

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**  
( Н И У « Б е л Г У » )

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА БИОЛОГИИ

**РОЛЬ СВОЙСТВ ПОВЕРХНОСТИ ТРЕХМЕРНЫХ МАТРИЦ ИЗ  
ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ НА ПРОЦЕССЫ ИНТЕГРАЦИИ И  
ПРОЛИФЕРАЦИИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТОК**

Выпускная квалификационная работа  
обучающегося по направлению подготовки 06.04.01 Биология  
очно-заочной формы обучения, группы 07001545  
Коршиковой Надежды Анатольевны

Научный руководитель  
к.б.н., доцент  
Наеждин С.В.

Рецензент  
научный сотрудник  
НИИ «Фармакологии живых  
систем», к.б.н.  
Колесниченко П.Д.

БЕЛГОРОД 2017

## Оглавление

Введение.....	3
Глава 1. Обзор литературы.....	5
1.1. Применение композитных материалов на основе фосфатов кальция для замещения костных дефектов.....	5
1.2. Методы и технологии исследования поверхности композитных материалов на основе фосфатов кальция.....	17
Глава 2. Материалы и методы исследования.....	31
Глава 3. Результаты исследования и их обсуждение.....	49
Выводы.....	58
Список использованной литературы.....	59

## Введение

Важнейшими задачами медицины являются увеличение продолжительности и улучшение качества жизни людей. В связи с этим предъявляются более высокие требования к качеству медицинского обслуживания и лечения пациентов, что требует разработки новых подходов к лечению больных, внедрения новых технологий и связанной с этим разработки новых материалов. Особую проблему представляет разработка новых материалов медицинского назначения, предназначенных для контакта со средой живого организма и необходимых для реконструктивной медицины. Еще более востребованы специализированные биосовместимые материалы сложной формы, полученные методами 3-х мерного прототипирования для нового направления – клеточной и тканевой инженерии, связанного с разработкой биоискусственных органов. Исследования в области материалов медицинского назначения выступают одним из актуальных направлений, соответствуют задачам и уровню развития науки, технологий и техники РФ и перечню критических технологий Российской Федерации, в котором приоритетным направлением является «Технологии создания биосовместимых материалов».

Серьезной проблемой современной восстановительной хирургии в травматологии и ортопедии, челюстно-лицевой хирургии и стоматологии является пластика дефектов костной ткани, образующихся при хирургическом лечении ряда заболеваний и повреждений кости. Результаты хирургического восстановления дефектов костной ткани в большей степени зависят от протекания процесса репаративного остеогенеза. Отдаленные сроки клинических исследований указывают на то, что репаративный остеогенез в посттравматических дефектах костной ткани проходит медленно – месяцы и годы, а в ряде случаев костные дефекты не заполняются костной тканью. Учитывая высокий травматизм и большое количество ортопедических манипуляций, разработка новых эффективных методов и материалов для реконструкции дефектов костных тканей, а также лекарственных средств для этого является

одной из важнейших проблем травматологии и ортопедии, челюстнолицевой хирургии и стоматологии. В настоящее время остро востребованными являются адекватные материалы для пластики больших костных дефектов, возникающих в результате хронических воспалений, после удаления кист, хондром, опухолей.

Цель исследования – изучение остеогенных свойств трехмерных матриц на основе фосфатов кальция в опытах *in vitro*.

Задачи:

- определить методы оценки топографии поверхности трехмерных матриц;
- оценить биосовместимость трехмерных матриц;
- установить влияние топографии поверхности трехмерных матриц на пролиферативную активность мезенхимальных стволовых клеток;
- определить характер взаимодействия и интеграции мезенхимальных стволовых клеток с поверхностью трехмерных матриц на основе фосфатов кальция.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Применение композитных материалов на основе фосфатов кальция для замещения костных дефектов

Разработка технологий создания индивидуальных имплантатов для замены поврежденных или отсутствующих фрагментов скелета человека и животных, а также тканеинженерных конструкций для направленной регенерации костных тканей является одной из актуальнейших междисциплинарных проблем современного биомедицинского материаловедения [40]. По своей структуре костная ткань является ярким примером высокопористой (50-90%) минерал/полимерной композитной системы.

Различные формы фосфатов кальция (в основном, гидроксиапатит – ГАП и трикальцийфосфаты - ТКФ) представляют собой ее минеральные компоненты (см. рис. 1). Они, в свою очередь, интегрированы в органический матрикс, состоящий, главным образом (~95%), из коллагена I типа, а также небольшого количества неколлагеновых и сывороточных белков, кислых гликопротеинов и малых протеогликанов [21]. ГАП в костной ткани формируется в виде пластинчатых кристаллитов, длина которых составляет 15–200 нм, ширина 10–80 нм и толщина варьируется от 2 до 7 нм [26].



Рис.1. Порошок фосфатов кальция (гидроксиапатит – ГАП)

Важнейшей проблемой разработки и создания синтетических материалов, предназначенных для замещения и регенерации костных тканей, является необходимость максимального приближения их химического и фазового состава к соответствующим характеристикам нативной костной ткани. Сегодня для ее решения применяются разнообразные материалы, включая керамику, натуральные и синтетические полимеры. В последнее время все больший удельный вес получают исследования по созданию биосовместимых матричных структур различной архитектуры на базе биорезорбируемых (постепенно растворяющихся в организме) минерал/полимерных композитов. В качестве минеральной компоненты таких композитов чаще всего используются различные формы фосфатов кальция, обладающие высоким остеокондуктивным потенциалом и регулируемой скоростью биодеградации [1], а в качестве полимеров – алифатические полиэфиры (полилактиды, полилактогликолиды, поли-ε-капролактоны и др.), нашедшие широкое применение в биомедицинских исследованиях и клинической практике [8]. При замещении дефекта или реконструкции костной ткани часто возникает необходимость создания индивидуальной имплантируемой конструкции заданной структуры и пористости с соблюдением необходимой точности ее геометрических размеров. Важную роль также может играть и оперативность изготовления имплантатов по индивидуальным томографическим (КТ или МРТ) данным конкретного пациента. Наиболее эффективно и успешно эта задача решается с помощью современных методов быстрого прототипирования [34]. Эта методология основана на программном разбиении трехмерной компьютерной модели требуемого изделия на поперечные сечения (слои) и последующего послойного изготовления этого изделия из выбранного материала. Преимущество быстрого прототипирования становится особенно очевидным при его использовании в сочетании с современными методами медицинской диагностики. Так, трехмерная модель органа или фрагмента ткани реального пациента может быть получена, например, на рентгеновском томографе, и затем

оперативно изготовлена ее точная копия или копия, пригодная для имплантации без дополнительной подгонки. В процессе изготовления образца в него можно дополнительно ввести или убрать определенные детали, создать требуемую архитектуру, в том числе и с градиентной пористостью.

Среди наиболее разработанных на сегодняшний день методов быстрого прототипирования, позволяющих использовать в качестве исходных материалов различные фосфаты кальция, следует, в первую очередь, выделить:

А. Селективное лазерное спекание (СЛС), базирующееся на послойном спекании порошковых материалов (металлы, керамика, полимеры) [51].

Б. Трехмерная печать, в процессе которой головка струйного принтера перемещается по заданной компьютером траектории над равномерно распределённым на плоскости порошком, нанося на него какое-либо адгезивное вещество, и послойно склеивая частички порошка вместе [25].

Эти методы позволяют получать индивидуальные имплантаты и матрицы для тканеинженерных конструкций с помощью систем автоматизированного проектирования/производства - САПР (в англоязычной литературе, CAD/CAM - Computer Assisted Design/Computer Assisted Manufacturing) с минимальными затратами времени, высокой воспроизводимостью, точной геометрией и заданной структурой пор (см. рис. 2).

Однако, несмотря на огромное количество научных публикаций и патентов по этой теме (более нескольких сотен только за последние пять лет), главным образом зарубежных, проблема выбора методов и параметров изготовления остеокондуктивных и остеоиндуктивных керамических градиентных материалов на основе фосфатов кальция в полной мере до сих пор остается не решенной. Наибольшим потенциалом для успешного решения этой задачи, на наш взгляд, обладают поверхностно-селективное лазерное спекание (ПСЛС), предложенное и разработанное в ФГБУН ИПЛИТ РАН и различные варианты трехмерной печати [14].

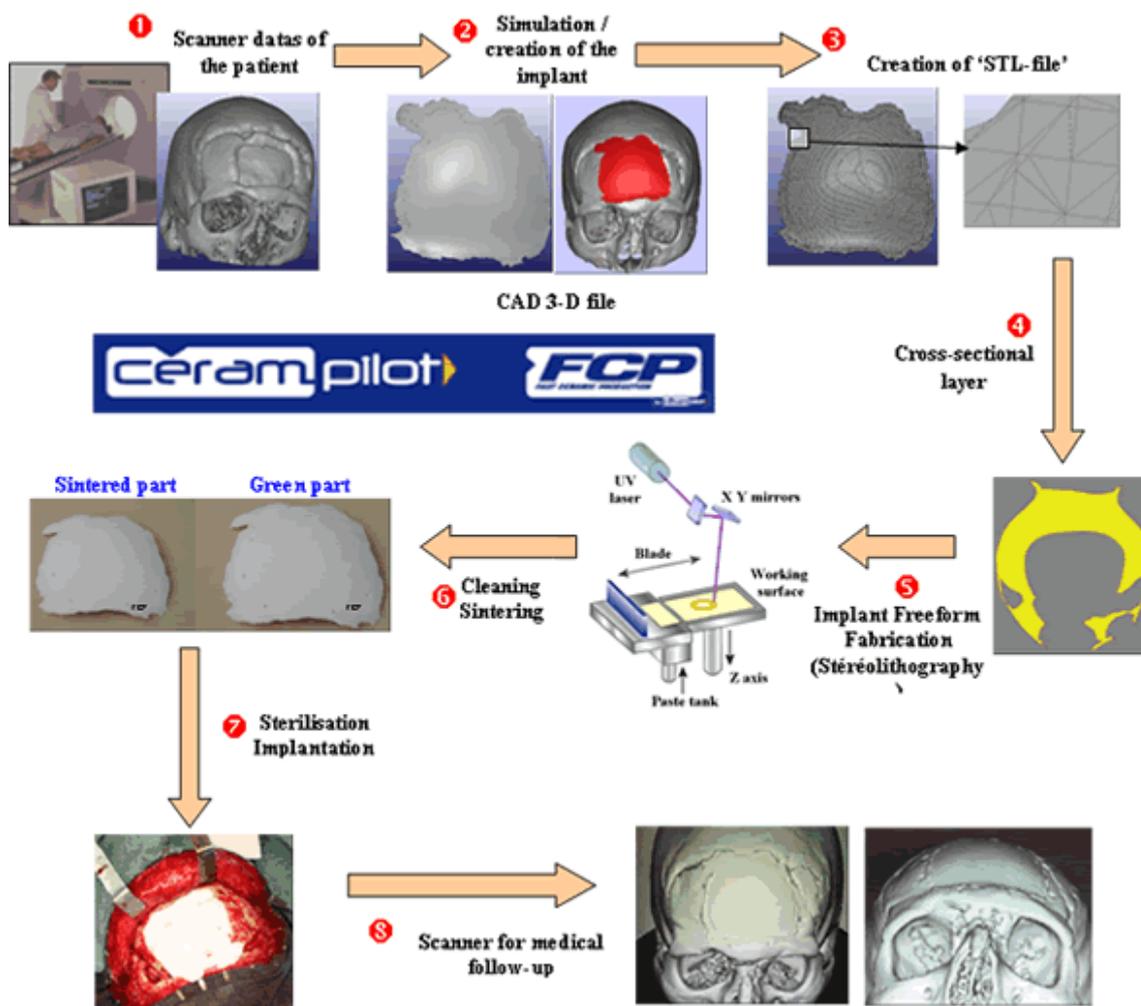


Рис. 2. Систем автоматизированного проектирования/производства для тканеинженерных конструкций

Применение имплантатов для устранения различных дефектов в стоматологии, челюстно-лицевой хирургии, является одним из перспективных направлений современного здравоохранения. В мире постоянно продолжается разработка новых материалов свойства, которых направлены на стимулирование репаративного остеогенеза. Успех восстановительного хирургического лечения с применением функциональных керамических и композиционных материалов во многом зависит от процессов регенерации костной ткани, степени развития воспалительных и иммунных реакций [4, 83].

По современным представлениям любой материал для изготовления имплантатов следует оценивать с учетом основных характеристик, к которым

относятся биоактивность, биосовместимость, биорезистентность [7, 68, 65, 63, 66]. Степень выраженности биоактивности в зависимости от физико-химических характеристик имплантируемого материала может, простирается в диапазоне от биорезистентности до цитотоксичности.

Согласно современным требованиям материал должен обладать хорошей биосовместимостью, минимизировать или исключать развитие вокруг себя соединительнотканной капсулы, а также поддерживать гистотипическую дифференцировку клеток хрящевой и костной ткани. Однако биоактивность и биосовместимость находятся в прямой зависимости от биорезистентности материала, в результате чего сроки послеоперационного восстановления могут меняться в широких пределах от одного месяца до нескольких лет. Анализ научной литературы показал, что существует ряд типов контактов «костная ткань – имплантат», зависящих от физико-химических характеристик имплантатов (см. рис. 3) [95, 85, 101, 90].

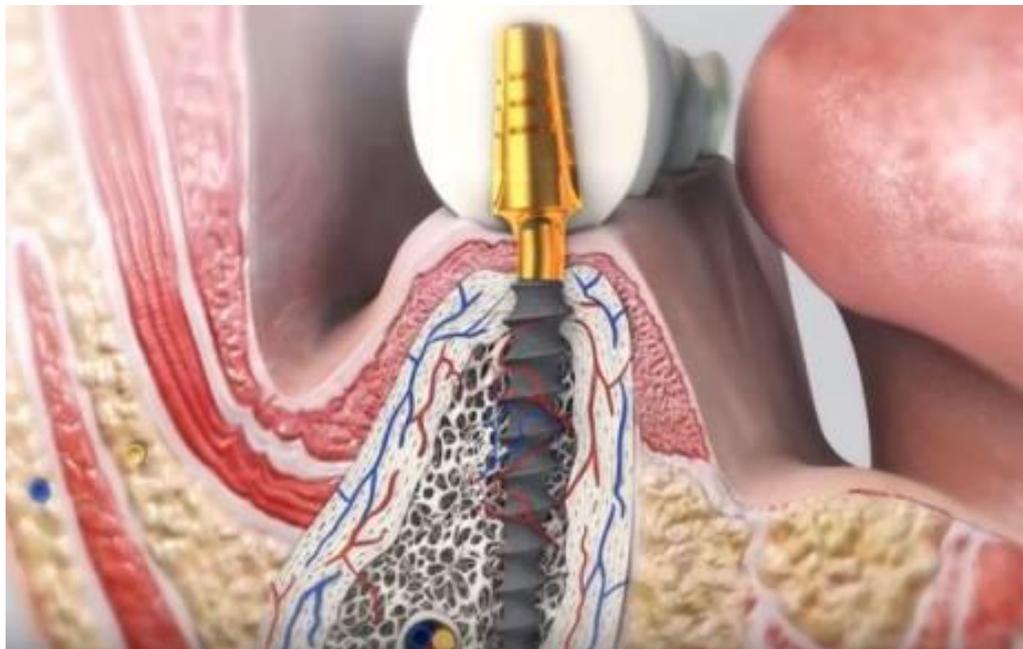


Рис. 3. Тип контакта – «костная ткань – имплантат»

Так имплантаты из сплавов стали, содержащие кобальт, хром, молибден и др., находясь *in vivo*, покрываются соединительнотканной капсулой,

что ведет к снижению жесткости конструкции, надежности её фиксации в организме. Титан, тантал, корундовая керамика непосредственно контактируют с костной тканью, и на границе не удается обнаружить ни признаков разрушения кости, ни интеграции с материалом. Биокерамикам на основе гидроксипатитов присуща химическая связь с костью. Показано проникновение ионов различных элементов из имплантатов в ткань, что обеспечивает надежную связь с костью с одной стороны и постепенное замещение костной тканью с другой. Титан с текстурированной поверхностью, напыленный минеральными фракциями кости, обладает физико-химическим контактом с костью. Проникновение кровеносных сосудов и трабекул вновь образованной костной ткани в структуру имплантата возможно, когда размеры его пор не меньше 120 мкм. Металлические имплантаты, используемые для внутреннего остеосинтеза, могут существенно замедлять ход репаративных процессов в костном органе не только благодаря своей химической природе, но и вследствие нарушения кровоснабжения в зоне перелома. При интрамедуллярном остеосинтезе разрушается не только богато кровоснабжаемый костный мозг, но и камбиальные элементы кости, что существенно тормозит процессы репаративного остеогенеза [5, 6, 93, 76, 71].

В настоящее время разработчики фиксирующих систем идут по пути ограничения контакта имплантата с элементами костного органа, несущего камбиальные элементы костной ткани и кровеносные сосуды. Проблема костных имплантатов далека от своего полного разрешения, имеет серьезные биоматериаловедческие аспекты, требует тесного сотрудничества травматологов, химиков-технологов, остеоморфологов, физиологов, специалистов в области клеточной биологии.

