область1- область2 область1- область3 область2- область3	1-2: <0.001* 1-3: <0.001* 2-3: <0.001*	1-2: <0.001* 1-3: <0.001* 2-3: <0.001*	1-2: <0.001* 1-3: <0.001* 2-3: <0.001*

Примечание: символом «» обозначены статистически значимо отличающиеся замеры, т.е. $p < 0,05$*

В срок 4 недели по данным срезов МСКТ рентгеновская плотность соответствовала D3 по классификации Misch в зоне дефекта со стороны надкостницы и D4 со стороны костномозгового канала. Значения костной плотности последней составили 15,18 НУ±17,21 (-12; 47). Для области дефекта со стороны надкостницы – 824,92 НУ ±252,64 (349; 1242) (Рисунок 19). В зоне

ненарушенной костной пластинки рентгеновская плотность кости составила $2220,33 \pm 311,95$ (1508; 2850), отличия по отношению к остальным областям на данном сроке внутри группы определены как значимые ($p < 0,05$).

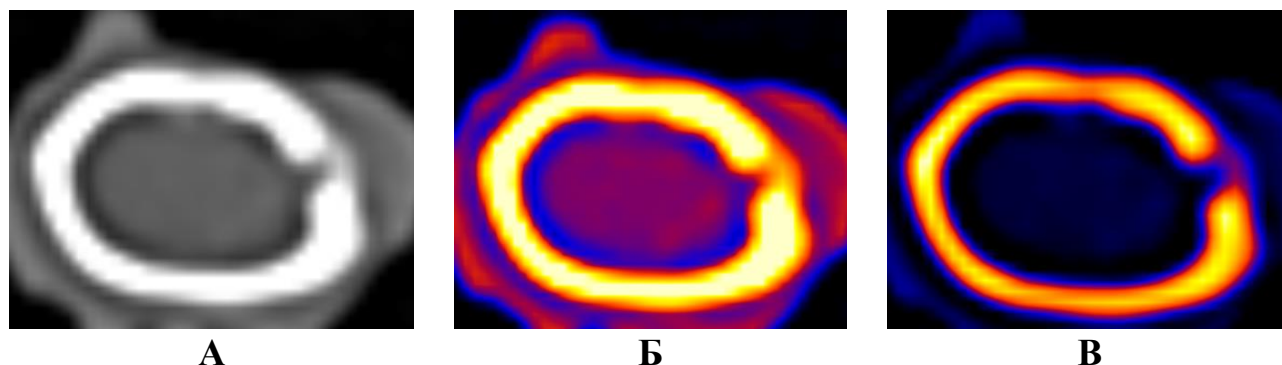


Рисунок 19 – Данные МСКТ на 4 неделе в группе №1 (А), без замещения костного дефекта (Б, В: обработка в программе К-Пас v 1.6.0; zoom factor x10)

По сравнению со сроком в 2 недели не было значимой разницы для значений области смоделированного дефекта. Однако для области смоделированного дефекта со стороны надкостницы отмечалось нарастание рентгеновской плотности в 4,1 раза ($p < 0,05$). Таким образом, максимальное значение в зоне дефекта к 4 неделям достигало 1629 HU.

По данным МСКТ в срок 6 недель костная плотность соответствовала D2 по классификации Misch в области костного дефекта со стороны надкостницы. Зона смоделированного дефекта со стороны костномозгового канала сохраняла свои параметры в рамках D4 в соответствии с классификацией Misch (Рисунок 20).

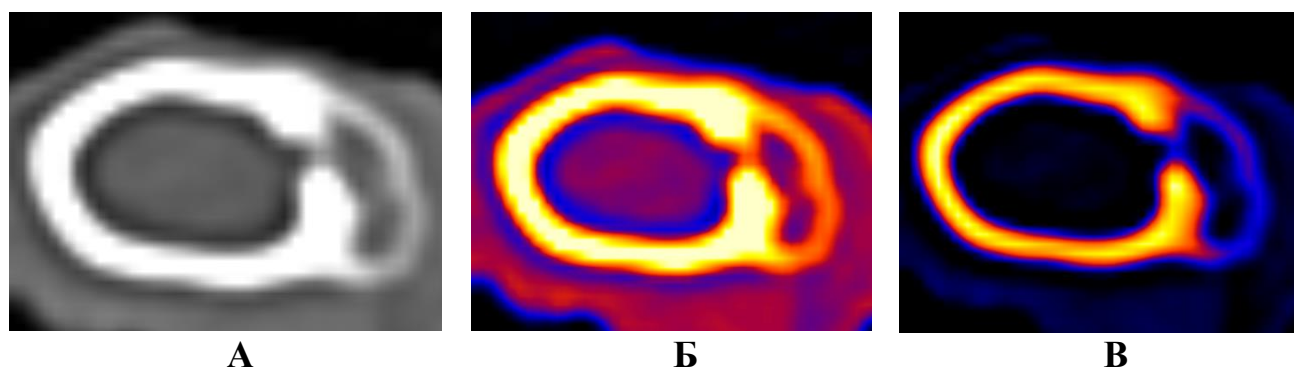


Рисунок 20 – Данные МСКТ на 6 неделе в группе №1 (А), без замещения костного дефекта (Б, В: обработка в программе К-Пас v 1.6.0; zoom factor x10)

Значения костной плотности в среднем составили $30,5 \text{ HU} \pm 78,01$ (-84; 197) в зоне смоделированного дефекта со стороны костномозгового канала и $1103,25 \text{ HU} \pm 440,15$ (421; 1678) со стороны надкостницы.

К 6 неделям определялось статистически незначимое увеличение рентгеновской плотности в области смоделированного дефекта. Определяли прогрессивное увеличение значений для области костного дефекта со стороны надкостницы по сравнению со 2-й и 4-й неделями – в 5,4 и 1,3 раза соответственно ($p < 0,05$). К 6 неделям в зоне ненарушенной костной пластинки рентгеновская плотность кости составила $2178,7 \pm 431,2 \text{ HU}$ [1418; 3025], $2178,67 \text{ HU} \pm 268,51$ (1726; 2791), отличия по отношению к остальным областям в группе на данном сроке определены как значимые ($p < 0,05$).

Данные лучевой диагностики подтверждались гистологическим исследованием образцов (таблица 13).

Таблица 13 – Результаты гистологического исследования в группе №1, без замещения дефекта ($M \pm m$)

Параметры исследования	1 группа (контрольная) Костный дефект без замещения		
	2 недели	4 недели	6 недель
Численная плотность сосудов в образцах костной ткани (N_{ai})	$5,61 \pm 1,50$	$8,25 \pm 1,50$	$16,66 \pm 5,70$
Процент полнокровных сосудов, %	$54,44 \pm 0,20$	$78,82 \pm 0,20$	$96,58 \pm 0,10$
Объемная плотность коллагеновых волокон в образцах костной ткани ($V_v\%$)	$5,15 \pm 0,60$	$7,08 \pm 1,10$	$12,68 \pm 2,50$
Объемная плотность аргирофильных волокон в образцах костной ткани ($V_v\%$)	$7,33 \pm 0,70$	$11,83 \pm 1,10$	$14,19 \pm 2,40$
Объемная плотность зрелой костной ткани ($V_v\%$)	$2,88 \pm 0,70$	$6,43 \pm 0,80$	$8,98 \pm 1,60$
Объемная плотность новообразованной костной ткани ($V_v\%$)	$3,81 \pm 0,70$	$6,43 \pm 0,80$	$9,26 \pm 2,10$

Со 2-й недели у всех животных в области моделированных костных дефектов и при их заполнении костно-замещающими материалами наблюдали незначительное утолщение кости. К 4-й неделе периода репарации наблюдали

формирование костной мозоли, образованной значительной степени пористости костной тканью с последующим ее уплотнением к 6-й неделе исследования. При обзорной световой микроскопии гистологических образцов в группе № 1 на 2-й неделе визуализировали дефекты костной ткани неправильной округлой формы, заполненные плотно-волокнистой соединительной тканью, формирование цепочек остеобластов поверхности костных трабекул, а также очаговое формирование ретикулофиброзной ткани. Это сопровождалось умеренным полнокровием сосудов с формированием незначительно выраженного периваскулярного отека, слабой клеточно-воспалительной инфильтрацией, преимущественно лимфоцитарно-макрофагального характера (Рисунок 21А).

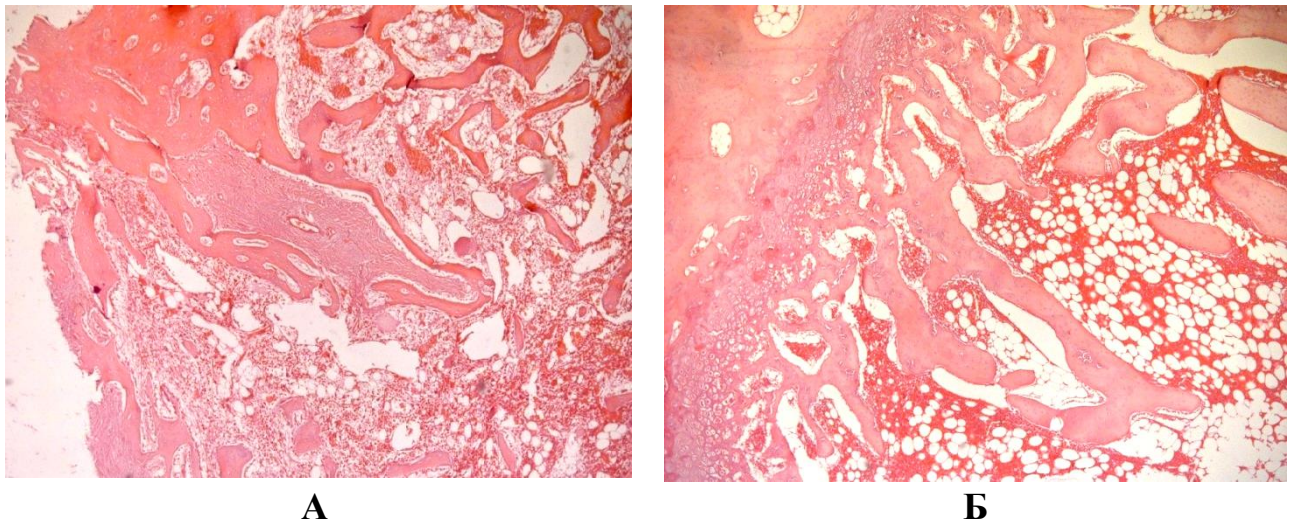


Рисунок 21 – Фрагмент костной ткани бедренной кости кролика линии NZW, область костного дефекта: А – 2-я неделя исследования; Б — 6-я неделя исследования. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

К 4-й неделе исследования отмечали компактизацию субхондрально расположенных трабекул костной ткани и сохранение более рыхлого их расположения в толще костной мозоли, образование первичных остеонов с первичными крупными гаверсовыми каналами, скопления незрелой костной ткани с большим количеством остеобластов на поверхности трабекул. Среди петель сформированной ретикулярной соединительной ткани и между волокнами грубоволокнистой соединительной ткани сохранялось большое количество

кровеносных сосудов без признаков нарушения гемодинамики. Степень выраженности клеточной реакции соответствовала предыдущему сроку наблюдения.

К 6-й неделе исследования происходило значительное уплотнение костной ткани в зоне моделированного дефекта за счет заполнения губчатой костью, тесно связанной с окружающей хрящевой тканью. В области внутренней поверхности дефектов происходило дальнейшее образование правильно ориентированных компактных костных балок со скоплением остеобластов на поверхности трабекул, формирование лакун элементами костного мозга (Рисунок 21Б). Сохранились очаги слабо выраженной клеточно-воспалительной инфильтрации лимфоцитарно-макрофагального характера.

При графической обработке данных морфологической части исследования выполнено разделение показателя численной плотности сосудов (Nai) на условные категории: от 0 до 9, от 10 до 19, от 20 до 29, от 30 до 40 (Рисунок 22).

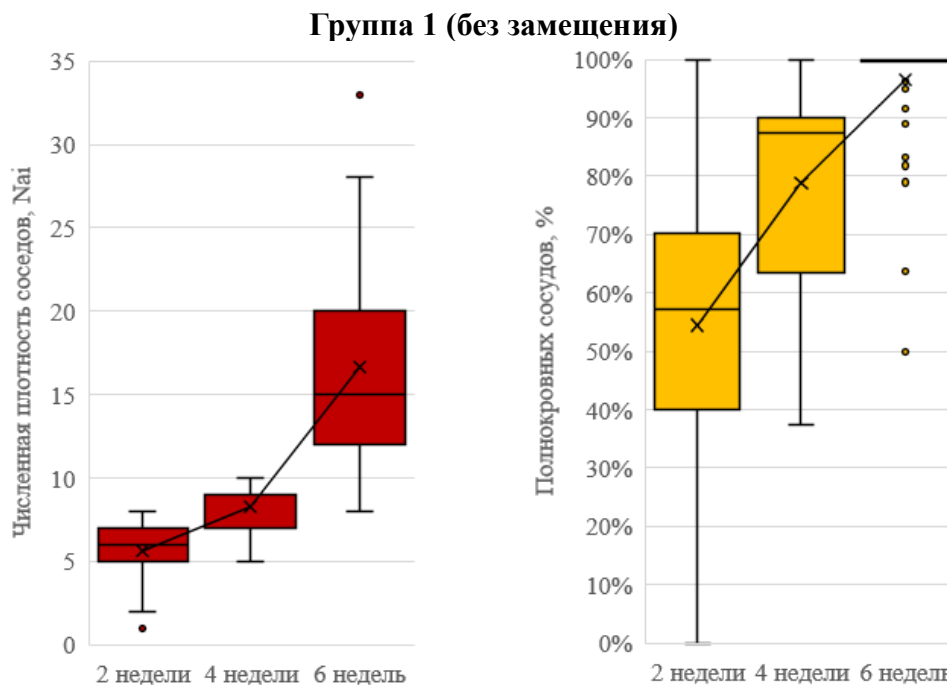


Рисунок 22 – Диаграмма распределения численной плотности сосудов (слева) и показателя (%) полнокровных сосудов (справа) на 2, 4 и 6-й неделе в группе № 1 эксперимента *in vivo*

Данные процентного содержания полнокровных сосудов разделены на условные категории: от 0 до 49 %, от 50 до 100 %. Определили прогрессивное увеличение обоих показателей со 2 по 6 неделю.

При графической обработке данных объемной плотности коллагеновых волокон выполнено разделение показателя на условные категории: от 0 до 4, от 5 до 9, от 10 до 15. Для показателей контрольной группы введена дополнительная категория от 16 до 20 (Рисунок 23). В ходе анализа данных выявлено равномерное распределение и нарастание показателя.

При обработке данных объемной плотности аргирофильных ретикулярных волокон выполнено разделение показателя на условные категории: от 0 до 4, от 5 до 9, от 10 до 15 (Рисунок 23). При этом также определяли равномерное нарастание показателя.

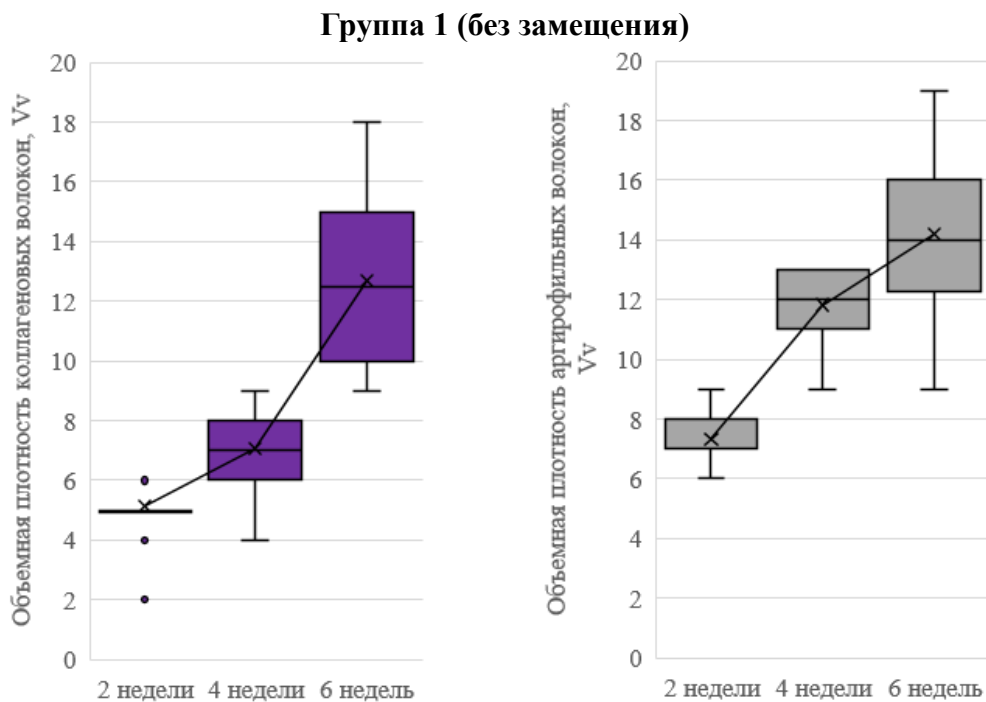


Рисунок 23 – Диаграмма распределения объемной плотности: коллагеновых волокон (слева) и аргирофильных волокон (справа) на 2, 4 и 6-й неделе в группе № 1 эксперимента *in vivo*

При графической обработке выполнено условное разделение показателей на категории: от 0 до 4, от 5 до 9, от 10 до 15, от 16 до 20 (Рисунок 24).

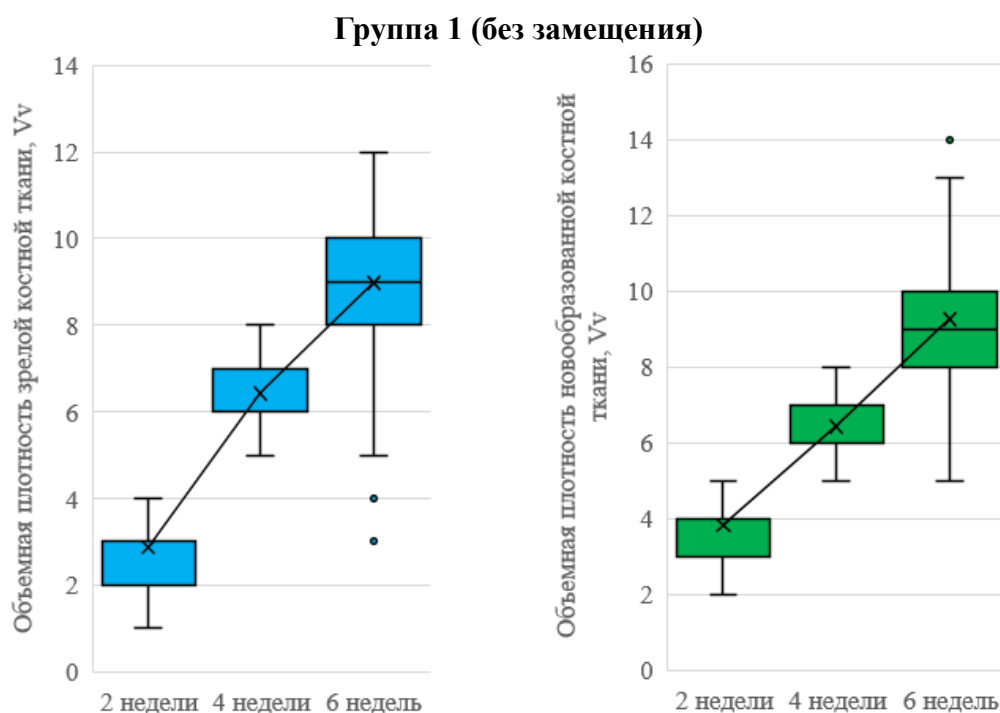


Рисунок 24 – Диаграммы распределения объемной плотности: зрелой (слева) и новообразованной (справа) костной ткани на 2, 4 и 6-й неделе в группе № 1 эксперимента *in vivo*

4.2 Оценка восстановления костной ткани в группе № 2 с замещением костного дефекта депротенизированной губчатой костью

При проведении рентгенографии и МСКТ образцов животных, выведенных в сроки наблюдения 2, 4 и 6 недель, выявлено последовательное восстановление костной ткани.

Учитывая заполнение костного дефекта КПМ, в отличие от контрольной группы, рентгеновская плотность к началу исследования была выше, не имела значимых отличий внутри зоны дефекта к 2 неделям (Таблица 14). По данным МСКТ в срок 2 недели костная плотность соответствовала D3 по классификации Misch: тонкая кость с пористой компактной пластинкой, рыхлое губчатое вещество (Рисунок 25). Показатели в среднем составили $575,25 \text{ HU} \pm 130,04$ (383; 759) для зоны заполнения костного дефекта со стороны костномозгового канала и $322,38 \text{ HU} \pm 370,1$ (-188; 727) для зоны заполнения костного дефекта со стороны

надкостницы. Показатели в зоне интактной кости составили 1826.25 ± 255.89 HU (1558 - 2344), D1 по Misch

Таблица 14 – Данные исследования рентгенплотности в группе № 2 исследования

Наименование показателя	2 группа Костный дефект с замещением губчатой ДПК		
	2 недели N=8 МЕД [Q1; Q3] СРЕД \pm СО (МИН-МАКС)	4 недели N=8 МЕД [Q1; Q3] СРЕД \pm СО (МИН-МАКС)	6 недель N=8 МЕД [Q1; Q3] СРЕД \pm СО (МИН-МАКС)
Зона дефекта со стороны костномозгового канала, HU (область 1)	580.5 [492; 639.25] 575.25 \pm 130.04 (383 - 759)	519.5 [352.5; 660] 529 \pm 244.42 (195 - 958)	777 [683.5; 1032.5] 874.38 \pm 283.51 (575 - 1336)
Зона дефекта со стороны надкостницы, HU (область 2)	406.5 [37.25; 601] 322.38 \pm 370.1 (-188 - 727)	1399 [1368; 1409.75] 1388.75 \pm 32.73 (1329 - 1430)	1490.5 [1351.75; 1609.5] 1426.25 \pm 326.81 (742 - 1774)
Зона интактной кортикальной пластинки (ИКП), HU (область 3)	1749.5 [1678; 1870.25] 1826.25 \pm 255.89 (1558 - 2344)	2143.5 [2094; 2339.75] 2183.5 \pm 226.68 (1770 - 2462)	2269 [2078; 2672.5] 2329.12 \pm 414.44 (1659 - 2852)
Классификация по Misch (область1/ область2/ область3)	3/3/1	3/2/1	2/1/1
Сравнение зон дефекта и ИКП критерием Вилкоксона, р-уровень, область1- область2 область1- область3 область2- область3	1-2: 0.195 1-3: 0.012* 2-3: 0.012*	1-2: 0.008* 1-3: 0.008* 2-3: 0.008*	1-2: 0.008* 1-3: 0.008* 2-3: 0.008*

Примечание: символом «» обозначены статистически значимо отличающиеся замеры, т.е. $p < 0,05$*

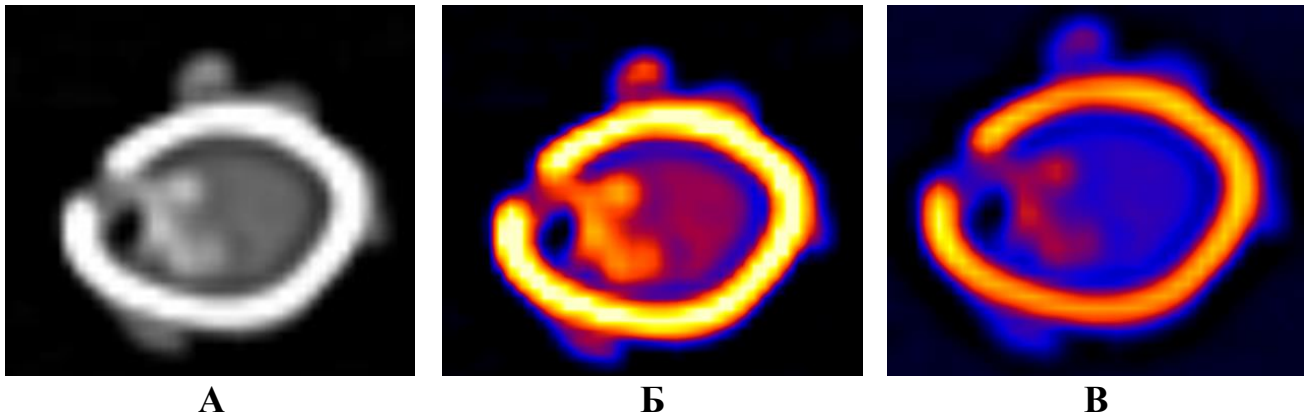


Рисунок 25 – Данные МСКТ на 2 неделе в группе №2 (А), с замещением костного дефекта ДПГК-ГБК при различной обработке снимков (Б, В: обработка в программе К-Пас v 1.6.0; zoom factor x10)

В срок 4 недели данные срезов МСКТ соответствовали типу D3 по классификации Misch костной ткани в зоне заполнения дефекта со стороны костномозгового канала. В среднем для данной области показатели составили $529,0 \text{ HU} \pm 244,42$ (195; 958) (Рисунок 26). Для области дефекта со стороны надкостницы отмечали значительное увеличение рентгеновской плотности, более чем в 4,3 раза ($p < 0,05$).

