



# КЛЕТОЧНЫЕ МАТРИЦЫ (СКАФФОЛДЫ) ДЛЯ ЦЕЛЕЙ РЕГЕНЕРАЦИИ КОСТИ: СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ПРОБЛЕМЫ

М.А. Садовой, П.М. Ларионов, А.Г. Самохин, О.М. Рожнова  
Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна

В обзоре рассмотрены необходимые свойства тканеинженерных скаффолдов для обеспечения остеогенной дифференцировки, межклеточных сигнальных взаимодействий и васкуляризации скаффолда, которые во многом обеспечиваются за счет архитектуры скаффолда: наличия пористости и размеров пор, наличия и влияния канальной взаимосвязанности пор скаффолда на межклеточные взаимодействия.

На основе литературных сведений показано, что геометрия поверхности, размеры пор и канальцев, обеспечивающих внутренние коммуникации между порами в матрице, собственно микроархитектура матрицы, рассматриваемые даже без учета влияния ростовых факторов и материалов, из которых изготовлены матрицы, могут оказывать влияние на клеточную пролиферацию, остеогенную индукцию и остеокондуктивные свойства, что реализуется через межклеточные взаимодействия.

**Ключевые слова:** скаффолд, регенерация, архитектура матрицы, стволовые клетки, фотолитография.

Для цитирования: Садовой М.А., Ларионов П.М., Самохин А.Г., Рожнова О.М. Клеточные матрицы (скаффолды) для целей регенерации кости: современное состояние проблемы // Хирургия позвоночника. 2014. № 2. С. 79–86.

CELLULAR MATRICES (SCAFFOLDS) FOR BONE REGENERATION: STATE OF THE ART

M.A. Sadovoy, P.M. Larionov, A.G. Samokhin, O.M. Rozhnova

The review considers the properties of tissue engineered scaffolds required for osteogenic differentiation, cell-cell signaling interactions, and scaffold vascularization, which are largely provided by the scaffold architecture: its porosity and pore sizes, the presence of pore-channel interconnectivity inside the scaffold and its influence on cell-cell interactions.

The review shows, based on the literature data, that the geometry of surface, and sizes of pores and canaliculi providing internal communication between the pores in the matrix, and the matrix microarchitecture itself considered even without the influence of growth factors and materials of which the matrices are made can affect the cell proliferation, osteogenic induction, and osteoconductive abilities, which are realized via intercellular communications.

**Key Words:** scaffold, regeneration, matrix architecture, stem cells, photolithography.

Hir. Pozvonoc. 2014;(2):79–86.

Одним из актуальных и инновационных направлений в биологии и медицине является поиск специализированных биосовместимых и биодegradуемых композитных структур в качестве материала для хирургии, тканевой инженерии и создания биоискусственных органов. Тканевой инжиниринг, использующий клетки, ростовые факторы и клеточные матрицы, является адекватным клиническим подходом для регенерации распространенных повреждений костной ткани при эндопротезировании крупных суставов и при реконструкции и замещении дефектов черепа с использованием биодegradуемой

клеточной матрицы в качестве одного из наиболее перспективных материалов. К основным требованиям, которыми должны обладать конструкции для клеточной инженерии, относятся способность имитировать структуру и биологические функции, обеспечивать механическую поддержку, дифференцировку и пролиферацию клеток, управлять структурой и функцией формирующейся ткани.

Сфера применения специализированных биосовместимых и биодegradуемых композиционных материалов может быть очень широкой. Наиболее востребованными данные материалы будут в травматологии

и ортопедии, а также в челюстно-лицевой хирургии, нейрохирургии, нейроонкологии.

В настоящее время существует два основных подхода к реконструкции обширных костных дефектов – это использование костных графтов (ауто-, алло- и ксенографтов) или тканеинженерных конструкций. Тканеинженерная стратегия включения клеток в матрицу представляет собой обнадёживающую альтернативу для лечения повреждений костей. Эта стратегия состоит из трех основных блоков: клеток, матрицы (скаффолда) и остеоиндуктивных ростовых факторов. Каждый из этих элементов

может вызывать тканевую регенерацию, но комбинация всех трех компонентов более эффективна. В процессе создания матрицы тщательно разрабатывается конструкция, желателен имитирующая трехмерную (3D) нишу для остеогенных прогениторных клеток внутри матрицы, с возможностью взаимодействия клеток с соответствующими химическими и физическими стимулами естественной кости. До недавнего времени большинство исследователей формировало костную структуру матрицы с переносом гистотопографии на микроуровне, однако сейчас основные усилия исследователей сфокусированы на создании дизайна костных конструкций, соответствующих биомеханическим и биомиметическим свойствам на наноуровне. Следовательно, разрабатываемые матрицы должны стимулировать остеогенную дифференцировку и обеспечивать функционирование остеогенных прогениторных клеток, таких как мезенхимальные стволовые клетки в составе искусственной кости [46].

Недавние исследования тканеинженерных конструкций для костных тканей с использованием мезенхимальных стволовых клеток показали важность различных параметров матрицы, ее биологических и механических свойств для остеогенной дифференцировки и заселения клетками. В этом смысле тканевой инжиниринг, использующий клетки, ростовые факторы и клеточные матрицы, является притягательным клиническим подходом для регенерации распространенных повреждений костной ткани.