На сегодняшний день круг материалов, используемых в современной восстановительной хирургии, травматологии, челюстно-лицевой хирургии и стоматологии, весьма широк и включает материалы природного и искусственного происхождения, среди которых – металлы, керамики, синтетиче-

ские и естественные полимеры, различные композиты. По характеру отклика организма на имплантат все биоматериалы принято классифицировать следующим образом: токсичные (если окружающие ткани отмирают при контакте) – большинство металлов; биоинертные (нетоксичные, но биологически неактивные) - керамика на основе  $Al_2O_3$ ,  $ZrO_2$ ; биоактивные (нетоксичные, биологически активные, срастающиеся с костной тканью) - композиционные материалы типа биополимер/фосфат кальция, керамика на основе фосфатов кальция и биостекла.

Эффективность репаративного остеогенеза базируется на создании максимально благоприятных условий для реализации собственного остеогенного потенциала организма. Оптимизация остеорепарации в условиях использования биоматериалов обеспечивается в первую очередь их osteoconductive свойствами. Такие биоматериалы не только заполняют пространство утраченной костной ткани, но и интегрируются с окружающей костью, выполняя функцию подложки для проникновения сосудов, врастания материнской костной ткани и миграции остеогенных клеток-предшественников реципиента [15, 39].

Osteoconductive способность биоматериалов зависит от их физико-химических характеристик, биосовместимости, архитектоники поверхности, размера пор и объема пористости [10, 67]. Из всех биоматериалов лучшими osteoconductive свойствами обладают кальцийфосфатные керамики (КФК) благодаря присущим им уникальным свойствам – биоактивности и остеотропизму, обуславливающим специфические механизмы osteoconductive способности [11, 48]. Более высокой степенью сродства с костью обладают биокомпозитные материалы, содержащие основные компоненты ее минеральной и органической фаз – гидроксилапатита (ГА) и коллагена [12, 32, 64]. Значение топографии поверхности в проявлении материалами osteoconductive свойств подтверждается данными, полученными при использовании имплантатов со специально обработанной шероховатой поверхностью. Так, преобразование глад-

кой структуры поверхности имплантатов из титана, корунда, углерода, в грубошероховатую повышало их остеокондуктивные свойства, что отражалось на характере взаимосвязи между имплантатом и костью. Вокруг имплантатов с гладкой поверхностью образовывалась в различной степени выраженная фиброзная ткань, а с шероховатой – имело место формирование костной ткани [23].

Для выполнения возлагаемой на имплантат функции по созданию оптимальных условий репаративного остеогенеза, прежде всего, необходимо обеспечить его остеоинтеграцию. Этого можно достичь путем подбора биокomпозитных материалов с химическим составом и структурой, подобными минеральной кости. На поверхности таких материалов формируется гидроксилapatитовый слой, идентичный минеральному компоненту кости [9]. Повысить темпы формирования такого слоя можно путем использования материалов, содержащих нанокристаллический гидроксилapatит. Нанокристаллический гидроксилapatит, с одной стороны обладает значительной степенью сродства с минеральным компонентом кости, а с другой, более выраженной, по сравнению с натуральной костью, интенсивностью обмена ионов, поскольку зерна синтетического нанокристаллического гидроксилapatита остаются свободными, в то время как пластинчатые микрокристаллы костного апатита связаны между собой [57].

Главным условием формирования гидроксилapatитового слоя и, как следствие – остеоинтеграции биокomпозитного материала является способность к биодеградации. Именно в результате этого процесса освобождаются ионы, которые участвуют в образовании связующего активного слоя между имплантатом и минеральным компонентом костной ткани [27, 30, 72, 85]. Была установлена корреляция между степенью биодеградации биокomпозитного материала, с одной стороны и интенсивностью остеогенеза – с другой [17, 29]. На скорость и характер биодеградации биокomпозитных материалов оказывают влияние фазовое состояние и пористость образца. Кристалличе-

ские материалы, которые подвержены преимущественно химическому растворению, биodeградируют медленнее, чем аморфные. Последним присущи как химическая, так и клеточно-опосредованная биodeградация, проявляющиеся уже на ранних стадиях имплантации, еще до начала формирования костной ткани [20, 44, 57, 70]. Клеточно-опосредованная биodeградация связывается многими исследователями с остеокластами и макрофагами, которые адгезируют к поверхности биокomпозитного материала и запускают процессы резорбции [46, 54].

Важной функцией гидроксилapatитового слоя является способность адсорбировать из окружающей среды белковые компоненты, в частности – адгезивный белок фибронектин, что обуславливает адгезию клеток (рис. 4).

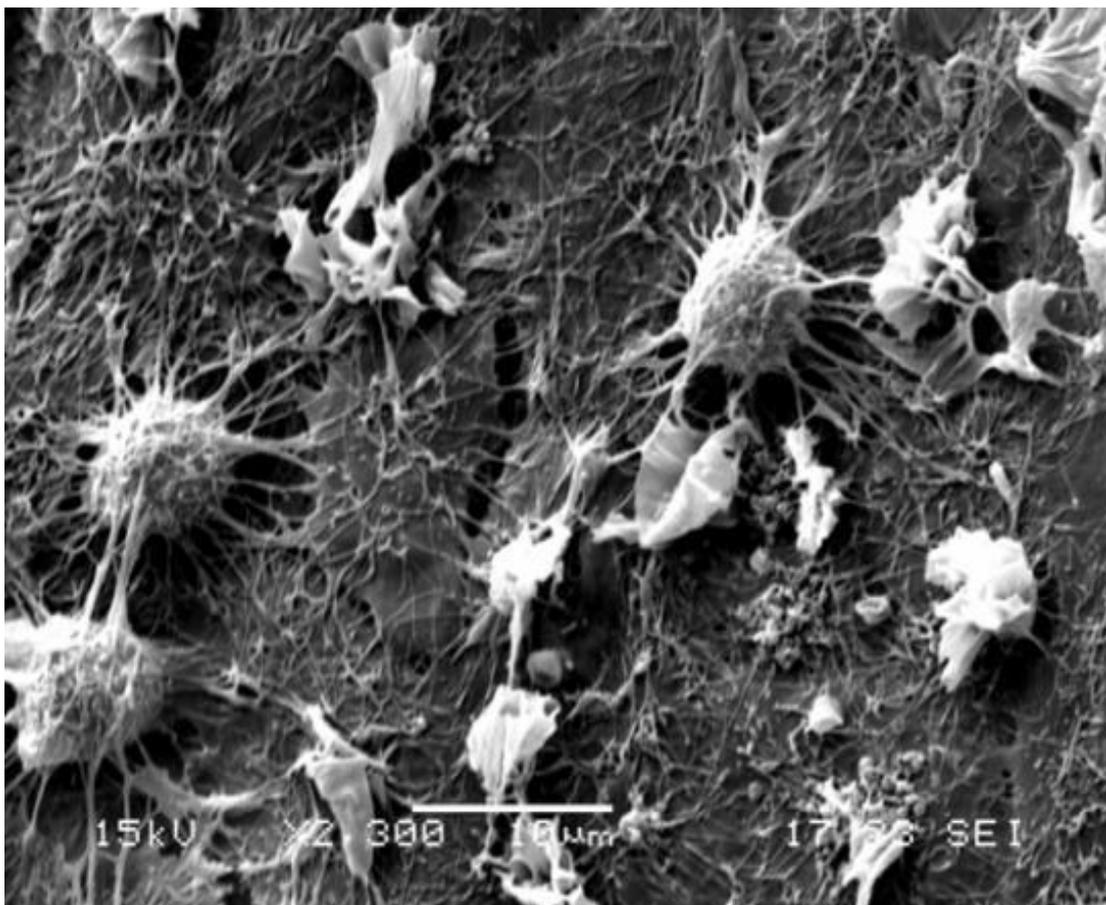


Рис. 4. Адгезия остеогенных клеток на поверхность имплантата.

Адгезия представляет собой неотъемлемый этап биологической фиксации имплантата, предшествующий процессам клеточной пролиферации и дифференциации [13, 37]. Адгезивные белки посредством аргинил-глицил-аспарагинового трипептида (RGD-пептид) связывают рецепторы клеточных мембран [33, 50]. Было установлено, что после нанесения таких белков на полимеры и сплавы металлов количество присоединившихся к ним клеток существенно возрастало. Более эффективной оказалась обработка металлов и полимеров непосредственно RGD-пептидом. Он инициировал рост числа зон связывания клеточных рецепторов, что сопровождалось выраженным увеличением количества адгезировавшихся клеток с повышением их биосинтетической активности [38, 43]. На интенсивность и прочность адгезии клеток влияют физико-химические свойства материала и топография его поверхности.

Эти характеристики определяют уровень поверхностной энергии материала, от которой зависит степень адсорбции белка из окружающей среды. На шероховатой поверхности экспрессия адгезивных белков внеклеточного матрикса и клеточных рецепторов, передающих сигнал клетке, равно как и адгезивных белков цитоплазмы, формирующих фокальные контакты, реализующие адгезию, значительно выше, чем на гладкой. Поэтому к шероховатой поверхности биоматериалов клетки присоединяются не только быстрее, но и в большем количестве [13, 62]. При этом остеогенные клетки реагируют не только на выраженность шероховатости, но и на ее топографию [37, 61, 60]. Более прочная адгезия снижает темпы пролиферации и дифференцировки клеток, а значит, костеобразование происходит при низкой их плотности. Формирующейся в этом случае костная ткань оказывается весьма ограниченной и не гарантирует стабильности имплантата. Напротив, при низком уровне адгезии имеет место выраженная пролиферация и медленная дифференциация, что сопровождается образованием незрелой костной ткани [41].

Оптимальные условия для репаративной регенерации больших костных дефектов могут обеспечить только пористые биоматериалы, так как общий объем пористости, размер пор и их топография влияют на остеокондуктивные свойства материала и, в конечном счете, на оптимизацию процесса остеогенеза. Поры не только способствуют миграции клеток и синтезу макромолекул матрикса, но и создают оптимальные транспортные пути, улучшая поступление необходимых питательных веществ и кислорода, усиливая репаративный остеогенез. Поэтому целесообразнее использовать материал со сквозными взаимосвязанными макро- и микропорами – порами, ориентированными вдоль основных линий нагружения кости. Биоматериалы с подобной структурой пористости имеют выраженные сорбционные качества [2,28]. Сорбционные механизмы также активны в мелкодисперсных и особенно нанокристаллических материалах. Например, титан приобретает способность связывать костный морфогенетический белок – 2 лишь после нанесения покрытия из нанокристаллического алмаза. В результате наблюдался существенный рост костеобразования [35]. Среди сорбируемых белков, повышающих способность биоматериалов оптимизировать репаративный остеогенез, важное значение принадлежит факторам роста и костным морфогенетическим белкам, являющимся истинными остеоиндукторами. В результате сорбции факторов роста и костных морфогенетических белков биокomпозитные материалы приобретают остеоиндуктивные свойства [33, 47].

В настоящее время применение биокomпозитных материалов, способных одновременно выполнять как заместительную функцию, так и функцию подложки-носителя клеток или остеогенных белков позволяет обеспечить ложе костного дефекта достаточным количеством необходимых источников остеогенеза [19, 33]. Такие подложки-носители обеспечивают временный каркас для трансплантированных клеток, которые могут быть заселены в них перед введением в дефекты, или клетки могут мигрировать внутрь подложки после ее имплантации. Подложки-носители могут использоваться также и

для транспорта биологических активных веществ – стимуляторов остеогенеза, что значительно повышает эффективность остеорепарации. Материал носителя, кроме соответствия общепринятым для имплантационных материалов стандартам, должен содействовать равномерному нагружению и прикреплению клеток, сохранять их жизнеспособность и регенераторный потенциал, не препятствовать диффузии газов и транспорту питательных веществ, способствовать пролиферации и дифференцировке клеток, а также синтезу внеклеточного матрикса [49, 55, 59].

Естественным субстратом прикрепления клеток являются биополимеры внеклеточного матрикса (коллаген, фибронектин, протеогликаны), которые часто входят в состав биокompозитного материала и используются в качестве подложки для выращивания клеток и их доставки в зону дефекта [50]. Наибольшее признание получил коллаген. Трехмерная структура коллагена определяет места прикрепления клеток, фиксирует их рецепторы, а также связывает находящиеся в окружающей среде факторы роста, способные индуцировать дифференцировку некоммутированных клеток в остеοидном направлении [50, 49, 24, 42]. Так, при имплантации в зону дефекта остеοгенных клеток-предшественников с коллагеновым гелем уже к 15 суткам отмечался выраженный интрамембранный остеοгенез. В процессе участвовали как трансплантированные клетки, так и клетки реципиента [3].

Наряду с коллагеном в качестве подложки и носителя клеток используют деминерализованный костный матрикс, различные типы гидроксилапатита и трикальцийфосфата, полимеры и их композиты. Так, заполнение дефекта бедренной кости у крыс бифазной кальций – фосфатной керамикой, нагруженной мезенхимальными стволовыми клетками, сопровождалось образованием значительно большего объема костной ткани, чем при использовании одной керамики [31, 16, 18, 52].

При имплантации в эктопическое и ортотопическое ложе цилиндров из пористого гидроксилапатита, с добавлением стромальных клеток костного

мозга, наблюдалось прямое образование костной ткани, как в поверхностных зонах керамики, так и в ее глубоких порах [10, 22, 36].

Доказано, что более эффективными носителями остеоиндукторов являются композитные материалы. Так, в эктопическом ложе диски из пористого гидроксилапатита и коллагена, насыщенные костным морфогенетическим белком, спустя 4 недели после имплантации были покрыты костной тканью. На дисках из гидроксилапатита, обработанных только коллагеном или одним костным морфогенетическим белком, не обнаружено ни костной, ни хрящевой соединительной ткани [53]. Высокая эффективность костного морфогенетического белка с биокompозитными материалами подтверждена как в ортотопическом, так и в эктопическом ложе. Причем повышение количества остеобластов и объема костеобразования оказалось весьма внушительным и достигало 10-12 раз [56]. Данные экспериментальных исследований и клинических наблюдений свидетельствуют, что имплантационные материалы в ложе костного дефекта не только восполняют недостающую ткань и фиксируют фрагменты кости. Они активно участвуют в регуляции репаративного остеогенеза как путем оптимизации условий для проявления эндогенного остеогенного потенциала организма, так и посредством его стимуляции, реализуемой за счет экзогенных источников.

## **1.2. Методы формирования трехмерных структур из фосфатов кальция для замещения костных дефектов**

Трехмерные биосовместимые матричные структуры на основе различных форм фосфатов кальция являются ключевыми элементами инженерии костной ткани. Матрица для тканевой инженерии должна удовлетворять разнообразным требованиям. Она должна быть не токсичной, пористой и обладать сложной иерархической внутренней структурой. Ее поверхность должна обеспечивать эффективное прикрепление клеток и способствовать

их полноценной дифференцировке в условиях *in vivo*. Также важной задачей при формировании таких матриц является обеспечение воспроизводимости их физико-химических, биохимических и механических свойств. Выполняемая НИР является междисциплинарным исследованием, направленным на разработку биоактивных керамических материалов на основе фосфатов кальция методами быстрого прототипирования с последующей характеристикой их топологии, структуры и морфологии методами оптической, сканирующей электронной (СЭМ) и атомно-силовой микроскопии (АСМ). В соответствии с техническим заданием (ТЗ) и календарным планом (КП), на первом этапе НИР был проведен анализ, имеющейся в открытом доступе, литературы по основным направлениям исследований. В частности, были изучены публикации в научных журналах и патенты, начиная с 2006 года и до настоящего времени, по биоматериалам на основе фосфатов кальция, по использованию технологий селективного лазерного спекания (СЛС) и трехмерной печати (ТМП) для формирования из них биосовместимых структур заданной архитектуры, а также по биохимическому и биологическому тестированию этих материалов.

Традиционные методы формирования трехмерных структур, основанные на использовании пресс-форм или сложной пост-обработки, имеют серьезные ограничения, как по возможностям воспроизводимого формирования требуемой внутренней структуры, так и по продолжительности времени их изготовления. Современные методы быстрого прототипирования практически свободны от указанных недостатков и позволяют получать, как пространственно градиентные, так и градиентные по составу структуры любой заданной формы, архитектуры и морфологии.

Технологии быстрого прототипирования (БП) – это технологии, базирующиеся на последних достижениях физики, химии, материаловедения, инженерных наук и информатики. Общие принципы БП включают в себя: создание трехмерного компьютерного образа требуемого материально-

го объекта; разделение этого образа на тонкие слои и, наконец, последовательное слой за слоем создание твердого 3-х мерного объекта требуемых размеров, формы и внутренней структуры с применением различных физико-химических методов. В обзоре [10] подробно рассмотрены основные технологии изготовления биосовместимых матричных элементов для тканевой инженерии. К ним относятся: выщелачивание солей, фазовое разделение, газовое вспенивание, методы плетения нитей. Также в нем рассмотрены принципиальные ограничения традиционных методов при их использовании в процессах в формировании тканеинженерных конструкций с требуемыми параметрами. В первую очередь, это невозможность точного воспроизведения внутренней структуры матриц, контроля размеров пор, их геометрии и связанности, необходимость использования токсичных компонентов (органические растворители) или высоких температур, продолжительность процессов производства индивидуальных изделий. Эти ограничения делают очевидным вывод о необходимости использования для прецизионного изготовления по CAD/CAM данным конкретных объектов керамических и/или композитных матричных структур методов быстрого прототипирования.