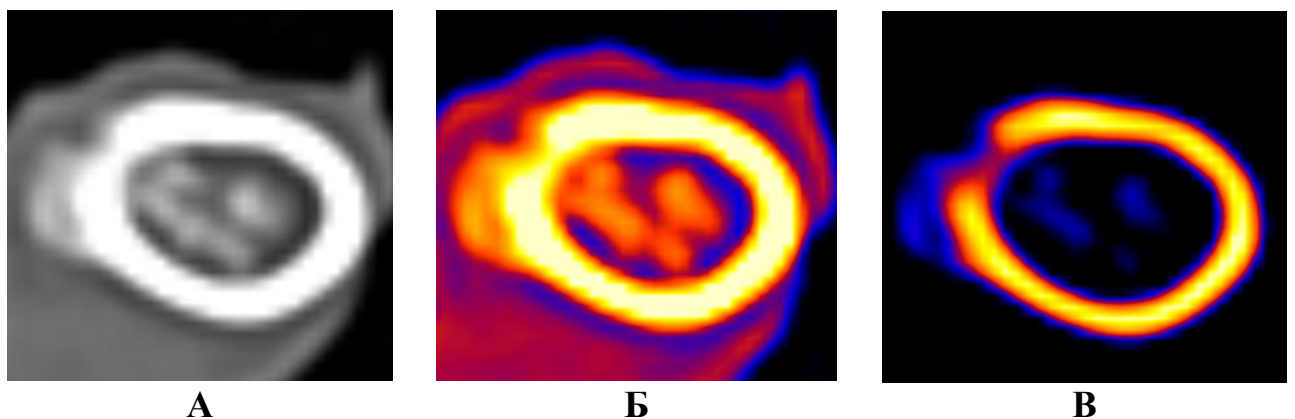


Рисунок 26 – Данные МСКТ на 4 неделе в группе №2 (А), с замещением костного дефекта ДПГК-ГБК (Б, В: обработка в программе К-Пас v 1.6.0; zoom factor x10)

По данным МСКТ в срок 6 недель рентгеновская плотность в области замещения дефекта со стороны костномозгового канала с учетом широкого

диапазона данных соответствовала типу D3–D2 по классификации Misch (Рисунок 27). В среднем этой зоне значения соответствовали типу D2, составили $874,38 \text{ HU} \pm 283,51$ (575; 1336).

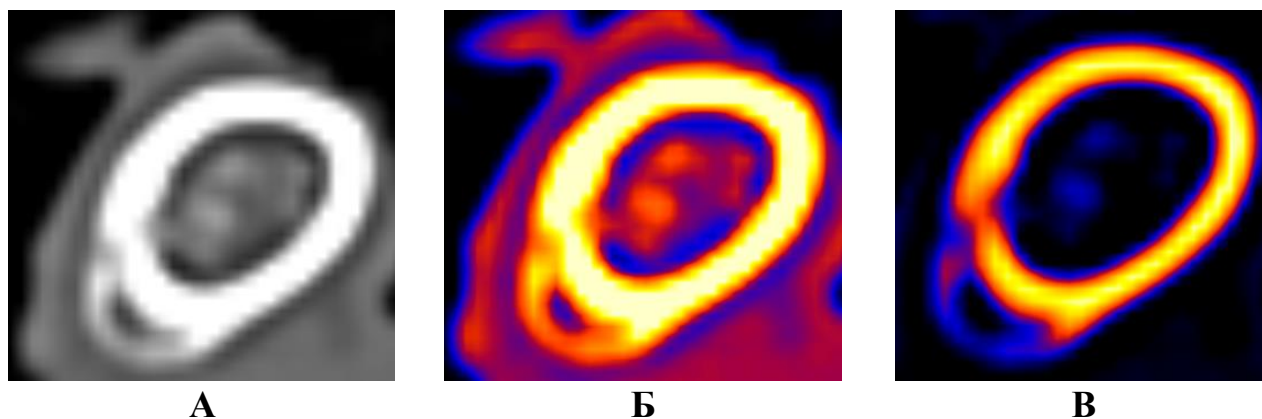


Рисунок 27 – Данные МСКТ на 6 неделе в группе №2 (А), с замещением костного дефекта ДПК-ГБК (Б, В: обработка в программе К-Рас v 1.6.0; zoom factor x10)

При этом, отмечено нарастание показателя плотности кости по отношению к 2 и 4 неделям исследования в 1,5 и 1,6 раза соответственно. Для области замещения дефекта со стороны надкостницы отмечали прогрессивное нарастание рентгенплотности к 4 неделям исследования в 4,3 раза ($p < 0,05$), и небольшое нарастание с 4 по 6 неделю в 1,03 раза ($p > 0,05$).

К 6 неделям показатели интактной кортикальной пластинки относили к D1 по Misch со средним значением $2329,12 \text{ HU} \pm 414,44$ (1659; 2852). Разница между показателями области дефекта по отношению к области ненарушенной костной пластинки оставалась значимой ($p = 0,008$).

При световой микроскопии образцов костной ткани группы № 2 на 2-й неделе отмечали полное заполнение костного дефекта фрагментами костно-замещающего материала и их плотное прилегание к собственной зрелой костной ткани в области внутренней поверхности зоны дефекта (Таблица 15).

Таблица 15 – Результаты гистологического исследования в группе №2, с использованием ДПК для замещения дефекта ($M \pm m$)

Параметры исследования	2 группа Костный дефект с замещением ДПК		
	2 недели	4 недели	6 недель
Численная плотность сосудов в образцах костной ткани (N_{ai})	10,43* \pm 3,50	18,73* \pm 2,20	23,70* \pm 6,80
Процент полнокровных сосудов, %	38,3* \pm 0,20	75,49* \pm 0,20	92,20* \pm 0,10
Объемная плотность коллагеновых волокон в образцах костной ткани ($Vv\%$)	6,35* \pm 3,80	8,83* \pm 2,53	9,26* \pm 1,60
Объемная плотность аргирофильных волокон в образцах костной ткани ($Vv\%$)	7,25 \pm 1,80	9,95* \pm 1,60	10,03* \pm 2,20
Объемная плотность зрелой костной ткани ($Vv\%$)	5,98* \pm 2,80	8,81* \pm 1,50	12,83* \pm 1,50
Объемная плотность новообразованной костной ткани ($Vv\%$)	6,11* \pm 3,20	9,81* \pm 1,60	13,53* \pm 2,70

*Примечание:** достоверность отличий величин рассматриваемых параметров от аналогичных показателей в контрольной группе, $p < 0,001$.

Во все периоды исследования хорошо выраженная кортикальная пластинка и губчатая кость имели четкую выраженность и развитую архитектуру трабекул с пластинчатым строением и хорошо выраженными гаверсовыми каналами, формированием остеонов со слабо выраженной структурой. На 2-й неделе исследования выявили значительное количество истонченных костных трабекул, хаотично расположенных, с расширением межтрабекулярного пространства, заполненного большим количеством ретикулярных и грубоволокнистых соединительно-тканых волокон. Губчатое вещество костных балок представлено пластинчатой костной тканью с поверхностным формированием цепочек остеобластов (Рисунок 28А).

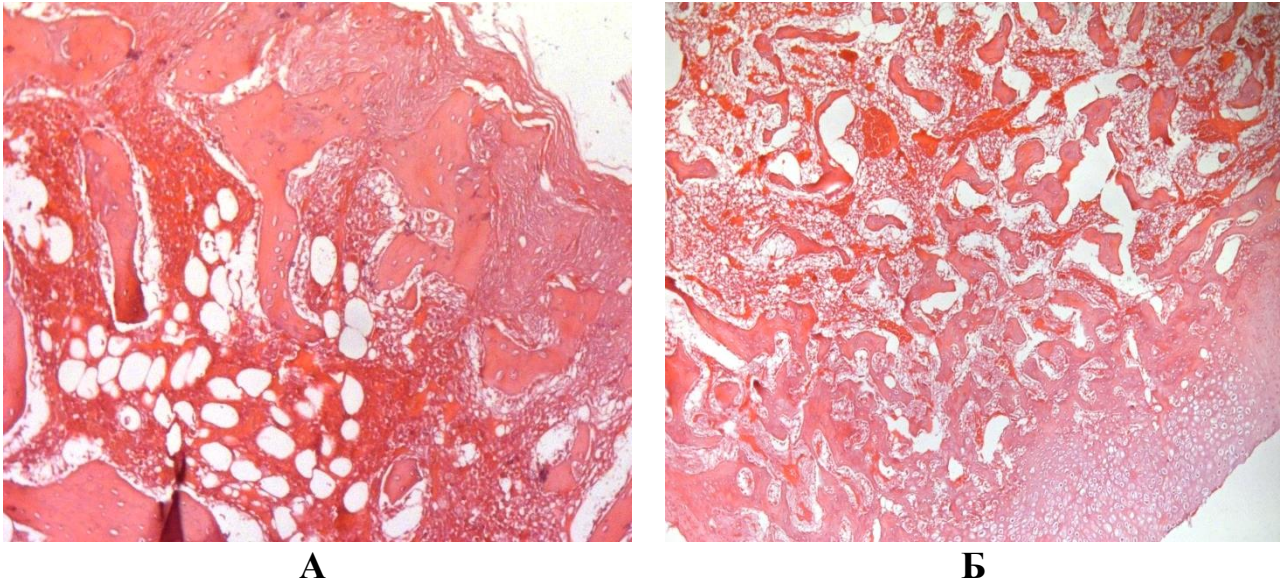


Рисунок 28 – Фрагмент костной ткани бедренной кости кролика линии NZW, область замещения костного дефекта ДПК-ГБК: А – 2-я неделя исследования; Б – 6-я неделя исследования. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

Помимо этого, определялась очаговая клеточная инфильтрация лимфоцитарно-макрофагального характера. На 4-й неделе исследования формирование трабекул костной ткани сохранялось. Межбалочные пространства были заполнены ретикулярной соединительной тканью с участками грубоволокнистой неоформленной соединительной ткани с сохранением большого количества кровеносных сосудов без признаков гемоциркуляторных нарушений. Аналогичные изменения были выявлены и на 6-й неделе исследования. При этом трабекулы губчатой кости были представлены зрелой костной тканью с очаговыми отложениями остеоида и формированием цепочек из остеобластов на поверхности. Сохранялись участки дезорганизации использованного костного матрикса в участках локализации многоядерных гигантских клеток и сохранения клеточного макрофагального инфильтрата. В большей степени это было выражено в области кортикальной пластинки. В сохраняющихся участках формирования ретикулярной соединительной ткани отмечали очаговое полнокровие сосудов (Рисунок 28Б).

При графической обработке данных показатели численной плотности сосудов (N_{ai}) разделили на условные категории: от 0 до 9, от 10 до 19, от 20 до 29,

от 30 до 40 (Рисунок 29). Определили увеличение численной плотности сосудов и их полнокровия со 2-й по 6-ю неделю.

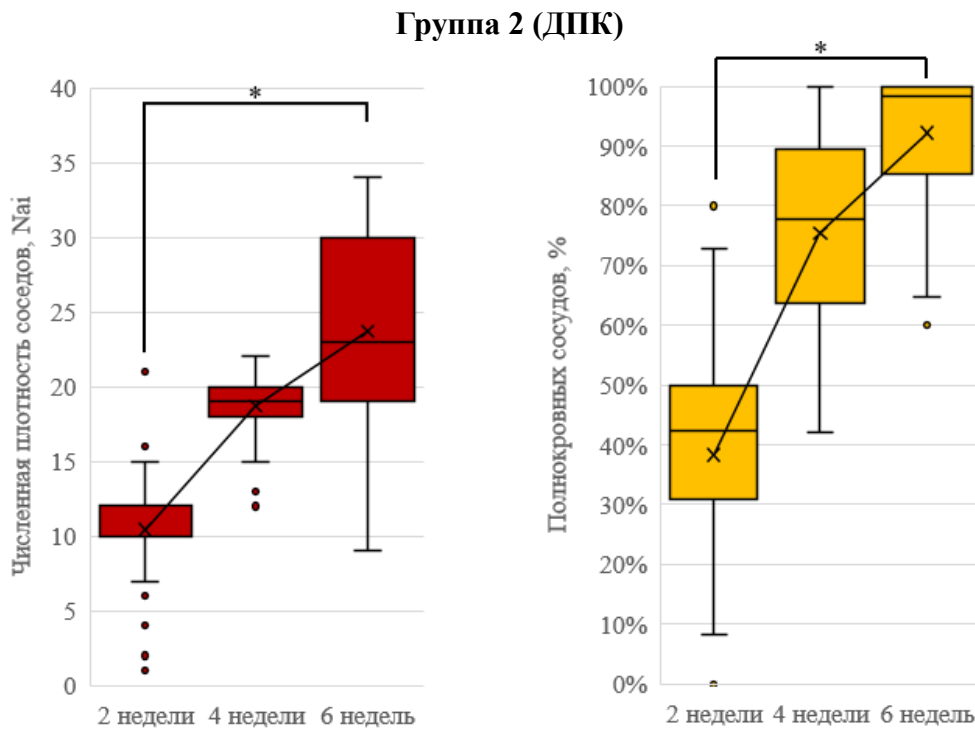


Рисунок 29 – Диаграмма распределения численной плотности сосудов (слева) и показателя % полнокровных сосудов (справа) на 2, 4 и 6-й неделе в группе № 2 эксперимента *in vivo* (* достоверность отличий по отношению к контрольной группе, $p < 0,001$)

При графической обработке данных процентного содержания полнокровных сосудов выполнено разделение показателя на условные категории: от 0 до 49 %, от 50 до 100 % (Рисунок 29). Со 2-й по 4-ю неделю определяется достоверное превалирование показателей численной плотности и % полнокровных сосудов группы № 2 по отношению к контрольной группе № 1 ($p < 0,001$). К 6-й неделе показатель % полнокровных сосудов прогрессивно увеличивается, как статистически значимое определено лишь небольшое снижение % полнокровных сосудов в по отношению к контрольной группе № 1 ($p < 0,001$).

При графической обработке данных объемной плотности коллагеновых волокон выполнено условное разделение показателя на категории: от 0 до 4, от 5

до 9, от 10 до 15 (Рисунок 30). Определяли увеличение показателей со 2-й по 6-ю неделю эксперимента. Показатели объемной плотности коллагеновых волокон были достоверно выше по отношению к группе № 1 ($p < 0,001$).

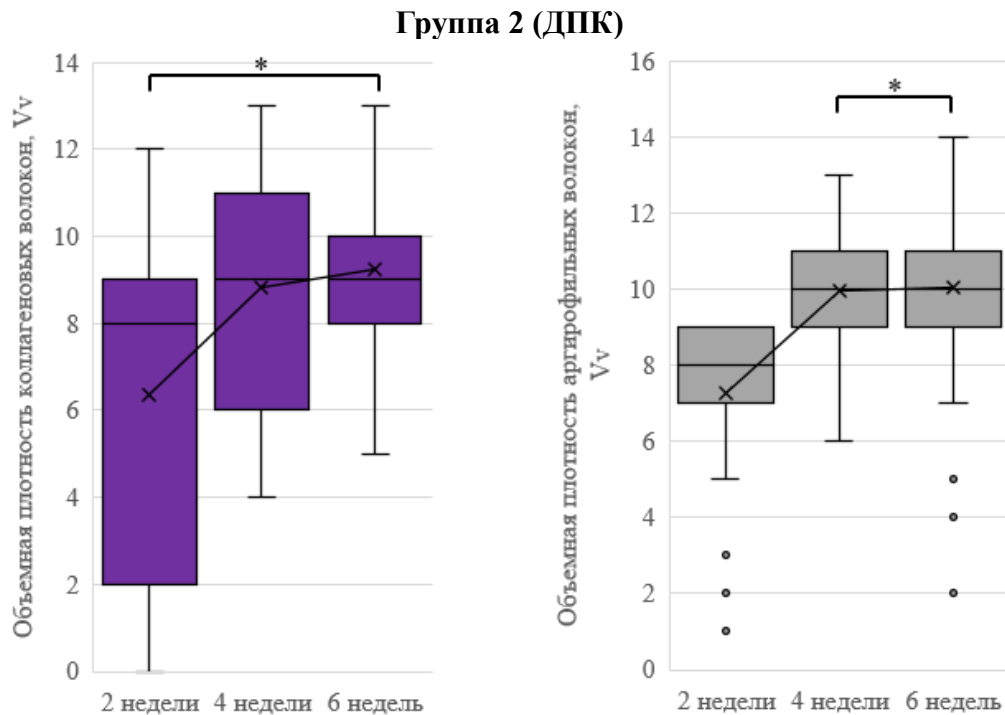


Рисунок 30 – Диаграмма распределения объемной плотности коллагеновых волокон (слева) и аргирофильных волокон (справа) на 2, 4 и 6-й неделе в группе № 2 эксперимента *in vivo* (* достоверность отличий по отношению к контрольной группе, $p < 0,001$)

Аналогичное нарастание показателя отмечали для объемной плотности аргирофильных волокон. Значимое отличие по показателю объемной плотности аргирофильных волокон наблюдали только с 4-й недели и до окончания эксперимента ($p < 0,001$), на 2-й неделе разница показателей определена как незначимая (Рисунок 30).

При графической обработке данных объемной плотности зрелой и новообразованной костной ткани выполнено условное разделение показателя на категории: от 0 до 4, от 5 до 9, от 10 до 15 (Рисунок 31). Со 2-й по 6-ю неделю эксперимента определяли прогрессивное увеличение показателей зрелой и новообразованной костной ткани. При этом для каждого срока наблюдения

отмечали значимое превалирование показателей как зрелой, так и новообразованной костной ткани по отношению к группе № 1 без замещения дефекта ($p < 0,001$).

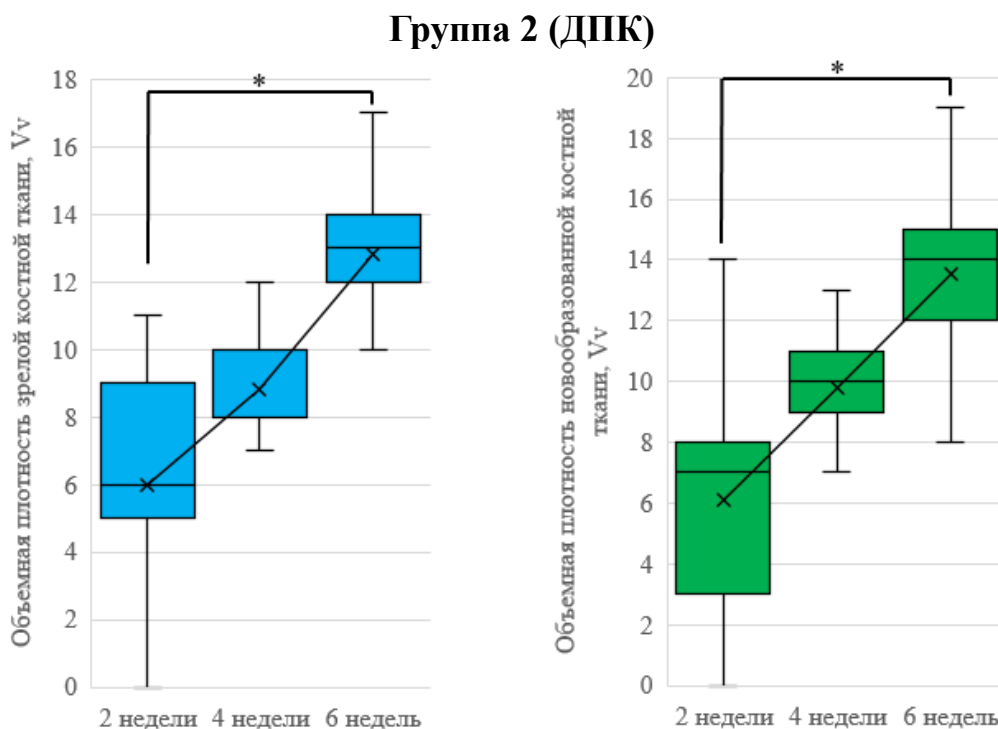


Рисунок 31 – Диаграмма распределения объемной плотности зрелой (слева) и новообразованной (справа) костной ткани на 2, 4 и 6-й неделе в группе № 2 эксперимента *in vivo* (* достоверность отличий по отношению к контрольной группе, $p < 0,001$)

4.3 Оценка восстановления костной ткани в группе № 3 с замещением костного дефекта тканеинженерной конструкцией

При проведении МСКТ образцов, полученных от животных, выведенных в сроки 2, 4 и 6 недель, выявлены данные о прогрессивном восстановлении костной плотности (Таблица 16). В срок 2 недели по данным срезов МСКТ рентгеновская плотность соответствовала D3 по классификации Misch для области замещения костного дефекта, что соответствовало аналогичным значениям в группе № 2 (Рисунок 32). Показатели в среднем составили $572,38 \text{ HU} \pm 178,07$ (322; 834) для

области замещения костного дефекта со стороны костномозгового канала и 413,38 HU \pm 145,55 (158; 649) со стороны надкостницы.

Таблица 16 – Данные исследования рентгеноплотности в группе № 3 исследования

Наименование показателя	3 группа Костный дефект с замещением губчатой ДПК + SVF		
	2 недели N=8 МЕД [Q1; Q3] СРЕД \pm СО (МИН-МАКС)	4 недели N=8 МЕД [Q1; Q3] СРЕД \pm СО (МИН-МАКС)	6 недель N=8 МЕД [Q1; Q3] СРЕД \pm СО (МИН-МАКС)
Зона дефекта со стороны костномозгового канала, HU (область 1)	560 [480.5; 664.25] 572.38 \pm 178.07 (322 - 834)	1028 [897.5; 1204.25] 1043.62 \pm 194.32 (789 - 1271)	1363 [1235; 1391.25] 1351.25 \pm 221.18 (1052 - 1805)
Зона дефекта со стороны надкостницы, HU (область 2)	435.5 [347.25; 467] 413.38 \pm 145.55 (158 - 649)	1260 [1220; 1393.5] 1294.12 \pm 110.38 (1149 - 1442)	1330.5 [1294.75; 1383.25] 1360.75 \pm 120.82 (1235 - 1580)
Зона интактной кортикальной пластинки (ИКП), HU (область 3)	1437 [1412.75; 1701.25] 1613.38 \pm 344.39 (1353 - 2172)	2303 [2155; 2542] 2341.12 \pm 213.97 (2113 - 2622)	1773 [1669; 1847.25] 1773.62 \pm 149.36 (1548 - 1992)
Классификация по Misch (область1/ область2/ область3)	3/3/1	2/2/1	1/1/1
Сравнение зон дефекта и ИКП критерием Вилкоксона, р-уровень область1- область2 область1- область3 область2- область3	1-2: 0.148 1-3: 0.012* 2-3: 0.012*	1-2: 0.039* 1-3: 0.021* 2-3: 0.021*	1-2: 0.547 1-3: 0.045* 2-3: 0.023*

Примечание: символом «*» обозначены статистически значимо отличающиеся замеры, т.е. $p < 0,05$

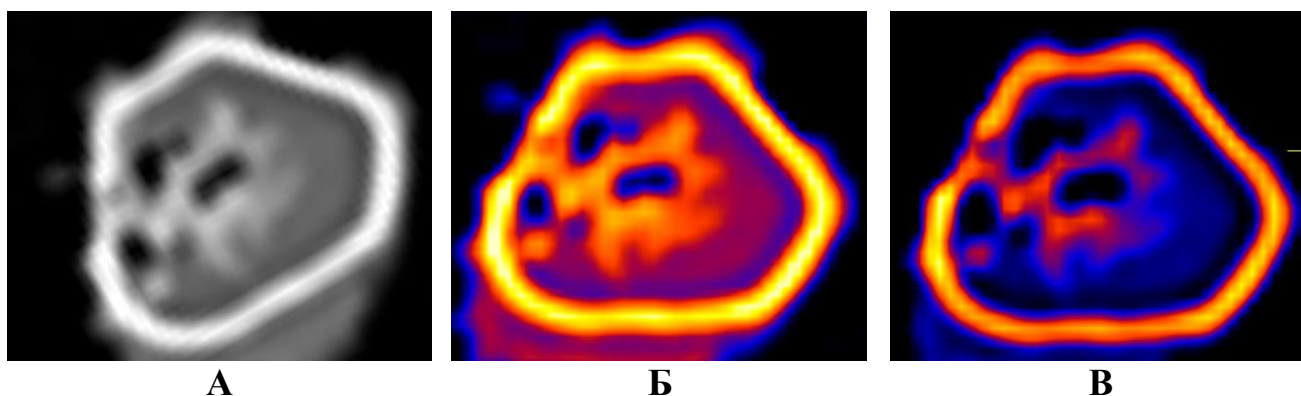


Рисунок 32 – Данные МСКТ на 2 неделе в группе №3 (А), с замещением костного дефекта при помощи тканеинженерной конструкции (Б, В: обработка в программе K-Pacs v 1.6.0; zoom factor x10)

На 4-й неделе рентгеновская плотность по данным МСКТ соответствовала D2 по классификации Misch для каждой области замещения костного дефекта. Со стороны надкостницы показатели составили $1294,12 \text{ HU} \pm 110,38$ (1149; 1442), а со стороны костно-мозгового канала – $1043,62 \pm 194,32$ (789; 1271), что превышало аналогичные показатели на сроке 2 недель в 3,13 и 1,8 раза соответственно (Рисунок 33). Отмечали относительное выравнивание между собой показателей областей в зоне смоделированного дефекта. В области ненарушенной кортикальной пластинки показатели рентгеновской плотности в среднем составили $2341,12 \text{ HU} \pm 213,97$ (2113; 2622), тип D1. Различия областей зоны дефекта по отношению к ненарушенной зоне оставались значимыми, $p = 0,021$.