С тех пор как костную ткань начали рассматривать в качестве нанокompозитной структуры, изменились представления и о клеточной матрице. Так, наноматериал клеточных матриц рассматривается в качестве структуры, которая может индуцировать или усиливать остеогенез за счет создания клеточных ниш на наноуровне.

Прогениторные мезенхимальные клетки, имплантируемые в матрицу перед их трансплантацией или рекрутируемые из окружающих тканей,

могут дифференцироваться в остеогенные через серию последовательных стадий – пролиферацию, формирование матрикса, минерализацию [57]. На протяжении этих стадий различные ростовые факторы, цитокины и гормоны включаются в биологические сигнальные взаимодействия, динамично контактируя с клеточной популяцией и облегчая дифференцировочный каскад. Костный морфогенетический протеин-2 (BMP-2) [3, 52], фактор роста фибробластов [35, 40], трансформирующий ростовой фактор [11], сосудистый эндотелиальный ростовой фактор [24] и тромбоцитарный фактор роста [17, 40] – главные остеогенные факторы, а щелочная фосфатаза и остеокальцин являются маркерами остеогенной дифференцировки. Остеопонтин, остеоонектин и костный сиалопротеин являются основными компонентами экстрацеллюлярного матрикса [44, 53].

Кроме верхнего уровня регуляции остеогенной сигнальной экспрессии, существуют динамические сигнальные пути: Smad и Wnt, митоген-активированные протеинкиназы (МАРК) [27, 33, 54], включение миниатюрного связанного транскрипционного фактора-2 (Runx2) [14] и рецептора активатора ядерного фактора κВ лиганда, которые определяют начальную костную регенерацию в тканеинженерных конструкциях [48].

Ассоциация большого числа клеток и конструкционные параметры матрицы влияют на остеогенную сигнальную экспрессию. Среди этих параметров матрицы важны физические конструкционные факторы, особенно дизайн матрицы, включая такие факторы, как пористость, размеры пор, возможность взаимодействия клеток, биологические и механические свойства материалов, из которых они изготовлены, что значительно влияет на индукцию остеогенной экспрессии и дифференциации при заселении клеток и в конечном счете на формирование костной ткани *in vitro* и *in vivo* [26, 28, 51].

В последующем эти свойства архитектуры матрицы оказывают суще-

ственное влияние на количественные показатели формирования костной ткани *in vivo* [7, 15, 41, 51]. Более того, демонстрация важности этих параметров матрицы диктуется тем, что оптимальная структура должна формировать сигнальную экспрессию и индуцировать остеогенную дифференцировку рекрутируемой клеточной популяции. Наряду с комбинацией биологических и химических факторов, таких как управляющие ростовые протеины, регулярные, прецизионные элементы архитектуры матрицы с оптимизированным дизайном параметров необходимы для достижения оптимальной тканевой инженерии костной ткани. Наиболее точно эти параметры с учетом микроразмеров матрицы можно воспроизвести с помощью стереофотолитографического метода [19, 32]. Метод стереофотолитографии – это быстрая техника прототипирования, в которой используется фотополяризация для формирования 3D-клеточных матриц с послойной детализацией специализированного дизайна, что достигается с помощью компьютерной графики [2, 20, 47]. Этот метод позволяет формировать матрицы с возможностью репродукции и контролируемыми пористостью, размерами пор, внутренними коммуникациями и механическими свойствами, что определяет остеогенные сигнальные взаимодействия и дифференцировку.

Для создания биодеградирующих матриц наиболее часто используются следующие материалы: сложный моноэтилэфир фумаровой кислоты, полипропилен фумарат, d,l-лактид олигомер, N-винил-2-пирролидон-d,l-лактид, полимеры молочной кислоты, полиметилметакрилат, полибутилен тетрафталат, поликапролактон [8, 13, 21, 29, 36]. К другим часто используемым материалам для приготовления скаффолдов относят коллаген, коллаген с гликозаминогликанами, желатин, шелк [5, 43, 58, 63].

Необходимо отметить, что при изготовлении скаффолдов возможно использование композитных инкорпорируемых наполнителей, напри-

мер, хитозана, гидроксиапатита, β-трикальцийфосфата, что позволяет изменять свойства основных материалов, из которых выполнена клеточная матрица, таких как прочностные характеристики, адгезивные свойства, формирование дополнительных стимулов на клеточную популяцию скаффолда и окружающих тканей, а также достигать усиления уровня остеогенной дифференцировки, скорости минерализации новообразованной костной ткани [9, 31, 63].

*Характеристика ключевых структурных параметров матричной архитектуры, оказывающих значительное влияние на межклеточное взаимодействие*

Из целого ряда характеристик формируемых тканеинженерных матриц необходимо остановиться на ряде ключевых структурных параметров, которые во многом определяют возможности межклеточных взаимодействий в матрице. К таковым относим пористость и размеры пор матрицы, а также степень канальной взаимосвязанности матричных пор.

