



Разработка и доклинические исследования ортотопических костных имплантатов на основе гибридной конструкции из поли-3-оксибутирата и альгината натрия

Бузрукзода Жавохир

Каримов Хумоюнбек

Абсаломов Дилмурод

Хайдаркулов Исфандийор

Самаркандский государственный
медицинский университет

Аннотация: Восстановление костных дефектов неправильной геометрической формы остается сложной в выполнении процедурой. Врожденные и особенно посттравматические дефекты и деформации в челюстно-лицевой области отличаются разнообразием форм, для их замещения требуются, как правило, не просто остеопластические материалы, а костные имплантаты (КИ), повторяющие форму восстанавливаемого дефекта. Благодаря современному программному обеспечению, интегрирующему в себе возможность обработки данных компьютерной томографии и виртуального объемного (3D) моделирования, у исследователей и клиницистов появилась возможность проводить компьютерное планирование реконструктивных операций и получать модели костных имплантатов, полностью конгруэнтных воспринимающему ложу, т.е. процесс подготовки модели КИ для производства можно считать вполне решаемой задачей.



Для изготовления самих КИ произвольной формы предложено несколько технологий. Одна из них — фрезерование аллокости, керамических блоков, сложных костных матриц. Однако многие исследователи отмечают, что аллокость имеет ряд недостатков, а керамика характеризуется длительным сроком резорбции. Другой многообещающей технологией для изготовления КИ является аддитивное производство, или 3D-печать. Одной из первых начала производить индивидуальные костные имплантаты методом 3D-прототипирования компания Oxford Performance Materials, Inc. В России имеется зарегистрированная и разрешенная к клиническому применению технология производства индивидуальных на костных имплантатов для контурной пластики из политетрафторэтилена, однако данный класс материалов относится к биоинертным, но не биоразлагаемым и не замещается костной тканью.

Развитие прямой 3D-печати КИ осложняется тем, что материалы, традиционно используемые для замещения костных дефектов: полимеры (полиокси-алканоаты (ПОА), полилактиды, полигликолид и др.), минеральные материалы (полигидроксипатит, соли кальция), ксено- и алломатериалы, — или не подходят для традиционных методов 3D-печати, или меняют свои физико-химические и биологические свойства и становятся непригодными для восстановления кости.

Для непрямых технологий изготовления 3D-изделий с заданной формой выбор материалов также имеет большое значение. Такие материалы должны обеспечивать заданную микроструктуру изделия, его физико-химические и биологические характеристики (достаточную прочность, пластичность, гидрофильность, способность к биодеградации, биосовместимость). Далеко не всегда один материал может обеспечить сочетание всех данных свойств, в связи с чем в последнее время активно развивается направление создания гибридных конструкций с использованием различных биополимеров и минеральных веществ.



Одними из наиболее используемых полимеров для биоинженерии твердой соединительной ткани являются ПОА и альгинаты. По своим свойствам эти полимеры сильно различаются. ПОА — это более гидрофобные, механически прочные, биodeгра-дируемые с низкой скоростью полиэфиры, тогда как альгинаты — гидрофильные, образующие гидрогели, механически непрочные полисахариды. Образование композитов из полимеров этих двух классов позволяет регулировать свойства полученного композитного материала в самых широких пределах. Альгинаты активно используются для изготовления матриц в инженерии костной, хрящевой, мягкой соединительной, мышечной тканей, тогда как матриксы на основе ПОА применяются преимущественно для регенерации костной ткани. ПОА, в частности гомополимер поли-3-оксибутират (ПОБ), получают биотехнологическим путем с использованием высокоэффективного штамма-продуцента 7Б, что дает возможность получать полимеры высокой степени очистки с заданными свойствами. Несмотря на то, что для биомедицинских целей используют альги-наты, выделенные из бурых водорослей, эти биополимеры можно также получать биотехнологическим путем с помощью штаммов-продуцентов того же самого вида бактерий.