В работе [28] дан обзор исходных материалов для биосовместимых и биоактивных конструкций. В частности, рассмотрен класс гидрогелей (включая терморевверсивные), полимеры и биокерамика. Сегодня керамические материалы широко используются как для производства пресс-форм металлических имплантатов, так и для непосредственного изготовления из них индивидуальных имплантов. Они обладают высокой химической стабильностью и биоинертностью (окись алюминия и окись циркония), а также биоактивностью (например, гидроксиапатит). В работе подробно проанализированы преимущества и недостатки различных методов быстрого прототипирования, уже нашедших сегодня свое применение, как в тканевой инженерии, так и при проектировании и изготовлении различных

биомедицинских изделий. Среди методов быстрого прототипирования наиболее перспективными для решения задач тканевой инженерии были выделены: лазерная стереолитография, селективное лазерное спекание, укладка расплавленной полимерной нити и трехмерная струйная печать.

Трехмерная струйная печать керамических материалов рассматривается как наиболее перспективная технология для инженерии костных тканей и изготовления пресс-форм индивидуальных эндопротезов/имплантов. Одновременно с этим продемонстрирована эффективность создания тканеинженерных конструкций при использовании гидрогелей совместно с клеточными культурами в печатающих системах, работающих по принципу экструзии.

В работе [79] рассмотрены стратегические направления развития тканевой инженерии, связанные с клеточной биологией, биоактивными компонентами (пептиды, факторы роста и др.) и матричными структурами различной архитектуры и состава. Показано, что матриксы для тканеинженерных конструкций начинают играть все большую роль в достижении положительного конечного результата в процессах направленной регенерации разных типов тканей. Идеальная матричная структура должна удовлетворять многочисленным физико-химическим, биохимическим, биологическим и механическим требованиям, обладать оптимальной архитектурой и макро- и микроструктурой. Подходы к созданию оптимального матрикса практически в равной степени определяются как типом используемых материалов, так и методом его изготовления.

Наиболее перспективными и широко используемыми сегодня для формирования таких матриксов являются биорезорбируемые полимерные материалы. В основном, это синтетические полимеры гомологического ряда алифатических полиэфиров, такие как полилактиды (ПЛ), полигликолиды (ПГ) и их сополимеры полилактогликолиды (ПЛГ), поли-ε-капролактон (ПКЛ), а также биополимеры природного происхождения:

полисахариды (такие как крахмал, альгинаты, гиалуроновая кислота), хитозан, коллаген и желатин [94, 100, 82]. Широкое применение находят также и керамические материалы на основе гидроксиапатита (ГАП) и трикальций-фосфата (ТКФ). К числу недостатков биокерамических материалов обычно относят их высокую твердость и хрупкость, а также проблемы, связанные с получением из них высокопористых структур со сложными формами. Матрицы, сделанные из композитов керамики с различными полимерами, позволяют расширить диапазон достижимых механических свойств. Среди гибридных материалов наиболее успешно применяется композиты ПКЛ/ГАП [102], ПЛГ/ТКФ [92], ПКЛ/полиэтиленоксид [97] и хитозан/желатин [91].

Методы формирования матриц в [79] рассмотрены в том же контексте, что и в [10]. Среди тенденций дальнейшего развития названы новые потенциальные технологии -биопечать органов [96], лазерная печать клеток [100], биоэлектроспрей [74], микропечать гидрогелем [78] и струйная печать микрососудов [83]. Таким образом, современные технологии и их дальнейшее развитие дают высокую степень свободы в дизайне матричных конструкций с заданными параметрами (размер пор, их геометрия, ориентация, взаимосвязанность, и т.д.) для инженерии тканей практически любого типа. Размеры пор и их распределение по объему матрикса являются важными параметрами, во многом определяющими успех регенерации или ремоделирования костной ткани. Схематически костная ткань имеет плотный наружный кортикальный слой и губчатую центральную область, плотность которой варьируется в широких пределах. Соответственно и матрицы для инженерии костной ткани должны иметь сложную градиентную структуру.

Разработке алгоритмов формирования структур с изменяемой плотностью посвящено большое количество работ. В работе [97] был разработан биомиметический дизайн для формирования определенной пори-

стости матрицы для замещения и регенерация кости пациента по его компьютерной модели. Управление пористой структурой изделия, которое затем изготавливается методом быстрого прототипирования, необходимо также и для оптимизации его биомеханических свойств. Корреляционные модели, связывающие структуру пористости с прочностью костной ткани, и биокерамические материалы с известными характеристиками были использованы для оценки требований к размерам, геометрии и распределению пор в конкретных зонах формирования трехмерных конструкций. Новый метод дает возможность заполнения формируемого пространства, используя фрактальные кривые (рис. 5).

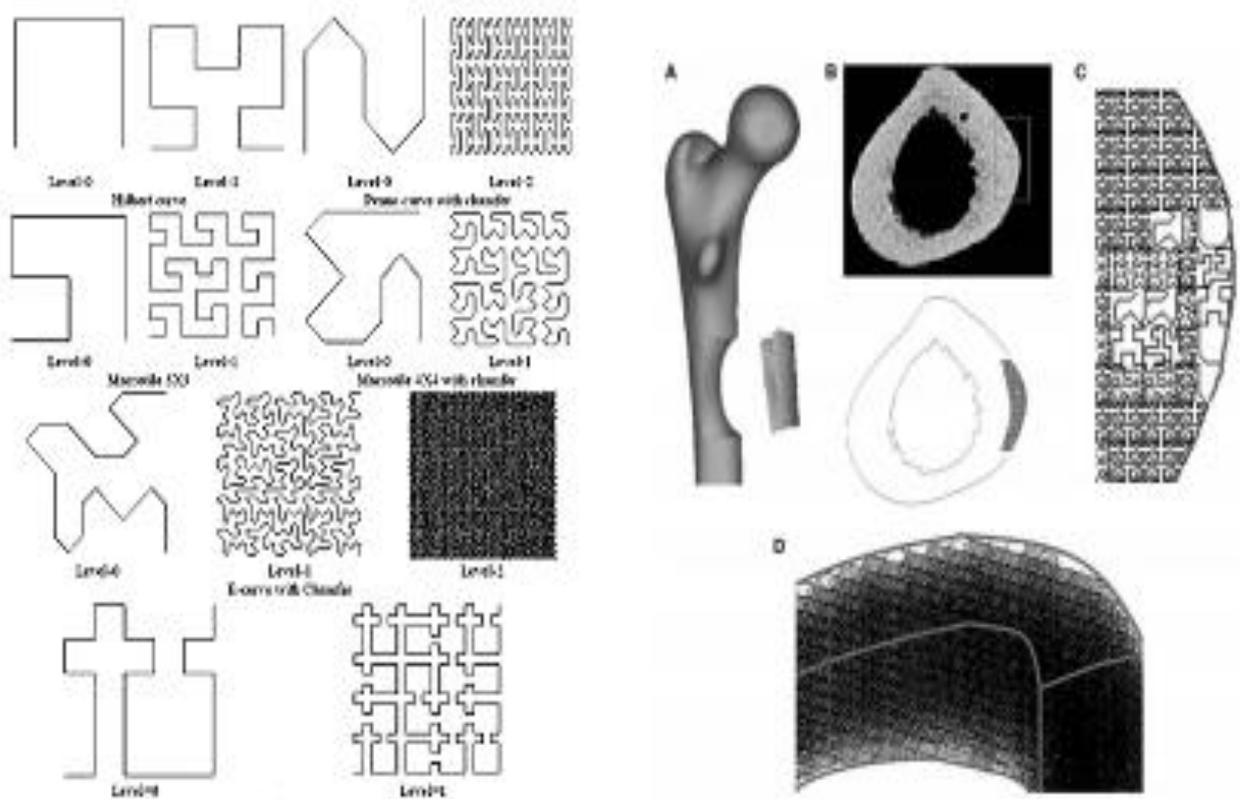


Рис. 5. Разработанные фрактальные кривые для заполнения объема с различной плотностью и пример заполнения слоя при формировании костной ткани

То есть, при изготовлении конкретной структуры используются ячейки, построенные с использованием одних и тех же уравнений, но с раз-

личным масштабom. Это устраняет трудности, связанные с процессом формирования объектов с системой связанных пор. В качестве иллюстрации развитой методологии было проведено исследование матрицы из гидроксиапатита сформированной для заполнения дефекта корковой части бедренной кости человека.

В работе [80] разработана библиотека архитектуры первичных ячеек, которые могут быть использованы согласно различным особенностям матриц, формируемых методом быстрого прототипирования для тканевой инженерии (рис. 6).

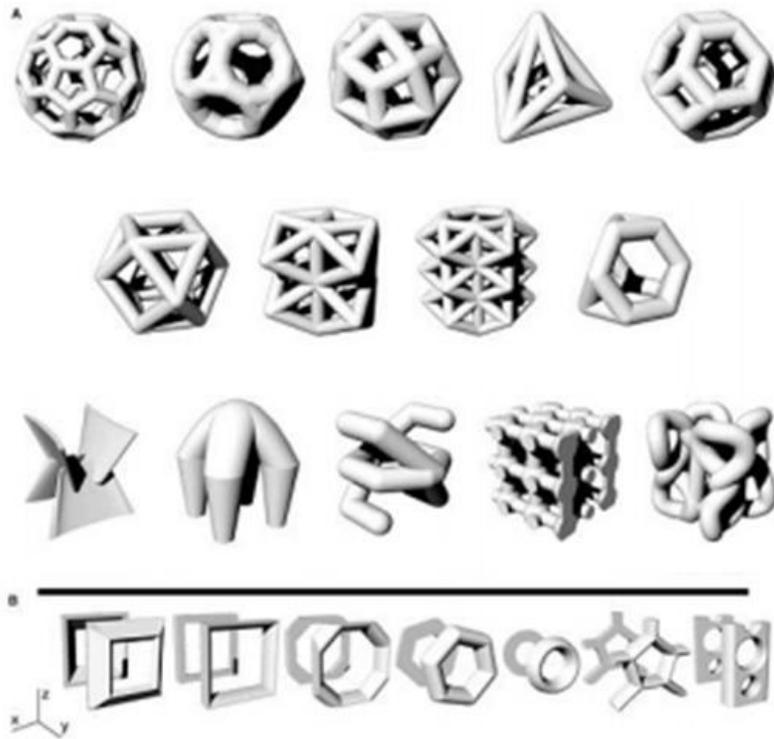


Рис. 6. Примеры первичных структурных блоков: А - ячейки, контактирующие в шести направлениях, В – первичные блоки для формирования ткани

В частности для механических характеристик кости, таких как зональная прочность, микроархитектурные уровни механического поверхностного напряжения, количество и ориентация пор, проницаемость и другие параметры могут быть очень важны как в каждом конкретном случае,

так и концептуально. При построении матрицы на базе первичной кубической ячейки можно было моделировать пористость, соответствующую пористости естественной кости.

Селективное лазерное спекание (СЛС) основано на послойном спекании порошковых материалов (металлы, керамика, полимеры) и обладает весьма широкими потенциальными возможностями, как варьирования параметров самого процесса спекания, так и контроля физико-химических и биологических свойств конечного изделия [89]. При сканировании лазерного излучения по поверхности, поглощающего это излучение порошка, происходит спекание его частиц по заданному контуру. По завершении процесса, поверх этого контура формируется новый порошковый слой, который «приваривается» к предыдущему. Не сплавленный порошок остаётся на своём месте и служит поддерживающим материалом. Этот процесс циклически повторяется до полного изготовления требуемой трехмерной структуры, после чего проводится удаление неиспользованного (не спекшегося) порошка из внутренних областей образца. Метод СЛС обладает высокой производительностью и достаточным для биомедицинских применений пространственным разрешением (0,1-0,2 мм). Однако до недавнего времени он использовался для изготовления структур и изделий только из термоустойчивых (как правило, биостабильных) материалов.

В последние годы СЛС стало использоваться для создания трехмерных биосовместимых структур на базе керамических и полимерных материалов. В работе [51] композитные матрицы из порошков 95/5 полилактогликолида (95% ПЛ/5% ПГ) и гидроксиапатита были получены методом селективного лазерного спекания. Варьировались параметры СЛС: мощность лазерного излучения, скорость сканирования и температура подогрева порошков и степень спекания оценивалась с помощью электронной микроскопии. Результаты эксперимента подтвердили, что спекание композитов на базе ПЛГ с гидроксиапатитом возможны вплоть до

40% весовых частей с минимальной тепловой деградацией, что позволяет формировать образцы с механическими свойствами, подобными трабекулярной кости. В работе [99] были разработаны композиты полиамида и гидроксиапатита для применения в имплантатах, подверженных не высоким механическим нагрузкам. Для прямого формирования минерал-полимерного композита было использовано селективное лазерное спекание. Исследовалось влияние различных параметров спекания на микро- и макроструктуру и физико-механические свойства композита. Было найдено, что толщины формируемых слоев являются наиболее существенным параметром, влияющим на эти характеристики. Также было показано, что одновременный контроль плотности мощности лазерного излучения и толщины слоя обеспечивает наилучшую воспроизводимость пористой структуры. Важным преимуществом метода СЛС является практическое отсутствие ограничений на номенклатуру используемых порошковых материалов. В тоже время есть методические ограничения, связанные с тем, что изначально все разработки, как правило, были ориентированы на использование самых экономичных и широко применяемых СО лазеров непрерывного действия, инфракрасное (длина волны 10,6 мкм) излучение которых поглощается полимерными частицами. Такой режим нагрева и спекания не может быть оптимальным для термолабильных биорезорбируемых полимеров, поскольку возможен сильный перегрев их объема с последующей деструкцией и образованием сшивок и токсичных компонентов. Предложенная и разрабатываемая на протяжении последних лет в ИПЛИТ РАН модифицированная версия селективного лазерного спекания, снимает эти ограничения [75, 69]. Позднее сотрудниками ИПЛИТ РАН был предложен и развит новый метод поверхностно селективного лазерного спекания (ПСЛС), в котором, в отличие от традиционного СЛС, основанного на объемном поглощении полимерным порошком излучения СО лазера, происходит сплавление его частиц за счет поглощения лазерного излучения ближнего ИК

диапазона ( $\lambda = 0,97$  мкм) небольшим ( $\leq 0,1$  вес, %) количеством микро-частиц углерода или золота, равномерно распределенных по поверхности полимера. ПСЛС позволяет избежать перегрева внутренних областей полимерных частиц за счет деликатного расплава только их поверхности. Данный метод был успешно применен для изготовления индивидуальных матриц из термически неустойчивых биорезорбируемых полимеров (таких как, полилактиды и их сополимеры) без сколь-нибудь видимых их структурных и химических изменений. Более того, этот подход дает возможность осуществлять спекание полимерных частиц, содержащих биоактивные энзимы (например, рибонуклеазу и каталазу), сохраняя при этом их высокую активность. Разработанные методы позволяют проводить оперативное изготовление как биостабильных, так и биорезорбируемых минерал-полимерных индивидуальных имплантатов и матриц для тканевой инженерии на основе CAD/CAM данных.

Трехмерная струйная печать. В процессе струйной печати головка струйного принтера ходит над распределённым на плоскости порошком определенной дисперсности и селективно наносит на него какое-либо адгезивное вещество «чернила», склеивая его частицы вместе (рис. 7).

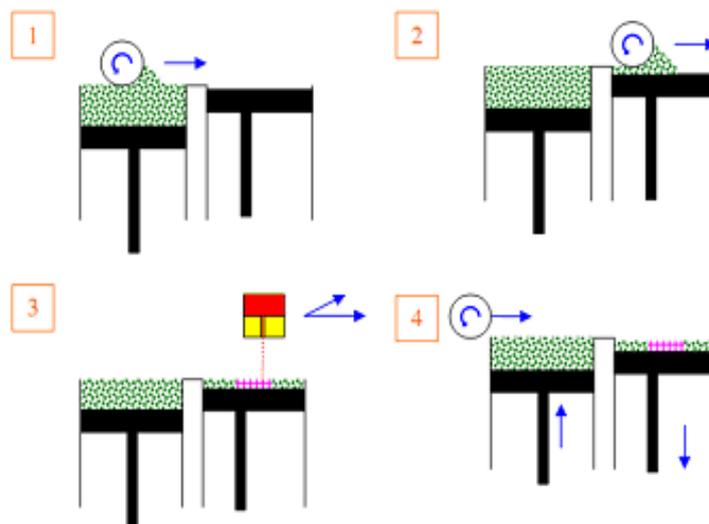


Рис. 7. Последовательность печати на порошковых материалах:

1–2 – формирование с помощью ролика тонкого (100-200 мкм) слоя

порошка, 3 – печать слоя связующей жидкостью по заданной компьютерной программе, 4 – опускание слоя порошка с напечатанным рисунком и нанесение следующего слоя

При этом окружающий порошок (на который не попали «чернила») становится поддерживающим материалом. Последующий слой наносится и разравнивается цилиндрическим валиком поверх предыдущего, причем новый порошок является уже частично связанным с предыдущим (нижележащим) слоем за счет его смачивания с нижней стороны. Повторение процедуры печати слой за слоем ведет к созданию первичной структуры необходимой модели. Затем, полученная структура извлекается и может быть подвергнута дополнительной обработке, например, высокотемпературным спеканием [81].