*Влияние пористости и размеров пор на межклеточное взаимодействие.* Способность матрицы к усилению остеогенной сигнальной экспрессии и поддержке формирования новой кости в значительной степени зависит от размеров пор и пористости, где пористость отражается суммарным процентом пор от общей поверхности, размеры пор являются диаметром отдельной поры матрицы [25]. Важность пористости и размеров пор матрицы может быть отличительной чертой нативной структуры кости, которая сама является пористой структурой. Кортикальная кость значительно более плотная структура, но и в ней также существует пористость более 10 %, при этом такая пористость региона кортикальной кости не препятствует васкуляризации и клеточной инфильтрации структур. Напротив, трабекулярная кость – значительно более пористая структура с типичной пористостью от 50 до 90 % [37].

Пористость и размеры пор оказывают значительное влияние на возможности тканеинженерной матрицы поддерживать регенерацию по нескольким резонам. Во-первых, поры оказывают значительное влияние на эффективность клеточной адгезии, что, в свою очередь, определяет плотность заселения клеток в матрице, их распространение и миграцию [38]. Эти факторы показали влияние на остеогенную дифференцировку за счет изменения сигнальной дистанции [29].

Более того, размеры пор и пористость оказывают влияние на прочностные характеристики матрицы. Достаточно прочная матрица обеспечивает механическую поддержку в зоне дефекта, часто прочность должна быть сопоставима с костной тканью, особенно в случае, когда кость опорная [18]. В перспективе пористость и размеры пор матрицы способны влиять *in vivo* на остеокондукцию и васкуляризацию. Интеграция нативных тканей в матрицу стимулируется через рост в коммуникационные поры, таким образом, оптимальные и минимальные размеры пор должны формироваться в матрице для поддержки врастания тканей [16, 25]. Наконец, размеры пор и пористость обуславливают межклеточные сигнальные взаимодействия, обеспечивающие остеобластную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток (МСК) и продукцию протеинов внеклеточного матрикса [6, 16, 56].

Оптимальная тканеинженерная матрица должна поддерживать рост и остеогенез заселяемой клеточной популяции, также обязательными являются остеокондуктивность и возможность ангиогенеза из окружающих тканей [1, 62]. Оба показателя (остеокондуктивность и васкуляризация) определяются размерами пор, пористостью и взаимосвязывающими поры каналами матрицы. Так, было показано, что в матрицах с одинаковой пористостью (около 50 %) размеры пор менее 40 мкм определяют минимальное врастание в матрицу, в то же время размеры пор от 100–350 мкм

являются обоснованно оптимальными [62].

В другом исследовании при анализе влияния пористости и размеров пор на костное заживление в модели критического краниального дефекта у крыс было показано, что поры небольшого размера (100 мкм) индуцируют большее количество костных формирований при заживлении кости, чем крупные поры (500 мкм). В этом исследовании также обнаружена связь между пористостью, отеком матрицы и ее биодegradацией [45].

Таким образом, было гипотетизировано, что малые размеры пор могут увеличивать формирование врастаний кости из окружающих матрикс тканей, также определено, что размеры пор влияют на места врастания костных формирований из окружающих тканей в матрицу. Отмечено, что пористость и размеры пор могут различаться в костях различного типа, что технически затрудняет получение матрицы адекватной пористости традиционными методами.

При исследовании скаффолда бедренной кости с размерами пор 565 мкм было показано большее формирование костных образований, чем при размерах пор 300 мкм. В этих группах пористость была от 40 до 50 %, наблюдались незначительные изменения в формировании костных образований. Было заключено, что пористость имеет меньшее значение для формирования костной ткани, чем размеры пор [15].

Несмотря на большое число исследований в этой области, есть разногласия в оценке значимости размеров пор на формирование костной ткани *in vivo*. Так, в поликапролактоновой матрице с размерами пор 350, 550, 800 мкм наблюдались незначительные различия в количестве костных формирований через восемь недель [49]. Спустя четыре недели в группах с большими размерами пор было продемонстрировано большее количество сформированной костной ткани, что показывало значимость влияния размеров на рост кости, однако через

восемь недель эти различия были незначительны.

В другом исследовании, в ходе которого сформированные матрицы использовали в модели с краниальным дефектом у кроликов, было обнаружено, что размеры пор в 300 мкм индуцируют значительное число костных формирований через четыре недели в сравнении с матриксами, где размеры пор были 100, 200 и 400 мкм [41].

Разногласия между этими исследованиями могут показывать, что на формирование костных образований в матриксе оказывают влияние не только размеры пор, но и тип используемого материала, скорость его биодеградации, формы пор, как и сам размер имплантата и особенность васкуляризации окружающих его тканей. Все эти факторы могут в значительной степени нивелировать эффекты, определяющиеся размерами пор.

В то же время при пренебрежении этими различиями влияние размеров пор и пористости матрицы уже подтверждены. Размеры пор оказывают влияние не только на остеокондукцию матрицы, но и на васкуляризацию, которая является критическим элементом успеха формирования кости. Так, в исследовании с использованием кальцийфосфатной керамики размеры пор от 140 до 280 мкм показали более быструю васкуляризацию, нежели матрица с размерами пор от 40 до 140 мкм. Матрицы с большими размерами пор демонстрировали значительно большую плотность капилляров по сравнению с матрицами с меньшими размерами пор, при этом объем формирования новой кости коррелировал с этими результатами: в группах с большими размерами пор (210–280 мкм) регистрировали больший объем костных формирований [10].