Авторами разработан метод изготовления КИ сложной формы на основе ПОБ и альгината натрия методом двойного выщелачивания с использованием пресс-формы, выполненной методом 3D-печати.

Ключевые слова: Костные импланты, альгинат натрия, регенерация костной ткани

Цель исследования. Разработка технологии изготовления костных имплантатов на основе гибридной полимерной конструкции из поли-3-оксибутирата



и альгината натрия для направленной костной регенерации с применением метода 3D-печати.

Материалы и методы

Реактивы. Использовали ПОБ (молекулярная масса — 150 кДа) и альгинат натрия Δ та-АШс1"1; трихлорметан; карбонат аммония; стрэнг из полилактида для 3D-печати методом послойного наплавления (температура плавления — 200-255°C, плотность — 1,2-1,08 кг/м², экологически чист, не токсичен, высокая точность при печати, производство Московского завода FDPlast, ; Золетил 100 Δ гБас,; Рометар; Доксициклин; Тетрациклин; ализариновый красный.

Компьютерное моделирование и 3D-печать форм для изготовления КИ. Проведена конусно-лучевая компьютерная томография головы крысы. На основе DICOM-файлов осуществлена реформация 3D-модели черепа. По центру теменной кости смоделирован костный дефект цилиндрической формы диаметром 8 мм. Модель имплантата выполнена таким образом, чтобы не только заполнять костный дефект, но также перекрывать его снаружи.

Это позволит защитить твердую мозговую оболочку и головной мозг от внешнего воздействия. Так как исследование проводилось на крысах одной массы и размера, все модели были изготовлены также од-

ного размера представлена 3й-модель формы для изготовления КИ.

Изготовление костных имплантатов по напечатанным 3D-формам. С использованием 3й-прин-тера PrusaMendel v2 (NWRepRap), работающего по принципу послойного наплавления, были выполнены формы для КИ из полилактида. Так как в процессе изготовления КИ применяется органический растворитель



хлороформ, растворяющий полилактид, формы были изолированы алюминиевой фольгой.

Такой процесс отливки легко масштабируется для изготовления имплантатов размером не менее 5*5*5 см.

Получение полимерных матриц для изготовления костных имплантатов. С целью получения пористых матриц использована новая модификация широко применяемого для изготовления матриц в тканевой инженерии метода выщелачивания — метод двойного выщелачивания. В качестве порообразующих агентов выбраны карбонат аммония и сахароза. Размер кристаллов карбоната аммония составлял 40-94 мкм, сахарозы — 94-315 мкм. Нормирование размеров производили с помощью лабораторных сит U1-ESL с ячейками 40, 94 и 315 мкм («Крафт»).

На первой стадии метода двойного выщелачивания происходит термическое разложение карбоната аммония:



при этом образуются поры меньшего диаметра. На второй стадии воду меняли несколько раз до полного вымывания сахарозы.

Раствор ПОБ (65 мг на 1 мл трихлорметана) добавляли к смеси карбоната аммония и сахарозы (1:3) до состояния смеси, близкого к жидкой пасте. Этой смесью заполняли форму, изготовленную ранее. После испарения растворителя форму погружали в горячую воду (~90°C). После прекращения газообразования полученные матрицы удаляли из формы и промывали дистиллированной водой — 5 раз по 30 мин на шейкере.



Перед имплантацией матриксы заполняли 1% раствором альгината натрия до полного насыщения и затем помещали в 50 мМ раствора CaCl_2 до полного гелирования альгината в матриксе, после чего полученный гибридный матрикс промывали фосфатно-бу-ферным солевым раствором.

Подобная гибридная конструкция из матрикса на основе ПОБ, заполненного альгинатом натрия, была разработана с учетом ранее полученных данных. Нами установлено, что барьерная мембрана из ПОБ и паста для заполнения костных дефектов на основе микросфер из ПОБ в альгинатном геле являются эффективными для регенерации костной ткани. Кроме того, альгинат натрия может быть использован в дальнейшем в качестве средства для инкапсулирования и введения в матрикс мезенхимальных стволовых клеток и других клеток, применяемых для стимуляции регенерации костной и хрящевой тканей.