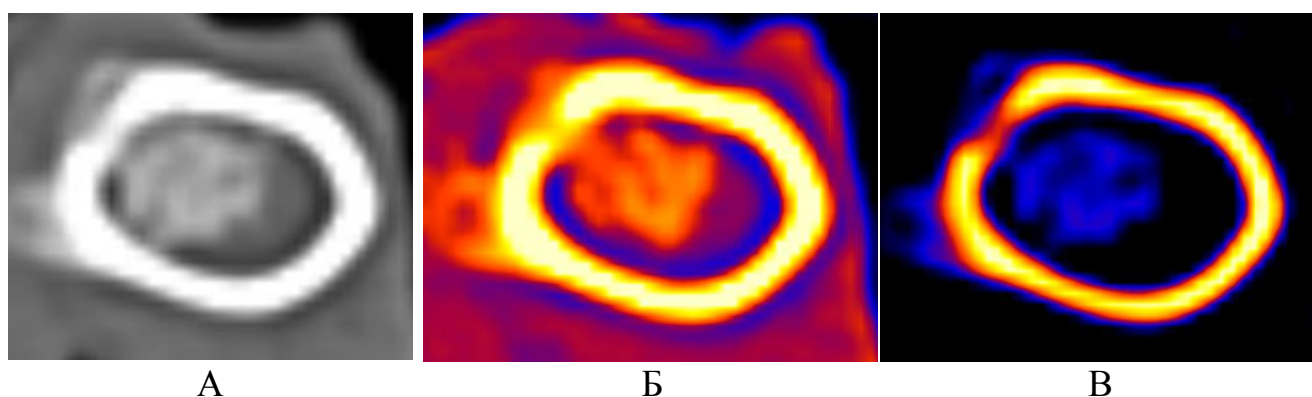


Рисунок 33 – Данные МСКТ на 4 неделе в группе №3 (А), с замещением костного дефекта при помощи тканеинженерной (Б, В: обработка в программе K-Pacs v 1.6.0; zoom factor x10)

К 6-й неделе исследования по данным МСКТ рентгенплотность с учетом распределения данных для области замещения костного дефекта при помощи тканеинженерной конструкции на основе ДПКГ совместно с SVF соответствовала типу D1 по классификации Misch. Что, в свою очередь, соответствует значениям равномерной выраженности компактного и губчатого вещества (Рисунок 34).

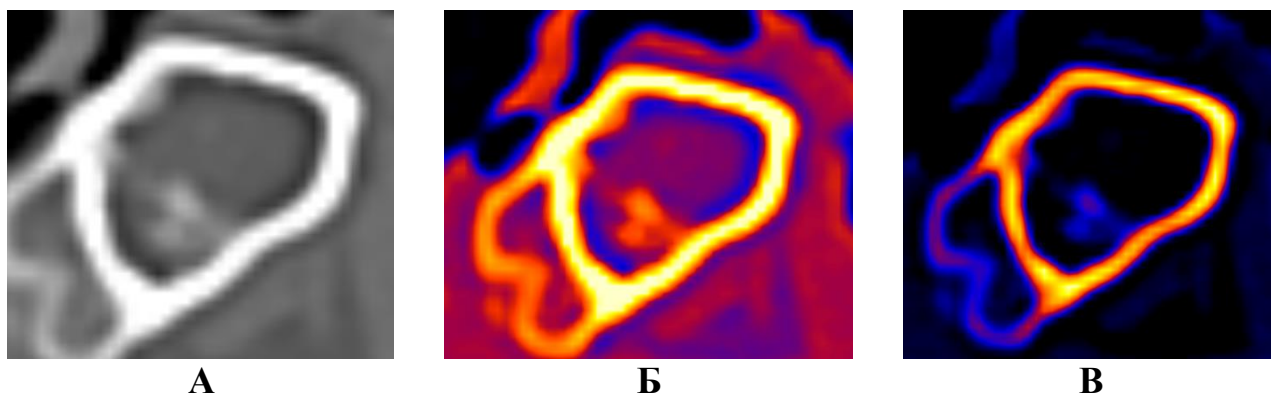


Рисунок 34 – Данные МСКТ на 6 неделе в группе №3 (А), с замещением костного дефекта при помощи тканеинженерной конструкции (Б, В: обработка в программе K-Pacs v 1.6.0; zoom factor x10)

Значения в области замещения дефекта со стороны надкостницы и со стороны костномозгового канала в среднем составили $1360,75 \pm 318,3$ HU [604; 1846] и $1351,3 \pm 442,3$ HU [164; 2324], $1360,75$ HU $\pm 120,82$ (1235; 1580) и $1351,25$ HU $\pm 221,18$ (1052; 1805), что в 3,3 и 2,3 раза превышает таковые значения на сроке в 2 недели соответственно. Область ненарушенной костной пластинки к 6 неделям имела средние значения $1773,62$ HU $\pm 149,36$ (1548; 1992) и соответствовала D1 типу по Misch с учетом широкого диапазона данные различия по отношению к области дефекта как со стороны надкостницы, так и со стороны костномозгового канала приближались к не значимой ($p=0,045$ и $p=0,023$ соответственно).

Данные лучевой диагностики подтверждались результатами гистологического исследования (таблица 17).

Таблица 17 – Результаты гистологического исследования репаративного остеогенеза в группе №3, с использованием ТИК для замещения дефекта ($M \pm m$)

Параметры исследования	3 группа Костный дефект с замещением губчатой ДПК + SVF		
	2 недели	4 недели	6 недель
Численная плотность сосудов в образцах костной ткани (Nai)	10,40* \pm 3,41	20,36*,** \pm 4,50	26,31*,** \pm 7,90
Процент полнокровных сосудов, %	81,19*,** \pm 0,20	64,45* \pm 0,20	97,37 \pm 0,30
Объемная плотность коллагеновых волокон в образцах костной ткани (Vv%)	6,88* \pm 1,50	9,30* \pm 1,10	10,68*,** \pm 1,60
Объемная плотность аргирофильных волокон в образцах костной ткани (Vv%)	9,66*,** \pm 1,30	10,23* \pm 1,90	10,65* \pm 2,10
Объемная плотность зрелой костной ткани (Vv%)	8,63*,** \pm 2,20	11,51*,** \pm 2,50	14,58*,** \pm 2,20
Объемная плотность новообразованной костной ткани (Vv%)	9,51*,** \pm 2,20	12,95*,** \pm 2,71	16,43*,** \pm 2,10

*Примечание:** достоверность отличий величин рассматриваемых параметров от аналогичных показателей в контрольной группе, $p < 0,001$; ** достоверность отличий величин рассматриваемых параметров от аналогичных показателей в группе № 2, $p < 0,001$.

При визуализации гистологических образцов костной ткани группы № 3 (Рисунок 35) выявили прогрессирующие признаки репаративного остеогенеза со 2-й по 6-ю неделю исследования (таблица 17), которые были выражены в большей степени, в сравнение с аналогичными гистологическими проявлениями в соответствующие сроки исследования в образцах групп № 1 и 2. К 6-й неделе исследования выявили формирование костной ткани, представленной кортикальной пластинкой с первичными широкими гаверсовыми каналами, в области прилегания к костной ткани к стенке дефекта. В вышерасположенных участках определяли отдельные очаги костного регенерата с фрагментами костно-замещающего материала, окруженного новообразованными костными балками с формированием на поверхности цепочек остеобластов и отложением остеоида. Новообразованная костная ткань плотно прилегала к участкам костно-

замещающего материала, местами образуя единую структуру с очагами резорбции костной ткани в участках локализации гигантских многоядерных клеток. Межбалочное пространство было заполнено стромальным компонентом костного мозга, преимущественно ретикулярными соединительно-тканными волокнами, неоформленными волокнами грубоволокнистой соединительной ткани, с достаточным количеством сосудов без признаков гемоциркуляторных нарушений. Помимо этого, сохранялись участки лимфоцитарно-макрофагальной инфильтрации.

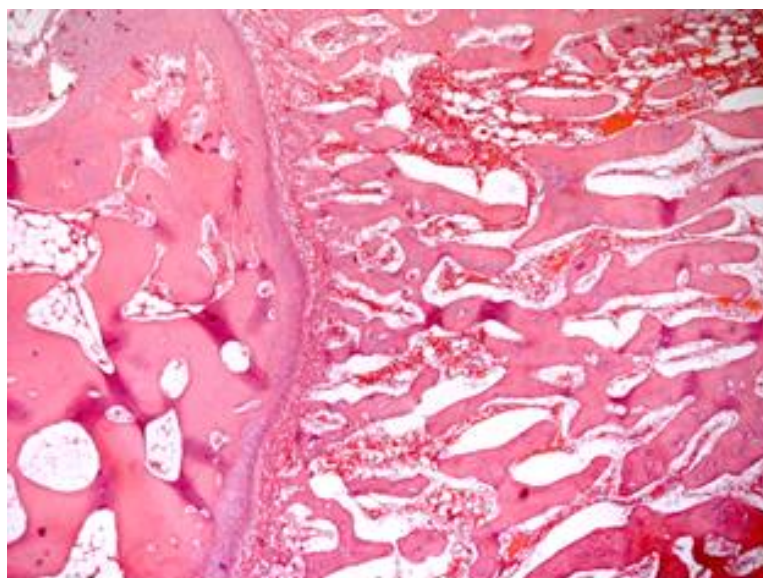


Рисунок 35 – Фрагмент костной ткани бедренной кости кролика линии NZW, область замещения костного дефекта тканеинженерной конструкцией на основе ДПКК с SVF жировой ткани в качестве клеточного компонента, 6-я неделя исследования. Окраска гематоксилином и эозином, $\times 100$

При графической обработке данных морфологической части исследования выполнено разделение показателя численной плотности сосудов (Nai) на условные категории: от 0 до 9, от 10 до 19, от 20 до 29, от 30 до 40 (Рисунок 36).

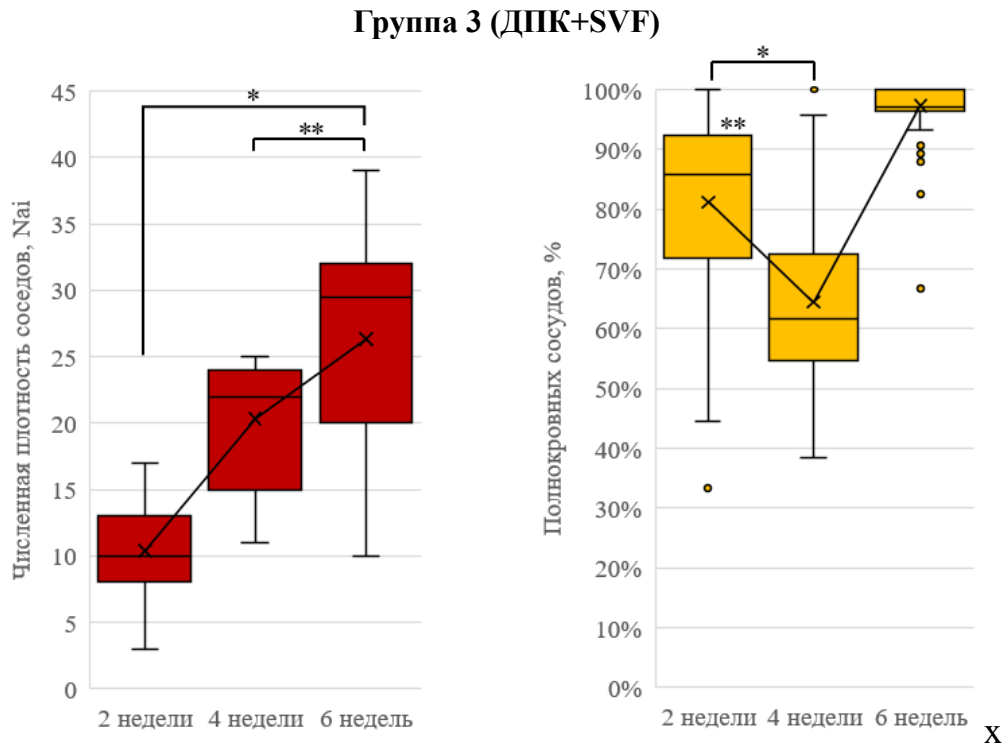


Рисунок 36 – Диаграмма распределения численной плотности сосудов (сверху) и показателя (%) полнокровных сосудов (снизу) на 2, 4 и 6-й неделе в группе № 3 эксперимента *in vivo* (* достоверность отличий величин рассматриваемых параметров от аналогичных показателей в контрольной группе, $p < 0,001$; ** достоверность отличий величин рассматриваемых параметров от аналогичных показателей в группе № 2, $p < 0,001$)

Уже со 2-й недели определяли достоверное превалирование показателей численной плотности сосудов группы № 3 по отношению к контрольной группе № 1 ($p < 0,001$). Между группами с замещением костного дефекта (группы № 2 и 3) на данном сроке значимых различий не определялось ($p = 0,699$). Преобладание показателей численной плотности сосудов группы № 3 над таковыми в группе № 2 определяется с 4-й недели исследования ($p < 0,001$) и сохраняется к 6-й неделе ($p < 0,001$).

При графической обработке данных процентного содержания полнокровных сосудов выполнено разделение показателя на условные категории: от 0 до 49 %, от 50 до 100 % (Рисунок 36). Для группы № 3 определяется преобладание процентного содержания полнокровных сосудов на 2-й неделе

исследования, однако к 4-й неделе показатель несколько снижается. При этом к 6-й неделе в группе № 3 с замещением дефекта тканеинженерной конструкцией процент полнокровия сосудов вновь возвращается к высокому уровню.

Следует отметить, что для групп № 1 и 2 на 2-й неделе исследования имеются данные о полнокровии сосудов менее 50 %, что подтверждается их статистически значимыми отличиями по отношению к группе № 3 ($p < 0,001$). С 4-й недели исследования значимым остается лишь отличие групп № 2 и 3 по отношению к контрольной группе ($p < 0,001$), между группами отличия определены как незначимые ($p = 0,009$). И к 6-й неделе показатель (%) полнокровных сосудов прогрессивно увеличивается во всех группах. Между группами № 2 и 3 различия оказались незначимыми ($p = 0,060$), показатели группы № 3 по отношению к контрольной группе признаны также незначимыми ($p = 0,008$).

При графической обработке данных объемной плотности коллагеновых волокон выполнено разделение показателя на категории: от 0 до 4, от 5 до 9, от 10 до 15 (Рисунок 37). В ходе анализа данных выявлено более равномерное распределение показателей для групп № 3 и 1. Между собой группы № 2 и 3 со 2-й по 4-ю неделю не имели достоверного отличия со значением $p = 0,002$ и $p = 0,329$ соответственно. К 6-й неделе показатели групп № 2 и 3 имели между собой значимые отличия ($p < 0,001$). При графической обработке данных объемной плотности аргирофильных ретикулярных волокон выполнено разделение показателя на категории: от 0 до 4, от 5 до 9, от 10 до 15 (Рисунок 37). Для показателей группы № 3 и контрольной группы № 1 введена дополнительная категория от 16 до 20. Показатель увеличивался со 2-й по 6-ю неделю. На протяжении всего срока наблюдения показатель был выше, чем в контрольной группе ($p < 0,001$). При этом на 2-й неделе исследования показатели объемной плотности аргирофильных волокон соединительной ткани были выше, чем остальных группах исследования ($p < 0,001$).

Группа 3 (ДПК+SVF)

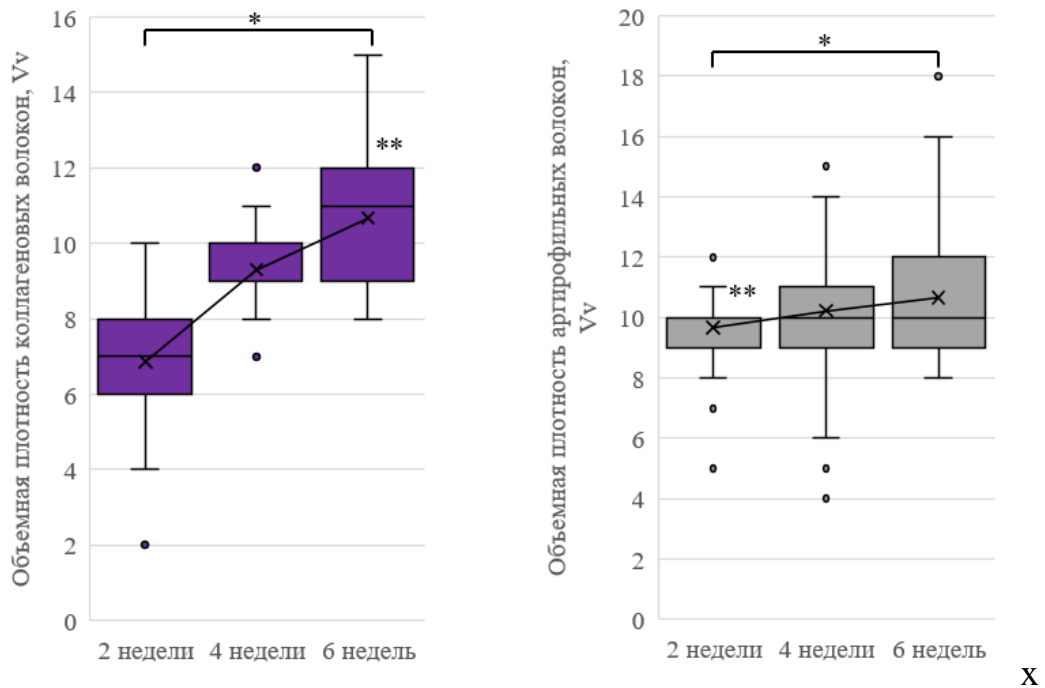


Рисунок 37 – Диаграмма распределения объемной плотности коллагеновых волокон (сверху) и аргирофильных волокон (снизу) на 2, 4 и 6-й неделе в группе № 3 эксперимента *in vivo* (* достоверность отличий от контрольной группы, $p < 0,001$; ** достоверность отличий от аналогичных показателей в группе № 2, $p < 0,001$)

При графической обработке данных объемной плотности зрелой и новообразованной костной ткани выполнено условное разделение показателя на категории: от 0 до 4, от 5 до 9, от 10 до 15. Для показателей группы № 3 и контрольной группы № 1 введена дополнительная категория от 16 до 20 (Рисунок 38). Показатели объемной плотности как зрелой, так и новообразованной костной ткани прогрессивно увеличивались со 2-й по 6-ю неделю эксперимента. На каждом сроке наблюдения определено преобладание показателей группы № 3 замещением дефекта тканеинженерной конструкцией на основе ДПК с SVF в качестве клеточного компонента ($p < 0,001$).

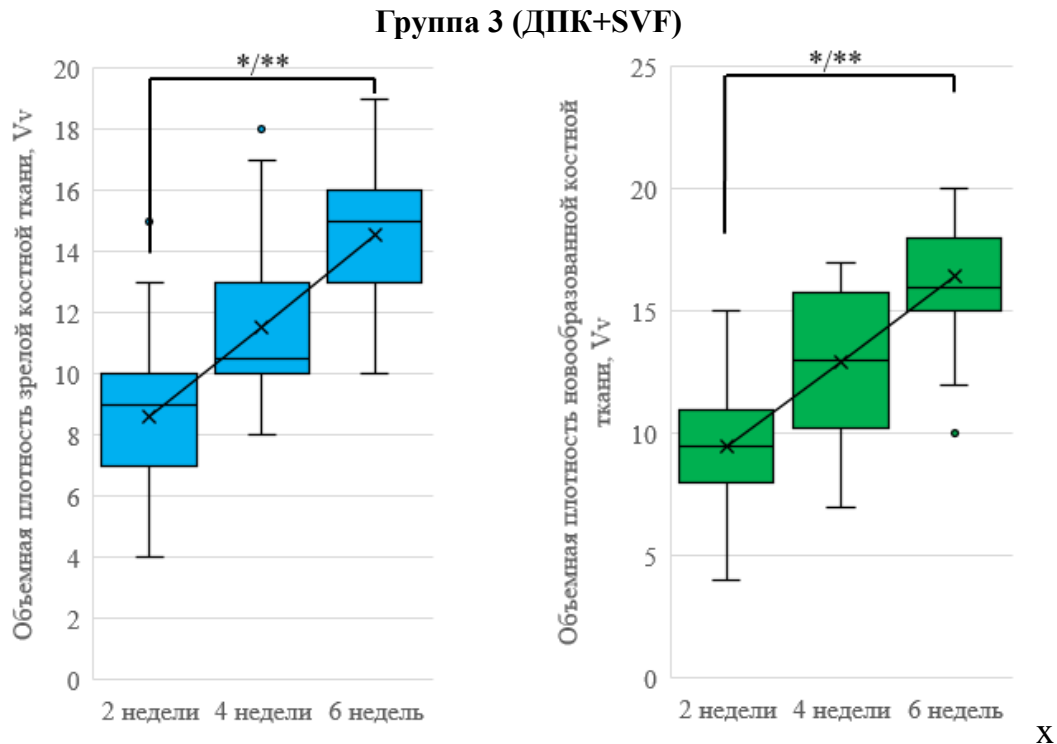


Рисунок 38 – Диаграмма распределения объемной плотности зрелой (сверху) и новообразованной (снизу) костной ткани на 2, 4 и 6-й неделе в группе № 3 эксперимента *in vivo* (* достоверность отличий от аналогичных показателей в контрольной группе, $p < 0,001$; ** достоверность отличий величин от аналогичных показателей в группе № 2, $p < 0,001$)

4.4 Сравнение показателей при замещении костных дефектов в эксперименте *in vivo* с применением ДПК-ГБК и тканеинженерной конструкции на ее основе

При визуальном осмотре покровных тканей участков экспериментального моделирования костных дефектов с их замещением КПМ у всех животных признаков местно-развивающейся воспалительной реакции выявлено не было. Послеоперационные рубцы у всех животных были состоятельны, толщиной до 0,2–0,3 см, плотной консистенции на всем протяжении. Целостность кожных покровов в области послеоперационного рубца была без нарушений и патологических изменений, бледно-розового цвета. Подкожная клетчатка в области послеоперационного рубца в виде равномерно распределенной жировой

ткани светло-кремового цвета, толщиной до 0,5 см, без патологических изменений.

При морфометрическом исследовании образцов костной ткани области моделирования костного дефекта и его замещением КПК во всех группах было выявлено прогрессивное увеличение показателя численной плотности сосудов к 6-й неделе исследования (Рисунок 39).