Быстрая (рапидная) васкуляризация необычайно важна для роста костной ткани в имплантируемом скаффолде, так как клетки, имплантированные в матрицу, теряют жизнеспособность без крови и питания. Кислород и питательные вещества передаются на дистанцию около 200 мкм,

следовательно, создание васкуляризации необходимо даже для небольших матриц [60]. Степень васкуляризации тканеинженерного скаффолда влияет на механизм формирования кости [30].

Гидроксипатитный скаффолд с размерами пор 90–120 мкм продемонстрировал стимуляцию эндохондрального механизма формирования кости, в ходе которого МСК, пролиферирующие в скаффолде, образовывали хрящевую ткань, после чего последняя начала васкуляризоваться, затем была резорбирована фагоцитирующими клетками. МСК мигрировали в эти места, дифференцировались в остеобласты и формировали костную ткань. Этот процесс приводил к формированию костной ткани, аналогичной ткани длинных трубчатых костей.

По сведениям Mistry и Mikos [37], скаффолд с размерами пор 350 мкм определял формирование кости через интрамембранозный механизм ossification, где МСК вначале мигрировали с началом васкуляризации и формировали только костную ткань без образования хряща. Этот тип кости напоминал кость свода черепа или любую другую плоскую кость. Таким образом, размеры пор оказывали влияние на механизм формирования костной ткани и степень васкуляризации, а последняя, в свою очередь, приводила к оксигенации тканей, отменяла хондрогенез и стимулировала остеогенез. Более того, эффект влияния размера пор на механизм формирования костной ткани показывает важность прецизионного контроля размеров пор и пористости скаффолда и архитектуры пор, что может быть необходимым для создания специфической костной ткани и эффективного тканевого инжиниринга.

Показательно, что *in vitro* рост клеток и дифференцировка в скаффолде в значительной степени зависят от размеров пор и пористости. Так, если *in vivo* пористость и размеры пор влияют на нативные ткани, окружающие и проникающие в скаффолд, то при изучении *in vitro* придается особое значение влиянию размеров пор и пористости

на миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток внутри матрицы [25]. Для примера, Mygind et al. [39] показали эффект влияния размера пор на экспрессию серии остеогенных сигналов. Человеческие мезенхимальные клетки, культивируемые в коралловом гидроксипатитном скаффолде, показывали более низкий уровень пролиферации и более высокий уровень остеогенной дифференцировки, а также увеличение мРНК щелочной фосфатазы и BMP-2 в скаффолде с меньшими размерами пор (200 мкм) против скаффолда с большими размерами пор (500 мкм). Усиление остеогенной дифференцировки и уменьшение уровня пролиферации определялось в обоих случаях экспланации за счет различий в площади поверхности и эффективности транспорта, вызванного изменениями в размерах пор. Это наводило на мысль, что геометрия скаффолда с меньшими размерами пор приводит к увеличению кривизны и, таким образом, к уменьшению транспортной эффективности растворимых факторов в окружающую среду и изменениям клеточной инфильтрации. В последующем снижении пролиферации наблюдалось из-за изменения сигнальной дистанции за счет вариативности геометрии пор, что индуцировало более высокий уровень дифференциации. В другом исследовании показано, что размеры пор и пористость влияют на уровень экспрессии остеогенных сигналов: в коллаген-гликозаминогликановом скаффолде наблюдалась большая экспрессия остеокластов и коллагена I типа у МСК через 21 день культивирования в скаффолде с размерами пор 151 мкм против скаффолда с порами 96 мкм [6].

Более того, размеры пор также оказывали влияние на дифференцировку человеческих МСК в  $\beta$ -трикальцийфосфатном скаффолде с различной пористостью (25–75 %) и размерами пор (10–600 мкм соответственно). В этом исследовании не наблюдалось значительных различий *in vitro* в остеогенной дифференциации между группами. Однако

при имплантации образцов мышам подкожно более высокий уровень остеобластной дифференцировки и продукции щелочной фосфатазы наблюдали в скаффолдах с пористостью 65 и 75 %, при этом наибольший уровень был отмечен в случае пористости скаффолда 65 %. Это исследование показало, что пористость не является основой влияния на остеогенную дифференцировку, различия в сигнальной экспрессии могут быть связаны с размерами пор *in vivo*, даже без костных вращаний из окружающих тканей [20].

Betz et al. [4] исследовали эффект размера пор и пористости на опосредованные BMP-2 сигнальные взаимодействия человеческих МСК, эксплицированных в скаффолдах с размерами пор 100 и 250 мкм, с одинаковой пористостью и временными контролями экспликации культуры на 4-, 8- и 12-е сут. В этой работе был использован гидрогель, приготовленный из полиэтиленгликолядиакрилата и 5-этил-5-(гидроксиметил)- $\beta$ ,  $\beta$ -диметил-1,3-диоксан-2-этанолдиакрилата. Результаты этого исследования показали, что размеры пор оказывают влияние на BMP-2 сигнальную экспрессию. Помимо того, было определено увеличение в 50–70 раз экспрессии BMP-2 в наблюдениях с 3D-пористым гелем при сравнении с 2D-монослойной культурой. Авторы связали эффект увеличения сигнальной экспрессии с влиянием 3D-архитектуры. Предпожили, что этот эффект опосредован за счет концентрации сигнальных молекул в гидрогеле, что усиливало паракринные и аутокринные межклеточные взаимодействия.