Структура и морфология матриксов. Исследование внешнего вида, морфологии и структуры полученных матриксов проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа JSM-6380LA (Tokyo Boeki Ltd.). С этой целью образцы закрепляли на алюминиевых столиках и напыляли золотом 15 мин при силе тока 15 мА (IB-3; Giko Engineering Co.).

Пористость. Пористость матриксов оценивали с помощью метода определения пористости через массу. Сначала измеряли массу пористого матрикса (Acculab AL-64, США), его диаметр и высоту, рассчитывали теоретический объем монолитного матрикса, а с учетом плотности полимера (1,25 г/см³) определяли массу сплошного непористого образца. Пористость рассчитывали по формуле:

$P = (1 - t_1/t_2)100\%$, где m_1 — измеренная масса пористого образца, а

печати; m_2 — на этапе изоляции фольгой



m_2 — расчетная масса монолитного образца без пор, объем которого совпадает с объемом пористого образца.

Наличие открытых пор выявляли путем окраски чернилами. Образец матрикса обмакивали в чернила, высушивали, после чего разрезали.

In vivo исследования на критическом костном дефекте. Для изучения регенерации костей черепа наиболее показательной является модель критического дефекта свода черепа (теменной кости) у крысы, позволяющая получить воспроизводимые данные и сравнить их с многочисленными результатами других исследований. Эту модель используют для оценки эффективности и безопасности различных костезамещающих материалов, в том числе матриксов с факторами роста и клетками.

Методика операции. Исследование проводили на 24 самцах крыс линии Wistar с массой тела 400 г. Эксперимент соответствовал рекомендациям локального при его постановке руководствовались правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» в соответствии.

Под внутрибрюшинным наркозом (Золетил 100, 125 мкг/кг массы тела) крысам производили поперечный и вертикальный латерально-смещенный разрез кожи головы, формируя треугольный лоскут, и последовательно тупым и острым путем обнажали теменные кости. Посередине сагиттального шва на теменных костях формировали круглое отверстие с помощью трепана C-reamer диаметром 8 мм и высотой 1,5 мм из набора Neobiotech SLA, избегая перфорации сагиттального венозного синуса. Рану послойно ушивали

Механизм мечения костного регенерата основывается на связывании тетрациклиноподобных флюорохро-мов и ионов кальция с образованием хелатных соединений, которые накапливаются в новообразованной костной ткани, что



обеспечивает их последующую визуализацию. Для оценки динамики неоостеогенеза на разных сроках проводили прижизненное тройное мечение новообразованной костной ткани. Всем экспериментальным крысам делали внутрибрюшинные инъекции раствора доксициклина к началу активной минерализации остеоида на 8, 9 и 10-й день после операции. Затем на 15, 16 и 17-й день эксперимента крысам внутрибрюшинно вводили раствор тетрациклина, который, включаясь в новообразованную костную ткань, образует новую меченую область. На 22, 23 и 24-й день вводили ализарин красный С для полного окрашивания краев минерализованного регенерата. Метки вводили в дозировке 25 мг/кг массы тела. Таким образом, мечение осуществляли по схеме 7-3-4-3-43-4 (три дня введения чередовались с четырехдневными перерывами).

На 28-й день, что соответствовало окончанию процессов первичного остеогенеза, крыс выводили из эксперимента передозировкой наркоза Золетил/Рометар. Скелетировали свод черепа, область регенерата выделяли с использованием хирургиче-

ских цилиндрических боров и физиодиспенсера. Полученные образцы свода черепа фиксировали в 40% этиловом спирте в течение 24 ч. Такой способ фиксации широко употребляется для сохранения флюоресцентных меток и хорошей пропитки костной ткани.