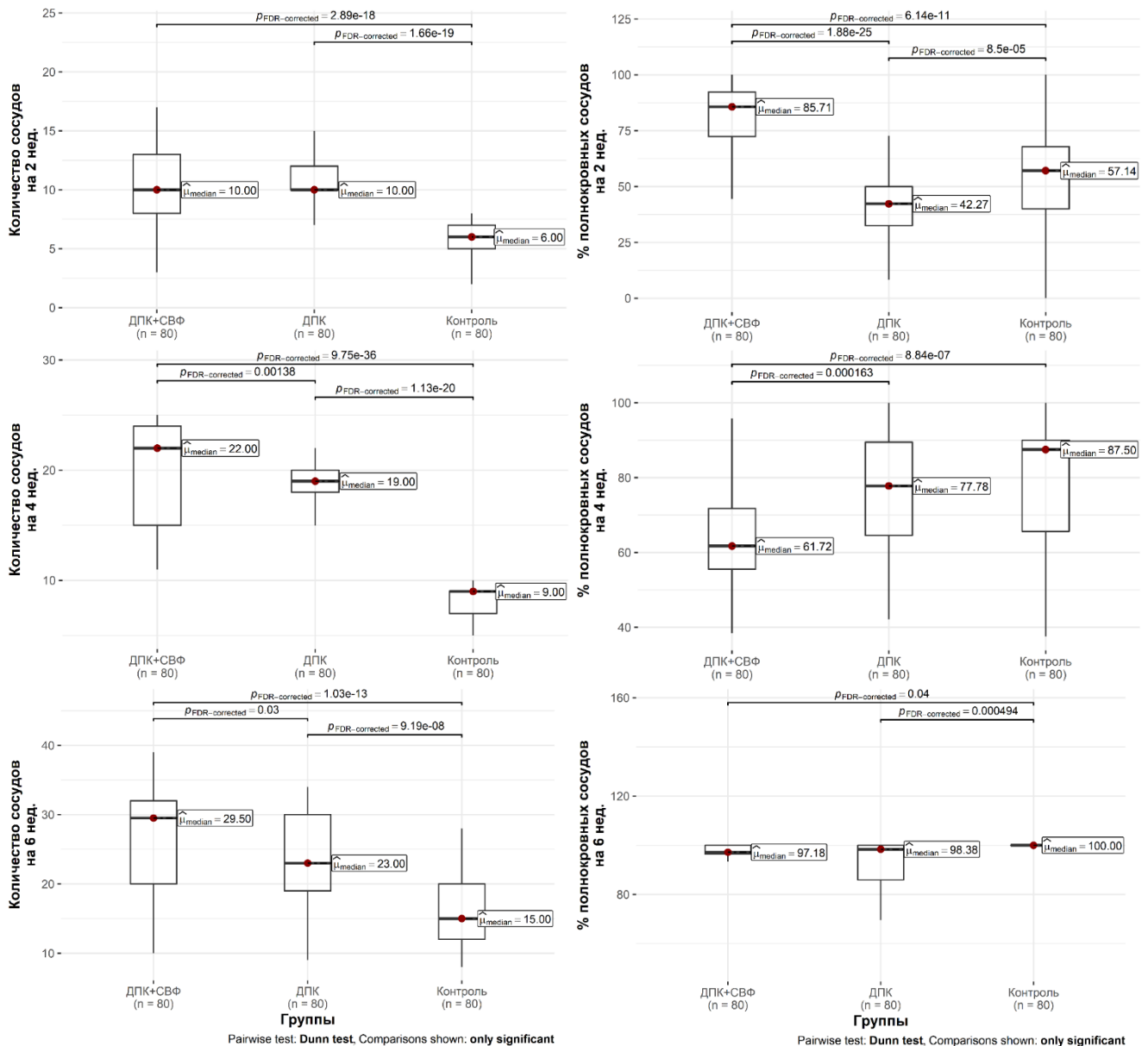


Рисунок 39 – Распределение показателя численной плотности сосудов (слева) и показателя (%) полнокровных сосудов (справа) для каждой группы исследования на 2, 4 и 6-й неделе

Аналогичные результаты были получены для показателя (%) полнокровных сосудов. При этом в группе № 3 величина показателя численной плотности сосудов была большей на 2, 4 и 6-й неделях исследования в 1,8, 2,3 и 1,5 раза соответственно, чем в образцах группы № 1 ($p < 0,001$), и несколько большей в сравнении с величинами аналогичных параметров группы № 2.

Полнокровие сосудов было выше в группе № 3 исследования по отношению к остальным группам лишь на 2-й неделе эксперимента. К 6-й неделе показатели полнокровия в группе № 1 (контрольной) и группе № 3 не имели значимых отличий. Только в группе № 2 определялось достоверное снижение данного показателя ($p < 0,001$)

При оценке показателя объемной плотности коллагеновых соединительно-тканых волокон в образцах исследования группы № 3 выявили его динамическое увеличение на 36 % со 2-й по 6-ю неделю исследования. При этом величина данного показателя уже на 2-й неделе исследования была больше на 25 %, чем в образцах группы № 1 ($p < 0,001$), однако на 6-й неделе отмечали ее незначительное уменьшение (Рисунок 40). Также во все сроки исследования величина данного параметра была незначительно большей, чем в образцах группы № 2. Это сопровождалось незначительным прогрессирующим увеличением показателя объемной плотности аргирофильных волокон в образцах группы № 3 и его некоторым преобладанием над величиной данного параметра в группе № 2 на 2-й ($p < 0,001$) и 4-й ($p = 0,300$) неделях исследования (Рисунок 40), с дальнейшим невелированием разницы в величинах данного показателя к 6-й неделе ($p = 0,628$). Увеличение показателя объемной плотности аргирофильных волокон в образцах групп № 1 и 2 выявили со 2-й по 6-ю неделю (в 2 раза и на 28 % соответственно). При этом объемная плотность аргирофильных волокон в группе № 1 на 6-й неделе была больше ($p < 0,001$) на 28 % в сравнении с величиной аналогичного показателя в группах № 2 и 3.

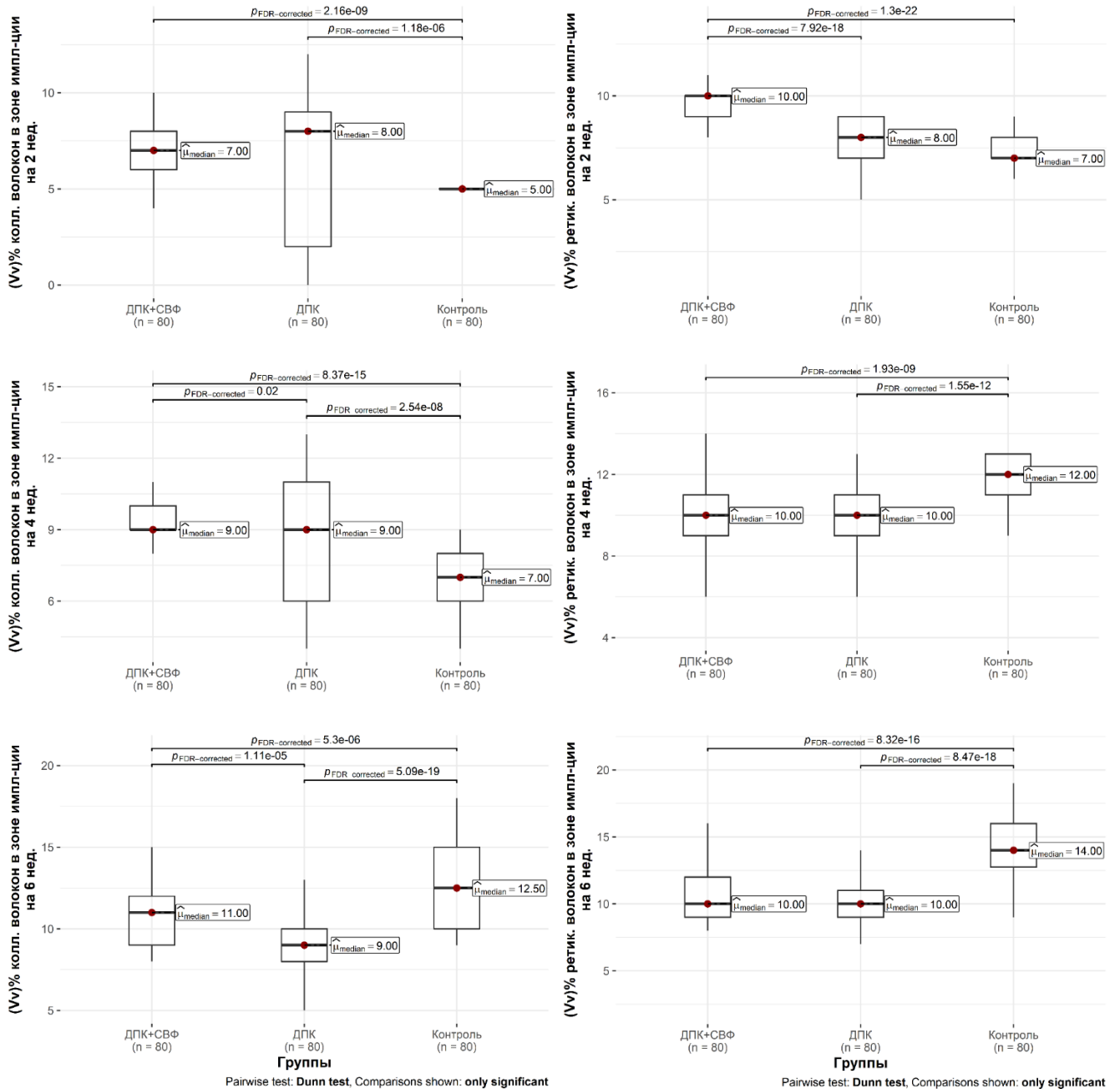


Рисунок 40 – Распределение показателя объемной плотности коллагеновых и ретикулярных волокон (V_v , %) для каждой группы исследования на 2, 4 и 6-й неделе

Основываясь на данных морфологического исследования отметили, что величина показателя объемной плотности новообразованной костной ткани

прогрессивно увеличивалась со 2-й по 6-ю недели исследования в группе № 1 — в 1,6 раза, № 2 — в 2,2 раза, № 3 — в 1,7 раза (Рисунок 41).

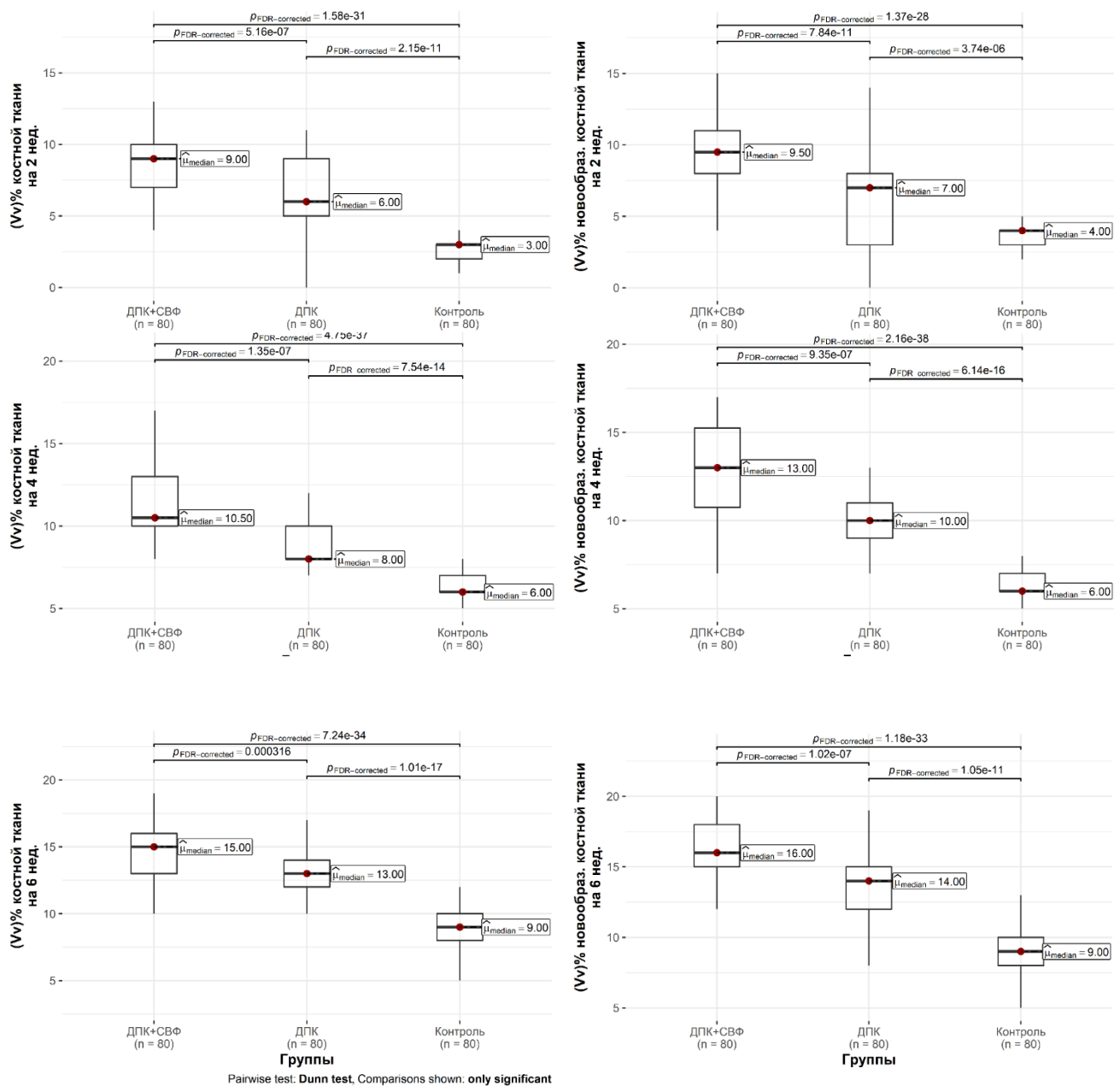


Рисунок 41 – Распределение показателя объемной плотности зрелой (слева) и новообразованной (справа) костной ткани (V_v , %) для каждой группы исследования на 2,4 и 6-й неделе

При этом во все сроки наблюдения объемная плотность новообразованной костной ткани в группе № 3 была примерно в 2 раза больше, чем в группе № 1 (р

< 0,001), и несколько выше, чем в группе № 2 ($p < 0,001$).

Объемная плотность зрелой костной ткани в образцах исследования увеличивалась со 2-й по 6-ю неделю во всех группах. При этом величины данного показателя в группах № 2 и 3 были большими, чем в группе № 1 во все сроки наблюдения. Данные исследования свидетельствовали о более активном процессе дифференцировки новообразованной костной ткани с 4-й недели исследования. Выявлено, что динамика изменения показателя объемной плотности зрелой костной ткани была аналогичной показателям новообразованной костной ткани, что подтверждаются динамикой результатов МСКТ исследования (Рисунок 42, 43 и 44). Далее приведены сводные таблицы показателей результатов лучевой диагностики (Таблица 18) и морфологического исследования (Таблица 19)

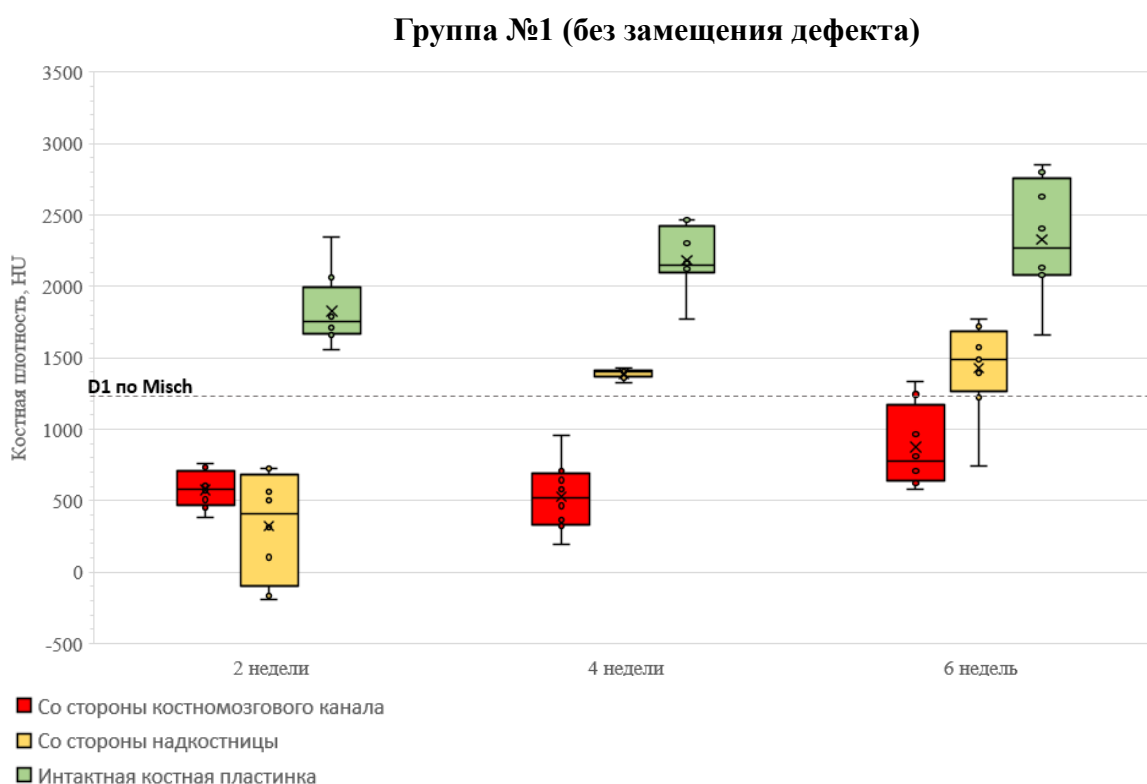


Рисунок 42 – Динамика показателей костной плотности по данным МСКТ в группе №1, без замещения костного дефекта

Группа №2 (ДПК)

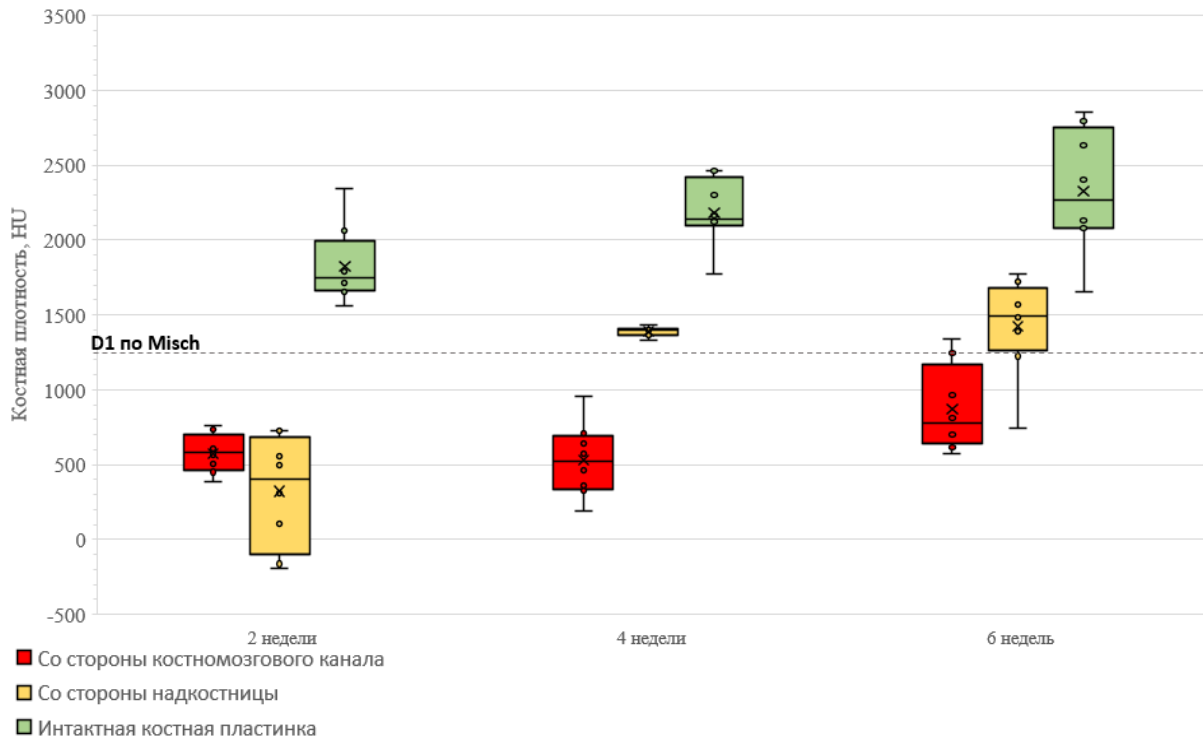


Рисунок 43 – Динамика показателей костной плотности по данным МСКТ в группе №2, с замещением дефекта при помощи ДПК

Группа №3 (ДПК+SVF)

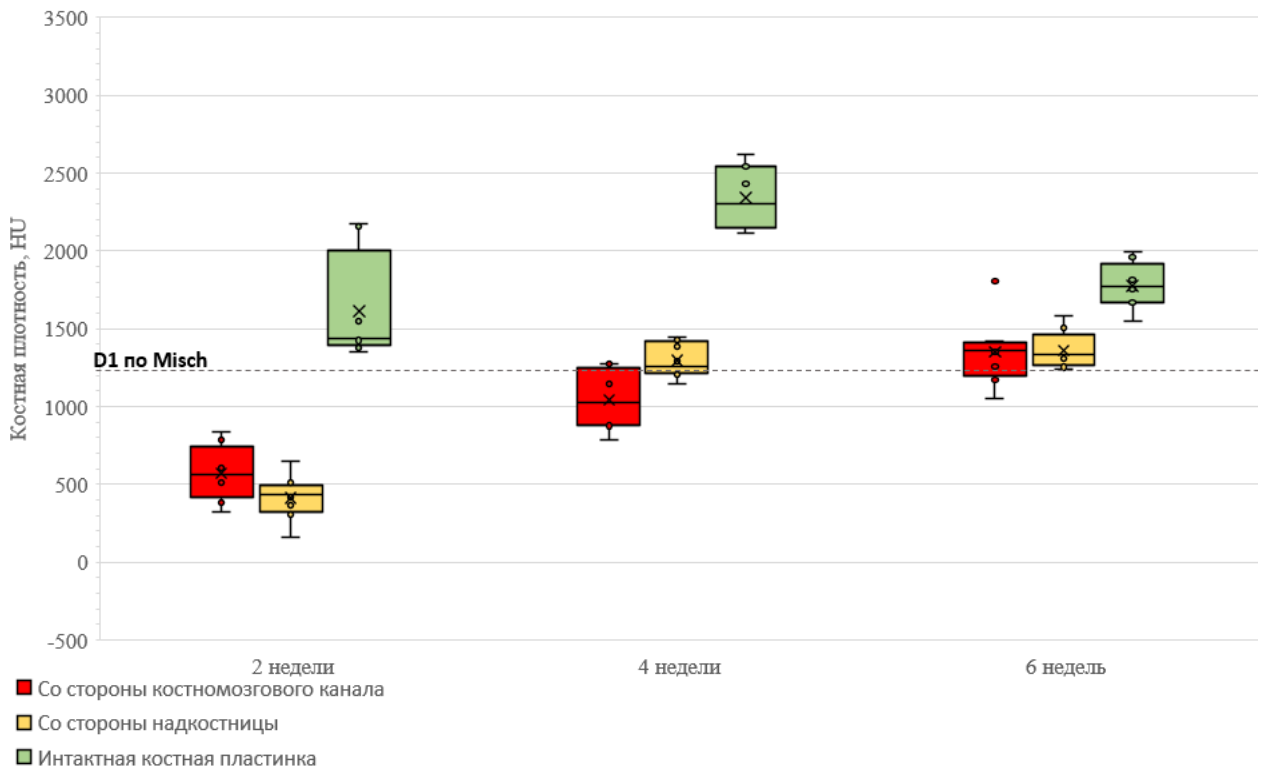


Рисунок 44 – Динамика показателей костной плотности по данным МСКТ в группе №3, с замещением дефекта при помощи ДПК совместно с SVF

Таблица 18 – Данные исследования средней рентгеновской плотности в группах исследования

Наименование показателя	1 группа (контрольная) Костный дефект без замещения			2 группа Костный дефект с замещением губчатой ДПК			3 группа Костный дефект с замещением губчатой ДПК + SVF		
	2 недели N=24 МЕД [Q1; Q3] СРЕД ±СО (МИН-МАКС)	4 недели N=24 МЕД [Q1; Q3] СРЕД ±СО (МИН-МАКС)	6 недель N=24 МЕД [Q1; Q3] СРЕД ±СО (МИН-МАКС)	2 недели N=8 МЕД [Q1; Q3] СРЕД ±СО (МИН-МАКС)	4 недели N=8 МЕД [Q1; Q3] СРЕД ±СО (МИН-МАКС)	6 недель N=8 МЕД [Q1; Q3] СРЕД ±СО (МИН-МАКС)	2 недели N=8 МЕД [Q1; Q3] СРЕД ±СО (МИН-МАКС)	4 недели N=8 МЕД [Q1; Q3] СРЕД ±СО (МИН-МАКС)	6 недель N=8 МЕД [Q1; Q3] СРЕД ±СО (МИН-МАКС)
Зона дефекта со стороны костномозгового канала, НУ (область 1)	26.5 [24.75; 29.25] 27 ± 6.32 (14 - 40)	14 [2.97; 27] 15.18 ± 17.21 (-12 - 47)	29 [-46.25; 81.25] 30.5 ± 78.01 (-84 - 197)	580.5 [492; 639.25] 575.25 ± 130.04 (383 - 759)	519.5 [352.5; 660] 529 ± 244.42 (195 - 958)	777 [683.5; 1032.5] 874.38 ± 283.51 (575 - 1336)	560 [480.5; 664.25] 572.38 ± 178.07 (322 - 834)	1028 [897.5; 1204.25] 1043.62 ± 194.32 (789 - 1271)	1363 [1235; 1391.25] 1351.25 ± 221.18 (1052 - 1805)
Зона дефекта с его внешней стороны, НУ (область 2)	225 [155; 253.25] 202.92 ± 65.35 (66 - 296)	907 [628; 983] 824.92 ± 252.64 (349 - 1242)	1302.5 [696; 1459] 1103.25 ± 440.15 (421 - 1678)	406.5 [37.25; 601] 322.38 ± 370.1 (-188 - 727)	1399 [1368; 1409.75] 1388.75 ± 32.73 (1329 - 1430)	1490.5 [1351.75; 1609.5] 1426.25 ± 326.81 (742 - 1774)	435.5 [347.25; 467] 413.38 ± 145.55 (158 - 649)	1260 [1220; 1393.5] 1294.12 ± 110.38 (1149 - 1442)	1330.5 [1294.75; 1383.25] 1360.75 ± 120.82 (1235 - 1580)
Зона интактной кортикальной пластинки (ИКП), НУ (область 3)	1792 [1417.5; 2083] 1850.88 ± 475.65 (1258 - 3200)	2182.5 [2073.5; 2444] 2220.33 ± 311.95 (1508 - 2850)	2184.5 [2069; 2252] 2178.67 ± 268.51 (1726 - 2791)	1749.5 [1678; 1870.25] 1826.25 ± 255.89 (1558 - 2344)	2143.5 [2094; 2339.75] 2183.5 ± 226.68 (1770 - 2462)	2269 [2078; 2672.5] 2329.12 ± 414.44 (1659 - 2852)	1437 [1412.75; 1701.25] 1613.38 ± 344.39 (1353 - 2172)	2303 [2155; 2542] 2341.12 ± 213.97 (2113 - 2622)	1773 [1669; 1847.25] 1773.62 ± 149.36 (1548 - 1992)
Классификация по Misch (область1/ область2/ область3)	4/4/1	4/3/1	4/2/1	3/3/1	3/2/1	2/1/1	3/3/1	2/2/1	1/1/1
Сравнение зон дефекта и ИКП критерием Вилкоксона, р-уровень	1-2: <0.001* 1-3: <0.001* 2-3: <0.001*	1-2: <0.001* 1-3: <0.001* 2-3: <0.001*	1-2: <0.001* 1-3: <0.001* 2-3: <0.001*	1-2: 0.195 1-3: 0.012* 2-3: 0.012*	1-2: 0.008* 1-3: 0.008* 2-3: 0.008*	1-2: 0.008* 1-3: 0.008* 2-3: 0.008*	1-2: 0.148 1-3: 0.012* 2-3: 0.012*	1-2: 0.039* 1-3: 0.021* 2-3: 0.021*	1-2: 0.547 1-3: 0.045* 2-3: 0.023*