Таким образом, можно говорить о том, что пористость скаффолда и размеры пор могут влиять *in vitro* на рост и дифференцировку имплантируемой клеточной популяции МСК, хоть эти эффекты и менее заметны, чем рост кости *in vivo*. Несмотря на то что в этой области ведутся многочисленные исследования, в дальнейшем возникает необходимость определить оптимальный размер для *in vitro* роста

кости и полностью объяснить влияние размеров пор и пористости на межклеточные сигнальные взаимодействия. Для будущих тканевых инженерных одной из важнейших задач будет являться создание хорошо управляемых и охарактеризованных скаффолдов, которые необходимы не только для дальнейшего изучения влияния пористости и размера пор, но и должны позволить создавать скаффолды с надежной геометрией для их последующего клинического использования.

*Влияние канальной взаимосвязанности пор клеточной матрицы на межклеточное взаимодействие.* Одной из важных характеристик архитектуры скаффолда (матрицы), помимо ранее описанных пористости и размеров пор, является взаимосвязанность между порами матрицы с помощью каналов. Матрица с архитектурой высокой степени взаимосвязанности пор увеличивает коммуникации между клетками различных областей скаффолда и усиливает тканевое вращание. Степень взаимосвязанности скаффолда имеет ограниченное влияние на МСК-опосредованные сигнальные взаимодействия и дифференциацию, но акцентированный эффект на морфологию кости, формирующейся внутри матрицы [50, 55, 59]. Однако степень взаимосвязанности не является ведущим фактором влияния на костное вращание, так как диаметр каналов, соединяющих поры, тоже может оказывать влияние на клеточную пенетрацию. Так, в эксперименте *in vitro* Rose et al. [50] использовали гидроксиапатитные скаффолды и клетки остеосаркомы человека, в результате чего показано, что каналы с более крупным диаметром увеличивают плотность клеток и усиливают пенетрацию клеток в центр скаффолда. В последующем эти же исследователи показали, что минимальный размер диаметра канала, обеспечивающий пенетрацию клеток, составляет 82 мкм.

В другом исследовании с близкими целями была показана возможность остеобластов к пенетрации каналов диаметром свыше 20 мкм и размерами

пор 50 мкм, требовавшихся для формирования новых костных образований в каналах. Это исследование показало, что минимальный диаметр каналов и материал скаффолдов могут варьировать, каналы, обеспечивающие взаимосвязи между порами, способствуют не только усилению клеточной инфильтрации скаффолда, но и васкуляризации и поддержке питания клеток, что подтверждает необходимость тщательного контроля взаимосвязей внутри скаффолда с помощью каналов [34].

Деградация скаффолда оказывает влияние на вращание костной ткани в скаффолд. Есть мнение, что этот вопрос необходимо рассматривать совместно с состоянием системы каналов скаффолда, обеспечивающих взаимосвязанность внутренней сети скаффолда, так как при дегградации скаффолда доступ к внутренним каналам графта может быть затруднен. Для изучения состояния внутренней сети был предложен прецизионный метод – микрокомпьютерная томография [22, 23, 42].

Имеется предположение, что путем манипуляций с пористостью и уровнями взаимосвязанности (внутренней сети скаффолда) скорость костной регенерации может быть увеличена. На основе исследования *in vivo* экспериментального изучения утилизации гидроксиапатитного скаффолда, изготовленного с обеспечением трехмерной пористости, на модели краниального дефекта костной ткани было высказано предположение, что направление и степень свободного пространства в скаффолде может влиять на формирование новой костной ткани [51]. Гистологическая оценка показала, что каналы могут направлять рост новой костной ткани: радиальные каналы пенетрировались со стороны скаффолда и показывали успешное формирование кости из окружающих тканей, а осевые каналы показывали рост костной ткани внутрь скаффолда, с его нижней части, направляя миграцию клеток в центр скаффолда. Это исследование продемонстрировало, что архи-

текстура скаффолда и внутренняя сеть коммуникаций скаффолда оказывают влияние на рост костной ткани *in vivo*. Более того, сходный результат с необходимыми контролями продемонстрировал костный рост костной ткани *in vivo* в скаффолде, изготовленном при помощи метода стереолитографии из гидроксиапатита [7].

При исследовании *in vivo* характера направлений каналов скаффолды с ортогональными или радиальными каналами были имплантированы в нижнюю челюсть свиньи, в ходе чего было показано влияние архитектуры скаффолда на количество регенерируемой костной ткани: при ортогональной архитектуре каналов показано большее формирование костной ткани по сравнению с радиально ориентированными каналами. Потерей взаимосвязи между отдельными каналами Chu et al. [7] объясняют уменьшение роста кости в скаффолдах с радиальными каналами. Помимо того, этими же авторами показано, что периодичность пор значимо влияет на геометрию формируемой костной ткани, так как костные ткани интегрировались на всем протяжении ортогональных каналов гидроксиапатитных скаффолдов, в то время как в радиальных каналах оставались интактные

участки в центре скаффолда без образования кости [7].

Все вышеприведенные исследования подтверждают значимость применения в скаффолдах взаимосвязывающих каналов и их архитектуры для направления и усиления костной регенерации *in vivo*.