Гистологическое исследование. Образцы фиксировали в 70% этаноле в течение 24-72 ч. Затем промывали, обезвоживали и заливали в метилмета-крилат по стандартной методике, рекомендованной производителем, с последующей полимеризацией. Из полученных блоков изготавливали первичные срезы толщиной 200 мкм, из которых в свою очередь готовились вторичные срезы толщиной 40-50



мкм. Контроль толщины среза осуществляли стандартным механическим микрометром барабанного типа.

Гистологическое исследование. Образцы фиксировали в 70% этаноле в течение 24-72 ч. Затем промывали, обезвоживали и заливали в метилмета-крилат по стандартной методике, рекомендованной производителем, с последующей полимеризацией. Из полученных блоков изготавливали первичные срезы толщиной 200 мкм, из которых в свою очередь готовились вторичные срезы толщиной 40-50 мкм. Контроль толщины среза осуществляли стандартным механическим микрометром барабанного типа.

Микроскопическое исследование проводили на флюоресцентном микроскопе Leica DM 4000B (Leica Microsystems, Германия). Микрофотографирование выполняли с помощью стандартного набора светофильтров с последующим сложением RGB-каналов в единое изображение с использованием штатного программного продукта Leica для флюоресцентной микроскопии (мультиканальная гистопантомограмма).

Результаты и обсуждение

Структура и морфология матриксов. По методике двойного выщелачивания нами получены трехмерные матриксы из ПОБ (молекулярная масса — 150 кДа). Изучение образцов полимерных подложек методом сканирующей электронной микроскопии показало, что матриксы имеют трехмерную пористую структуру с разным размером пор: микропоры — 23 ± 8 мкм, макропоры — 410 ± 75 мкм.

Размер микропор более 300 мкм считается оптимальным для проникновения питательных веществ и клеток во всем объеме материала



С помощью окрашивания чернилами определяли характер системы пор. Установлено, что матриксы из ПОБ имеют сообщающуюся систему пор. В среднем пористость матриксов составила 93%.

Гистологическое исследование. При микроскопическом исследовании с использованием флюоресцентной микроскопии образцов костной ткани теменных костей крыс выявлено, что накопление флюоресцирующих меток в костной ткани произошло успешно. Однако четкого градиента окрасок на гистологических срезах при микроскопии выявить не удалось, поскольку объем костной ткани накапливался постепенно и области окрашивания перекрывались. Поканальное изучение свечения флюорохромов выявило их присутствие и накопление в своем спектре, однако совмещение изображений в единое целое уже не позволяло четко идентифицировать области накопления флюорохромов в зависимости от срока наблюдения

Заключение. Разработана комплексная методика получения гибридных полимерных 3D-матриксов заданной формы и микроструктуры, включающая методы 3D-печати, двойного выщелачивания и создания гибридных полимерных конструкций. Метод 3D-печати позволяет создавать форму для изготовления шаблонов для заполнения черепных дефектов не менее 5 мм в диаметре. Метод двойного выщелачивания позволяет изготавливать матриксы, предназначенные для заполнения костных дефектов. Полученные матриксы представляют собой гибридную конструкцию из различных биосовместимых полимеров — поли-3-оксибутирата и альгината натрия, в которой альгинат служит гидрогелем-наполнителем твердого высокопористого матрикса из поли-3-оксибутирата.

Исследования гистологических срезов образцов костной ткани при помощи флюоресцентной микроскопии с отдельным окрашиванием флюорохромами показали, что гибридный матрикс из поли-3-оксибутирата и альгината натрия



обладает ограничительной функцией, обеспечивая условия для нормальной регенерации плоских костей черепа у крыс. Разработанный гибридный 3D-матрикс не препятствует течению нормального остеогенеза и обеспечивает благоприятные для регенерации условия.