Примечание: символом «*» обозначены статистически значимо отличающиеся замеры, т.е. $p < 0.05$

Таблица 19 – Результаты гистологического исследования репаративного остеогенеза при замещении костных дефектов разными видами КПМ ($M \pm m$)

Параметры исследования	Группы исследования								
	Группа № 1 (контрольная) Костный дефект без замещения			Группа № 2 Костный дефект с замещением губчатой ДПК			Группа № 3 Костный дефект с замещением губчатой ДПК + SVF		
	Сроки исследования (недели)								
	2-я	4-я	6-я	2-я	4-я	6-я	2-я	4-я	6-я
Численная плотность сосудов в образцах костной ткани (N_{ai})	5,61 ± 1,50	8,25 ± 1,50	16,66 ± 5,70	10,43* ± 3,50	18,73* ± 2,20	23,70* ± 6,80	10,40* ± 3,41	20,36*,** ± 4,50	26,31*,** ± 7,90
Процент полнокровных сосудов, %	54,44 ± 0,20	78,82 ± 0,20	96,58 ± 0,10	38,3* ± 0,20	75,49* ± 0,20	92,20* ± 0,10	81,19*,** ± 0,20	64,45* ± 0,20	97,37 ± 0,30
Объемная плотность коллагеновых волокон в образцах костной ткани (V_v , %)	5,15 ± 0,60	7,08 ± 1,10	12,68 ± 2,50	6,35* ± 3,80	8,83* ± 2,53	9,26* ± 1,60	6,88* ± 1,50	9,30* ± 1,10	10,68*,** ± 1,60
Объемная плотность аргирофильных волокон в образцах костной ткани ($V_v?$ %)	7,33 ± 0,70	11,83 ± 1,10	14,19 ± 2,40	7,25 ± 1,80	9,95* ± 1,60	10,03* ± 2,20	9,66*,** ± 1,30	10,23* ± 1,90	10,65* ± 2,10
Объемная плотность зрелой костной ткани (V_v , %)	2,88 ± 0,70	6,43 ± 0,80	8,98 ± 1,60	5,98* ± 2,80	8,81* ± 1,50	12,83* ± 1,50	8,63*,** ± 2,20	11,51*,** ± 2,50	14,58*,** ± 2,20
Объемная плотность новообразованной костной ткани ($V_v?$ %)	3,81 ± 0,70	6,43 ± 0,80	9,26 ± 2,10	6,11* ± 3,20	9,81* ± 1,60	13,53* ± 2,70	9,51*,** ± 2,20	12,95*,** ± 2,71	16,43*,** ± 2,10

*Примечание:** достоверность отличий величин рассматриваемых параметров от аналогичных показателей в контрольной группе, $p < 0,001$; ** достоверность отличий величин рассматриваемых параметров от аналогичных показателей в группе № 2, $p < 0,001$.

Резюме

В эксперименте *in vivo* изучено восстановление костной ткани при замещении костного дефекта кортикальной пластины тканеинженерной конструкцией. Использование тканеинженерной конструкции приводит к восстановлению рентгеновской плотности кости до показателя D1 по шкале Misch ($p = 0,045$) к сроку наблюдения 6 недель в 3-ей группе по сравнению аналогичными показателями 1-ой (D2) и 2-ой (D3) групп исследования. Также наблюдалось увеличение показателя объемной плотности зрелой и новообразованной костной ткани к 6-ой неделе исследования в 1,7 раза в 3-ей группе, что превышает аналогичные показатели в 1-ой и 2-ой группах исследования ($p < 0,001$).

Использование тканеинженерной конструкции на основе ДПК позволяет ускорить процесс замещения костного дефекта, по сравнению с 1-ой и 2-ой группами и подтверждают возможность её эффективного использования в качестве основы тканеинженерной конструкции для замещения костных дефектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из перспективных современных стратегий лечения дефектов костной ткани, особенно крупных или сложных, стало использование комплексных систем и технологий регенеративной медицины и ортобиологии. Таким образом, необходимость практической медицины в более эффективном восстановлении костной ткани потребовала создания качественно новых конструкций, полноценно имитирующих аутологичную костную ткань в необходимом пациенту объеме [27, 113, 229]. Необходимые свойства таких конструкций это: сохранение физических и анатомических особенностей донорской кости, высокая прочностью, быстрая фиксация в зоне имплантации и наличие регенераторного потенциала [36, 41]. Этим требованиям удовлетворяет тканеинженерная конструкция на основе жесткой и относительно упругой матрицы, содержащая аутологичный клеточный материал [36, 41, 79, 229].

Кроме того, для обеспечения диффузии кислорода, питательных веществ и удаления продуктов метаболизма необходимой особенностью носителей является наличие системы взаимосвязанных пор различного размера [31], что потенциально обеспечивает и условия для формирования мелких кровеносных сосудов. Таким образом, каркасы (носители-скаффолды) должны служить проводящим микроокружением для поддержания пролиферации и дифференцировки стволовых клеток в остеобласты и остециты, т.е. становиться нишей для стволовых клеток и быть направленными на имитацию свойств костной ткани [29, 41, 43, 50, 52, 54]. Всем перечисленным требованиям соответствуют материалы из аллогенной кости. Они являются практически идеальным материалом для получения каркасов для сложных конструктов, т.к. по своей архитектонике и физико-механическим свойствам соответствуют характеристикам кости реципиента и обладают остеоиндуктивностью и остеокондуктивностью. Одним из недостатков аллогенного костного материала является сложность получения исходной донорской костной ткани.

В качестве наиболее перспективного клеточного компонента для регенерации костной ткани на протяжении двух последних десятилетий активно изучаются МСК [36, 38, 92, 112, 141, 147, 173, 200, 217, 225, 228]. Они могут быть получены из различных источников: костного мозга, надкостницы, пульпы зуба, плаценты, пуповины, жировой ткани и т.д. [114, 181]. Для восстановления костной ткани основное значение имеет остеогенный потенциал данных клеточных культур. Несмотря на различное мнение специалистов о выраженности остеогенного потенциала МСК в зависимости от происхождения, исследователи сходятся во мнении, что решающими являются длительность выделения клеточного материала и свойства основы, на которую адгезируются сами клетки. То есть с целью сохранения эффективности клеток МСК не должно быть периода культивирования и материал должен быть использован сразу после его выделения [160]. Более того, жесткость конструкции может определять направление дифференцировки МСК. Так, на мягких субстратах преимущественно происходит адипогенная и нейрогенная дифференцировка, а на жестких – миогенная, хондрогенная и остеогенная [46, 54]. Таким образом, при необходимости создания конструкции для восстановления костной ткани ее основание должно быть жестким, иметь архитектуру, схожую с реципиентной зоной, быть не токсичным для клеточного материала.

Все виды МСК, независимо от источника получения, должны соответствовать трем основным критериям, выработанным Международным обществом клеточной терапии (ISCT): адгезия к пластику, экспрессия специфических маркеров, способность к дифференцировке в остеобласты, адипоциты и хондробласты в условиях *in vitro* [41, 43, 54, 56, 88, 89, 93, 95, 104, 113, 147, 148, 151, 153]. Для восстановления костной ткани основное значение имеет остеогенный потенциал клеточных культур. По данным одних специалистов, остеогенный потенциал МСК КМ и МСК ЖТ не отличается [111, 167, 176], по данным других, остеогенный потенциал МСК КМ и МСК надкостницы выражены значительно, чем МСК ЖТ [140, 148]. При этом в сравнительном исследовании было показано, что выход стволовых клеток и

способность к пролиферации у МСК ЖТ выше, чем у МСК КМ [147, 152]. Указанные особенности МСК ЖТ, а также легкая доступность при получении и относительное изобилие МСК ЖТ по сравнению с МСК КМ, позволяющие получить необходимое для терапевтических целей количество клеточной массы, делают жировую ткань наиболее перспективным источником МСК для практического применения [140, 148, 160]. Чаще всего большое количество аллогенной жировой ткани может быть получено во время стандартных операций липосакции, которые проводятся в клиниках всего мира. Кроме того, важно подчеркнуть, что использование жировой ткани позволяет получать и в ряде ситуаций применять не только аллогенные, но и аутологичные МСК ЖТ, что снимает массу юридических, этических и даже психологических проблем, возникающих у некоторых пациентов при лечении сложных патологических процессов. Все выше перечисленное послужило основанием для выбора в качестве клеточного материала для исследования МСК ЖТ человека. Заселение костных матриц клетками (дермальные фибробласты и МСК) происходит равномерно, что подтверждено количественными данными — количество адгезированных клеток на одно поле зрения. Однако нельзя не отметить факт, что осуществление депротенизации (децеллюляризации) костной матрицы изменяет характеристики адгезированных клеток. Так, наиболее выраженные изменения касаются увеличения размеров ядер клеток, адгезированных на депротенизированной костной матрице губчатой структуры на 25–30% по сравнению с величиной аналогичного параметра на образцах нативной или депротенизированной костной матрицы компактной структуры. Это может быть обусловлено более глубокой степенью очистки и освобождением костного матрикса от органических компонентов до следового уровня содержания альбумина в образцах костной ткани с формированием большей площади поверхности матрицы [13, 29, 33, 63]. При этом показатели плотности адгезии клеток и распределение клеток по поверхности депротенизированной костной матрицы губчатой структуры аналогичны показателям нативной костной матрицы и депротенизированной костной матрицы компактной структуры. Поскольку

губчатая структура костной ткани предполагает достаточно выраженную пористость материала матрицы, ядра клеток располагаются по внутренним и внешним поверхностям трабекул (периметрам пор), подчеркивая архитектуру костной матрицы. Более глубокая степень очистки костной матрицы способствует более выраженной адгезии, миграции и, вероятно, пролиферации клеточных элементов, о чем косвенно свидетельствует увеличение размеров ядер клеток (от 8,8 до 11,5 мкм), средняя площадь ядер клеточных элементов (от 86,3 мкм до 129,0 мкм) и средний периметр ядер (от 30,7 мкм до 40,7 мкм). Клетки хорошо адгезируются на поверхности и в глубоких структурах образцов губчатого костного материала, проникая в его поры. Это сопровождается сохранением жизнеспособности клеток до 7 суток исследования.

ДПК-ГБК позволяет реализовать свойства мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани:

- адгезию клеток подтверждает визуализация ядер клеток на поверхности кости;
- миграцию – наличие клеток в структуре материала на глубине от 273 мкм до 702 мкм от поверхности;
- пролиферацию – увеличение общего количества клеток от 302 до 1744 с 1 по 7 сутки эксперимента соответственно.

Предложенное нами основание тканеинженерной конструкции, а именно ДПК-ГБК (стандарт обработки в соответствии с патентами RU 2232585 C2, RU 2223104 C2, RU 2640932 C2), обладает остеокондуктивностью, обеспечивает адгезию и функционирование клеток [3, 79, 31, 186]. Такое основание (матрица) тканеинженерной конструкции способно обеспечить подходящее микроокружение для поддержания пролиферации и дифференцировки клеточного материала [110, 197]. Нами отмечено, что в случае использования предложенной ДПК клетки адгезируют не только на поверхности, но и в глубоких структурах образцов материала, проникая в его поры. Это сопровождается сохранением жизнеспособности клеток до 7 суток исследования [79].

Выбор депротенизированной губчатой кости из резецированной головки бедренной кости человека обоснован данными научной литературы и собственными исследованиями по свойствам данного материала. Полученные данные позволяют рассматривать данный материал как в качестве самостоятельно используемого, так и в качестве матрицы для создания эффективных тканеинженерных конструкций [33, 63, 79, 107, 108, 118, 127, 138, 161, 171, 183, 192].

В случае использования конструкции на основе депротенизированной костной матрицы с содержанием аутологичного материала, способного воздействовать на регенерацию костной ткани, происходит увеличение задействованных механизмов регенерации костной ткани. Механизмы воздействия костно-пластического материала (КПМ) на процессы регенерации кости представлены на рисунке 45 и, в зависимости от влияния и действующих факторов делятся на остеобластический, остеоиндуктивный, остеокондуктивный и стимулированный остеогенез.

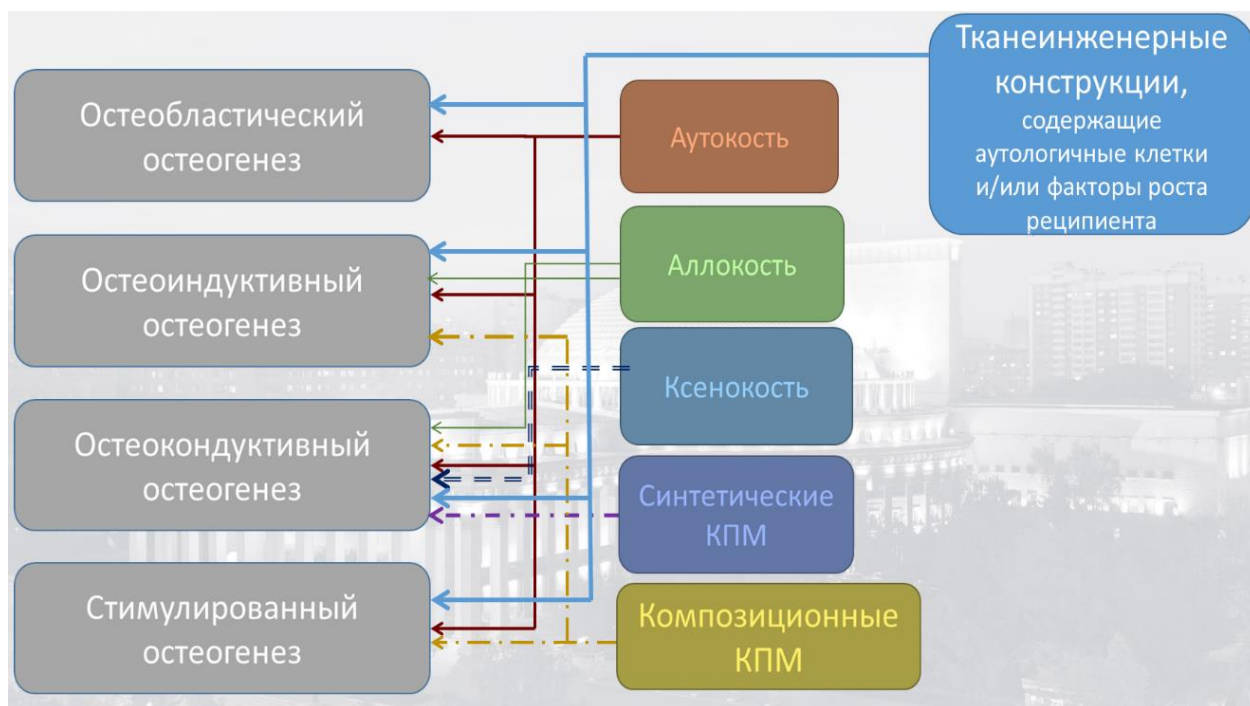


Рисунок 45 – Механизмы воздействия костно-пластического материала (КПМ) на процессы регенерации кости.

Выбор кролика в качестве модели животного для настоящего исследования обоснован аналогичным типом репаративного остеогенеза у данного вида млекопитающих и человека [191]. Это позволяет экстраполировать результаты данного исследования на человека. Кроме того, экспериментальная модель на кроликах необходима для тестирования имплантируемых материалов.

Несмотря на то, что в нашем исследовании использованные костные матрицы в отношении выбранной модели животных (кролик) являются ксеногенными, начиная со 2-й нед. выявили отсутствие макро- и микроскопических морфологических признаков формирования местной воспалительной реакции мягких тканей и отторжения костных матриц. Это обусловлено соответствующими свойствами использованных костных матриц — физико-химическими и биологическими, удовлетворяющими характеристикам окружающих тканей в участках имплантации, что, в свою очередь, определяется способом и степенью очистки губчатой костной ткани от антигенных структур [13, 14, 33]. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии токсического действия выбранного материала в отношении живых клеток и тканей *in vivo* и иммунной реакции макроорганизма. Это позволило использовать его в качестве костных матриц для разработки тканеинженерных конструкций и дальнейшего изучения их эффективности.

В качестве биологически активного компонента для создания тканеинженерной конструкции на основе депротенизированной губчатой костной матрицы была выбрана SVF жировой ткани, выделенная и обработанная по стандартной методике [91, 185, 205]. Клеточный состав фракции и свойства клеток — стволовых клеток жировой ткани, эндотелиальные и гладкомышечные клетки кровеносных сосудов и их предшественники, фибробласты, макрофаги, Т-лимфоциты, перициты и другие клетки, обуславливающие выраженный регенераторный потенциал, выраженное противовоспалительное действие и иммунорегуляторную активность. Также факторы SVF стимулируют образование сосудистой сети, что способствует регенерации костной ткани [56, 95, 124, 135].

В соответствии с данными литературы жировая ткань кролика имеет четко охарактеризованные параметры и не обладает широкой вариабельностью, как в случае МСК костного мозга животного [56, 91, 95, 124, 135]. Так же оптимальным местом забора SVF определена область в районе шеи и между плеч животного – паравертебрально. Помимо более легкого доступа к тканям, это обосновывается тем, что именно в этой локализации у взрослых особей расположено наибольшее количество бежевых жировых клеток (bAT) [5, 9, 19, 20, 21, 67], имеющих схожие свойства с хорошо васкуляризированной бурой жировой тканью. Данный подход допустимо использовать и для человека, следуя принципам современной физиологии. Таким образом, при выполнении операций с использованием SVF жировой ткани может быть обоснован забор жировой ткани из области передней брюшной стенки (параумбиликальная зона), зоны возле шеи и между лопаток [101]. В настоящем исследовании экспериментальная часть *in vivo* выявила, что применение ДПК совместно с аутологичной SVF способствует восстановлению структурно-функциональной состоятельной костной ткани в месте повреждения, не вызывая развития выраженного реактивного воспаления. При этом изолированное использование ДПК обеспечивает восстановление костной ткани с меньшими показателями по данным морфологического исследования ($p < 0,001$). Данные, помимо морфологического исследования подтверждены при помощи лучевой диагностики. По данным МСКТ на каждом сроке наблюдали изменение показателей костной плотности в зоне дефекта. Так, при использовании тканеинженерной конструкции уже к 6 неделе исследования, даже не смотря на сравнительно меньший показатель по отношению к интактной кости (в 1,3 раза), значения костной плотности соответствовали показателям толстой компактной кости по шкале Misch ($p = 0,045$). По отношению к использованию ДПК, значения в зоне заполнения костного дефекта составили со стороны костно-мозгового канала $1351,25 \text{ HU} \pm 221,18$ (1052; 1805), что в 1,5 раза выше ($p < 0,05$). При этом следует отметить, что в каждой группе и для каждого срока наблюдали меньшую костную плотность в зоне дефекта со стороны костно-мозгового канала. Это может быть обусловлено особенностями хирургического

вмешательства в эксперименте, при котором сохранялась ткань надкостницы. Подобное явления так же отмечено в данных литературы и объясняется наличием более выраженного остеогенного потенциала МСК надкостницы, чем МСК ЖТ или КМ [140, 147, 148].

Совершенствование метода замещения костных дефектов путем использования разных КПМ требует объективных данных о безопасности и эффективности используемых материалов [77]. Получить объективные и достоверные данные о замещении костного дефекта можно с помощью микроскопического исследования гистологических образцов костной ткани. Гистологическое исследование позволяет оценить клеточные и тканевые реакции, формирующиеся в ответ на имплантируемый материал, и определить степень выраженности остеогенеза — ключевое звено в исследованиях по поиску эффективных и безопасных КПМ и разработке на их основе тканеинженерных конструкций для травматологии и ортопедии.

Использование окрашивания гематоксилином и эозином позволяет оценить качество гистологических срезов, провести обзорную оценку гистологических критериев изучаемого процесса. Для уточнения полученной информации о характере выявленных процессов в костном регенерате в работе использовали дополнительные гистохимические методы окраски — по Ван Гизону, импрегнация серебром.

Разработка новых костнозамещающих материалов на основе, в частности, депротенизированной губчатой костной матрицы, невозможна без проведения морфометрической оценки гистологических критериев биологической безопасности используемого материала и его влияния на остеогенез. Необходимым является исследование как фрагментов самого костного регенерата, так и структурных компонентов КПМ, помещенного в костный дефект, так как он обуславливает реализацию, в большей или меньшей степени выраженности, каскада специфических реакций на введение данного агента, исходя из его свойств [117, 118].

В нашем исследовании была проведена морфологическая и морфометрическая оценка восстановления костной ткани после имплантации в дефект КПМ на основе костной матрицы из депротеинизированной губчатой костной ткани резецированной головки бедренной кости человека и аналогичной костной матрицы с добавлением SVF жировой ткани. С целью комплексной оценки биологических свойств КПМ осуществляли подсчет относительного объема «зрелой» и новообразованной костной ткани. Динамика изменения показателя объемной плотности «зрелой» костной ткани была аналогичной показателю объемной плотности «незрелой» костной ткани в гистологических образцах при имплантации КПМ. Минимальным показателем объемной плотности новообразованной и «зрелой» костной ткани был выявлен в гистологических образцах без замещения костных дефектов. Помимо этого, выявили склонность к формированию грубоволокнистой соединительной ткани на поверхности костного регенерата и внутри него в случаях заполнения костного дефекта депротеинизированной костной матрицей и при ее сочетанном использовании с SVF. Выраженное формирование грубоволокнистой соединительной ткани, локализованной преимущественно над поверхностью регенерата, выявили при отсутствии замещения костного дефекта. Это сопровождалось тем, что объемная плотность аргирофильных соединительнотканых волокон преобладала над показателем объемной плотности коллагеновых волокон во все периоды исследования. Также преобладание аргирофильных волокон при самопроизвольном заживлении костного дефекта над показателями в образцах костной ткани при замещении костных дефектов выбранными КПМ могут быть косвенным признаком нарушения дифференцировки соединительной ткани в области самопроизвольного заживления костного дефекта и причиной формирования осложнений, таких как ложный сустав.

Вероятно, формирование выявленных структурных изменений обусловлено, в том числе, влиянием про- и противовоспалительной активности клеток в составе лимфоцитарно-макрофагального клеточного инфильтрата в ответ на инородное тело при замещении костных дефектов, что может служить активатором процесса

остеогенеза. Принимая во внимание непродолжительный период исследования, выявленные структурные изменения свидетельствуют о преобладании процессов репарации костной ткани в области ее дефектов над процессами резорбции и ремоделирования, что в большей степени выражено при использовании КПМ.

Сравнительный анализ репаративных процессов при использовании костной матрицы из ДПК и при ее сочетании с SVF на экспериментальной модели *in vivo* выявил, что использование указанных КПМ способствует не только ранней активации репаративной регенерации основных структурных элементов костной ткани в месте замещения костного дефекта, но и их своевременной дифференцировке. Это обуславливает восстановление структурно-функциональной состоятельной костной ткани в месте повреждения, не вызывая развития выраженного реактивного воспаления. Использование тканеинженерной конструкции в составе с SVF на депротеинизированной костной матрице позволяет задействовать все механизмы регенерации и ускорить процесс замещения костного дефекта по сравнению с изолированным использованием костной матрицы или без заполнения дефекта. Действие выбранной тканеинженерной конструкции с сочетанным влиянием нескольких факторов в ее составе оказалось более эффективным в отношении замещения костных дефектов.