### Заключение

В настоящем обзоре представлены основные тенденции и подходы, реализующие идеи регенеративной медицины, – создание идеального скаффолда (матрицы) для восстановления целостности кости в местах ее дефицита с использованием клеточных технологий. Показано, что геометрия поверхности, размеры пор и каналовцев, обеспечивающих внутренние коммуникации между порами в матрице, собственно микроархитектура матрицы, рассматриваемые даже без учета влияния ростовых факторов и материалов, из которых изготовлены матрицы, могут оказывать влияние на клеточную пролиферацию, остеогенную индукцию и остеокондуктивные свойства, что реализуется через межклеточные сигнальные взаимодействия.

Более того, можно говорить о смещении зоны интереса исследователей

с переноса микроразмерной гистопографии костной ткани на микроархитектуру матрицы, на ее наноразмерный уровень в интересах влияния на межклеточные сигнальные взаимодействия, что пока в значительной степени реализуется через инкорпорацию в синтетические и биологические полимеры нанофазы гидроксиапатита. В этом смысле наш обзор нацеливает на исследование оптимальной микроархитектуры клеточной матрицы, обеспечивающей эффективную клеточную адгезию, пролиферацию и остеогенную индукцию прогениторных клеток, что будет определять эффекты остеоиндуктивности и остеокондуктивности в целом. Кратко освещенный в настоящем обзоре метод стереолитографии является уникальным инструментом для создания матриц на синтетической основе по целому ряду причин, позволяя не только формировать наноразмерные структуры, но и обеспечивать абсолютную воспроизводимость этих структур при масштабировании, одновременно инкорпорируя вещества, модифицирующие свойства поверхности и самой матрицы в интересах клеточно-опосредованной регенерации костной ткани.

### Литература

1. **Alsberg E, Hill EE, Mooney DJ.** Craniofacial tissue engineering. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2001; 12: 64–75.
2. **Bartolo PJ, Almeida HA, Rezende RA, et al.** Advanced processes to fabricate scaffolds for tissue engineering. In: Bidanda B, Bartolo PJ, eds, *Virtual Prototyping and Bio Manufacturing in Medical Applications.* New York, 2008: 149–170.
3. **Bessa PC, Casal M, Reis RL.** Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery). *J Tissue Eng Regen Med.* 2008; 2: 81–96. doi: 10.1002/term.74.
4. **Betz MW, Yeatts AB, Richbourg WJ, et al.** Macroporous hydrogels upregulate osteogenic signal expression and promote bone regeneration. *Bio-macromolecules.* 2010; 11: 1160–1168. doi: 10.1021/bm100061z.
5. **Buxton PG, Bitar M, Gellynck K, et al.** Dense collagen matrix accelerates osteogenic differentiation and rescues the apoptotic response to MMP inhibition. *Bone.* 2008; 43: 377–385. doi: 10.1016/j.bone.2008.03.028.
6. **Byrne EM, Farrell E, McMahon LA, et al.** Gene expression by marrow stromal cells in a porous collagen-glycosaminoglycan scaffold is affected by pore size and mechanical stimulation. *J Mater Sci Mater Med.* 2008; 19: 3455–3466. doi: 10.1007/s10856-008-3506-2.
7. **Chu TM, Orton DG, Hollister SJ, et al.** Mechanical and in vivo performance of hydroxyapatite implants with controlled architectures. *Biomaterials.* 2002; 23: 1283–1293.
8. **Ciocca L, De Crescenzo F, Fantini M, et al.** CAD/CAM and rapid prototyped scaffold construction for bone regenerative medicine and surgical transfer of virtual planning: a pilot study. *Comput Med Imaging Graph.* 2009; 33: 58–62. doi: 10.1016/j.compmedimag.2008.10.005.
9. **Collins JM, Ayala P, Desai TA, et al.** Three-dimensional culture with stiff microstructures increases proliferation and slows osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Small.* 2010; 6: 355–360. doi: 10.1002/sml.200901757.
10. **Daculsi G, Laboux O, Malard O, et al.** Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics. *J Mater Sci Mater Med.* 2003; 14: 195–200.
11. **Dean D, Wolfe MS, Ahmad Y, et al.** Effect of transforming growth factor beta 2 on marrow-infused foam poly(propylene fumarate) tissue-engineered constructs for the repair of critical-size cranial defects in rabbits. *Tissue Eng.* 2005; 11: 923–939.
12. **Dulla Roy T, Simon JL, Ricci JL, et al.** Performance of hydroxyapatite bone repair scaffolds created via three-dimensional fabrication techniques. *J Biomed Mater Res A.* 2003; 67: 1228–1237.
13. **Fisher JP, Dean D, Mikos AG.** Photocrosslinking characteristics and mechanical properties of diethyl