В отличие от традиционных методов (упомянутых выше), технологии быстрого прототипирования позволяют получать воспроизводимым образом матричные конструкции практически любой формы и сложности (рис. 8).

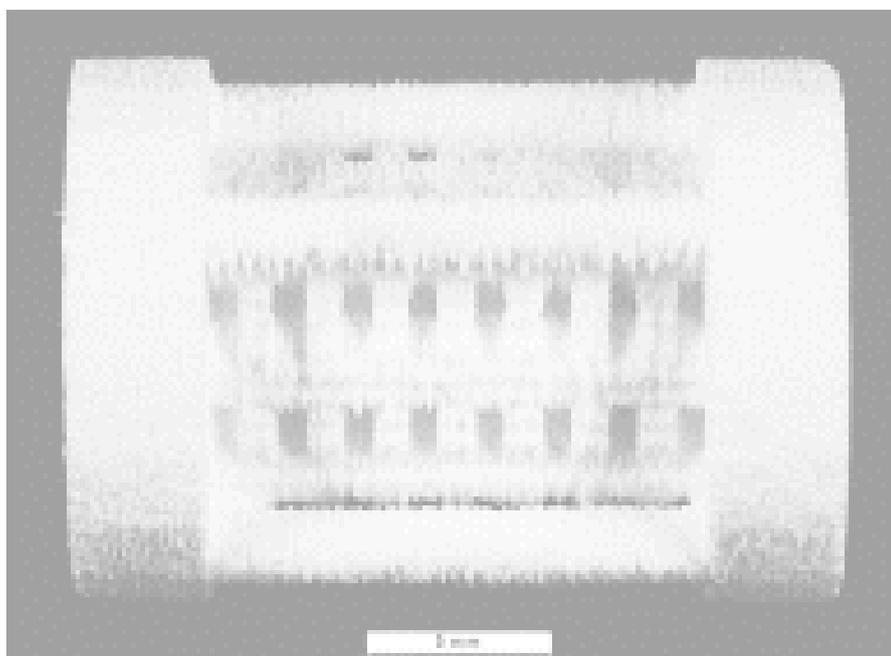
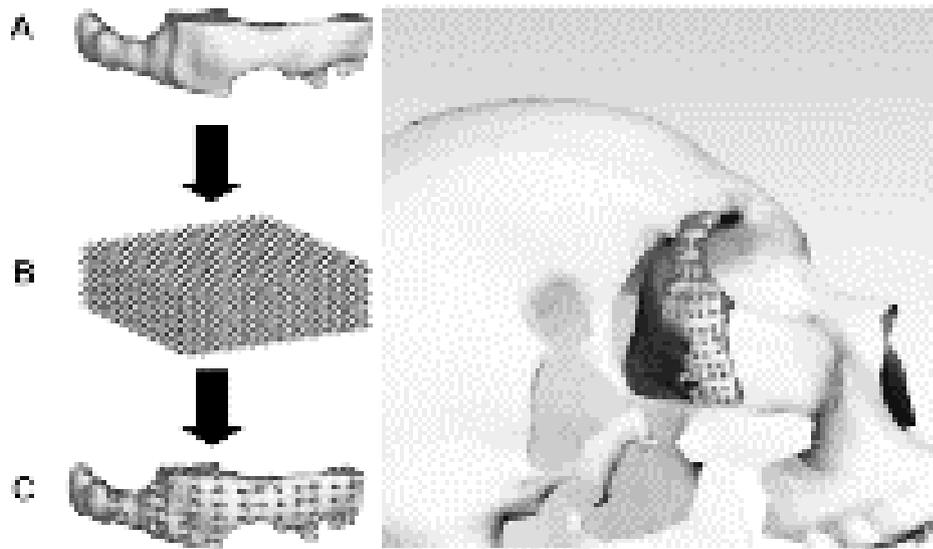


Рис. 8. Биосовместимая матрица, сформированная методом трехмерной печати из трикальций фосфата

## Что происходит с нумерацией рисунков?



**Рис. 5. Последовательность изготовления фрагмента черепа по виртуальной модели, и планирование операции по имплантации на модели черепа**

Однако при использовании методов быстрого 3х-мерного прототипирования для тканевой инженерии в каждом конкретном случае необходима разработка оптимальных схем и методик формирования матриц. В обзоре [81] рассмотрено текущее состояние дел в области использования трехмерной печати объемных матриц для инженерии костных тканей. Определены как механические, так и структурные требования для этих матриц. Показаны очевидные (в первую очередь с точки зрения коммерциализации этих технологий) достоинства и перспективы трехмерной печати в сравнении с другими методами быстрого прототипирования. Рассмотрены существующие принципы выбора исходных материалов и методов контроля процессов формирования трехмерных структур. Оценены возможности и проанализированы факторы, ограничивающие области применения технологий, и предложены потенциальные стратегии их устранения. В работе [87] технология трехмерной печати была выбрана для непо-

средственного (без пресс-формы) изготовления имплантатов из ТКФ для замещения дефектов костной ткани (рис. 6).

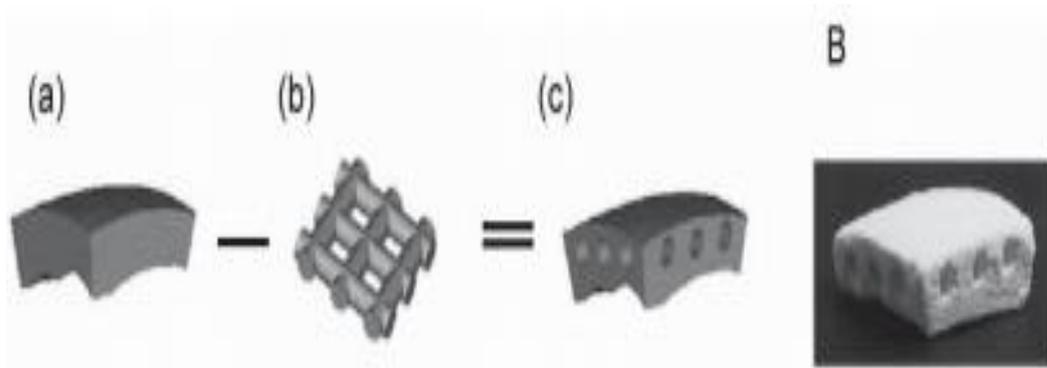


Рис. 6. Изготовление биоактивного матрикса (15×15 мм) на основе фосфата кальция для инженерии костной ткани

**Глава не может заканчиваться рисунком, где выводы?**

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследовании использованы трехмерные конструкции в виде цилиндров из фосфатов кальция полученные разным технологическим способом с последующей высокотемпературной обработкой (Центр наноструктурных материалов и технологий НИУ «БелГУ»):

1. Методом поверхностно-селективного лазерного спекания – 6 штук (см. рис. 7).

2. Методом трехмерной печати – 6 штук (см. рис. 8).



Рис. 7. Образец композиционного материала из фосфатов кальция полученный методом поверхностно-селективного лазерного спекания, с высокотемпературным отжигом



Рис. 8. Образец композиционного материала из фосфатов кальция полученный методом трехмерной печати, с высокотемпературным отжигом

Изучение остеогенных свойств трехмерных матриц на основе фосфатов кальция были проведены в опытах *in vitro* с использованием мезенхимальных стволовых клеток (МСК), выделенных из красного костного мозга большеберцовой кости крысы. Получали первичную культуру МСК общепринятым способом по стандартным протоколам.

После 4 пассажа культуру МСК снимали со дна флакона при помощи смеси трипсина-ЭДТА 0,25% (ПанЭко, Россия), отмывали питательной средой и вносили в лунки 24х луночного планшета в количестве 20 тыс. клеток на 1 мл питательной среды, помещая в опытных пробах суспензию клеток на трехмерные матрицы (рис. 9).



Рис. 9. Культура МСК (контрольная проба)

Культивирование МСК проводили в 24 луночных планшетах с питательной средой для индукции остеогенной дифференцировки (6 контрольных проб) в присутствии 5% CO<sub>2</sub> при температуре 37 C<sup>0</sup>. В пробах, где находился композитный материал (6 проб с материалом полученным методом поверхностно-селективного лазерного спекания и 6 проб с материалом полученным методом трехмерной печати), в питательной среде отсутствовал β- глицерофосфат натрия (остеоиндуктор).

Клетки культивировали в течение двух недель. Рост клеточной культуры контролировали при помощи инвертированного оптического микроскопа Eclipse Ti-S фирмы Nikon (рис. 10).



Рис. 10. Инвертированный оптический микроскоп Eclipse Ti-S  
фирмы Nikon

Затем клетки фиксировали фиксировали 2,5% раствором глутарового альдегида и исследовали методами световой, атомно-силовой микроскопии (АСМ) и растровой электронной микроскопии (РЭМ) с применением приставки рентгеноспектрального микроанализа (Центр коллективного пользования НИУ «БелГУ»).

Для растровой электронной микроскопии (РЭМ) образцы – трехмерные матрицы с МСК наклеивали на держатель образцов при помощи электропроводящего скотча и исследовали в режиме низкого вакуума при помощи микроскопа Quanta 200 3D фирмы FEI (рис. 11).



Рис. 11. Растровый электронный микроскоп Quanta 200 3D фирмы FEI

Краткий ход работы. Включаем пульт управления системой, запускаем системные блоки и мониторы. После загрузки среды Windows на рабочем столе находим пиктограмму «xT microscope Server Software» -запуск сервера. Нажимаем на открывшемся окне кнопку «Start», начинается тестирование и запуск системы. Система загружена правильно если все кнопки в окне «xT microscope Server Software» становятся зеленого цвета, сворачивают окно.

Автоматически открывается главное окно управления «xT microscope Control». В этом окне имеются все необходимые кнопки, закладки режимов с параметрами системы для проведения работ на РЭМ (см. рис. 12).

Первичные этапы подготовки РЭМ к работе в режиме низкого вакуума:

- открыть дверь вакуумной камеры;
- установить в слот «GSED» детектор (для работы в режиме низкого вакуума);
- надеть на кольцевой выступом ««Liner» диафрагму для работы в режиме низкого вакуума «Low vacuum»;
- установить на предметный столик образец;
- закрыть дверь вакуумной камеры;

- нажать на кнопку «Pump» откачка воздуха на панели настроек параметров главного окна «xT microscope Control».

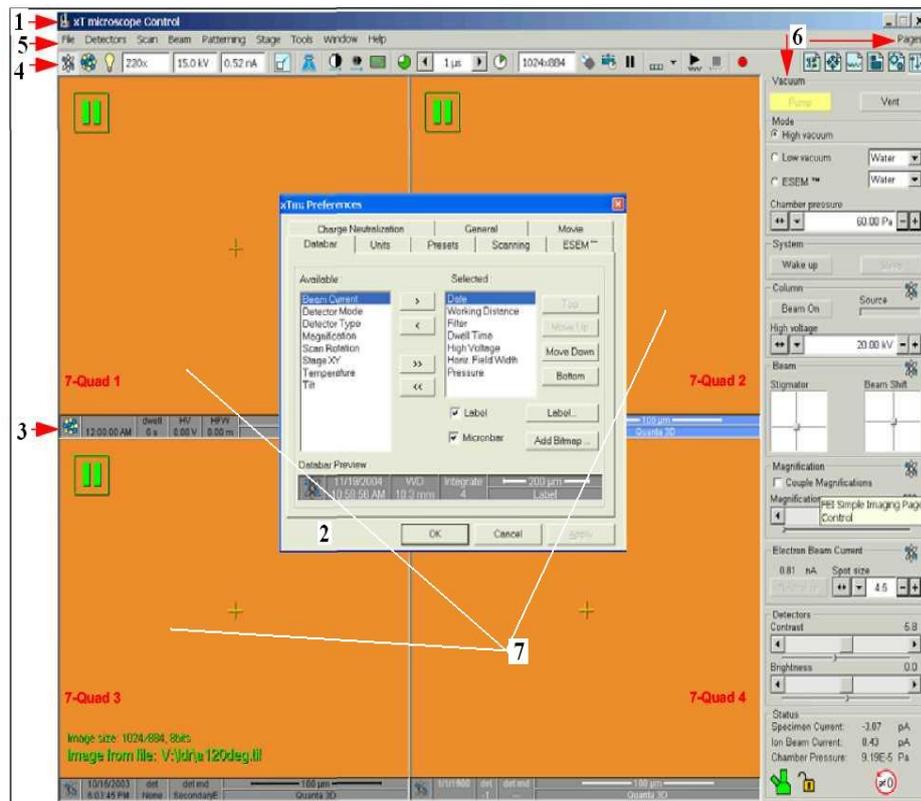


Рис. 12. Окно управления «xT microscope Control» системой:

1 – панель названия окна; 2 – окно предварительной установки эксплуатационных условий; 3 – панель информации данных, которая будет сохранена вместе с полученным изображением; 4 – панель инструментов; 5 – панель меню; 6 – страницы закладок режимов; 7 – окна – квадраты для изображений

Далее наблюдаем за процессом откачки/подачи воздуха (пиктограмма из зеленого цвета станет темно-желтой) в электронной колонне, ионной колонне, камере будет вакуум. После операции откачки воздуха выбирают на панели управления лучом режим работы – низкий вакуум «Low vacuum», устанавливая в окне прокрутки давление в камере (рис. 13).

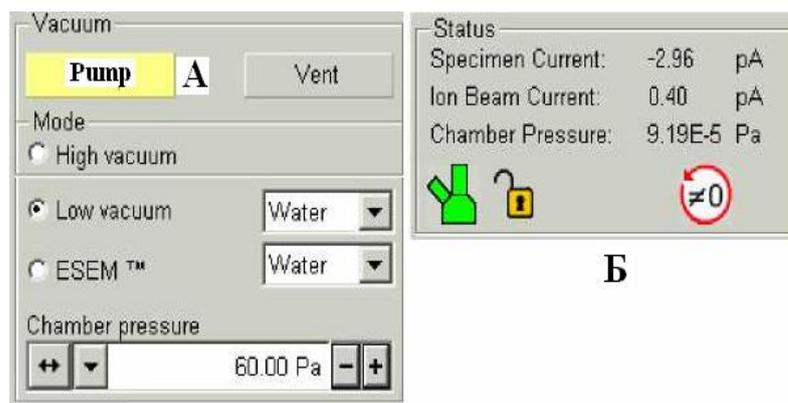


Рис. 13. Кнопка «Pump» (А) и нижняя часть панели настроек микроскопа (Б)

На этой же панели находят клавишу «Beam On» и включают электронный пучок контролируя процесс по заполнению окна «Source» зеленым цветом, устанавливают в окне прокрутки необходимое ускоряющее напряжение.

В открытом главном окне «xT microscope Control» выбирают правое верхнее окно, отжимают кнопку пауза на панели инструментов и получают изображение вакуумной камеры внутри. Если это необходимо корректируют положение предметного столика с образцом, устанавливают расстояние от образца до места насадки диафрагмы – втулки «Liner» 8 мм и нажимают кнопку привязки системы по высоте на панели инструментов (рис. 14).

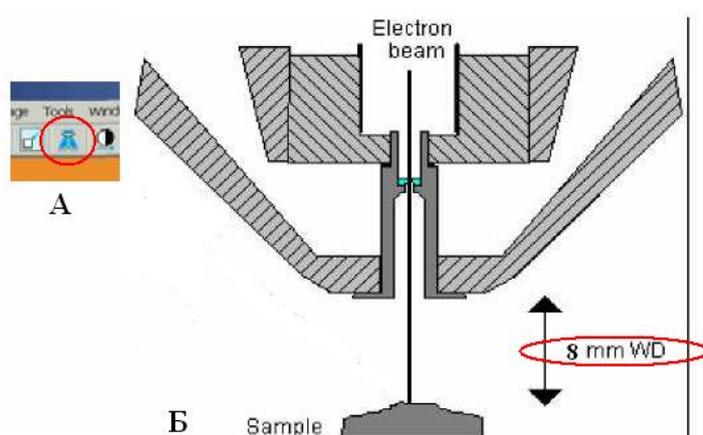


Рис. 14. Корректировка положения образца: А – кнопка привязки системы по высоте на панели инструментов главного окна «xT microscope Control»; Б – регулировка расстояния между образцом и кольцевым выступом «Liner»

Затем нажимают снова кнопку пауза и переходят на левое верхнее окно, отжав там, кнопку пауза настраиваем изображение. Для этого необходимо двигать мышь в горизонтальном направлении удерживая нажатой правую кнопку мыши. Если на изображении плохо видны края, то производим коррекцию настроек при помощи компенсатора «Stigmator», перемещая, ползунков окна «Stigmator» в различных направлениях. Можно провести корректировку при помощи настроек панели «Detectors» контраст «Contrast» и яркость «Brightness». Когда изображение надлежащего качества получено, производят его документирование нажать клавишу F2 и сохраняют полученное изображение.