ВЫВОДЫ

1. Депротенизированная губчатая кость имеет пористую структуру с общей пористостью от 32% до 37%, сохранением микроэлементного состава и показателем атомного соотношения Са/Р - 1,55, без проявлений цитотоксичности в тестовой культуре фибробластов человека *in vitro*.
2. Выявленные структурные характеристики депротенизированной губчатой кости обеспечивают условия для адгезии мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани на поверхности материала, способствуют сохранению клетками жизнеспособности, пролиферативной активности и миграции вглубь структуры материала на протяжении всего периода культивирования *in vitro*.
3. Разработанный способ создания тканеинженерной конструкции позволяет осуществить замещение дефекта костной ткани, что подтверждается в эксперименте *in vivo* восстановлением рентгеновской плотности кости до показателя D1 по шкале Misch ($p = 0,045$) к сроку наблюдения 6 недель в группе исследования по сравнению аналогичными показателями 1-ой (D2) и 2-ой (D3) групп.
4. Использование тканеинженерной конструкции для замещения дефекта кортикальной пластинки бедренной кости кролика в эксперименте *in vivo* способствует раннему восстановлению структуры кости, что подтверждено увеличением показателя объемной плотности зрелой и новообразованной костной ткани к 6-ой неделе в группе исследования в 1,7 раза, что превышает аналогичные показатели в 1-ой и 2-ой группах ($p < 0,001$).

ОТ АВТОРА

Выражаю благодарность коллегам, без которых выполнение данного труда было бы невозможно.

Научному руководителю – доктору медицинских наук, доценту Кириловой Ирине Анатольевне.

Ведущим специалистам института по направлению исследования:

- доктору медицинских наук Павлову Виталию Викторовичу;
- кандидату медицинских наук Черданцевой Лилии Александровне;
- профессору, доктору медицинских наук Ларионову Петру Михайловичу.

Выполнение данного труда было бы невозможно без помощи коллег смежных специальностей:

- Шаркеева Юрия Петровича, доктора физико-математических наук, профессора (лаборатория физики наноструктурных биоконструктов, ФГБУН «Институт физики прочности и материаловедения» СО РАН);

- Алейник Дианы Яковлевны, кандидата медицинских наук, старшего научного сотрудника лаборатории регенеративной медицины НИИ ЭОиБМТ, (ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России);

- Толстиковой Татьяны Генриховны, доктора биологических наук (ФГБУН Новосибирский институт органической химии им. Н.Н. Ворожцова СО РАН).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ГБК	– головка бедренной кости
ДПК	– депротенинизированная губчатая кость
ДПК-ГБК	– депротенинизированная губчатая кость головки бедренной кости
ДФЧ	– дермальные фибробласты человека
КПМ	– костно-пластический материал
МСК	– мезенхимальные стромальные клетки
МСК ЖТ	– МСК из жировой ткани человека
МСК КМ	– МСК из костного мозга человека
МСКТ	– мультиспиральная компьютерная томография
ОИР	– относительная интенсивность роста клеток
ОП	– оптическая плотность
ТИК	– тканеинженерная конструкция
SVF	– стромально-васкулярная фракция

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Айрапетов, Г.А. Плазма, обогащенная тромбоцитами / Г.А. Айрапетов, А.В. Аксенено, Л.И. Алексеева [и др.] // IX Научно-практическая конференция с международным участием Приоровские чтения 2021 "Ортобиология" совместно с конференцией молодых ученых : Материалы к конгрессу, Москва, 23–24 апреля 2021 года / Редколлегия: М. А. Страхов [и др.]. – Воронеж: Издательско-полиграфический центр "Научная книга", 2022. – С. 12–99. – EDN AVTXUQ.
2. Ананьева, А.Ш. Моделирование повреждений костных структур в экспериментах на животных / А.Ш. Ананьева, Л.М. Бараева, И.М. Быков, Ю.В. Веревкина, А.Н. Курзанов // Инновационная медицина Кубани. – 2021. – № 1 (21). – С. 47–55. – doi.org/10.35401/2500-0268-2021-21-1-47-55.
3. Анастасиева, Е.А. Использование ауто- и аллотрансплантатов для замещения костных дефектов при резекциях опухолей костей / Е.А. Анастасиева, М.А. Садовой, А.А. Воропаева, И.А. Кирилова // Травматология и ортопедия России. – 2017. – Т. 23. – № 3. – С. 148–155. – doi.org/10.21823/2311-2905-2017-23-3-148-155.
4. Архипов, А.В. Эффективность современных методов рентгенологического обследования в условиях стоматологической поликлиники / А.В. Архипов, В.Д. Архипов, С.Н. Вырмаскин, В.Я. Архипов, В.В. Афанасьев // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. – 2014. – Т. 16. – № 5–4. – С. 1364–1367. – EDN TSCIT.
5. Афанаскина, Л.Н. Бурая жировая ткань: особенности биологии, участие в энергетическом обмене и ожирении (обзор литературы) / Л.Н. Афанаскина, С.Н. Деревцова, Л.В. Синдеева, Е.А. Хапилина, Н.Н. Медведева // Вестник Российской академии медицинских наук. – 2020. – Т. 75. – № 4. – С. 326–330. – doi.org/10.15690/vramn1316.
6. Балаев, П.И. Возможности костной пластики по Г.А. Иллизарову в восстановительном лечении пациентов с первичными опухолями костей голени /

П.И. Балаев, Д.Ю. Борзунов // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – № 1 (55). – С. 59–64.

7. Балберкин, А.В. Клиника, диагностика и хирургическое лечение опухолей костей области коленного сустава (обзор литературы) / А.В. Балберкин, Д.А. Шавырин // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2013. – № 1. – С. 15–23.

8. Бовкис, Г.Ю. Компенсация дефектов метаэпифизов бедренной и большеберцовой костей при ревизионном эндопротезировании коленного сустава – способы и результаты их применения (обзор литературы) / Г.Ю. Бовкис, Т.А. Куляба, Н.Н. Корнилов // Травматология и ортопедия России. – 2016. – Т. 22. – № 2. – С. 101–113. – DOI: 10.21823/2311-2905-2016-0-2-101-113.

9. Бородкина, Д.А. Периваскулярная жировая ткань и атеросклероз: фенотипические особенности и терапевтический потенциал / Д.А. Бородкина, О.В. Груздева, Е.В. Белик, Ю.А. Дылева, Е.И. Паличева // Атеросклероз. – 2020. – Т. 16. – № 2. – С. 63–72. – doi.org/10.15372/ATER20200206.

10. Брижань, Л.К. Реализация общебиологических законов, открытых Г.А. Илизаровым, в лечении раненых и пострадавших с дефектами диафизов длинных костей нижних конечностей / Л.К. Брижань, М.И. Бабич, В.В. Хоминец, Т.Д. Цемко, В.А. Артемьев, Ю.В. Аксенов // Гений ортопедии. – 2016. – № 2. – С. 21–26. – DOI: 10.18019/1028-4427-2016-2-21-26

11. Брижань, Л.К. Опыт использования цифрового планирования при эндопротезировании тазобедренного сустава в ортопедическом отделении ГВКГ им. Н.Н. Бурденко МО РФ / Л.К. Брижань, Б.П. Буряченко, Д.И. Варфоломеев // Травма-2018: мультидисциплинарный подход: сб. тезисов Международной конференции, Москва, 02–03 ноября 2018 г. / Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова. – М.: Издательско-полиграфический центр «Научная книга», 2018. – С. 61–62. – EDN YULKWD.

12. Волокитина, Е.А. Эндопротезирование тазобедренного сустава при деформациях и дефектах вертлужной впадины (обзор литературы) / Е.А.

Волокитина, М.С. Хабиб // Уральский медицинский журнал. – 2018. – № 1. – С. 56–63.

13. Воробьев, К.А. Влияние методов заготовки костнопластического материала на процессы ремоделирования в модели костного дефекта в эксперименте *in vivo* / К.А. Воробьев, С.А. Божкова, Л.И. Анисимова, Г.И. Нетылько // Практическая медицина. – 2019. – Т. 17. – № 1. – С. 67–72.

14. Воробьев, К.А. Современные способы обработки и стерилизации аллогенных костных тканей (обзор литературы) / К.А. Воробьев, С.А. Божкова, Р.М. Тихилов, А.Ж. Черный // Травматология и ортопедия России. – 2017. – Т. 23. – № 3. – С. 134–147. – DOI: 10.21823/2311-2905-2017-23-3-134-147.

15. Горбатов, Р.О. Прецизионные персонифицированные имплантаты для замещения костных дефектов при лечении пациентов с остеонкологией / Р.О. Горбатов, Р.М. Нифтуллаев, А.Е. Новиков // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – Т. 6. – С. 247–255.

16. ГОСТ Р ISO 10993-2-2009. Система нормативных документов. Режим доступа: <https://meganorm.ru/Index/48/48460.htm>.

17. Гуражев, М.Б. Методы замещения костного дефицита большеберцовой кости при первичном эндопротезировании коленного сустава: систематический обзор литературы / М.Б. Гуражев, В.С. Баитов, А.Н. Гаврилов, В.В. Павлов, А.А. Корыткин // Травматология и ортопедия России. – 2021. – Т. 27. – № 3. – С. 173–188. – DOI: 10.21823/2311-2905-2021-27-3-173-188.

18. Гуражев, М.Б. Среднесрочные результаты применения метода аутопластики медиального дефекта большеберцовой кости при первичном эндопротезировании коленного сустава / М.Б. Гуражев, В.С. Баитов, А.Н. Гаврилов, В.Л. Лукинов, А.А. Корыткин, В.В. Павлов // Гений ортопедии. – 2022. – Т. 28. – № 5. – С. 659–668. – doi.org/10.18019/1028-4427-2022-28-5-659-668.

19. Гурков, Н.А. Индуцированная холодом активация бурой жировой ткани и ангиогенез жировой ткани у мышей / Н.А. Гурков // Инновационные тенденции развития российской науки. – 2021. – С. 108–113.

20. Демьяненко, И.А. Функциональная морфология жировой ткани и ее роль в формировании метаболического синдрома / И.А. Демьяненко, А.В. Ткач // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2021. – Т. 11. – № 1. – С. 51–60.
21. Драпкина, О.М. Бурая жировая ткань – новая мишень борьбы с ожирением? / О.М. Драпкина, О.Т. Ким // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. – 2021. – Т. 20. – № 5. – С. 134–138.
22. Дроздецкий, А.П. Собственный опыт применения костнопластических материалов при хирургическом лечении костных кист у детей / А.П. Дроздецкий, А.В. Овсянкин, Е.С. Кузьмина, А.Н. Прохоров, Ю.С. Попов, В.А. Шаров, И.В. Попов, А.Д. Кузьмина // Вестник Смоленской государственной медицинской академии. – 2019. – Т. 18. – № 3 – С. 74-82. – EDN KXOJYY.
23. Зайдман, А.М. Особенности регенерации костной ткани тел позвонков на основе остеотрансплантата в эксперименте / А.М. Зайдман, Ю.А. Предеин, А.В. Корель, Е.И. Щелкунова, Е.И. Строкова, А.Д. Ластевский, В.В. Рерих, А.И. Шевченко // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2017. – Т. 6. – № 4. – С. 95–102. – EDN ZTNHBT.
24. Зыкин, А.А. Результаты ревизионного эндопротезирования коленного сустава с применением индивидуальных имплантатов / А.А. Зыкин, С.А. Герасимов, Р.О. Горбатов, Т.В. Илларионова // Травматология и ортопедия России. – 2022. – Т. 28. – № 4. – С. 21–30.– DOI: 10.17816/2311-2905-1995.
25. Иорданишвили, А.К. Репаративный остеогенез: инновационный подход к его оптимизации / А.К. Иорданишвили, А.Г. Слугина, Д.В. Балин // Экология и развитие общества. – 2013. – Т. 4. – № 9. – С. 74.
26. Ирьянов, Ю.М. Современные представления о гистологических аспектах репаративной регенерации костной ткани (обзор литературы) клеточные источники репаративного остеогенеза. Гетерогенность клеточной популяции в области травматического повреждения кости / Ю.М. Ирьянов, Т.А. Силантьева // Гений ортопедии. – 2007. – № 2. – С. 111–116.

27. Казакова, В.С. Использование факторов роста в восстановлении костной ткани: обзор) / В.С. Казакова, В.П. Чуев, О.О. Новиков, Е.Т. Жилиякова, Д.А. Фадеева // Научные ведомости Белгородского государственного университета. Серия: Медицина. Фармация. – 2011. – № 4–2(99). – С. 5–12. – EDN TJYKRF.

28. Казарезов, М.В. Ортопедия и восстановительная хирургия / М.В. Казарезов, В.М. Прохоренко, А.М. Королева. – Новосибирск, 2008. – 447 с. – EDN QLRNSJ.

29. Кирилова, И.А. Деминерализованный костный трансплантат как стимулятор остеогенеза: современные концепции / И.А. Кирилова // Хирургия позвоночника. – 2004. – № 3. – С. 105–110.

30. Кирилова, И.А. Организация донорства головок бедренных костей в Новосибирском НИИТО / И.А. Кирилова, В.Т. Подорожная, В.В. Павлов, И.Ю. Бедорева // Успехи современного естествознания. – 2015. – № 9. – С. 49–52.

31. Кирилова, И.А. Костная ткань как основа остеопластических материалов для восстановления костной структуры / И.А. Кирилова // Хирургия позвоночника. – 2011. – № 1. – С. 68–74.

32. 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.

33. Кирилова, И.А. Анатомо-функциональные свойства кости как основа создания костно-пластических материалов для травматологии и ортопедии / И.А. Кирилова. – М.: ООО Издательская фирма "Физико-математическая литература", 2019. – 256 с. – EDN OERRFZ.

34. Коваленко, А.Н. Среднесрочные результаты использования индивидуальных конструкций при ревизионном эндопротезировании тазобедренного сустава / А.Н. Коваленко, А.А. Джавадов, И.И. Шубняков, С.С. Билык, А.О. Денисов, М.А. Черкасов, А.И. Мидаев, Р.М. Тихилов // Травматология и ортопедия России. – 2019. – Т. 25. – № 3. – С. 37–46.

35. Коваленко, А.Н., Ревизии вертлужных компонентов индивидуальными конструкциями с минимальным сроком наблюдения 12 месяцев: функциональные результаты, качество жизни и удовлетворенность пациентов / А.Н. Коваленко, Р.М. Тихилов, И.И. Шубняков, С.С. Билык, А.О. Денисов, М.А. Черкасов, К.И. Ибрагимов // Травматология и ортопедия России. – 2019. – Т. 25. – № 1. – С. 21–31. – DOI: 10.21823/2311-2905-2019-25-1-21-31.

36. Корель, А.В. Тканеинженерные стратегии для восстановления дефектов костной ткани. Современное состояние вопроса / А.В. Корель, С.Б. Кузнецов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2019. – № 4. – С. 228–234.

37. Корыткин, А.А. Опыт применения индивидуальных трехфланцевых вертлужных компонентов при ревизионном эндопротезировании тазобедренного сустава / А.А. Корыткин, Д.В. Захарова, Я.С. Новикова, Р.О. Горбатов, К.А. Ковалдов, Ю.М. Эль Мудни // Травматология и ортопедия России. – 2017. Т. 23. № 4. С. 101–111. – doi.org/10.21823/2311-2905-2017-23-4-101-111.

38. Крюков, Е.В. Опыт клинического применения тканеинженерных конструкций в лечении протяженных дефектов костной ткани / Е.В. Крюков, Л.К. Брижань, В.В. Хоминец, Д.В. Давыдов, Ю.В. Чирва, В.И. Севастьянов, Н.В. Перова, М.И. Бабич // Гений ортопедии. – 2019. – Т. 25. – № 1. – С. 49–57.

39. Куляба, Т.А. Способы компенсации костных дефектов при ревизионном эндопротезировании коленного сустава / Т.А. Куляба, Н.Н. Корнилов, А.В. Селин, В.Л. Разорёнов, И.И. Кроитору, А.И. Петухов, А.В. Каземирский, Ф.Ю. Засульский, В.Л. Игнатенко, А.В. Сараев // Травматология и ортопедия России. – 2011. – № 3. – С. 5–12. – doi.org/10.21823/2311-2905-2011-0-3-5-12.

40. Ладутько, Д.Ю. Алгоритм хирургического лечения крупных костных дефектов длинных трубчатых костей методом васкуляризированной костной пластики / Д.Ю. Ладутько, В.Н. Подгайский, Ю.Н. Ладутько, А.В. Пекарь, О.П. Кезля, А.В. Селицкий, А.В. Губичева // Вопросы реконструктивной и

пластической хирургии. – 2022. – Т. 24. – № 3–4. – С. 63–75. – doi.org/10.52581/1814-1471/78/06.

41. Ларионов, П.М. Создание тканеинженерного эквивалента костной ткани и перспективы его использования в травматологии и ортопедии / П.М. Ларионов, М.А. Садовой, А.Г. Самохин, О.М. Рожнова, А.Ф. Гусев, В.Я. Принц, В.А. Селезнев, С.В. Голод, А.В. Принц, И.А. Корнеев, А.И. Комонов, Е.В. Мамонова, Ю.Н. Малютина, В.А. Батаев // Хирургия позвоночника. – 2014. – № 3. – С. 77–85. – doi.org/10.14531/ss2014.3.77-85.

42. Леонова, О.Н. Плотность костной ткани позвонков в единицах Хаунсфилда как предиктор несостоятельности межтелового блока и проседания имплантата при круговом поясничном спондилодезе / О.Н. Леонова, Е.С. Байков, А.В. Пелеганчук, А.В. Крутько // Хирургия позвоночника. – 2022. – Т. 19. – № 3. – С. 57–65. – DOI: 10.14531/ss2022.3.57-65. – EDN GZQCAУ.

43. Лызиков, А.Н. Стволовые клетки в регенеративной медицине: достижения и перспективы / А.Н. Лызиков, Б.Б. Осипов, А.Г. Скуратов, А.А. Призенцов // Проблемы здоровья и экологии. – 2015. – № 3 (45). – С. 4–8.

44. Максимов И.Б. и др. Эндопротезирование тазобедренного сустава у военнослужащих / Максимов И.Б., Паиюшии К.А., Брижань Л.К., Буряченко Б.П., Варфоломеев Д.И., Пиманчев О.В. // Военно-медицинский журнал. – 2014. – Т. 335. – № 1. – С. 30–37. – doi.org/10.17816/RMMJ74075.

45. Максимов, И.Б. О применении нового «Комплекта стержневого военно-полевого» при боевых повреждениях опорно-двигательного аппарата / И.Б. Максимов, Л.К. Брижань, В.Л. Асташов, Д.В. Давыдов, А.А. Керимов, Ю.В. Арбузов, Д.И. Варфоломеев // Военно-медицинский журнал. – 2014. – Т. 335. – № 4. – С. 22–30. – EDN SXEUPT.

46. Матвеева, Д.К. Регуляторная активность децеллюляризованного матрикса мультипотентных мезенхимных стромальных клеток / Д.К. Матвеева // Цитология. – 2020. – Т. 62. – № 10. – С. 699–715. – doi.org/10.31857/S004137712010003X.

47. Мелешко, А.А. Перспективы применения наноматериалов на основе гидроксипатита, созданных в условиях послойной химической сборки, в травматологии и ортопедии детского возраста / А.А. Мелешко, В.П. Толстой, Г.Е. Афиногенов, А.С. Левшакова, А.Г. Афиногенова, В.П. Мульдьяров, С.В. Виссарионов, С.А. Линник // Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста. – 2020. – Т. 8. – № 2. – С. 217–230. – doi.org/10.17816/PTORS33824.

48. Микайлов, И.М. Результаты эндопротезирования плечевого сустава у больных с новообразованиями проксимального отдела плечевой кости / И.М. Микайлов, П.В. Григорьев, Д.А. Пташников, С.В. Майков // Травматология и ортопедия России. – 2014. – Т. 20. – № 4. – С. 27–35. – doi.org/10.21823/2311-2905-2014-0-4-27-35.

49. Минимально манипулированные клеточные продукты / Г.А. Айрапетов, А.В. Аксенено, Л.И. Алексеева и др. // IX Научно-практическая конференция с международным участием Приоровские чтения-2021 «Ортобиология» совместно с конференцией молодых ученых : Материалы к конгрессу, Москва, 23–24 апреля 2021 г. / Редколлегия: М. А. Страхов [и др.]. – Воронеж: Издательско-полиграфический центр «Научная книга», 2022. – С. 100–121. – EDN SQDBSL.

50. Миронов, С.П. Тканевые и клеточные технологии управления репаративным остеогенезом / С.П. Миронов, Н.П. Омеляненко, В.К. Ильина, И.Н. Карпов, А.И. Дорохин, О.В. Кожевников // Кремлевская медицина. Клинический вестник. – 2007. – № 1. – С. 48–52.

51. Мурылев, В.Ю. Ревизионное эндопротезирование вертлужного компонента эндопротеза тазобедренного сустава / В.Ю. Мурылев, Н.В. Петров, Я.А. Рукин, П.М. Елизаров, А.Д. Калашник // Кафедра травматологии и ортопедии. – 2012. – № 1. – С. 20–25.

52. Мухаметов, У.Ф. Аллопластические и имплантационные материалы для костной пластики: обзор литературы / У.Ф. Мухаметов, С.В. Люлин, Д.Ю.

Борзунов, И.Ф. Гареев, О.А. Бейлерли, G. Yang // Креативная хирургия и онкология. – 2021. – № 4. – С. 343–353.

53. Мухаметов, У.Ф. Некоторые аспекты ревизионного эндопротезирования тазобедренного сустава. Пластика костных дефектов губчатыми аллоплантами / У.Ф. Мухаметов, Ф.Ф. Мухаметов, Я.Н. Сулейманов, Р.Я. Нагаев, Р.Т. Нигматуллин, О.Р. Шангина // Гений ортопедии. – 2016. – № 4. – С. 29–35. – doi.org/10.18019/1028-4427-2016-4-29-35

54. Нимирицкий, П.П. Ниша стволовой клетки / П.П. Нимирицкий, Г.Д. Сагарадзе, А.Ю. Ефименко, П.И. Макаревич, В.А. Ткачук // Цитология. – 2018. – Т. 60. – № 8. – С. 575–586. – doi.org/10.31116/tsitol.2018.08.01.

55. Нисиченко, Д.В. Субтотальная резекция большеберцовой кости в НИИ детской онкологии и гематологии ФГБУ «РОНЦ им. НН Блохина» Минздрава России / Д.В. Нисиченко, Д.Б. Хестанов, Е.В. Михайлова, В.Х. Харбедия, О.В. Илюшина, А.А. Малахова, А.З. Дзампаев, М.Д. Алиев // Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. – 2017. – № 1. – С. 52–58.

56. Павлов, В.Н. Современные возможности клинического применения стромально-васкулярной фракции жировой ткани / В.Н. Павлов, А.А. Казихинуров, Р.А. Казихинуров, А.М. Пушкарев, М.А. Агавердиев, С.Ю. Максимова, И.Ф. Гареев, О.А. Бейлерли // Медицинский вестник Башкортостана. – 2020. – Т. 15. – № 6. – С. 142–153.

57. Пальцев, М.А. Перспективы использования стволовых клеток в медицине / М.А. Пальцев, В.Н. Смирнов, Ю.А. Романов, А.А. Иванов // Вестник Российской академии наук. – 2006. – Т. 76. – № 2. – С. 99–103. – EDN GYWAXR.

58. Пасатецкая, Н.А. Сравнительный анализ влияния адреноблокаторов в условиях органотипического культивирования ткани кости / Н.А. Пасатецкая, А.И. Лопатин, Е.В. Лопатина // Волгоградский научно-медицинский журнал. – 2020. – № 3. – С. 25–29.

59. Патент № 2534523 С1 Российская Федерация, МПК А61В 17/56. Способ пластики вертлужной впадины при ревизионном эндопротезировании тазобедренного сустава : № 2013119313/14 : заявл. 25.04.2013 : опубл. 27.11.2014 /

Г.П. Котельников, Ю.В. Ларцев, А.Г. Нагога [и др.] ; заявитель Государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

60. Патент № 2737732 С2 Российская Федерация, МПК А61К 41/00, А61К 47/64, А61К 47/65. Экзосомы, содержащие терапевтические полипептиды : № 2018145738 : заявл. 25.05.2017 : опубл. 02.12.2020 / Д. Хин, И. Мейджер, М. Вуд [и др.] ; заявитель Ивокс Терапьютикс ЛТД, Охфорд Юниверсити Инновейшн Лимитед. – EDN ADVALP.