- fumarate/poly (propylene fumarate) biomaterials. *Biomaterials*. 2002; 23: 4333–4343.
14. **Franceschi RT, Xiao G.** Regulation of the osteoblast-specific transcription factor, Runx2: responsiveness to multiple signal transduction pathways. *J Cell Biochem*. 2003; 88: 446–454.
  15. **Gauthier O, Bouler JM, Aguado E, et al.** Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth. *Biomaterials*. 1998; 19: 133–139.
  16. **Harrington DA, Cheng EY, Guler MO, et al.** Branched peptide-amphiphiles as self-assembling coatings for tissue engineering scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2006; 78: 157–167.
  17. **Hollinger JO, Hart CE, Hirsch SN, et al.** Recombinant human platelet-derived growth factor: biology and clinical applications. *J Bone Joint Surg Am*. 2008; 90(Suppl 1): 48–54. doi: 10.1016/j.jbjs.2008.01.231.
  18. **Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM.** Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints. *Biomaterials*. 2002; 23: 4095–4103.
  19. **Hollister SJ.** Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater*. 2005; 4: 518–524.
  20. **Hutmacher DW, Sittinger M, Risbud MV.** Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems. *Trends Biotechnol*. 2004; 22: 354–362. doi: 10.1016/j.tibtech.2004.05.005.
  21. **Jansen J, Melchels FP, Grijpma DW, et al.** Fumaric acid monoethyl ester-functionalized poly(D,L-lactide)/N-vinyl-2-pyrrolidone resins for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Biomacromolecules*. 2009; 10: 214–220. doi: 10.1021/bm801001r.
  22. **Jones AC, Arns CH, Hutmacher DW, et al.** The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth. *Biomaterials*. 2009; 30: 1440–1451. doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.10.056.
  23. **Jones AC, Arns CH, Sheppard AP, et al.** Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT. *Biomaterials*. 2007; 28: 2491–2504.
  24. **Kanczler JM, Ginty PJ, Barry JJ, et al.** The effect of mesenchymal populations and vascular endothelial growth factor delivered from biodegradable polymer scaffolds on bone formation. *Biomaterials*. 2008; 29: 1892–1900. doi: 10.1016/j.biomaterials.2007.12.031.
  25. **Karageorgiou V, Kaplan D.** Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005; 26: 5474–5491.
  26. **Kasten P, Beyen I, Niemeyer P, et al.** Porosity and pore size of beta-tricalcium phosphate scaffold can influence protein production and osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells: an in vitro and in vivo study. *Acta Biomater*. 2008; 4: 1904–1915. doi: 10.1016/j.actbio.2008.05.017.
  27. **Khatiwala CB, Kim PD, Peyton SR, et al.** ECM compliance regulates osteogenesis by influencing MAPK signaling downstream of RhoA and ROCK. *J Bone Miner Res*. 2009; 24: 886–898. doi: 10.1359/jbmr.081240.
  28. **Khatiwala CB, Peyton SR, Putnam AJ.** Intrinsic mechanical properties of the extracellular matrix affect the behavior of pre-osteoblastic MC3T3–E1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006; 290: 1640–1650.
  29. **Kim K, Dean D, Mikos AG, et al.** Effect of initial cell seeding density on early osteogenic signal expression of rat bone marrow stromal cells cultured on cross-linked poly(propylene fumarate) disks. *Biomacromolecules*. 2009; 10: 1810–1817. doi: 10.1021/bm900240k.
  30. **Klenke FM, Liu Y, Yuan H, et al.** Impact of pore size on the vascularization and osseointegration of ceramic bone substitutes in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2008; 85: 777–786.
  31. **Kuo YC, Yeh CF, Yang JT.** Differentiation of bone marrow stromal cells in poly(lactide-co-glycolide)/chitosan scaffolds. *Biomaterials*. 2009; 30: 6604–6613. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.028.
  32. **Leong KF, Cheah CM, Chua CK.** Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs. *Biomaterials*. 2003; 24: 2363–2378.
  33. **Ling L, Nurcombe V, Cool SM.** Wnt signaling controls the fate of mesenchymal stem cells. *Gene*. 2009; 433: 1–7. doi: 10.1016/j.gene.2008.12.008.
  34. **Lu JX, Flautre B, Anselme K, et al.** Role of interconnections in porous bioceramics on bone recolonization in vitro and in vivo. *J Mater Sci Mater Med*. 1999; 10: 111–120.
  35. **Maegawa N, Kawamura K, Hirose M, et al.** Enhancement of osteoblastic differentiation of mesenchymal stromal cells cultured by selective combination of bone morphogenetic protein–2 (BMP–2) and fibroblast growth factor–2 (FGF–2). *J Tissue Eng Regen Med*. 2007; 1: 306–313.
  36. **Melchels FP, Feijen J, Grijpma DW.** A poly (D,L-lactide) resin for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography. *Biomaterials*. 2009; 30: 3801–3809. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.03.055.
  37. **Mistry AS, Mikos AG.** Tissue engineering strategies for bone regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 2005; 94: 1–22.
  38. **Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ.** The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen–glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2010; 31: 461–466. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.063.
  39. **Mygind T, Stiehler M, Baatrup A, et al.** Mesenchymal stem cell ingrowth and differentiation on coral-line hydroxyapatite scaffolds. *Biomaterials*. 2007; 28: 1036–1047.
  40. **Ng F, Boucher S, Koh S, et al.** PDGF, TGF–beta, and FGF signaling is important for differentiation and growth of mesenchymal stem cells (MSCs): transcriptional profiling can identify markers and signaling pathways important in differentiation of MSCs into adipogenic, chondrogenic, and osteogenic lineages. *Blood*. 2008; 112: 295–307. doi: 10.1182/blood-2007-07-103697.
  41. **Oh SH, Park IK, Kim JM, et al.** In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method. *Biomaterials*. 2007; 28: 1664–1671.
  42. **Otsuki B, Takemoto M, Fujibayashi S, et al.** Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials*. 2006; 27: 5892–6900. doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.08.013.
  43. **Park SH, Gil ES, Kim HJ, et al.** Relationships between degradability of silk scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2010; 31: 6162–6172. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.04.028.
  44. **Patel M, Dunn TA, Tostanoski S, et al.** Cyclic acetal hydroxyapatite composites and endogenous osteogenic gene expression of rat marrow stromal cells. *J Tissue Eng Regen Med*. 2010; 4: 422–436. doi: 10.1002/term.252.
  45. **Petrie Aronin CE, Sadik KW, Lay AL, et al.** Comparative effects of scaffold pore size, pore volume, and total void volume on cranial bone healing patterns using microsphere-based scaffolds. *J Biomed Mater Res A*. 2009; 89: 632–641. doi: 10.1002/jbm.a.32015.
  46. **Phadke A, Hwang Y, Kim SH, et al.** Effect of scaffold microarchitecture on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *Eur Cell Mater*. 2013; 25: 114–129.
  47. **Pham DT, Gault RS.** A comparison of rapid prototyping technologies. *Int J Machine Tools Manufacture*. 1998; 38: 1257–1287.
  48. **Robling AG, Castillo AB, Turner CH.** Biomechanical and molecular regulation of bone remodeling. *Annu Rev Biomed Eng*. 2006; 8: 455–498.
  49. **Roosa SM, Kempainen JM, Moffitt EN, et al.** The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 92: 359–368. doi: 10.1002/jbm.a.32381.
  50. **Rose FR, Cyster LA, Grant DM, et al.** In vitro assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. *Biomaterials*. 2004; 25: 5507–5514.
  51. **Roy TD, Simon JL, Ricci JL, et al.** Performance of degradable composite bone repair products made via