Для проведения рентгеноспектрального микроанализа необходимо активировать систему микроанализа EDAX интегрированную с РЭМ и перейти в режим работы из «Low vacuum» (низкий вакуум) в режим «High vacuum» (высокий вакуум).

Рентгеноспектральный (электронно-зондовый) микроанализ проводят при ускоряющем напряжении электронов 25 кВ, токе электронов зонда 5 нА и времени накопления импульсов рентгеновского излучения 40 с.

Все начальные этапы работы выполняют согласно выше перечисленным действиям. После получения изображений поверхности, а режиме высокого вакуума начинают осуществлять настройки для проведения рентгеноспектрального микроанализа.

В открытом главном окне «xT microscope Control» выбирают правое верхнее окно, отжимают кнопку пауза на панели инструментов и получают изображение вакуумной камеры внутри. Если это необходимо корректируют положение предметного столика с образцом, устанавливают расстояние от образца до места насадки диафрагмы – втулки «Liner» 15 мм и нажимают кнопку привязки системы по высоте на панели инструментов.

Затем нажимают снова кнопку пауза и переходят на левое верхнее окно, отжав там, кнопку пауза наблюдают изображение – препарата. Получив

изображение, включают режим сканирования с высокой скоростью для, этого увеличивают значения окна прокрутки «Dwell Time» до максимальных значений. После этого открыв закладку «Scan» на главной панели инструментов выбирают место «Spot» и ставят точку сбора спектра на изображении препарата. Останавливают работу камеры регистрирующей изображение препарата, нажав кнопку «пауза», на панели инструментов главного окна «xT microscope Control».

Для проведения рентгеновского микроанализа на втором мониторе системы находят пиктограмму программы «EDS Genesis» в главном окне и запускают. В открывшемся окне «Genesis Spectrum» выбирают закладку «Setup» → «UMS control» → ввести EDS детектор (рис. 15).

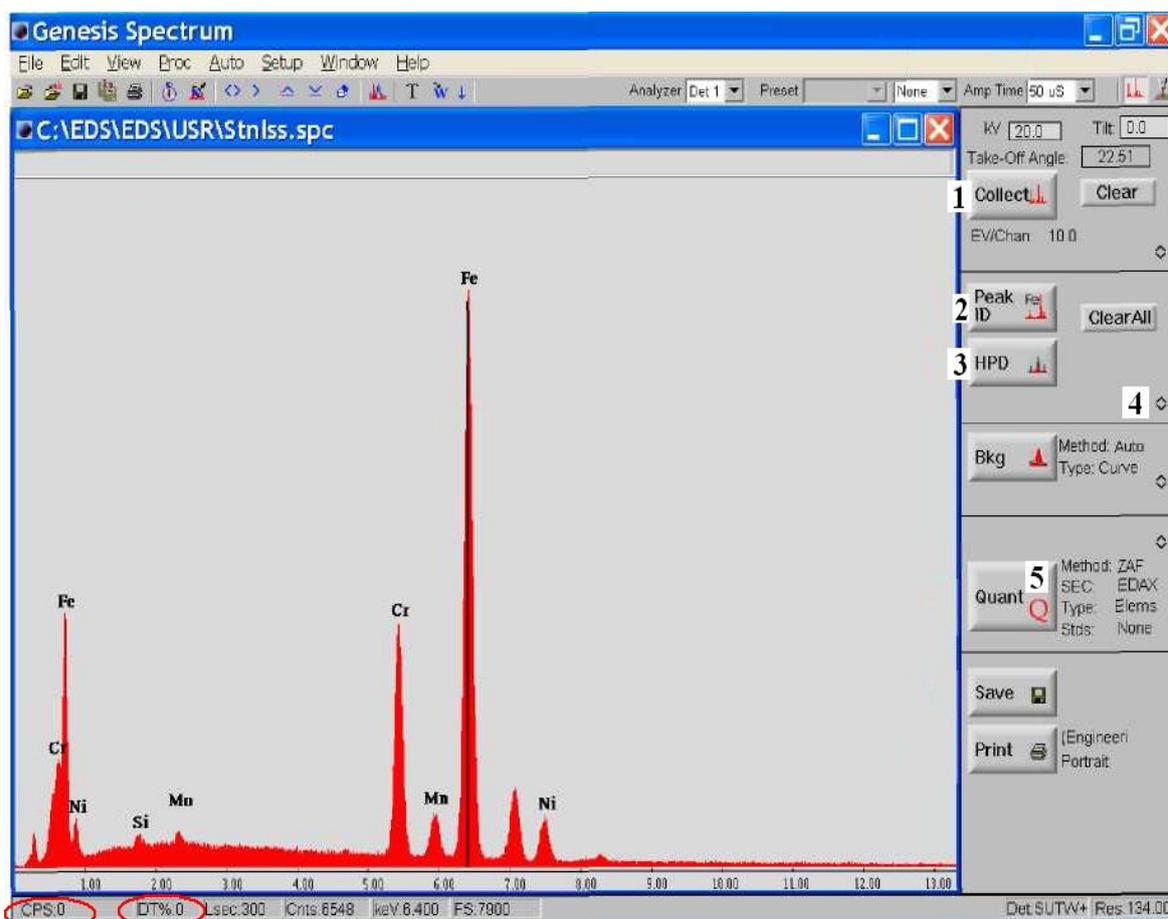


Рис. 15. Главная панель управления «EDS Genesis»:

- 1 – кнопка собрать спектр; 2 - кнопка идентификации элементов;
- 3 – кнопка обрисовать спектр; 4 – закладка выбор элемента;

## 5 – кнопка химический анализ

В строке текущего состояния настраивают следующие параметры: «CPS» число импульсов в секунду (от 2000 до 5000) используя окно прокрутки «Spot size» – размер пучка; «DT» – время задержки EDS детектора в пределах от 20 до 40% регулировкой времени (микро секунды) усиления детектора в окне прокрутки «Amp Time».

Для запуска процесса микроанализа нажимают кнопку «Collect» – собрать спектр в намеченной ранее точке. После того как в окне появились спектральные пики элементов проводят их идентификацию «Peak», если возникают трудности с сопоставлением спектров то осуществляют обрисовку спектров – кнопка «HPD» и выбор элементного состава из списка элементов. Если идентификация прошла успешно, проводят химический анализ. Возле кнопки «Quant» курсор мыши подводят к надписи тип «Type» и выбирают элементы «Elements» или оксиды «Oxides», после чего нажимают на кнопку «Quant».

В итоге определяют весовое содержание (WT,%) и молярное содержание (Mol, %) элемента в исследуемом образце. Строят графики, на которых показано весовое и молярное содержания элементов.

После того как образцы – трехмерные матрицы были исследованы при помощи РЭМ их аккуратно снимают и прикрепляют при помощи двухстороннего скотча на предметное стекла и перемешают на рабочий столик сканирующего зондового микроскопа Nanoeducator фирмы НТ-МДТ (см. рис. 16). Установленный при помощи РЭМ сложный рельеф поверхности трехмерных матриц не позволил использовать стандартные кантилеверы в виде чипа, которые применяются на АСМ модификации NTEGRA, фирмы НТ-МДТ (см. рис. 17) сканирование поверхности трехмерной матрицы было проведено при помощи вольфрамового зонда в виде иглы при радиусе конца зонда 200 нм (см. рис. 18). Сканирование проводят на воздухе в «полуконтактном» режиме.



Рис. 16. Сканирующий зондовый микроскоп Nanoeducator фирмы НТ-МДТ

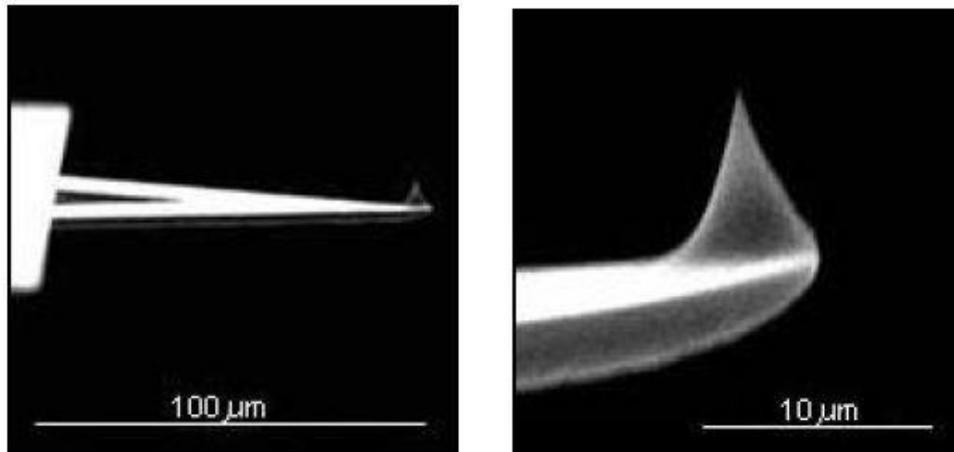


Рис. 17. Кантилевер в виде чипа (слева балка, справа зонд)

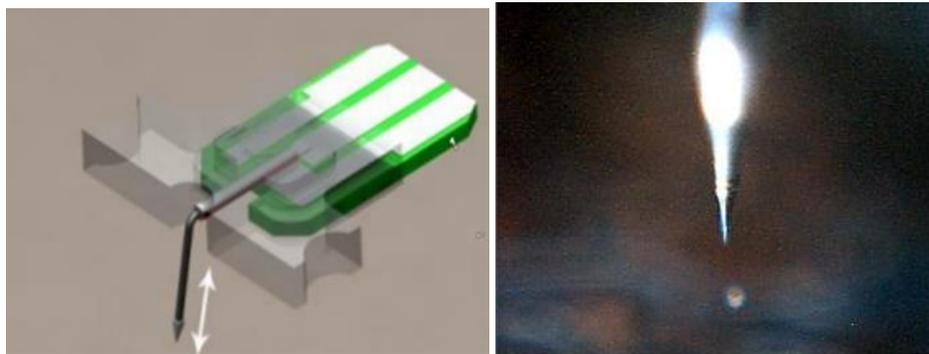


Рис. 18. Чип с вольфрамовой иглой - зонд (слева),  
Конец вольфрамовой иглы - зонда (справа)

После загрузки программы NanoEducator на экране компьютера появляется главное окно программы. Работу следует начать с пункта меню «File» и в нем выбрать команды «Open» или «New».

Выбор команды «File → New» для перехода к проведению сканирующей зондовой микроскопии, а выбор команды «File → Open» для перехода к просмотру и обработке ранее полученных данных. Программа позволяет осуществлять просмотр и обработку данных параллельно с измерениями.

После выполнения команды File→New на экране появляется окно диалога, которое позволяет выбрать или создать рабочий каталог, в который по умолчанию будут записываться результаты текущего измерения. По умолчанию в этом каталоге создается файл данных текущего измерения с именем ScanData.spm. Если данные последнего проведенного измерения не сохранены, то перед началом нового измерения файл ScanData.spm можно переименовать любым доступным способом. После закрытия окна диалога на экран выводится панель управления прибором (рис. 19).



Рис. 19. Панель управления прибором

В левой части панели управления прибором расположены кнопки выбора конфигурации СЗМ выбираем ( F ) сканирующий силовой микроскоп (ССМ).

Проведение измерений на учебном СЗМ NanoEducator заключается в выполнении следующих операций:

1. Установка образца. Перед установкой образца необходимо снять датчик с зондом, чтобы не повредить зонд.

2. Установка зондового датчика. Устанавливать датчик с зондом следует всегда после установки образца! Эту операцию рекомендуется выполнять при верхнем положении держателя датчика. Датчик переводится в верхнее положение поворотом винта ручного подвода 1 по часовой стрелке.

Выбрав нужный зондовый датчик (держите датчик за металлические кромки основания), ослабляют винт фиксации зондового датчика на крышке измерительной головки, вставляют датчик в гнездо держателя до упора, закручивают винт фиксации по часовой стрелке до легкого упора (рис. 20).

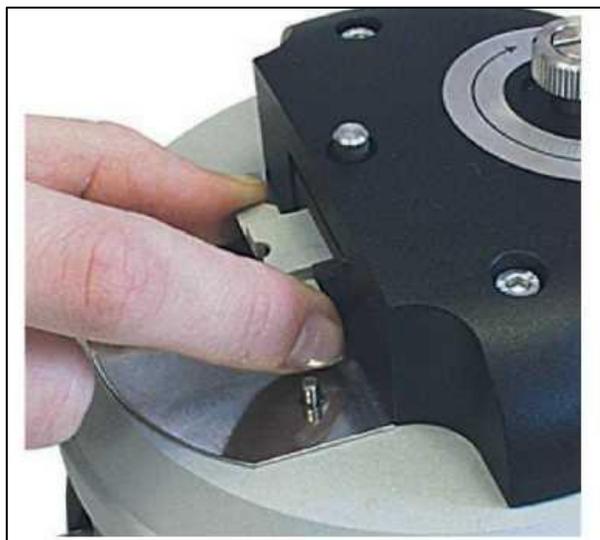


Рис. 20. Установка зондового датчика

3. Выбор места сканирования. При выборе на образце участка для исследования используют винты перемещения двухкоординатного столика, расположенного в нижней части прибора.

4. Предварительный подвод зонда к образцу. Операция предварительного подвода не является обязательной для каждого измерения, необходимость ее выполнения зависит от величины расстояния между образцом и острием зонда. Операцию предварительного сближения желательно производить, если расстояние между кончиком зонда и поверхностью образца пре-

вышает 0,5-1 мм. При использовании автоматизированного подвода зонда к образцу с большого расстояния между ними процесс подвода займет очень много времени.

Используя винт ручного подвода для опускания зонда, контролируют расстояние между ним и поверхностью образца визуально.

5. Построение резонансной кривой и установка рабочей частоты. Эта операция обязательно выполняется в начале каждого измерения и пока она не произведена, переход к дальнейшим этапам измерений заблокирован. В процессе измерений иногда возникают ситуации, требующие повторного выполнения этой операции (например, при потере контакта).

Окно поиска резонанса вызывается командой «ADJUST» → «RESONANCE». Выполнение этой операции предусматривает измерение амплитуды колебаний зонда при изменении частоты вынужденных колебаний, задаваемых генератором. Для этого нажимают кнопку «START» (рис. 21).

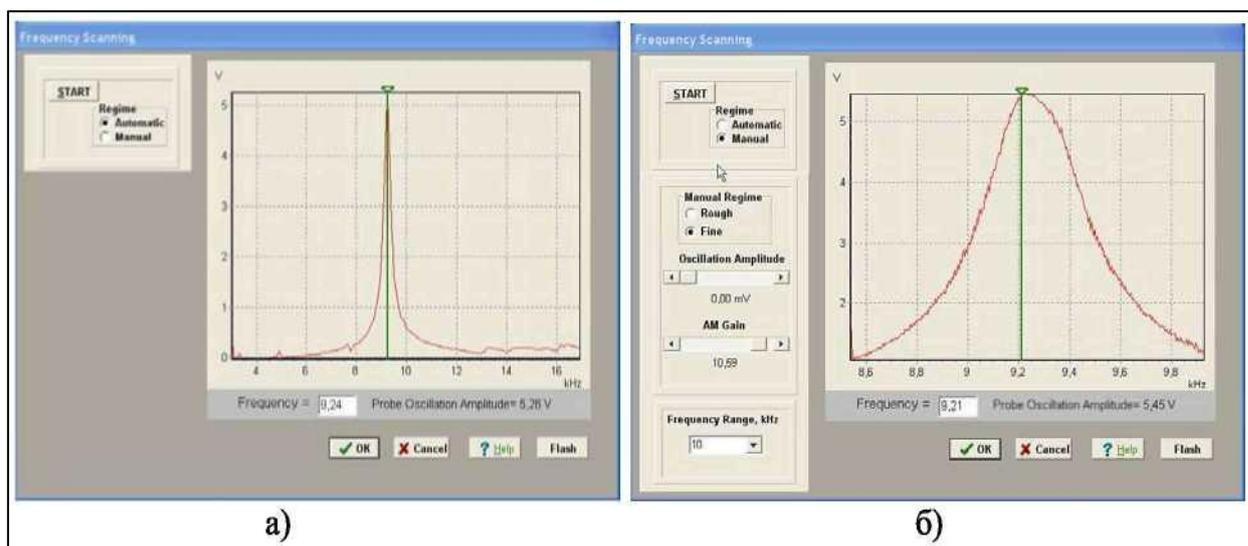


Рис. 21. Окно операции поиска резонанса и установки рабочей частоты:

а) автоматический режим, б) ручной режим

В автоматическом режиме устанавливается частота генератора, равная частоте, при которой наблюдалась максимальная амплитуда колебаний зонда. График, демонстрирующий изменение амплитуды колебаний зонда в заданном диапазоне частот, позволяет наблюдать форму резонансного пика.

Если резонансный пик недостаточно ярко выражен, или амплитуда при частоте резонанса мала (менее 1V), то необходимо изменить параметры проведения измерений и повторно провести определение резонансной частоты.