61. Патент № 2746529 С1 Российская Федерация, МПК А61F 2/28, А61К 35/32, А61L 27/38. Способ изготовления костнопластического материала : № 2020117526 : заявл. 18.05.2020 : опубл. 15.04.2021 / К.А. Воробьев, Д.В. Смоленцев, Н.В. Загородний, А.В. Губин ; заявитель Федеральное государственное бюджетное учреждение "Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова" Министерства здравоохранения Российской Федерации. – EDN VZWJFJ.

62. Петухова, В.В. Применение бисфосфонатов при экспериментальном туберкулезном остите: КТ-визуализация / В.В. Петухова, А.Ю. Мушкин, М.М. Костик, Т.И. Виноградова, А.С. Кафтырев, В.А. Евсеев, А.М. Кульков // Гений ортопедии. – 2023. – Т. 29. – № 1. – С. 78–84. – doi.org/10.18019/1028-4427-2023-29-1-78-84.

63. Подорожная, В.Т. Аллогенные костные материалы: структура, свойства, применение / В.Т. Подорожная, М.А. Садовой, И.А. Кирилова, Ю.П. Шаркеев, Е.В. Легостаева // Известия высших учебных заведений. Физика. – 2013. – Т. 56. – № 12–3. – С. 14-20.

64. Попков, А.В. Использование биodeградируемой матрицы из поликапролактона для заживления костных дефектов (экспериментальное исследование) / А.В. Попков, Е.Н. Горбач, Н.А. Кононович, С.И. Твердохлебов, Е.Н. Большасов, Д.А. Попков, Е.С. Горбач // Acta Biomedica Scientifica. – 2022. – Т. 7. – № 4. – С. 201–211.

65. Размыслов, А.В. Оптимизация хирургической тактики при замещении костных дефектов и увеличении размеров альвеолярного отростка верхней челюсти и альвеолярной части нижней челюсти / А.В. Размыслов, А.У. Минкин // Пародонтология. – 2012. – Т. 17. – № 3. – С. 35–40.
66. Резник, Л.Б. Применение физических факторов для оптимизации костной регенерации (обзор литературы) / Л.Б. Резник, К.Ю. Рожков, С.А. Ерофеев, Г.Г. Дзюба, Д.В. Котов // Гений ортопедии. – 2015. – № 1. – С. 89–95.
67. Романцова, Т.И. Жировая ткань: цвета, депо и функции / Т.И. Романцова // Ожирение и метаболизм. – 2021. – Т. 18. – № 3. – С. 282-301.
68. Ронь, Г.И. Цифровая диагностика практически здорового пародонта на трехмерной реконструкции конусно-лучевого компьютерного томографа / Г.И. Ронь, Т. М. Еловицова, Л. В. Уварова, М. А. Чибисова // Проблемы стоматологии. – 2015. – № 3–4. – С. 32–37. – DOI: 10.18481/2077-7566-2015-11-3-4-32-37. – EDN UXCDPL.
69. Самойлова, Е.М. Экзосомы: от биологии к клинике / Е.М. Самойлова, В.А. Кальсин, В.А. Беспалова, В.М. Девиченский, В.П. Баклашев // Гены и клетки. – 2017. – Т. 12. – № 4. – С. 7–19. – doi.org/10.23868/201707024.
70. Сметанин, С. Классификации дефектов костной ткани при первичной артропластике коленного сустава / С. Сметанин, Г. Кавалерский // Врач. – 2017. – № 10. – С. 70–72.
71. Терсков, А.Ю. Наша тактика в диагностике и лечении больных с гигантоклеточными опухолями костей / А.Ю. Терсков, В.В. Иванов, А.Н. Николаенко // Гений ортопедии. – 2013. – № 2. – С. 67–71.
72. Тихилов, Р.М. Ближайшие и среднесрочные результаты эндопротезирования тазобедренного сустава при опухолях проксимального отдела бедренной кости / Р.М. Тихилов, Д.А. Пташников, Ф.Ю. Засульский, И.М. Микайлов, П.В. Григорьев, Д.Г. Плиев // Травматология и ортопедия России. – 2014. – № 2 (72). – С. 14–21.
73. Тихилов, Р.М. Импакионная костная пластика в сочетании с установкой бедренного компонента цементной фиксации при ревизии

тазобедренного сустава (сложный случай из практики) / Р.М. Тихилов, В.С. Сивков, А.В. Цыбин, Р.В. Малыгин, В.В. Любчак, М.И. Шубняков // Новые горизонты травматологии и ортопедии. – 2017. – С. 210–214.

74. Тихилов, Р.М. Оперативное лечение больных с гигантоклеточной опухолью костей / Р.М. Тихилов, Д.А. Пташников, И.М. Микайлов, Ф.Ю. Засульский, П.В. Григорьев // Онкология. Журнал им. П.А. Герцена. – 2017. – Т. 6. – № 1. – С. 5–11.

75. Тихилов, Р.М. Анализ экономической эффективности использования индивидуальных и серийных вертлужных конструкций при ревизионном эндопротезировании тазобедренного сустава / Р.М. Тихилов, А.А. Джавадов, А.О. Денисов, А.М. Чилилов, М.А. Черкасов, С.С. Билык, И.Э. Хужаназаров, И.И. Шубняков // Гений ортопедии. 2022. – Т. 28. – № 2. – С. 234–40. – doi.org/10.18019/1028-4427-2022-28-2-234-240.

76. Тихилов, Р.М. Классификации дефектов вертлужной впадины: дают ли они объективную картину сложности ревизионного эндопротезирования тазобедренного сустава? (критический обзор литературы и собственных наблюдений) / Р.М. Тихилов, И.И. Шубняков, А.О. Денисов // Травматология и ортопедия России. – 2019. – Т. 25. – № 1. – С. 122-141. – DOI: 10.21823/2311-2905-2019-25-1-122-141. – EDN JIGCTL.

77. Хоминец, В.В. Аллогенные остеопластические материалы для реконструктивной хирургии боевых травм / В.В. Хоминец, К.А. Воробьев, М.О. Соколова, А.К. Иванова, А.В. Комаров // Известия Российской военно-медицинской академии. – 2022. – Т. 41. – № 3. – С. 309–314. – DOI: 10.17816/rmmar109090. – EDN ZJLNQX.

78. Хэм, А. Костная ткань / А. Хэм, Д. Кормак // Гистология. – М.: Мир, 1983. – Т. 3. – С. 19–131.

79. Черданцева, Л.А. Оценка *in vitro* влияния аллогенной костной матрицы на характеристики мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани при создании комбинированных тканеинженерных конструкций / Л.А. Черданцева, Е.А. Анастасиева, Д.Я. Алейник, М.Н. Егорихина, И.А. Кирилова //

Травматология и ортопедия России. – 2021. – Т. 27. – № 1. – С. 53-65. – DOI: 10.21823/2311-2905-2021-27-1-53-65.

80. Шастов, А.Л. Проблема замещения посттравматических дефектов длинных костей в отечественной травматолого-ортопедической практике (обзор литературы) / А.Л. Шастов, Н.А. Кононович, Е.Н. Горбач // Гений ортопедии. – 2018. – Т. 24. – № 2. – С. 252–257. DOI: 10.18019/1028-4427-2018-24-2-252-257.

81. Яременко, А.И. Оценка регенераторного потенциала альвеолярно-периодонтальных дефектов / А.И. Яременко, С.П. Рубникович, Д.М. Нейзберг, А.И. Ерохин, Л.Ю. Орехова, В.Г. Атрушкевич, Ю.Л. Денисова, Е.С. Лобода // Известия Национальной академии наук Беларуси. Серия медицинских наук. – 2021. – Т. 18. – № 3. – С. 304–314.

82. Adachi, T. Framework for optimal design of porous scaffold microstructure by computational simulation of bone regeneration / T. Adachi, Y. Osako, M. Tanaka, M. Hojo, S.J. Hollister // Biomaterials. – 2006. – Vol. 27. – N 21. – P. 3964–3972.

83. Aktuglu, K. Ilizarov bone transport and treatment of critical-sized tibial bone defects: a narrative review / K. Aktuglu, K. Erol, A. Vahabi // Journal of Orthopaedics and Traumatology. – 2019. – Vol. 20. – N 1. – P. 1–14.– doi.org/10.1186/s10195-019-0527-1.

84. AlGheshyan, F. Comparison of gait parameters in distal femoral replacement using a metallic endoprosthesis versus allograft reconstruction / F. AlGheshyan, M. Eltoukhy, K. Zakaria, H.T. Temple, S. Asfour // Journal of orthopaedics. – 2015. – Vol. 12. – P. S25–S30.

85. Al-Namnam, N. Recent advances in bone graft substitute for oral and maxillofacial applications: A review / N. Al-Namnam, S.N. Jayash // Int. J. Biosci. – 2019. – Vol. 15. – P. 70–94.

86. Amini, A.R. Bone tissue engineering: recent advances and challenges / A.R. Amini, C.T. Laurencin, S.P. Nukavarapu // Critical reviews in biomedical engineering. – 2012. – Vol. 40. – N 5. – P. 363–408.

87. Amini, Z. A systematic review of decellularized allograft and xenograft-derived scaffolds in bone tissue regeneration / Z. Amini, R. Lari // *Tissue and Cell*. – 2021. – Vol. 69. – P. 101494. – doi.org/10.1016/j.tice.2021.101494.
88. Atala, A. Engineering complex tissues / A. Atala, F.K. Kasper, A.G. Mikos // *Science translational medicine*. – 2012. – Vol. 4. – N 160. – P. 160rv12–160rv12. – doi.org/10.1126/scitranslmed.3004890.
89. Avril, P. Mesenchymal stem cells increase proliferation but do not change quiescent state of osteosarcoma cells: Potential implications according to the tumor resection status / P. Avril, L.R. Le Nail, M.Á. Brennan, P. Rosset, G. De Pinieux, P. Layrolle, D. Heymann, P. Perrot, V. Trichet // *Journal of bone oncology*. – 2016. – Vol. 5. – N 1. – P. 5–14.
90. Ayerza, M.A. Structural allograft reconstruction of the foot and ankle after tumor resections / M.A. Ayerza, N.S. Piuze, L.A. Aponte-Tinao, G.L. Farfalli, D.L. Muscolo // *Musculoskeletal surgery*. – 2016. – Vol. 100. – N 2. – P. 149–156.
91. Baer, P.C. Adipose-derived mesenchymal stromal/stem cells: tissue localization, characterization, and heterogeneity / P.C. Baer, H. Geiger // *Stem cells international*. – 2012. – Vol. 2012. – P. 812693.
92. Battafarano, G. Strategies for Bone Regeneration: From Graft to Tissue Engineering / G. Battafarano, M. Rossi, De V. Martino, F. Marampon, L. Borro, A. Secinaro, A. Del Fattore // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2021. – Vol. 22. – N 3. – P. 1128.
93. Bicer, M. Impact of 3D cell culture on bone regeneration potential of mesenchymal stromal cells 217. / M. Bicer, G.S. Cottrell, D. Widera // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2021. – Vol. 12. – N 1. – P. 1–13. – doi.org/10.1186/s13287-020-02094-8.
94. Boehm, K.S. Donor site morbidities of iliac crest bone graft in craniofacial surgery: a systematic review / K.S. Boehm, M. Al-Taha, A. Morzycki, O.A. Samargandi, S. Al-Youha, M.R. LeBlanc // *Annals of Plastic Surgery*. – 2019. – Vol. 83. – N 3. – P. 352–358.
95. Bora, P. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative

medicine: a brief review on biology and translation / P. Bora, A.S. Majumdar // *Stem cell research & therapy*. – 2017. – Vol. 8. – N 1. – P. 1–10.

96. Borzunov, D.Y. Reconstruction by bone transport after resection of benign tumors of tibia / D.Y. Borzunov, P.I. Balaev, K.N. Subramanyam // *Indian Journal of Orthopaedics*. – 2015. – Vol. 49. – N 5. – P. 516–522.

97. Bose, S. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds / S. Bose, M. Roy, A. Bandyopadhyay // *Trends in biotechnology*. – 2012. – Vol. 30. – N 10. – P. 546–554.

98. Bouyer, M. 3D-printed scaffold combined to 2D osteoinductive coatings to repair a critical-size mandibular bone defect / M. Bouyer, C. Garot, P. Machillot, J. Vollaire, V. Fitzpatrick, S. Morand, J. Boutonnat, V. Josserand, G. Bettega, C. Picart // *Materials Today Bio*. – 2021. – Vol. 11. – P. 100113.

99. Bow, A. Commercially available bone graft substitutes: the impact of origin and processing on graft functionality / A. Bow, D.E. Anderson, M. Dhar // *Drug metabolism reviews*. – 2019. – Vol. 51. – N 4. – P. 533–544. – doi.org/10.1080/03602532.2019.1671860.

100. Bracey, D.N. Bone xenotransplantation: A review of the history, orthopedic clinical literature, and a single-center case series / D.N. Bracey, N.E. Cignetti, A.H. Jinnah, A.V. Stone, B.M. Gyr, P.W. Whitlock, A.T. Scott // *Xenotransplantation*. – 2020. – Vol. 27. – N 5. – P. e12600. – doi.org/10.1111/xen.12600.

101. Brashers, V.L. et al. (ed.). *Pathophysiology: the biologic basis for disease in adults and children*. – Elsevier, 2018. – 4232 pp.

102. Brudnicki, A. Secondary alveolar bone grafting in cleft lip and palate: A comparative analysis of donor site morbidity in different age groups/ A. Brudnicki, M. Rachwalski, Ł. Wiepszowski, E. Sawicka // *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. – 2019. – Vol. 47. – N 1. – P. 165–169.

103. Bus, M.P.A. Intercalary allograft reconstructions following resection of primary bone tumors: a nationwide multicenter study / M.P. Bus, P.D. Dijkstra, van de

M.A. Sande, A.H. Taminiau, H.W. Schreuder, P.C. Jutte, I.C. van der Geest, G.R. Schaap, J.A. Bramer // JBJS. – 2014. – Vol. 96. – N 4. – P. e26.

104. Chang, X. New perspective into mesenchymal stem cells: Molecular mechanisms regulating osteosarcoma / X. Chang, Z. Ma, G. Zhu, Y. Lu, J. Yang // Journal of Bone Oncology. – 2021. – Vol. 29. – P. 100372.

105. Chen, W.M. High- grade osteosarcoma treated with hemicortical resection and biological reconstruction / W.M. Chen, P.K. Wu, C.F. Chen, L.H. Chung, C.L. Liu, T.H. Chen // Journal of surgical oncology. – 2012. – Vol. 105. – N 8. – P. 825–829.

106. Chortkoff, B. Chemotherapy, immunosuppression, and anesthesia / B. Chortkoff, D. Stenehjem // Pharmacology and Physiology for Anesthesia. – Elsevier, 2019. – P. 753–768.

107. Ciapetti, G. Enhancing osteoconduction of PLLA-based nanocomposite scaffolds for bone regeneration using different biomimetic signals to MSCs / G. Ciapetti, D. Granchi, V. Devescovi, S.R. Baglio, E. Leonardi, D. Martini, M.J. Jurado, B. Olalde, I. Armentano, J.M. Kenny, F.X. Walboomers, J.I. Alava, N. Baldini // International journal of molecular sciences. – 2012. – Vol. 13. – N 2. – P. 2439–2458.

108. Daculsi, G. Osteoconduction, osteogenicity, osteoinduction, what are the fundamental properties for a smart bone substitutes / G. Daculsi, B.H. Fellah, T. Miramond, M. Durand // Irbm. – 2013. – Vol. 34. – N 4-5. – P. 346–348.

109. Dai, J. Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy / J. Dai, Y. Su, S. Zhong, L. Cong, B. Liu, J. Yang, Y. Tao, Z. He, C. Chen, Y. Jiang // Signal transduction and targeted therapy. – 2020. – Vol. 5. – N 1. – P. 145. – doi.org/10.1038/s41392-020-00261-0.

110. Dawson, E. Biomaterials for stem cell differentiation / E. Dawson, G. Mapili, K. Erickson, S. Taqvi, K. Roy // Advanced drug delivery reviews. – 2008. – Vol. 60. – N 2. – P. 215–228.

111. De Ugarte, D.A. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow / D.A. De Ugarte, K. Morizono, A. Elbarbary, Z. Alfonso, P.A. Zuk, M. Zhu, J.L. Dragoo, P. Ashjian, B. Thomas, P. Benhaim, I. Chen, J. Fraser, M.H. Hedrick // Cells tissues organs. – 2003. – Vol. 174. – N 3. – P. 101–109.

112. De Wildt, B.W.M. From bone regeneration to three-dimensional in vitro models: tissue engineering of organized bone extracellular matrix / Br.W.M. de Wildt, S. Ansari, N.A.J.M. Sommerdijk, K. Ito, A. Akiva, S. Hofmann / *Current opinion in biomedical engineering*. – 2019. – Vol. 10. – P. 107–115.

113. Dimitriou, R. Bone regeneration: current concepts and future directions / R. Dimitriou, E. Jones, D. McGonagle, P.V. Giannoudis // *BMC medicine*. – 2011. – Vol. 9. – P. 66.

114. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, Dj. Prockop, E. Horwitz // *The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy*. – 2006. – Vol. 8. – N 4. – P. 315–317.

115. Drumond, J.M.N. Benign bone tumors and tumor-like bone lesions: treatment update and new trends / J.M.N. Drumond // *Revista brasileira de ortopedia*. – 2015. – Vol. 44. – N 5. – P. 386–390.

116. Elefteriou, F. Control of bone remodeling by the peripheral sympathetic nervous system / F. Elefteriou, P. Campbell, Y. Ma // *Calcified tissue international*. – 2014. – Vol. 94. – N 1. – P. 140–151.

117. Elgali, I. Guided bone regeneration using resorbable membrane and different bone substitutes: Early histological and molecular events / I. Elgali, A. Turri, W. Xia, B. Norlindh, A. Johansson, C. Dahlin, P. Thomsen, O. Omar // *Acta biomaterialia*. – 2016. – Vol. 29. – P. 409–423.

118. Elgali, I. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited / I. Elgali, O. Omar, C. Dahlin, P. Thomsen // *European journal of oral sciences*. – 2017. – Vol. 125. – N 5. – P. 315–337.

119. Engh, G.A. Classification of bone defects / G.A. Engh // *Surgical Techniques in Total Knee Arthroplasty*. – Springer, NY, 2002. – P. 401–408.

120. Engh, G.A. Classification of bone defects femur and tibia / G.A. Engh // *Knee arthroplasty handbook*. – NY: Springer, 2006. – P. 116–132.

121. Farfalli, G.L. Clinical and functional outcomes of tibial intercalary allografts after tumor resection / G.L. Farfalli, L. Aponte-Tinao, L. Lopez-Millán, M.A. Ayerza, D.L. Muscolo // *Orthopedics*. – 2012. – Vol. 35. – N 3. – P. e391–e396.
122. Florio, P. Activin A in asphyxiated full-term newborns with hypoxic ischemic encephalopathy / P. Florio, A. Frigiola, R. Battista, H. Abdalla Ael, D. Gazzolo, L. Galleri, S. Pinzauti, R. Abella, G. Li Volti, M. Strambi // *Frontiers in Bioscience-Elite*. – 2010. – Vol. 2. – N 1. – P. 36–42.
123. García-Cimbreló, E. Bone defect determines acetabular revision surgery / E. García-Cimbreló, E. García-Rey // *Hip International*. – 2014. – Vol. 24. – N 10_suppl. – P. 33–36.
124. Gentile, P. Systematic review: allogenic use of stromal vascular fraction (SVF) and decellularized extracellular matrices (ECM) as advanced therapy medicinal products (ATMP) in tissue regeneration / P. Gentile, A. Sterodimas, J. Pizzicannella, L. Dionisi, D. De Fazio, C. Calabrese, S. Garcovich // *International journal of molecular sciences*. – 2020. – Vol. 21. – N 14. – P. 4982.
125. Ghanem, M. Acetabular defect classification and management / M. Ghanem, D. Zajonz, C.E. Heyde, A. Roth // *Der Orthopäde*. – 2020. – Vol. 49. – N 5. – P. 432–442.
126. Gharedaghi, M. Evaluation of Clinical Results and Complications of Structural Allograft Reconstruction after Bone Tumor Surgery / M. Gharedaghi, M.T. Peivandi, M. Mazloomi, H.R. Shoorin, M. Hasani, P. Seyf, F. Khazaei // *The Archives of Bone and Joint Surgery*. – 2016. – Vol. 4. – N 3. – P. 236–242.
127. Ghayor, C. Osteoconductive Microarchitecture of Bone Substitutes for Bone Regeneration Revisited / C. Ghayor, F.E. Weber // *Frontiers in Physiology*. – 2018. – Vol. 9. – P. 960–960.
128. Ghorbani, F. 3D printing of acellular scaffolds for bone defect regeneration: A review / F. Ghorbani, D. Li, S. Ni, Y. Zhou, B. Yu // *Materials Today Communications*. – 2020. – Vol. 22. – P. 100979.

129. Glatt, V. A concert between biology and biomechanics: the influence of the mechanical environment on bone healing / V. Glatt, C.H. Evans, K. Tetsworth // *Frontiers in Physiology*. – 2017. – Vol. 7. – P. 678 (1–18).

130. Glennie, R.A. A systematic review with consensus expert opinion of best reconstructive techniques after osseous en bloc spinal column tumor resection / R.A. Glennie, Y.R. Rampersaud, S. Boriani, J.J. Reynolds, R. Williams, Z.L. Gokaslan, M.H. Schmidt, P.P. Varga, C.G. Fisher // *Spine*. – 2016. – Vol. 41. – N 1. – P. S205–S211.

131. Gouron, R. Bone defect reconstruction in children using the induced membrane technique: a series of 14 cases / R. Gouron, F. Deroussen, M.C. Plancq, L.M. Collet // *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*. – 2013. – Vol. 99. – N 7. – P. 837–843.

132. Gouron, R. Surgical technique and indications of the induced membrane procedure in children / R. Gouron // *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*. – 2016. – Vol. 102. – N 1. – P. S133–S139.

133. Gu, Y. Donor-and recipient-site morbidity of vascularized fibular and iliac flaps for mandibular reconstruction: A systematic review and meta-analysis / Y. Gu, H. Ma, S. Shujaat, K. Orhan, W. Coucke, M.S. Amoli, M. Bila, C. Politis, R. Jacobs // *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. – 2021. – Vol. 74. – N 7. – P. 1470–1479.

134. Guerado, E. Challenges of bone tissue engineering in orthopaedic patients / E. Guerado, E. Caso // *World journal of orthopedics*. – 2017. – Vol. 8. – N 2. – P. 87–98.

135. Guo, J. Stromal vascular fraction: A regenerative reality? Part 2: Mechanisms of regenerative action / J. Guo, A. Nguyen, D.A. Banyard, D. Fadavi, J.D. Toranto, G.A. Wirth, K.Z. Paydar, G.R. Evans, A.D. Widgerow // *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. – 2016. – Vol. 69. – N 2. – P. 180–188.

136. Halim, A.S. Long-term outcome of free fibula osteocutaneous flap and massive allograft in the reconstruction of long bone defect / A.S. Halim, S.C. Chai, W.F. Wan Ismail, W.S. Wan Azman, A.Z. Mat Saad, Z. Wan // *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery*. – 2015. – Vol. 68. – N 12. – P. 1755–1762.

137. Han, G. Reconstruction using massive allografts after resection of extremity osteosarcomas the study design: A retrospective cohort study / G. Han, Y. Wang, W. Bi, J. Jia, W. Wang, M. Xu, X. Zheng, L. Mei, M. Yang // *International Journal of Surgery*. – 2015. – Vol. 21. – P. 108–111.

138. Hannink, G. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? / G. Hannink, J.J.C. Arts // *Injury*. – 2011. – Vol. 42. – P. S22–S25.

139. Haugen, H.J. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? / H.J. Haugen, S.P. Lyngstadaas, F. Rossi, G. Perale // *Journal of Clinical Periodontology*. – 2019. – Vol. 46. – P. 92–102.

140. Hayashi, O. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue / O. Hayashi, Y. Katsube, M. Hirose, H. Ohgushi, H. Ito // *Calcified tissue international*. – 2008. – Vol. 82. – N 3. – P. 238–247.

141. Henkel, J. Bone regeneration based on tissue engineering conceptions – a 21st century perspective / J. Henkel, M.A. Woodruff, D.R. Epari, R. Steck, V. Glatt, I.C. Dickinson, P.F. Choong, M.A. Schuetz, D.W. Hutmacher // *Bone research*. – 2013. – Vol. 1. – N 1. – P. 216–248.

142. Hillmann, A. Benign bone tumors. General principles / A. Hillmann, T. Gösling // *Der Unfallchirurg*. – 2014. – Vol. 117. – N 10. – P. 873–882.

143. Houdek, M.T. What is the outcome of allograft and intramedullary free fibula (Capanna technique) in pediatric and adolescent patients with bone tumors? / M.T. Houdek, E.R. Wagner, A.A. Stans, A.Y. Shin, A.T. Bishop, F.H. Sim, S.L. Moran // *Clinical Orthopaedics and Related Research®*. – 2016. – Vol. 474. – N 3. – P. 660–668.