- three-dimensional fabrication techniques. *J Biomed Mater Res A*. 2003; 66: 283–291.
52. **Ryoo HM, Lee MH, Kim YJ.** Critical molecular switches involved in BMP-2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal cells. *Gene*. 2006; 366: 51–57.
53. **Salgado AJ, Coutinho OP, Reis RL.** Bone tissue engineering: state of the art and future trends. *Macromol Biosci*. 2004; 4: 743–765.
54. **Senta H, Park H, Bergeron E, et al.** Cell responses to bone morphogenetic proteins and peptides derived from them: biomedical applications and limitations. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009; 20: 213–222. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.05.006.
55. **Shor L, Guceri S, Wen X, et al.** Fabrication of three-dimensional polycaprolactone / hydroxyapatite tissue scaffolds and osteoblast-scaffold interactions in vitro. *Biomaterials*. 2007; 28: 5291–5297.
56. **Sundelacruz S, Kaplan DL.** Stem cell- and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin Cell Dev Biol*. 2009; 20: 646–655. doi: 10.1016/j.semdb.2009.03.017.
57. **Tare RS, Babister JC, Kanczler J, et al.** Skeletal stem cells: phenotype, biology and environmental niches informing tissue regeneration. *Mol Cell Endocrinol*. 2008; 288: 11–21. doi: 10.1016/j.mce.2008.02.01.
58. **Tierney CM, Haugh MG, Liedl J, et al.** The effects of collagen concentration and crosslink density on the biological, structural and mechanical properties of collagen-GAG scaffolds for bone tissue engineering. *J Mech Behav Biomed Mater*. 2009; 2: 202–209. doi: 10.1016/j.jmbbm.2008.08.007.
59. **Uebersax L, Hagenmuller H, Hofmann S, et al.** Effect of scaffold design on bone morphology in vitro. *Tissue Eng*. 2006; 12: 3417–3429.
60. **Volkmer E, Drosse I, Otto S, et al.** Hypoxia in static and dynamic 3D culture systems for tissue engineering of bone. *Tissue Eng Part A*. 2008; 14: 1331–1340. doi: 10.1089/ten.tea.2007.0231.
61. **Waddell JP, Morton J, Schemitsch EH.** The role of total hip replacement in intertrochanteric fractures of the femur. *Clin Orthop*. 2004; (429): 49–53.
62. **Yang S, Leong KF, Du Z, et al.** The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue Eng*. 2001; 7: 679–689.
63. **Zandi M, Mirzadeh H, Mayer C, et al.** Biocompatibility evaluation of nano-rod hydroxyapatite/gelatin coated with nano-HAp as a novel scaffold using mesenchymal stem cells. *J Biomed Mater Res A*. 2010; 92: 1244–1255. doi: 10.1002/jbm.a.32452.

**Адрес для переписки:**

Ларионов Петр Михайлович  
630091, Новосибирск, ул. Фрунзе, 17,  
НИИТО,  
ptrl@mail.ru

Статья поступила в редакцию 28.10.2013

Михаил Анатольевич Садовой, д-р мед. наук, проф.; Петр Михайлович Ларионов, д-р мед. наук, проф.; Александр Геннадьевич Самохин, канд. мед. наук; Ольга Михайловна Рожнова, канд. мед. наук, Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна.

Mikhail Anatolyevich Sadovoy, MD, DMSc, Prof.; Pyotr Mikbailovich Larionov, MD, DMSc, Prof.; Aleksandr Gennadyevich Samokhin, MD, PhD; Olga Mikbailovna Rozhnova, MD, PhD, Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopaedics n.a. Ya.L. Tsiyuan.