Для этого предназначен режим «Manual». При выборе этого режима в окне «Frequency Scanning» появляется дополнительная панель, позволяющая корректировать следующие параметры:

- амплитуда колебаний, задаваемых генератором (Oscillation Amplitude). Рекомендуется устанавливать эту величину минимальной (вплоть до нуля) и не более 50 mV;

- коэффициент усиления амплитуды (AM Gain). При недостаточной величине амплитуды колебаний зонда (<1 V) рекомендуется увеличить коэффициент AM Gain.

Для начала операции поиска резонанса нажимают кнопку «START». Режим «Manual» позволяет вручную менять выбранную частоту, передвигая зеленый курсор на графике с помощью мыши, а также уточнить характер изменения амплитуды колебаний в узком диапазоне значений вокруг выбранной частоты (для этого необходимо установить переключатель «Manual Regime» в положение «Fine» и нажать кнопку «START»).

6. Захват взаимодействия. Для захвата взаимодействия выполняют процедуру контролируемого сближения зонда и образца с помощью механизма автоматизированного подвода. Окно управления этой процедурой вызывается кнопкой «LANDING» панели управления прибором. При работе с «SCM» эта кнопка становится доступной после выполнения операции поиска и установки резонансной частоты. Окно «Scanning Force Microscope, Landing» содержит элементы управления подводом зонда, а также индикации параметров, которые позволяют анализировать ход выполнения процедуры.

В окне «LANDING» отображается следующая информация:

- удлинение сканера «Scanner Protraction» по оси Z относительно максимально возможной, принятой за единицу. Величина относительного

удлинения сканера характеризуется уровнем заполнения левого индикатора цветом, соответствующим зоне, в которой находится сканер в текущий момент: зеленый цвет - рабочая зона, синий - вне рабочей зоны, красный - сканер подошел слишком близко к поверхности образца, что может повлечь деформацию зонда. В последнем случае программа выдает звуковое предупреждение;

- амплитуда колебаний зонда «Probe Oscillation Amplitude» относительно амплитуды его колебаний в отсутствии силового взаимодействия, принятой за единицу. Величина относительной амплитуды колебаний зонда отображается на правом индикаторе уровнем его заполнения бордовым цветом. Горизонтальная метка на индикаторе «Probe Oscillation Amplitude» указывает на уровень, при переходе через который производится анализ состояния сканера и его автоматический вывод в рабочее положение;

- количество шагов «Steps», пройденных в заданном направлении «Probe Moving»: «Landing» - сближение, «Rising» - удаление.

До начала процесса опускания зонда необходимо:

- убедиться, что в элементе «Probe Moving» выбран пункт «Landing» (сближение);

- проверить правильность установок параметров сближения: коэффициент усиления в цепи обратной связи «Feed Back Loop Gain» установлен на значении 3;

- убедиться, что параметр «Amplitude Suppression» в окне Set Interaction Parameters имеет величину около 0,3 нажав на кнопку «Set Interaction»;

- нажать кнопку «Normalize». После выполнения команды «Normalize» правый индикатор «Probe Oscillation Amplitude» целиком заполняется бордовым цветом. Это означает, что амплитуда колебаний зонда в данный момент принята за единицу;

- нажать на кнопку «START».

Индикатор «Steps» начинает отсчитывать пройденные шаги. После захвата взаимодействия появляется сообщение «ОК». Для вывода зонда из обратной связи и увеличения расстояния между зондом и образцом используют операцию отвода зонда «Probe Moving: Rising». Для выполнения операции отвода необходимо выбрать направление движения «Probe Moving»: «Rising» и нажать кнопку «START».

7. Сканирование. После выполнения процедуры подвода «Landing» и захвата взаимодействия становится доступным сканирование – кнопка «Scan» в окне панели управления прибором. Нажимают на эту кнопку и прибор начинает проводить измерения.

Перед проведением процесса сканирования устанавливают параметры сканирования. Эти параметры сгруппированы в правой части верхней панели окна «Scanning» (рис. 22).

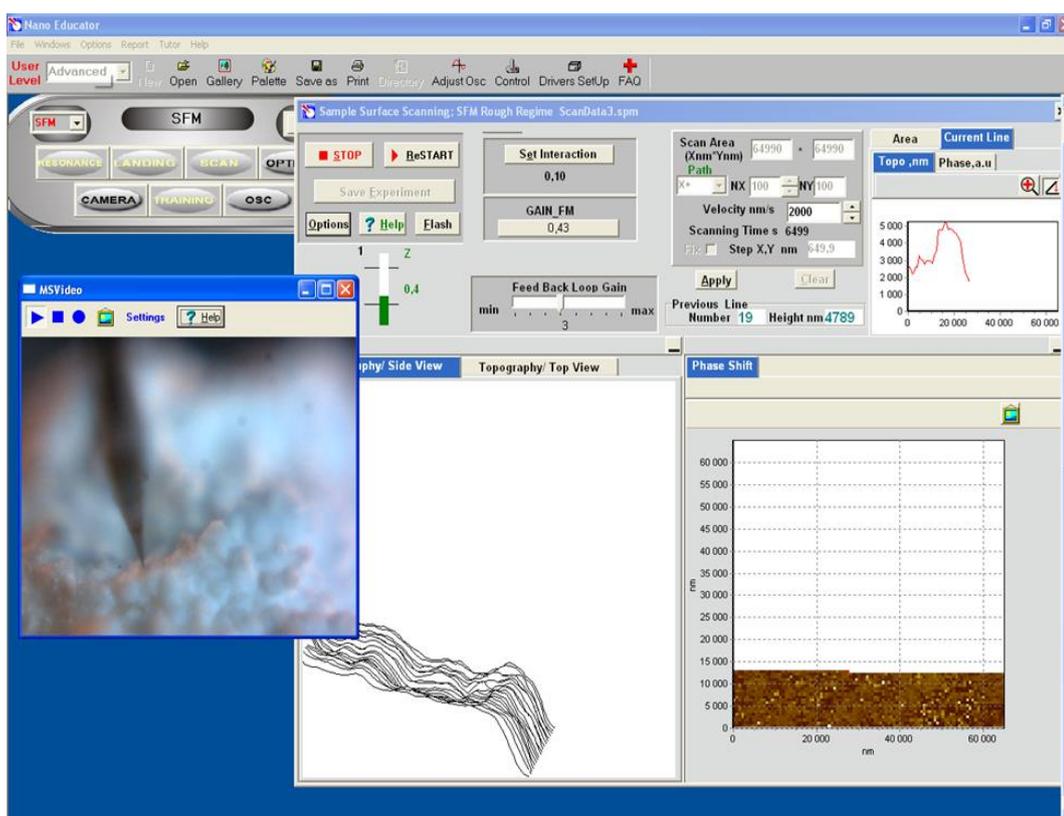


Рис. 22. Окно управления процессом и отображения результатов сканирования

При первом запуске программы параметры установлены по умолчанию:

- площадь сканирования Scan Area ( $X_{nm} * Y_{nm}$ ): 5000\*5000 нм;
- количество точек измерений по осям X, Y :  $NX=100, NY=100$ ;
- скорость сканирования Velocity = 1000 nm/s.

Путь сканирования «Path» определяет направление сканирования. Программа позволяет выбирать направление оси быстрого сканирования (X или Y). При запуске программы устанавливается «Path=X+».

После задания параметров сканирования нажимают кнопку «Apply» для подтверждения ввода параметров и кнопку «START» для начала сканирования.

Для сохранения результатов после окончания сканирования нажимают кнопку «Save Experiment» и в появившемся окне диалога выбирают каталог и указывают имя файла, при этом файл ScanData.spm, который служит временным файлом сохранения данных в процессе проведения измерений, будет переименован. По умолчанию файл будет сохранен в рабочем каталоге, назначенном перед началом измерений. Если не выполнить операцию сохранения результатов измерений, то данные последнего измерения будут сохранены в файле ScanData.spm, и новое измерение их уничтожит.

Статистическую обработку полученных результатов осуществляли при помощи программного обеспечения «Statistica 6.0» в виде иглы при

### ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенного исследования при помощи РЭМ было установлено, что экспериментальные трехмерные матрицы имеют различную топографию поверхности со сложным рельефом. Используя функцию измерений специализированного программного обеспечения «xT microscope Control» были определены размеры пор трехмерных матриц. Согласно результатам измерений электронограмм у матриц полученных методом поверхностно-селективного лазерного спекания размер пор равнялся  $137,88 \pm 40,75$  мкм, тогда как у матрицы полученной методом трехмерной печати, размер пор составил  $99,31 \pm 64,76$  мкм, при  $p < 0,03$  (см. рис. 23, 24, 25).

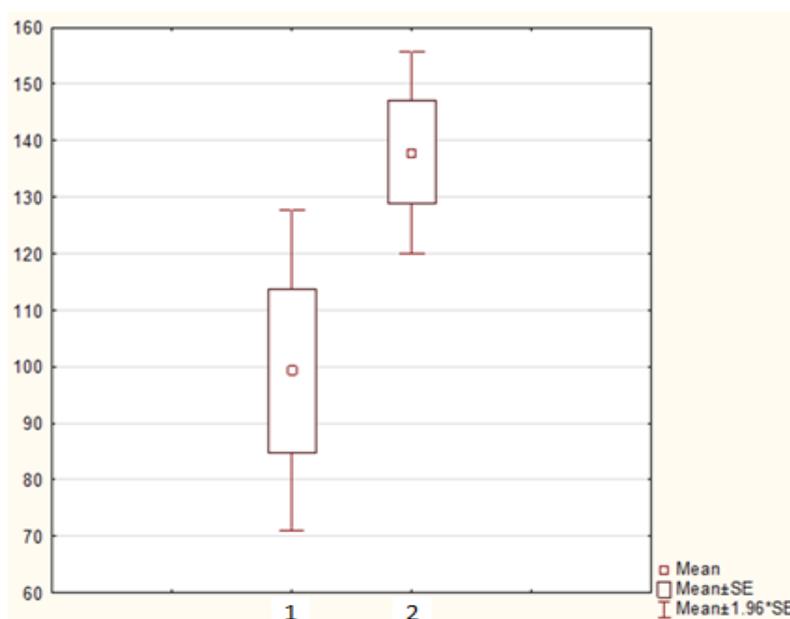


Рис. 23. Диаграмма пористости трехмерных матриц из фосфатов кальция: 1 – пористость матриц полученных методом поверхностно-селективного лазерного спекания, 2 – пористость матриц полученных методом трехмерной печати

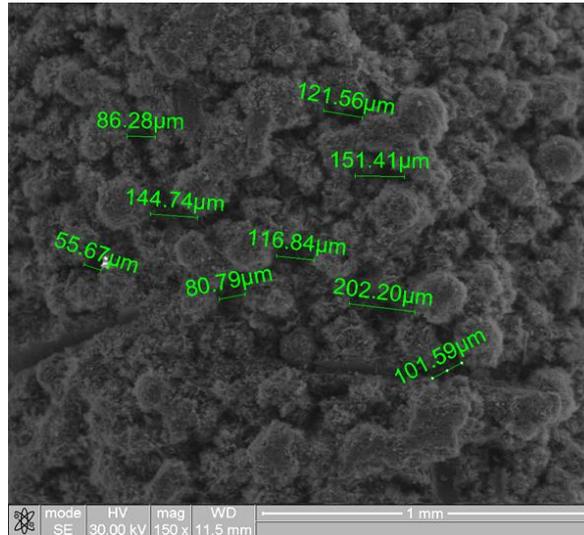


Рис. 24. Электронограмма. Матрица, полученная методом поверхностно-селективного лазерного спекания, размер пор от 80 до 200 мкм

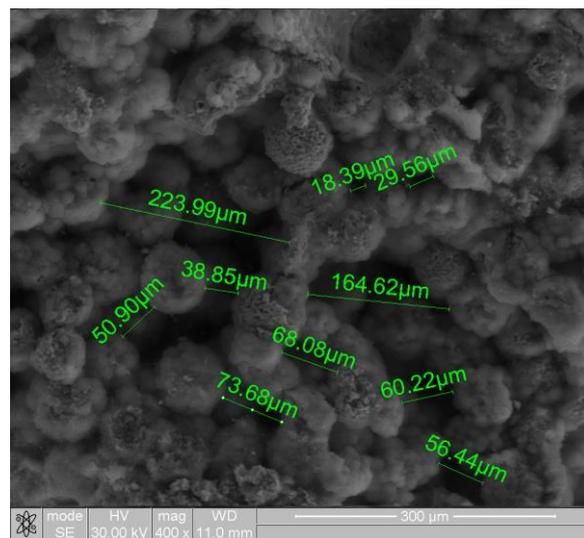


Рис. 25. Электронограмма. Матрица, полученная методом трехмерной печати, размер пор от 20 до 200 мкм

В результате более детального исследования поверхности трехмерных матриц было установлено, что в структуру матриц входят шаровидные частицы с различной морфологией поверхности и размерам. На шаровидных частицах матриц, полученных методом поверхностно-селективного лазерно-

го спекания поры отсутствуют, отмечается «шуба» из игольчатых структур различных геометрических форм (рис. 26).

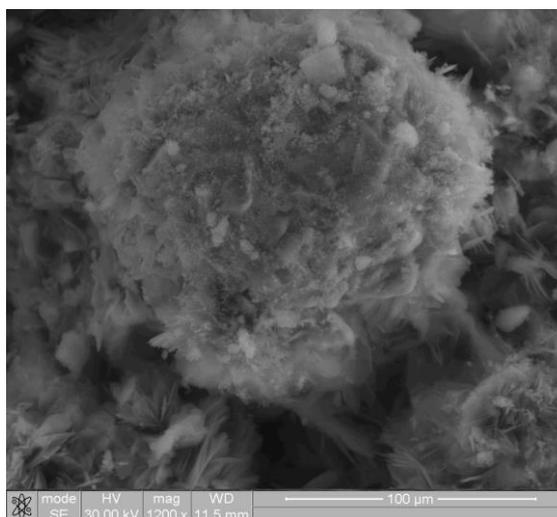


Рис. 26. Электронограмма. Шаровидная частица матрицы полученной методом поверхностно-селективного лазерного спекания, поры отсутствуют

На шаровидных частицах матриц, полученных методом трехмерной печати, определяются поры различных геометрических форм, среднее значение  $3,65 \pm 1,82$  мкм. При более детальном изучении было установлено, что крупные поры сливаясь друг с другом уходят в глубину материала (рис. 27).

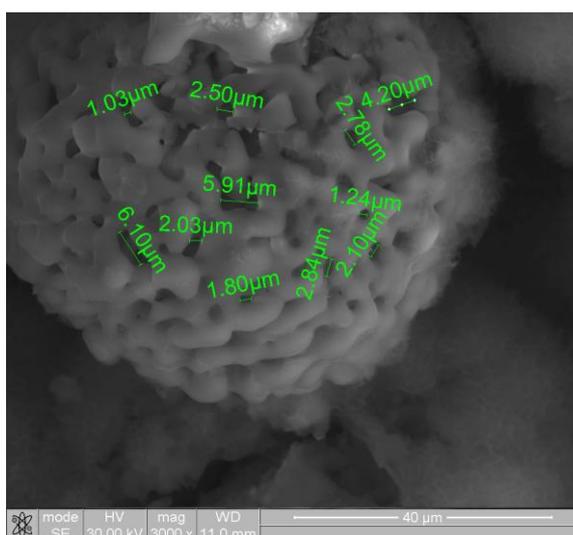


Рис. 27. Электронограмма. Шаровидная частица матрицы полученной методом трехмерной печати, размер пор от 1 до 6 мкм

Сложный рельеф поверхности трехмерных матриц с большими перепадами высот по оси  $Z$  не позволил использовать кантилеверы АСМ модификации NTEGRA, фирмы НТ-МДТ. Сканирование поверхности было проведено при помощи вольфрамового зонда в виде иглы, которая была заточены электро-химическим способом (см. рис. 28, 29).



Рис. 28. Сканирование поверхности матрицы полученной методом поверхностно-селективного лазерного спекания



Рис. 29. Сканирование поверхности матрицы полученной методом трехмерной печати

Согласно результатов сканирования поверхности было установлено, что шероховатость поверхности ( $R_a$ ) на наноуровне была в одном диапазоне, у матриц полученных методом поверхностно-селективного лазерного спека-

ния  $Ra = 641.94 \pm 164.97$  нм, тогда как у матрицы полученной методом трехмерной печати  $Ra = 462.14 \pm 103.84$  нм, при  $p < 0.004$  (рис. 30).