144. Hounsfield, G.N. Computerized transverse axial scanning (tomography): Part 1. Description of system / G.N. Hounsfield // *The British journal of radiology*. – 1973. – Vol. 46. – N 552. – P. 1016–1022.

145. Hrapkiewicz, K. Clinical laboratory animal medicine: an introduction / K. Hrapkiewicz, L.A. Colby, P. Denison. – John Wiley & Sons, 2013. – 431 pp.

146. Huang, G. Identification and characterization of long non-coding RNAs in osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells / G. Huang, Y. Kang, Z. Huang, Z. Zhang, F. Meng, W. Chen, M. Fu, W. Liao, Z. Zhang // *Cellular Physiology and Biochemistry*. – 2017. – Vol. 42. – N 3. – P. 1037–1050.

147. Huang, S. New insights on the reparative cells in bone regeneration and repair / S. Huang, M. Jin, N. Su, L. Chen // *Biological Reviews*. – 2021. – Vol. 96. – N 2. – P. 357–375.

148. Im, G.I.I. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? / G.I.I. Im, Y.W. Shin, K.B. Lee // *Osteoarthritis and cartilage*. – 2005. – Vol. 13. – N 10. – P. 845–853.

149. Jia, Y. Exosomes secreted by endothelial progenitor cells accelerate bone regeneration during distraction osteogenesis by stimulating angiogenesis / Y. Jia, Y. Zhu, S. Qiu, J. Xu, Y. Chai // *Stem cell research & therapy*. – 2019. – Vol. 10. – P. 1–13. – doi.org/10.1186/s13287-018-1115-7.

150. Jin, J. Physicochemical niche conditions and mechanosensing by osteocytes and myocytes / J. Jin, A.D. Bakker, G. Wu, J. Klein-Nulend, R.T. Jaspers // *Current osteoporosis reports*. – 2019. – Vol. 17. – P. 235–249. – doi.org/10.1007/s11914-019-00522-0.

151. Ju, C. Mesenchymal stem cell-associated lncRNA in osteogenic differentiation / C. Ju, R. Liu, Y.W. Zhang, Y. Zhang, R. Zhou, J. Sun, X.B. Lv, Z. Zhang // *Biomedicine & Pharmacotherapy*. – 2019. – Vol. 115. – P. 108912.

152. 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. – Vol. 24. – N 5. – P. 1294–1301.

153. Khan, M. The role of mesenchymal stem cells in oncology and regenerative medicine / M. Khan, S.E.R. Adil, A.L. Olson // *Future Oncology*. – 2017. – Vol. 13. – N 9. – P. 821–831.

154. Khan, Y. Bone defect classifications in revision total knee arthroplasty, their reliability and utility: a systematic review / Y. Khan, S. Arora, A. Kashyap, M.K.

Patralekh, L. Maini // Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery. – 2023. – Vol. 143. – N 1. – P. 453–468.

155. Khira, Y.M. Pedicled vascularized fibular graft with Ilizarov external fixator for reconstructing a large bone defect of the tibia after tumor resection / Y.M. Khira, H.A. Badawy // Journal of Orthopaedics and Traumatology. – 2013. – Vol. 14. – N 2. – P. 91–100.

156. King, J.J. Allograft-prosthetic composite reverse total shoulder arthroplasty for reconstruction of proximal humerus tumor resections / J.J. King, L.M. Nystrom, N.B. Reimer, C.P. Gibbs Jr, M.T. Scarborough, T.W. Wright // Journal of Shoulder and Elbow Surgery. – 2016. – Vol. 25. – N 1. – P. 45–54.

157. Kirubha P. et al. A novel technique to enhance bone density in implant dentistry-osseodensification. – 1981.

158. Kong, Y. The bone marrow microenvironment is similarly impaired in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation patients with early and late poor graft function / Y. Kong, Y.T. Wang, Y. Hu, W. Han, Y.J. Chang, X.H. Zhang, Z.F. Jiang, X.J. Huang // Bone marrow transplantation. – 2016. – Vol. 51. – N 2. – P. 249–255.

159. Kotela, A. Revision knee arthroplasty in patients with inherited bleeding disorders: a single-center experience / A. Kotela, M. Wilk-Frańczuk, P. Żbikowski, P. Łęgosz, P. Ambroziak, I. Kotela // Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research. – 2017. – Vol. 23. – P. 129–137.

160. Kozłowska, U. Similarities and differences between mesenchymal stem/progenitor cells derived from various human tissues / U. Kozłowska, A. Krawczyński, K. Futoma, T. Jurek, M. Rorat, D. Patrzalek, A. Klimczak // World journal of stem cells. – 2019. – Vol. 11. – N 6. – P. 347–374.

161. Kraus, K.H. Mesenchymal stem cells and bone regeneration / K.H. Kraus, C. Kirker-Head // Veterinary surgery. – 2006. – Vol. 35. – N 3. – P. 232–242.

162. Kwakwa, K.A. Engineering 3D models of tumors and bone to understand tumor-induced bone disease and improve treatments / K.A. Kwakwa, J.P. Vanderburgh, S.A. Guelcher, J.A. Sterling // Current osteoporosis reports. – 2017. – Vol. 15. – N 4. – P. 247–254.

163. Lei, P. Bone defects in revision total knee arthroplasty and management / P. Lei, R. Hu, Y. Hu // *Orthopaedic Surgery*. – 2019. – Vol. 11. – N 1. – P. 15–24.
164. Lendeckel, S. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report / S. Lendeckel, A. Jödicke, P. Christophis, K. Heidinger, J. Wolff, J.K. Fraser, M.H. Hedrick, L. Berthold, H.P. Howaldt // *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. – 2004. – Vol. 32. – N 6. – P. 370–373.
165. Li, C. Mesenchymal stem/stromal cells: developmental origin, tumorigenesis and translational cancer therapeutics / C. Li, H. Zhao, B. Wang // *Translational Oncology*. – 2021. – Vol. 14. – N 1. – P. 100948.
166. Li, J. Image navigation assisted joint-saving surgery for treatment of bone sarcoma around knee in skeletally immature patients / J. Li, L. Shi, G. Chen // *Surgical Oncology*. – 2014. – Vol. 23. – N 3. – P. 132–139.
167. Liao, H.T. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells / H.T. Liao, C.T. Chen // *World journal of stem cells*. – 2014. – Vol. 6. – N 3. – P. 288–295.
168. Liu E., Fan J. (ed.). *Fundamentals of laboratory animal science*. – CRC Press, 2017.
169. Lodoso-Torrecilla, I. Calcium phosphate cements: Optimization toward biodegradability / I. Lodoso-Torrecilla, J.J.J.P. van den Beucken, J.A. Jansen // *Acta biomaterialia*. – 2021. – Vol. 119. – P. 1–12. – doi.org/10.1016/j.actbio.2020.10.013.
170. Luck, J. A Systematic Review of Autologous Platelet-Rich Plasma and Fat Graft Preparation Methods / J. Luck, O.J. Smith, A. Mosahebi // *Plastic and reconstructive surgery*. *Global open*. – 2017. – Vol. 5. – N 12. – P. e1596.
171. Mahajan, A. Periodontal bone regeneration in intrabony defects using osteoconductive bone graft versus combination of osteoconductive and osteostimulative bone graft: A comparative study / A. Mahajan, S. Kedige // *Dental Research Journal*. – 2015. – Vol. 12. – N 1. – P. 25.

172. Malviya, A. Evidence for orthopaedic surgery in the treatment of metastatic bone disease of the extremities: a review article / A. Malviya, C. Gerrand // *Palliative Medicine*. – 2012. – Vol. 26. – N 6. – P. 788-796.
173. Mercado-Pagán, Á.E. Vascularization in bone tissue engineering constructs / Á.E. Mercado-Pagán, A.M. Stahl, Y. Shanjani, Y. Yang // *Annals of biomedical engineering*. – 2015. – Vol. 43. – N 3. – P. 718–729.
174. Mesimäki, K. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells / K. Mesimäki, B. Lindroos, J. Törnwall, J. Mauno, C. Lindqvist, R. Kontio, S. Miettinen, R. Suuronen // *International journal of oral and maxillofacial surgery*. – 2009. – Vol. 38. – N 3. – P. 201–209.
175. Misch, C.E. Bone-grafting materials in implant dentistry / C.E. Misch, F. Dietsch // *Implant dentistry*. – 1993. – Vol. 2. – N 3. – P. 158–166.
176. Mizuno, H. Concise review: adipose- derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine / H. Mizuno, M. Tobita, A.C. Uysal // *Stem cells*. – 2012. – Vol. 30. – N 5. – P. 804–810.
177. Morar, L. Analysis of CBCT Bone Density Using the Hounsfield Scale / L. Morar, G. Băciuț, M. Băciuț, S. Bran, H. Colosi, A. Manea, O. Almășan, Dinu C. // *Prosthesis*. – 2022. – Vol. 4. – N 3. – P. 414–423. – doi.org/10.3390/prosthesis4030033.
178. Mossman, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays / T. Mossman // *Journal Immunol Methods*. – 1983. – Vol. 65. – P. 55–63.
179. Müller, D.A. Allograft-prosthetic composite versus megaprosthesis in the proximal tibia – What works best? / D.A. Müller, G. Beltrami, G. Scoccianti, P. Cuomo, R. Capanna // *Injury*. – 2016. – Vol. 47. – P. S124–S130.
180. Muramatsu, K. Stimulation of neo-angiogenesis by combined use of irradiated and vascularized living bone graft for oncological reconstruction / K. Muramatsu, K. Ihara, T. Miyoshi, K. Yoshida, R. Iwanaga, T. Hashimoto, T. Taguchi // *Surgical oncology*. – 2012. – Vol. 21. – N 3. – P. 223–229.
181. Mushahary, D. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells / D. Mushahary, A. Spittler, C. Kasper, V. Weber, V. Charwat

// Cytometry Part A. – 2018. – Vol. 93. – N 1. – P. 19–31.

182. Nakamura, K. Tumor-induced osteomalacia caused by a massive phosphaturic mesenchymal tumor of the acetabulum: A case report / K. Nakamura, M. Ohishi, T. Matsunobu, Y. Nakashima, A. Sakamoto, A. Maekawa, Y. Oda, Y. Iwamoto // *Modern Rheumatology*. – 2018. – Vol. 28. – N 5. – P. 906–910.

183. Nazirkar, G. Effortless effort in bone regeneration: a review / G. Nazirkar, S. Singh, V. Dole, A. Nikam // *Journal of international oral health*. – 2014. – Vol. 6. – N 3. – P. 120–124.

184. Nieminen, J. Orthopaedic reconstruction of complex pelvic bone defects. Evaluation of various treatment methods / J. Nieminen, T.K. Pakarinen, M. Laitinen // *Scandinavian Journal of Surgery*. – 2013. – Vol. 102. – N 1. – P. 36–41.

185. Oedayrajsingh-Varma, M.J. Adipose tissue-derived mesenchymal stem cell yield and growth characteristics are affected by the tissue-harvesting procedure / M.J. Oedayrajsingh-Varma, S.M. van Ham, M. Knippenberg, M.N. Helder, J. Klein-Nulend, T.E. Schouten, M.J. Ritt, F.J. van Milligen // *Cytherapy*. – 2006. – Vol. 8. – N 2. – P. 166–177.

186. Oryan, A. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions / A. Oryan, S. Alidadi, A. Moshiri, N. Maffulli // *Journal of orthopaedic surgery and research*. – 2014. – Vol. 9. – N 1. – P. 1–27.

187. Paganelli, A. The dark side of adipose-derived mesenchymal stromal cells in cutaneous oncology: roles, expectations, and potential pitfalls / A. Paganelli, E. Rossi, C. Magnoni // *Stem Cells and Development*. – 2022. – Vol. 31. – N 19–20. – P. 593–603.

188. Panagopoulos, G.N. Intercalary reconstructions after bone tumor resections: a review of treatments / G.N. Panagopoulos, A.F. Mavrogenis, C. Mauffrey, J. Lesenský, A. Angelini, P.D. Megaloikonomos, V.G. Igoumenou, J. Papanastassiou, O. Savvidou, P. Ruggieri, P.J. Papagelopoulos // *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*. – 2017. – Vol. 27. – N 6. – P. 737–746.

189. Papadimitropoulos, A. Engineered decellularized matrices to instruct bone regeneration processes / A. Papadimitropoulos, C. Scotti, P. Bourguine, Scherberich A., I. Martin // *Bone*. – 2015. – Vol. 70. – P. 66–72.
190. Papantoniou, I. Process quality engineering for bioreactor-driven manufacturing of tissue-engineered constructs for bone regeneration / I. Papantoniou Ir, Y.C. Chai, F.P. Luyten, J. Schrooten Ir // *Tissue Engineering Part C: Methods*. – 2013. – Vol. 19. – N 8. – P. 596–609.
191. Permuy, M. Rabbit as model for osteoporosis research / M. Permuy, M. López-Peña, F. Muñoz, A. González-Cantalapiedra // *Journal of Bone and Mineral Metabolism*. – 2019. – Vol. 37. – N 4. – P. 573–583.
192. Plachokova, A.S. The bone regenerative effect of platelet- rich plasma in combination with an osteoconductive material in rat cranial defects / A.S. Plachokova, J. van den Dolder, P.J. Stoelinga, J.A. Jansen // *Clinical Oral Implants Research*. – 2006. – Vol. 17. – N 3. – P. 305–311.
193. Qiu, Y.Y. Bone defect classifications in revision total knee arthroplasty / Y.Y. Qiu, C.H. Yan, K.Y. Chiu, F.Y. Ng // *Journal of orthopaedic surgery*. – 2011. – Vol. 19. – N 2. – P. 238–243.
194. Qu, H. Reconstruction of segmental bone defect of long bones after tumor resection by devitalized tumor-bearing bone / H. Qu, W. Guo, R. Yang, D. Li, S. Tang, Y. Yang, S. Dong, J. Zang // *World Journal of Surgical Oncology*. – 2015. – Vol. 13. – P. 282.
195. Ramphal, R. Adolescent and young adult cancer: principles of care / R. Ramphal, S. Aubin, P. Czaykowski, S. De Pauw, A. Johnson, S. McKillop, D. Szwajcer, K. Wilkins, P. Rogers // *Current oncology*. – 2016. – Vol. 23. – N 3. – P. 204–209.
196. Reece, E.M. Vascularized Bone Grafts for Spinal Fusion – Part 1: The Iliac Crest / E.M. Reece, M.J. Davis, R.D. Wagner, A. Abu-Ghname, A. Cruz, G. Kaung, T. Verla, S. Winocour, A.E. Ropper // *Operative Neurosurgery*. – 2021. – Vol. 20. – N 5. – P. 493–496.
197. Reichert, J.C. Bone. In: Steinhoff G. (ed.) *Regenerative Medicine – from*

Protocol to Patient / J.C. Reichert, U. Nöth, A. Berner, D.W. Hutmacher. – Switzerland: Springer, Cham; 2016. – DOI: 10.1007/978-3-319-28386-9_9.

198. Rudert, M. Impaction bone grafting for the reconstruction of large bone defects in revision knee arthroplasty / M. Rudert, B.M. Holzapfel, E. von Rottkay, D.E. Holzapfel, U. Noeth // Operative Orthopädie und Traumatologie. – 2015. – Vol. 27. – N 1. – P. 35–46.

199. Sakellariou, V.I. Management bone loss of the proximal femur in revision hip arthroplasty: Update on reconstructive options / V.I. Sakellariou, G.C. Babis // World journal of orthopedics. – 2014. – Vol. 5. – N 5. – P. 614.

200. Sándor, G.K. Adipose stem cell tissue-engineered construct used to treat large anterior mandibular defect: a case report and review of the clinical application of good manufacturing practice-level adipose stem cells for bone regeneration / G.K. Sándor, V.J. Tuovinen, J. Wolff, M. Patrikoski, J. Jokinen, E. Nieminen, B. Mannerström, O.P. Lappalainen, R. Seppänen, S. Miettinen // Journal of Oral and Maxillofacial Surgery. – 2013. – Vol. 71. – N 5. – P. 938–950.

201. Schlund, M. Rabbit calvarial and mandibular critical-sized bone defects as an experimental model for the evaluation of craniofacial bone tissue regeneration / M. Schlund, A. Depeyre, S. Kotagudda Ranganath, P. Marchandise, J. Ferri, F. Chai // Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery. – 2022. – Vol. 123. – N 6. – P. 601–609.

202. Schofield, R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell / R. Schofield // Blood Cells. – 1978. – Vol. 4. – N 1–2. – P. 7–25. – PMID: 747780.

203. Scolaro, J.A. Surgical management of metastatic long bone fractures: principles and techniques / J.A. Scolaro, R.D. Lackman // JAAOS-Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons. – 2014. – Vol. 22. – N 2. – P. 90–100.

204. Shanmugam, S. Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of aliovalent substituted hydroxyapatite/ S. Shanmugam, B. Gopal // Applied surface science. – 2014. – T. 303. – C. 277-281.

205. Sharun, K. Standardization and characterization of adipose-derived stromal vascular fraction from New Zealand white rabbits for bone tissue engineering / K. Sharun, A.M. Pawde, R. Kumar, E. Kalaiselvan, P. Kinjavdekar, Dhama K., A. Pal // *Veterinary world*. – 2021. – Vol. 14. – N 2. – P. 508–514.
206. Singh, B. Dyce, Sack, and Wensing's textbook of veterinary anatomy / B. Singh. – St. Louis, Missouri: Saunders, 2018. – 872 pp.
207. Siswanto, S. Biocompatibility and osteoconductivity of scaffold porous composite collagen-hydroxyapatite based coral for bone regeneration / S. Siswanto, D. Hikmawati, U. Kulsum, D.I. Rudyardjo, R. Apsari, A. Aminatun // *Open Chemistry*. – 2020. – Vol. 18. – N 1. – P. 584–590. – doi.org/10.1515/chem-2020-0080.
208. Soung, Y.H. Exosomes in cancer diagnostics / Y.H. Soung, S. Ford, V. Zhang, J. Chung // *Cancers*. – 2017. – Vol. 9. – N 1. – P. 8. – doi.org/10.3390/cancers9010008.
209. Steijvers, E. Manufacturing artificial bone allografts: a perspective / E. Steijvers, A. Ghei, Z. Xia // *Biomaterials Translational*. – 2022. – Vol. 3. – N 1. – P. 65. – doi.org/10.12336%2Fbiomatertransl.2022.01.007.
210. Stewart, S.K. Fracture Non-Union: A Review of Clinical Challenges and Future Research Needs / S.K. Stewart // *Malaysian orthopaedic journal*. – 2019. – Vol. 13. – N 2. – P. 1–10.
211. Tetsworth, K.D. Classification of bone defects: an extension of the Orthopaedic Trauma Association open fracture classification / K.D. Tetsworth, H.G. Burnand, E. Hohmann, V. Glatt // *Journal of orthopaedic trauma*. – 2021. – Vol. 35. – N 2. – P. 71–76.
212. Tinti, C. Clinical classification of bone defects concerning the placement of dental implants / C. Tinti, S. Parma-Benfenati // *International Journal of Periodontics & Restorative Dentistry*. – 2003. – Vol. 23. – N 2. – P. 147–155.
213. Titsinides, S. Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review / S. Titsinides, G. Agrogiannis, T. Karatzas // *Japanese dental science review*. – 2019. – Vol. 55. – N 1. – P. 26–32.

214. Toosi, S. Osteogenesis and bone remodeling: A focus on growth factors and bioactive peptides / S. Toosi, J. Behravan // *Biofactors*. – 2020. – Vol. 46. – N 3. – P. 326–340. – doi.org/10.1002/biof.1598.

215. Tosun, E. Complications associated with anterior iliac bone grafting for the reconstruction of dentoalveolar defects / E. Tosun, M. Akkocaoğlu, H.H. Tüz, C. Avağ, T. Göktürk // *Journal of Craniofacial Surgery*. – 2019. – Vol. 30. – N 4. – P. 980–984.

216. Tye, C.E. Regulation of osteogenesis by long noncoding RNAs: an epigenetic mechanism contributing to bone formation / C.E. Tye, J.R. Boyd, N.A. Page, M.M. Falcone, J.L. Stein, G.S. Stein, J.B. Lian // *Connective tissue research*. – 2018. – Vol. 59. – N sup1. – P. 35–41.

217. Valtanen, R.S. Synthetic and Bone tissue engineering graft substitutes: What is the future? / R.S. Valtanen, Y.P. Yang, G.C. Gurtner, W.J. Maloney, D.W. Lowenberg // *Injury*. – 2021. – Vol. 52. – P. S72–S77.

218. 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*. – 2004. – Vol. 46. – N 2. – P. 11–17.

219. Wang, W. Allogeneic bone transplantation for pelvic reconstruction of large skeletal defects after tumor resection / W. Wang, Y. Wang, W. Bi, J. Yang, G. Han, J. Ia, M. Xu, G. Liu // *Zhongguo xiu fu Chong Jian wai ke za zhi. Zhongguo Xiu fu Chongjian Waike Zazhi. Chinese Journal of Reparative and Reconstructive Surgery*. – 2014. – Vol. 28. – N 3. – P. 331–334. – PMID: 24844014.

220. Wang, Y. Effects of metoprolol, methyldopa, and nifedipine on endothelial progenitor cells in patients with gestational hypertension and preeclampsia / Y. Wang, C. Liu, X. He, Y. Li, Y. Zou // *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. – 2019. – Vol. 46. – N 4. – P. 302–312.

221. Wei, S. Biodegradable materials for bone defect repair / S. Wei, J.X. Ma, L. Xu, X.S. Gu, X.L. Ma // *Military Medical Research*. – 2020. – Vol. 7. – N 1. – P. 1–25.

222. Weng, Y. Engineering of axially vascularized bone tissue using natural coral scaffold and osteogenic bone marrow mesenchymal stem cell sheets / Y. Weng, Z.

Wang, J. Sun, L. Han, X. Li, B. Wu, Q. Dong, Y. Liu // *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery*. – 2021. – Vol. 122. – N 4. – P. 397–404. – doi.org/10.1016/j.jormas.2021.01.013.

223. Wessling, M. Basic principles of surgical treatment of bone metastases / M. Wessling, R. Pflugmacher, M.C. Müller, K. Kabir, P.H. Pennekamp // *Zeitschrift für Orthopädie und Unfallchirurgie*. – 2013. – Vol. 151. – N 3. – P. 303–315.

224. Wu, Z. Three-dimensional virtual bone bank system for selecting massive bone allograft in orthopaedic oncology / Z. Wu, J. Fu, Z. Wang, X. Li, J. Li, Y. Pei, G. Pei, D. Li, Z. Guo, H. Fan // *International Orthopaedics*. – 2015. – Vol. 39. – N 6. – P. 1151–1158.

225. Xie, C. Advanced Strategies of Biomimetic Tissue- Engineered Grafts for Bone Regeneration / C. Xie, J. Ye, R. Liang, X. Yao, X. Wu, Y. Koh, W. Wei, X. Zhang, H. Ouyang // *Advanced healthcare materials*. – 2021. – Vol. 10. – N 14. – P. 2100408.

226. Yang, Q. Long noncoding RNAs: new players in the osteogenic differentiation of bone marrow-and adipose-derived mesenchymal stem cells / Q. Yang, L. Jia, X. Li, R. Guo, Y. Huang, Y. Zheng, W. Li // *Stem Cell Reviews and Reports*. – 2018. – Vol. 14. – N 3. – P. 297–308.

227. Yin, N. Platelet-rich plasma enhances the repair capacity of muscle-derived mesenchymal stem cells to large humeral bone defect in rabbits / N. Yin, Y. Wang, L. Ding, J. Yuan, L. Du, Z. Zhu, M. Pan, F. Xue, H. Xiao // *Scientific reports*. – 2020. – Vol. 10. – N 1. – P. 1–13.

228. Yin, S. Recent advances in scaffold design and material for vascularized tissue- engineered bone regeneration / S. Yin, W. Zhang, Z. Zhang, X. Jiang // *Advanced healthcare materials*. – 2019. – Vol. 8. – N 10. – P. 1801433.

229. Yu, X. Biomaterials for bone regenerative engineering / X. Yu, X. Tang, S.V. Gohil, C.T. Laurencin // *Advanced healthcare materials*. – 2015. – Vol. 4. – N 9. – P. 1268–1285.

230. Zhang, M. Recent developments in biomaterials for long-bone segmental defect reconstruction: A narrative overview / M. Zhang, J.P. Matinlinna, J.K.H. Tsoi,

W. Liu, X. Cui, W.W. Lu, H. Pan // *Journal of Orthopaedic Translation*. – 2020. – Vol. 22. – P. 26–33. – doi: 10.1016/j.jot.2019.09.005.

231. Zhang, L. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair / L. Zhang, G. Yang, B.N. Johnson, X. Jia // *Acta biomaterialia*. – 2019. – Vol. 84. – P. 16–33.

232. Zhu, Y. Catalpol promotes the osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells via the Wnt/ β -catenin pathway / Y. Zhu, Y. Wang, Y. Jia, J. Xu, Y. Chai // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2019. – Vol. 10. – N 1. – P. 1–14.

Приложение А