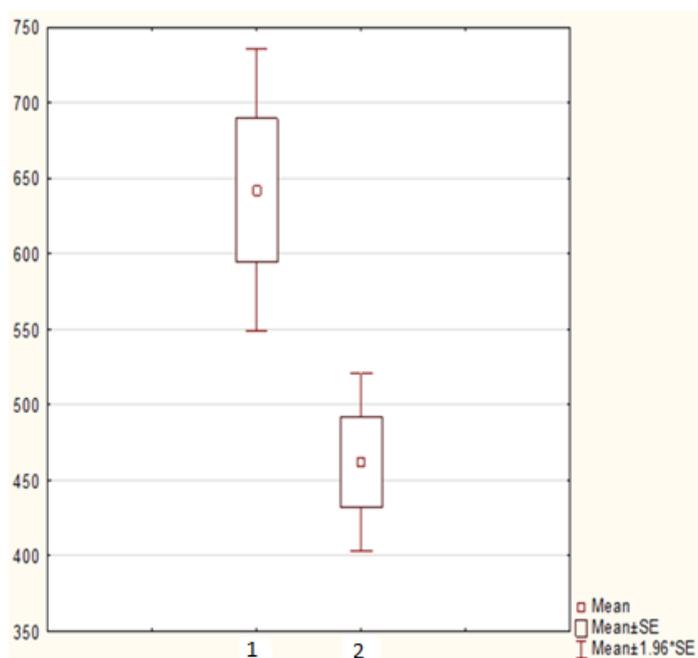


Рис. 30. Диаграмма, шероховатость поверхности ( $Ra$ ) на наноуровне трехмерных матриц из фосфатов кальция: 1 – пористость матриц полученных методом поверхностно-селективного лазерного спекания, 2 – пористость матриц полученных методом трехмерной печати

Исследуя образцы трехмерных матриц при помощи РЭМ было выявлено, что МСК, высаженные на поверхность матриц, не распространяются по всему объему материала, а остаются только на участках имеющих сглаженные формы рельефа и меньшую шероховатость поверхности. Анализ электронограмм трехмерных матриц полученных методом поверхностно-селективного лазерного спекания и методом трехмерной печати показал, что количество групп МСК больше на поверхности матриц полученных методом трехмерной печати.

Таким образом, топография поверхности трехмерных матриц полученных методом трехмерной печати в большей мере способствуют пролифера-

ции МСК и их дифференцировке в остеогенном направлении с формированием кальцифицированных фибриллярных структур (см. рис. 31, 32).

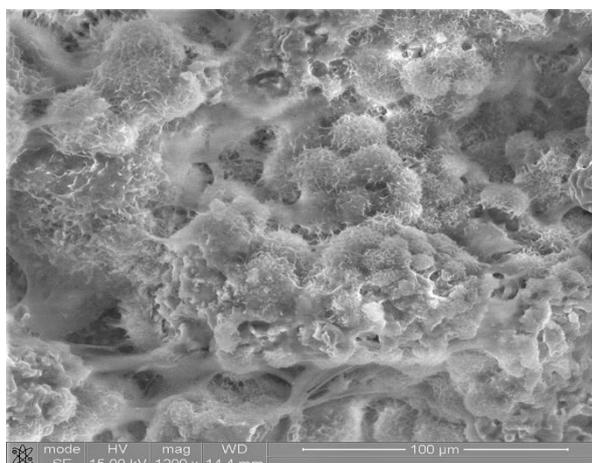


Рис. 31. Электронограмма. Скопление МСК на поверхности трехмерной матрицы полученные методом трехмерной печати

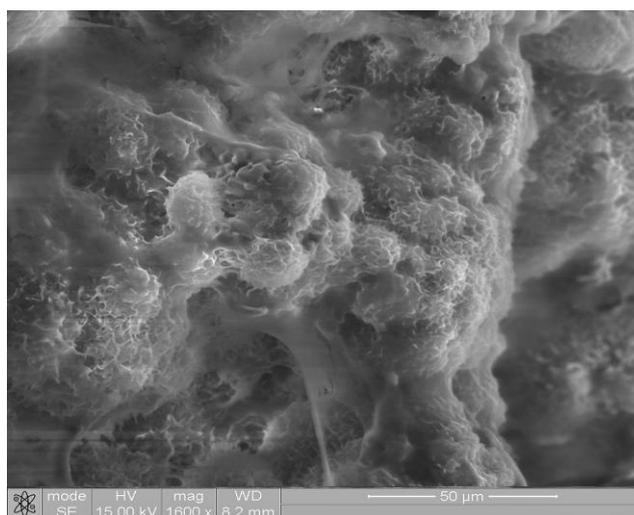


Рис. 32. Электронограмма. МСК формирующие кальцифицированные фибриллярные структуры на поверхности трехмерной матрицы полученной методом трехмерной печати

Используя приставку РЭМ для рентгеноспектрального микроанализа были определены спектры характеристического рентгеновского излучения для кальция (определено весовое содержание, вес, %) в МСК на поверхности матриц. Установлено, что в клетках на матрицах полученных методом по-

верхностно-селективного лазерного спекания содержание кальция равнялось  $25.63 \pm 2.89$  вес.%, тогда как в клетках на матрицах полученных методом трехмерной печати  $36.06 \pm 7.05$  вес, %, при  $p < 0.004$  (см. рис. 33, 34).

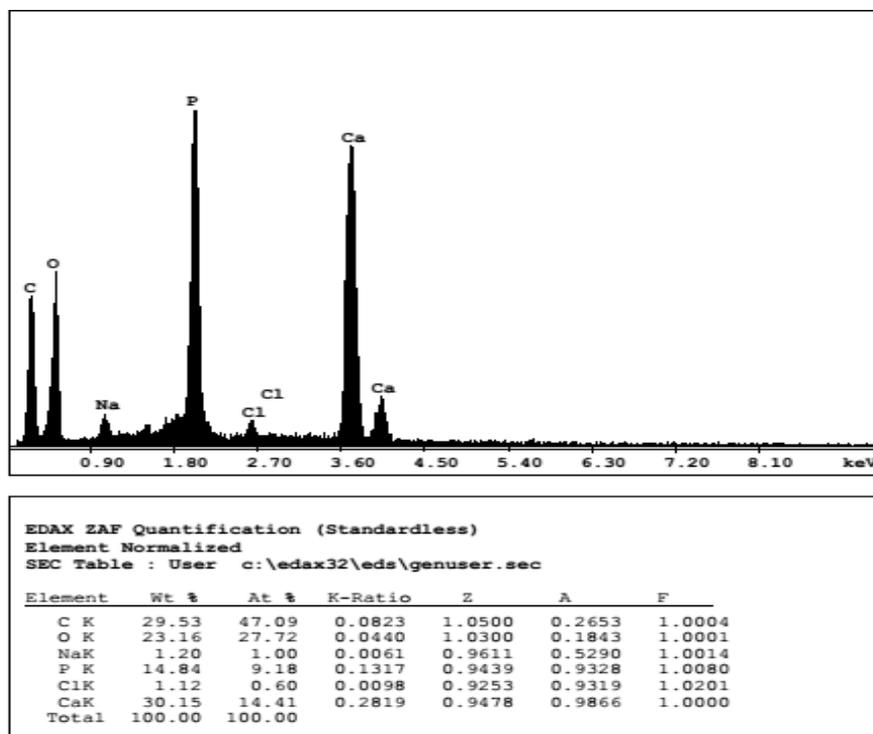


Рис. 33. График спектров характеристического рентгеновского излучения для МСК клетки находящейся на поверхности трехмерной матрицы полученной методом трехмерной печати

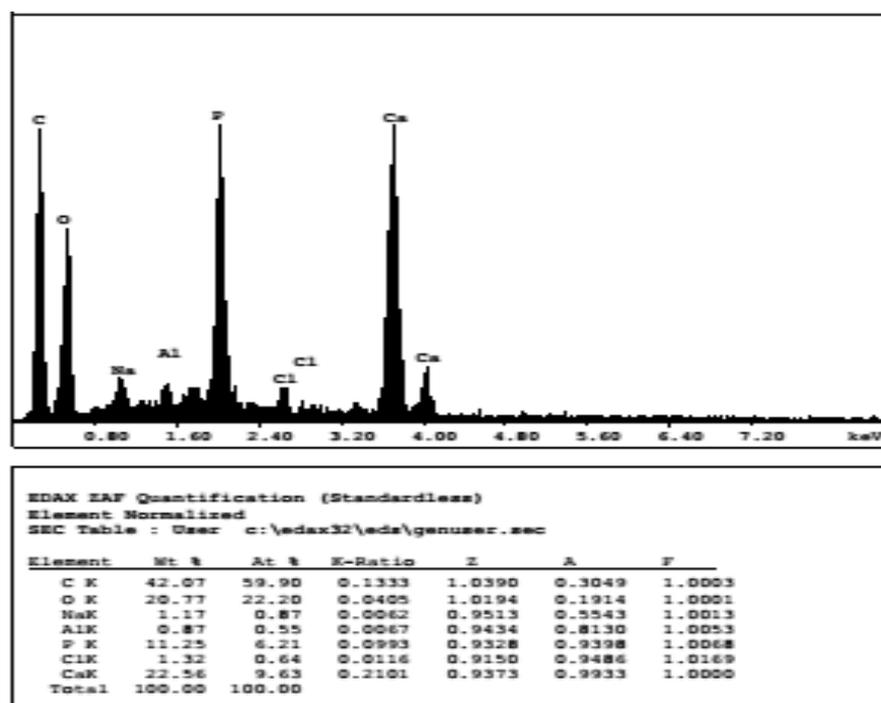


Рис. 34. График спектров характеристического рентгеновского излучения для МСК клетки находящейся на поверхности трехмерной матрицы полученной методом поверхностно-селективного лазерного спекания

Таким образом, в ходе настоящего исследования было установлено, что топография поверхности может оказывать существенное влияние на пролиферацию и дифференцировку МСК, при этом отмечается дифференцировка МСК в остеогенном направлении за счет наличия кальция в составе матрицы материала. Как показало данное исследование способ формирования трехмерных матриц может существенно повлиять на процессы остеоиндукции и остеоинтеграции трехмерного композитного материала с костной тканью.

## ВЫВОДЫ

1. Для исследования топографии поверхности материалов с развитым рельефом оптимальным является атомно-силовой микроскоп, где в качестве зонда используется вольфрамовая игла.
2. Все матрицы из фосфатов кальция являются биосовместимыми.
3. Сглаженные формы рельефа, пористость материала в диапазоне от 20 до 200 мкм и шероховатость поверхности менее 400 нм способствует пролиферации МСК.
4. МСК свободно адгезируют и активно пролиферируют покрывая сглаженные участки матрицы материала, формируют кальцифицированный матрикс, дальнейшая интеграция в структуры материала зависит от его топографии и физико-химических свойств.

## СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баринов С.М. Керамические и композиционные материалы на основе фосфатов кальция для медицины. Успехи химии, 2010; 79: 15-30.
2. Бухарова Т.Б., Антонов Е.Н., Попов В.К. и др. Биосовместимость тканеинженерных конструкций на основе пористых полилактидных носителей, полученных методом селективного лазерного спекания, и мультипотентных стромальных клеток костного мозга. Клеточные Технологии в Биологии и Медицине[Текст], 2010; 1: 40-46.
3. Вахрушев И.В., Суздальцева Ю.Г., Бурунова В.В., Каралкин П.А., Лупатов А.Ю., Ярыгин К.Н. Мезенхимальные клетки пульпы молочного зуба: цитофенотип и первичная оценка возможности применения в тканевой инженерии костной ткани. [Текст] // Клеточные технологии в биологии и медицине, 2010, No.1, P. 55-60.
4. Волова Л.Т., Долгалев А.А., Школин А.С. и др. Результаты тестирования синтетического и аллогенного гидроксилапатита на культурах клеток. [Текст] / Л.Т. Волова, А.А. Долгалев, А.С. Школин и др. // Пародонтология. –2006. –№4 (41). – С. 60 - 65.
5. Григорьян, А.С. Остеопластическая эффективность различных форм гидроксиапатита по данным экспериментально–морфологического исследования [Текст] / А.С. Григорьян, А.И. Воложин, В.С. Агапов и др. // Стоматология. – 2000. – № 3. – С. 4-8.
6. Григорян А.С. Проблемы интеграции имплантатов в костную ткань (теоретические аспекты) [Текст] / А.С. Григорян. – М.: Техносфера, 2007. – 128 с.
7. Джоунс, Р. Искусственные органы // Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей [Текст] / Л. Хенч, Д. Джонс. – М. : Техносфера, 2007. – С. 158-170.

8. Дьячков, А.Н. Оптимизация репаративного остеогенеза трансплантацией стромальных клеток костного мозга [Текст] / А.Н. Дьячков // Клеточная трансплантол. и тканевая инженер. – 2004. – № 2. – С. 1-4.

9. Иорданишвили, А.К. Хирургическое лечение зубов с хроническими периапикальными очагами одонтогенной инфекции (анатомическое, экспериментальное и клиническое исследование) [Текст] : дис. канд. мед. наук. / А.К. Иорданишвили. – СПб., 1993. – 215 с.

10. Лаврищева Г.И. Регенерация и кровоснабжение кости [Текст] / Г.И.Лаврищева, С.П. Карпов, И.С. Бачу. Кишинев, «Штиинца», 1981. – 168с

11. Лаврищева, Г.И. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей [Текст] / Г.И. Лаврищева, Г.А. Оноприенко. – М. : Медицина, 1996. – 208 с.

12. Левер, М. Д. Системы сердечно-сосудистой стимуляции[Текст] / М. Д. Левер // Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. – М. : Техносфера, 2007. – С. 199–212.

13. Леонов А.Н., Цедик Л.В., Сморяго О.Л. Композиционный керамический дентальный имплантат[Текст] // Актуальные вопросы стоматологической имплантации. – Минск, 1996. – С. 55-60.

14. Лысенко, Л.Н. Клеточные аспекты замещения дефектов костной ткани стеклокристаллическими материалами [Текст] / Л.Н. Лысенко // Клиническая имплантология и стоматология. – 2001. – № 3-4. – С. 109-111.

15. Орлов, В.П. Реконструктивно-восстановительные операции при травмах и заболеваниях позвоночника с использованием стеклокристаллических имплантатов (клинико-экспериментальное исследование) [Текст] : автореф. дис. д-ра мед. наук / В. П. Орлов. – СПб., 2002. – 27 с.

16. **Перикова М.Г., Сирак С., Казиева И., Мартиросян А. Оценка влияния биоактивного покрытия винтовых дентальных имплантатов на сроки остеоинтеграции (экспериментально-морфологическое исследование). Современные проблемы науки и образования [Текст] 2013; 2.**

17. Попов В.К., Евсеев А.В., Антонов Е.Н. и др. Лазерные технологии изготовления индивидуальных имплантатов и матриц для тканевой инженерии. [Текст] Оптический Журнал, 2007; 74 (9): 636-640.

18. Попсуйшапка А.К., Дубас В.И. Упругий остеосинтез диафизарных переломов голени стержневым аппаратом [Текст] / А.К. Попсуйшапка, В.И. Дубас // Травма. – 2004. Т. 5. – №4. – С. 444 – 446.

19. Севастьянов, В.И. и Кирпичников М.П. Биосовместимые материалы [Текст], ред.. Изд-во «МИА», М., 2011 г., 544 стр.

20. Сирак С.В., Казиева И.Э. Разработка конструкции дентального имплантата с возможностью внутрикостного введения лекарственных средств для купирования воспаления и усиления процесса остеоинтеграции при дентальной имплантации [Текст]. Современные проблемы науки и образования 2013; 3.

21. Хлусов, И.А. Зависимость остеогенных свойств клеток костного мозга от рельефа и растворимости кальцийфосфатных поверхностей [Текст] / И.А. Хлусов, А.В. Карлов, Н.С. Поженко // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 141. – № 1. – С. 107-112.

22. Шевцов М.А., Галибин О.В., Юдинцева Н.М., Блинова М.И., Пинаев Г.П., Щербина К.К., Шведовченко И.В., Питкин М.Р. Остеоинтеграция в реконструктивной хирургии: современное состояние и перспективы развития направления (обзор литературы). [Текст] Травматология и ортопедия России 2012; 4(66): 126–134.

23. Щепеткин, И.А. Кальцийфосфатные материалы в биологических средах [Текст] / И.А. Щепеткин // Успехи современной биологии. – 1995. – Т. 115, № 1. – С. 58-73.

24. Abeyewickreme A., Kwok A., McEwan J.R., Jayasingh, S.N. Bioelectrospraying embryonic stem cells: interrogating cellular viability and pluripotency. Integrative Biology, [Text] 2009; 1: 260-266.

25. Al Ruhaimi Kh. A. Bone graft substitutes comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials [Text] / Kh. A. Al Ruhaimi // Intern. J. Oral Maxillofacial Implants. – 2001. – Vol.16, №1. – P. 105 - 114.

26. Albrektsson T. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration [Text] / T. Albrektsson, C. Johansson // Eur. Spine J. – 2001. – № 10. – P. 96-101.

27. Alvis M. Osteoinduction by a collagen/mineral composite combined with isologous bone marrow in a subcutaneous rat model [Text] / M. Alvis, P. Lalor, M.K.C. Brown et al. // Orthopedics. – 2003. – Vol.26, No1. – P. 77-80.

28. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials [Text] / K. Anselme // Biomaterials. – 2000. – № 21. – P. 667-681.

29. Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Howdle S.M., et al. Fabrication of Polymer Scaffolds for Tissue Engineering Using Surface Selective Laser Sintering, Laser Physics, [Text] 2006;16: 774-787.

30. Antonov E.N., V.N. Bagratashvili, S.M. Howdle, A.N. Konovalov, V.K. Popov, K.M. Shakesheff, M.J. Whitaker 3-D bioactive and biodegradable scaffolds fabricated by selective laser sintering. Advanced Materials, 2005; 17 (3): 327-330. Murray P.E. Constructs and scaffolds employed to regenerate dental tissue [Text] // Dent Clin North Am, 2012, V.56, No.3, P. 577-588

31. Baggi L., Cappelloni I., Di Girolamo M., Maceri F., Vairo G. The influence of implant diameter and length on stress distribution of osseointegrated implants related to crestal bone geometry: a three-dimensional finite element analysis. J Prosthet Dent [Text] 2008; 100(6): 422–431.

32. Baksh D. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy [Text] / D. Baksh, L. Song, R.S. Tuan // J. Cell. Mol. Med. – 2004. – Vol.8, No3. – P. 301-316.

33. Barry R. III, Shepherd R., Hanson J., et al. Direct-write assembly of 3D hydrogel scaffolds for guided cell growth. Advanced Materials, [Text] 2009; 21: 2407-2410.

34. Bartolo P.J., Almeida H.A., Rezende R.A., et al., Advanced Processes to Fabricate Scaffolds for Tissue Engineering. In: Virtual Prototyping & Bio Manufacturing in Medical Applications, eds. Bidanda B., Bartolo P.J., New York, Springer, [Text] 2008; 149-170.

35. Bartolo, P.J., Chua C. K. , Almeida H.A., et al. Biomanufacturing for tissue engineering: Present and future trends. Virtual and Physical Prototyping, [Text] 2009; 4: 203-216.

36. Becker S. Osteopromotion by a  $\beta$ -tricalcium phosphate/bone marrow hybrid implant for use in spine surgery [Text] / S. Becker, O. Maissen, I. Ponomarev et al. // Spine. – 2006. – Vol.31, No1. – P. 11-17.

37. Bucklen B.S., Wettergreen W.A., Yuksel E., Liebschner M.A.K. Bone-derived CAD library for assembly of scaffolds in computer-aided tissue engineering. Virtual and Physical Prototyping, [Text] 2008; 3: 13-23.

38. Buma P. Histological and biomechanical analysis of bone and interface reactions around hydroxyapatite-coated intramedullary implants of different stiffness: a pilot study on the goat [Text] / P. Buma, van Loon P.J.M., H. Versleyen et al. // Biomaterials. – 1997. – Vol.18, №18. – P. 1251-1260.

39. Butscher A., Bohner M., Hofmann S., et al. Structural and material approaches to bone tissue engineering in powder-based three-dimensional printing. Acta Biomaterialia, [Text] 2011; 7: 907-920.

40. Cancedda R. Cell therapy and bone repair [Text] / R. Cancedda, R. Quarto, P. Giannoni et al. // Eur. Cells Mater. – 2003. – Vol.5, Suppl. 2. – P. 2 - 3.

41. Caplan A.I. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21-st century [Text] / A.I. Caplan, S.P. Bruder // Trends in Mol. Med. – 2001. – No7. – P. 259-264.

42. Cerroni L. Growth of osteoblast-like cells on porous hydroxyapatite ceramics: an in vitro study [Text] / L. Cerroni, R. Filocamo, M. Fabbri et al. // Biomolecular Eng. – 2002. – №19. – P. 119-124.

43. Chan G., Mooney D.J. New materials for tissue engineering: towards greater control over the biological response. *Trends Biotechnol*, [Text] 2008; 26: 382-392.
44. Cochran D.L. A comparison of endosseous dental implant surfaces. *J Periodontol* [Text] 1999; 70(12): 1523-1539.
45. Cui X., Boland T. Human microvasculature fabrication using thermal inkjet printing technology. *Biomaterials* [Text], 2009; 30: 6221-6227.
46. Currey J.D. *Bones: Structure and Mechanics*, Princeton, NJ, Princeton [Text] University Press, 2002.
47. Dayer R., Brennan T.C., Rizzoli R., Ammann P. PTH improves titanium implant fixation more than pamidronate or renutrition in osteopenic rats chronically fed a low protein diet. *Osteoporos Int* [Text] 2010; 21(6): 957-967.
48. Dayer R., Rizzoli R., Kaelin A., Ammann P. Low protein intake is associated with impaired titanium implant osseointegration. *J Bone Miner Res* [Text] 2006; 21(2): 258–264.
49. Derubeis A.R. Bone marrow stromal cells (BMSCs) in bone engineering: limitations and recent advances [Text] / A.R. Derubeis, R. Cancedda // *Ann. Biomed. Eng.* – 2004. – Vol.32, No 1. – P. 160-65.
50. Duguay N. Biomaterials and osseous regeneration [Text] / N. Duguay, A. Petite, E. Arnaud // *Ann.Chir. Plast. Esthet.* – 2000. – Vol.45, N3. – P. 364 - 376.
51. Eid K. Systemic effects of severe trauma on the function and apoptosis of human skeletal cells [Text] / K. Eid, L. Labler, W. Ertel // *J. Bone Jt Surg.* – 2006. – Vol. 88 – B, No 10. – P. 1394-1400.
52. Fierz F.C., Beckmann F., Huser M., Irsen S.H., Leukers B., Witte F. The morphology of anisotropic 3D-printed hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*, [Text] 2008; 29: 3799-3806.
53. Fratzl P., Gupta H.S., Paschalis E.P. Structure and mechanical quality of the collagen-mineral nano-composite in bone. *J. Mater. Chem.*, [Text] 2004; 14: 2115-2120.

54. Geesink R.G.T. Osteoconductive coating for total joint arthroplasty [Text] / R.G.T. Geesink // Clin. Orthop. – 2002. – №395. – P. 55-65.

55. Greenwald A.S. Bone-graft substitutes: facts, fictions and applications [Text] / A.S. Greenwald, S.D. Boden, V.M. Goldberg et al. // J. Bone Jt Surg. – 2001. – Vol.83 – A, Suppl. 2, Part 2. – P. 98-103.

56. Gross U.M. Reaction of tissues and cells surrounding the ceramic implants [Text] / U.M. Gross, C.F. Voigt, C. Muller-Mai // Biosis. – 1991. – №16. – P. 70-73.

57. Hagberg K., Brånemark R., Gunterberg B., Rydevik B. Osseointegrated trans-femoral amputation prostheses: prospective results of general and condition-specific quality of life in 18 patients at 2-year follow-up. Prosthet Orthot Int[Text] 2008; 32(1): 29–41.

58. He J., Li D., Liu Y., et al. Indirect fabrication of microstructured chitosan-gelatin scaffolds using rapid prototyping. Virtual and Physical Prototyping, 2008; 3: 159-166.20 Mironov V., Prestwich G., Forgacs G. Bioprinting living structures. Journal of Materials Chemistry, [Text] 2007; 17: 2054-2060.

59. Helm G.A. Bone graft substitutes for the promotion of spinal arthrodesis [Text] / G.A. Helm, H. Dayoub, J.A. Jane // Neurosurg. Focus. – 2001. Vol.10, No 4. – P. 1-5.

60. Hench L.L. The challenge of orthopaedic materials [Text] / L.L. Hench // Current Orthop. – 2000. – №14. – P. 7 - 15.

61. Hilborn J. Scaffolds for tissue engineering [Text] / J. Hilborn // Nano Med. 5-th Intern. Workshop on Biomed. Appl. Nanotech. – Berlin, Germany, [Text] Febr. 16 – 17, 2006. – P. 29-30.

62. Hing K.A. Bioceramic bone graft substitutes: influence of porosity and chemistry [Text] / K.A. Hing // Int. J. Appl. Ceram. Technol. – 2005. – Vol.2, No3. – P. 184-199.

63. Hutmacher D.W., Sittinger M., Risbud M.V. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends in Biotechnology*, [Text] 2004; 22; 354-362.

64. Igawa K., Mochizuki M., Sugimori O., et al., Tailor-made tricalcium phosphate bone implant directly fabricated by a three-dimensional ink-jet printer. *J. Artif. Organs* [Text], 2006; 9: 234-240.

65. Iwami K., Umeda N. Rapid Prototyping in Biomedical Engineering. In: *Advanced Applications of Rapid Prototyping Technology in Modern Engineering*, ed. Hoque M.E., InTech, <http://www.intechopen.com>[Text], 2011; 75-90.

66. Jain P.K., Pandey P.M., Rao P.V.M. Experimental investigations for improving part strength in selective laser sintering. *Virtual and Physical Prototyping*, [Text] 2008; 3: 177-188.

67. Kloss F.R. Immobilized BMP-2 on nano-crystalline diamond remains strongly bioactive [Text] / F.R. Kloss, D. Steinmuller-Nethl, R. Gassner et al. // *Nano Med. 5-th Intern. Workshop on Biomed. Appl. Nanotech.* – Berlin, Germany, Febr. 16 – 17, 2006. – P. 34.

68. Kon E. Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in criticalsize defects of sheep long bones [Text] / E. Kon, A. Muraglia, A. Corsi et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2000. – Vol.49, No 3. – P. 328-337.

69. Korovessis P.G. Role of surface roughness of titanium versus hydroxyapatite on human bone marrow cells response [Text] / P.G. Korovessis, D.D. Deligianni // *J. Spinal Disord. Tech.* – 2002. – Vol.15, №2. – P. 175-183.

70. Kroese–Deutman H.C. Influence of RGD- loaded titanium mplants on bone formation in vivo [Text] / H.C. Kroese-Deutman, J. Van Den Dolder, P.H.M. Spauwen, J.A. Jansen // *Tissue Eng.* – 2005. – Vol.11, No 11 – 12. – P. 1867-1875.

71. Kuboki Y. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: topology of osteogenesis

[Text] / Y. Kuboki, H. Takita, D. Kobayashi et al. // J. Biomed Mater Res. – 1998. – Vol.39, N2. – P. 190-199.

72. Lam C., Olkowski R., Swieszkowski, et al. Mechanical and in vitro evaluations of composite PLDLLA/TCP scaffolds for bone engineering. Virtual and Physical Prototyping, [Text] 2008; 3: 193-197.

73. Lambers F.M., Schulte F.A., Kuhn G., Webster D.J., Müller R. Mouse tail vertebrae adapt to cyclic mechanical loading by increasing bone formation rate and decreasing bone resorption rate as shown by time-lapsed in vivo imaging of dynamic bone morphometry. Bone [Text] 2011; 49(6): 1340–1350.

74. Laurencin C.T., Khan Y., El-Amin S.F. Bone graft substitutes. Expert Rev. Med. Devices [Text], 2006; 3: 49-57.

75. Lindholm T.S. Response of bone marrow stroma cells to demineralized cortical bone matrix in experimental spinal fusion in rabbits [Text] / T.S. Lindholm, P. Ragni, T.C. Lindholm // Clin. Orthop. – 1988. – No 230. – P. 296-302.

76. Linez-Bataillon P. In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates [Text] / P. Linez-Bataillon, F. Monchau, M. Bigerelle, M. Hildebrand // Biomolecular Eng. – 2002. – №19. – P. 133-141.

77. Maïmoun L., Brennan T.C., Badoud I., Dubois Ferriere V., Rizzoli R., Ammann P. Strontium ranelate improves implant osseointegration. Bone [Text] 2010; 46(5): 1436–1441.

78. Marlera J. Transplantation of cells in matrices for tissue regeneration [Text] / J. Marlera, J. Uptonac, R. Langerbo, J.P. Vacantica // Advan. Drug Delivery Rev. – 1998. – No 33. – P. 165-182.

79. Mironov V., Prestwich G., Forgacs G. Bioprinting living structures. Journal of Materials Chemistry, [Text] 2007; 17: 2054-2060.

80. Monchau F. In vitro studies of human and rat osteoclast activity on hydroxyapatite,  $\beta$ -tricalcium phosphate, calcium carbonate [Text] / F. Monchau, A. Lefevre, M. Descamps et al. // Biomolecular Eng. – 2002. – №19. – P. 143-145.

81. Murray P.E. Constructs and scaffolds employed to regenerate dental tissue // *Dent Clin North Am*[Text], 2012, V.56, No.3, P. 577-588
82. Myrdycz A. Cells under stress: a non-destructive evaluation of adhesion by ultrasounds [Text] / A. Myrdycz, D. Callens, K. Kot et al. // *Biomolecular Eng.* – 2002. – №19. – P. 219-225.
83. Nair L.S., Laurencin C.T. Polymers as biomaterials for tissue engineering and controlled drug delivery. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology* [Text], 2006; 102: 47-90.
84. Nakagawa T. Ultrastructural study of direct bone formation induced by BMPs —collagen complex implanted into an ectopic site [Text] / T. Nakagawa, T. Tagawa // *Oral Diseases.* – 2000. – No 6. – P. 172-179.
85. Neo M. Osteoblast reaction at the interface between surfaceactive materials and bone in vivo: a study using in situ hybridization [Text] / M. Neo, C.F. Yoigt, A. Herbst, U.M. Gross // *Biomed. Mater. Res.* – 1998. – Vol.39, № 1. – P. 1-8.
86. Orii H. Beta-tricalcium phosphate ( $\beta$ -TCP) graft combined with bone marrow stromal cells (MSCs) for posterolateral spine fusion [Text] / H. Orii, Sh. Soto me, J. Chen et al. // *J. Med. Dent. Sci.* – 2005. – Vol.52. – P. 51 - 57.
87. Pandithevan P., Gurunathan S.K. Personalised bone tissue engineering scaffold with controlled architecture using fractal tool paths in layered manufacturing. *Virtual and Physical Prototyping*, [Text] 2009; 4: 165-180.
88. Rath S., Cohn D., Hutmacher D. Comparison of chondrogenesis in static and dynamic environments using a SFF designed and fabricated PCL-PEO scaffold. *Virtual and Physical Prototyping*, [Text] 2008; 3: 209-219.
89. Rocha L.B. Biocompatibility of anionic collagen matrix as scaffold for bone healing [Text] / L.B. Rocha, G. Goissis, M.A. Rossi // *Biomaterials.* – 2002. – Vol.23. – P. 449 -456.
90. Savalani M.M., Hao L., Dickens P.M., et al. The effects and interactions of fabrication parameters on the properties of selective laser sintered hydroxyap-

atite polyamide composite biomaterials. *Rapid Prototyping Journal*, [Text] 2012; 18: 16-27.

91. Schiele N., Koppes R., Corr D., et al. Laser direct writing of combinatorial libraries of idealized cellular constructs: Biomedical applications. *Applied Surface Science*, [Text] 2009; 255: 5444-5447.

92. Schleicher I. Surface modification by complexes of vitronectin and growth factors for serum — free culture of human osteoblasts [Text] / I. Schleicher, A. Parker, D. Leavesley et al. // *Tissue Engineering*. — 2005. — Vol.11, No 11 — 12. — P. 1688 - 1698.

93. Simpson R.L., Wiria F.E., Amis A.A., Chua C.K., Leong K.F., Hansen U.N. Development of a 95/5 poly(L-lactide-co-glycolide)/ hydroxylapatite and beta-tricalcium phosphate scaffold as bone replacement material via selective laser sintering. *J. Biomed Mater Res B*[Text], 2008; 84B: 17–25.

94. Takaoka K. Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein [Text] / K. Takaoka, H. Nakahara, H. Yoshikawa et al. // *Clin. Orthop.* — 1988. — No 234. — P. 250 - 254.

95. Thull R. Physicochemical principles of tissue material interactions [Text] / R. Thull // *Biomolecular Eng.* — 2002. — №19. — P. 43 - 50.

96. Uchimura E. In-situ visualization and quantification of mineralization of cultured MSCs [Text] / E. Uchimura, H. Machida, N. Kotobuki et al. // *Calcif. Tissue Int.* — 2003. — Vol.73. — P. 575 - 583.

97. Urist M.R. Beta-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein [Text] / M.R. Urist, A. Lietze, E. Dawson // *Clin. Orthop.* — 1984. — Vol.187. — P. 277 -280.

98. Vasconcelos L.M.R., Oliveira F.N., Leite D. de O., de Vasconcelos L.G.O., do Prado R.F., Ramos C.J., Graça M.L., Cairo C.A., Carvalho Y.R. Novel production method of porous surface Ti samples for biomedical application. *J Mater Sci Mater Med* [Text] 2012; 23(2): 357–364.

99. Velema J., Kaplan D. Biopolymer-based biomaterials as scaffolds for tissue engineering. *Advances in Biochemical Engineering and Biotechnology*, [Text] 2006; 102: 187-238.

100. Webster T.J. Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics [Text] / T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus et al. // *Biomaterials*. – 2001. – Vol.22, №11. – P. 1327-1333.

101. Wilke A. Biocompatibility analysis of different biomaterials in human bone marrow cell cultures [Text] / A. Wilke, J. Orth, M. Lomb et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1998. – Vol.40. – P. 301-306.

102. Wiria F.E., Leong K.F., Chua C.K., Liu Y. Polyepsiloncaprolactone/hydroxyapatite for tissue engineering scaffold fabrication via selective laser sintering. *Acta Biomater*, [Text] 2007; 3: 1-12.

103. Yoshikawa H. Bone tissue engineering with hydroxyapatite ceramics [Text] / H. Yoshikawa, A. Myoui // *J. Artif. Organs*. – 2005. – No8. – P. 131-136.

Выпускная квалификационная работа выполнена мной самостоятельно.  
Все использованные материалы из опубликованной научной литературы и  
других источников имеют ссылки на них.

« \_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ Г.

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

(Ф.И.О.)