Список Литературы:

1. Jardini A.L., Larosa M.A., Maciel Filho R., Zavaglia C.A., Bernardes L.F., Lambert C.S., Calderoni D.R., Kharmandayan P. Cranial reconstruction: 3D biomodel and custom-built implant created using additive manufacturing. J Craniomaxillofac Surg 2014; 42(8): 1877-1884,
2. van der Meer W.J., Bos R.R., Vissink A., Visser A. Digital planning of cranial implants. Br J Oral Maxillofac Surg 2013; 51(5): 450-452,
3. Muraev A.A., Dymnikov A.B., Korotkova N.L., Kobets K.K., Ivanov S.Y. Planning technique in maxillofacial plasty. Sovremennye tehnologii v medicine 2013; 5(3): 57-62.
4. Knox G. Surgical bone and cartilage shaping on demand with 3D CAD/CAM. Patent US 8,483,63 B1. 2013.
5. Jacotti M., Barausse C., Felice P. Posterior atrophic mandible rehabilitation with onlay allograft created with CAD/CAM procedure: a case report. Implant Dent 2014; 23(1): 2228,.
6. Garagiola U., Grigolato R., Soldo R., Bacchini M., Bassi G., Roncucci R., De Nardi S. Computer-aided design/ computer-aided manufacturing of hydroxyapatite scaffolds for bone reconstruction in jawbone atrophy: a systematic review and case report. Maxillofac plast Reconstr Surg 2016; 38(1), .
7. Mangano F., Macchi A., Shibli J.A., Luongo G., Iezzi G., Piattelli A., Caprioglio A., Mangano C. Maxillary ridge augmentation with custom-made CAD/CAM scaffolds. A 1-year prospective study on 10 patients. J Oral Implantol 2014; 40(5): 561-569, .



8. Kuznetsova D.S., Timashev P.S., Bagratashvili V.N., Zagaynova E.V. Scaffold- and cell system-based bone grafts in tissue engineering (review). *Sovremennye tehnologii v medicine* 2014; 6(4): 201-212.

9. OpM Receives FDA clearance for 3D printed OsteoFab patient-specific facial device. 2014..

10. Greenstein G., Carpentieri J.R. Utilization of d-PTFE barriers for post-extraction bone regeneration in preparation for dental implants. *Compend Contin Educ Dent* 2015; 36(7): 465-473.

11. López N.I., Pettinari M.J., Nikel P.I., Méndez B.S. Polyhydroxyalkanoates: much more than biodegradable plastics. In: *Advances in applied microbiology*. Elsevier BV; 2015; p. 73-106,

12. Фуркатов, Ш., Хайдаркулов, И., Нарзиев, И., & Аъзамкулов, А. (2024).

ВЛИЯНИЕ КУРЕНИЯ НА ЗДОРОВЬЕ ПАРОДОНТА: ОСВЕДОМЛЕННОСТЬ

ПАЦИЕНТОВ МЕДИЦИНСКОГО КОЛЛЕДЖА АБУ АЛИ ИБН

СИНО. SAMARALI TA'LIM VA BARQAROR INNOVATSIYALAR JURNALI, 1(6), 574-

581.

13. Akmal o'g'li J. E., Umar o'g'li B. X. The Use of a Composite Synthetic Osteoplastic Substitute to Increase the Volume of the Alveolar Bone of the Jaws Before Dental Implantation // *Research Journal of Trauma and Disability Studies*. – 2024. – Т. 3. – №. 2. – С. 358-362.



14. Furkatov S. F., Khazratov A. I. THE CONSEQUENCES OF THE DILIGENCE OF THE

SLAVIC EMOLLIENT FOR REPARATION PROSTHESES ASEPT PARODONTAL

//Молодежный инновационный вестник. – 2023. – Т. 12. – №. S2. – С. 467-470.

15. Исматов Ф. А., Мустафоев А. А., Фуркатов Ш. Ф. АНАЛИЗ ЭФФЕКТИВНОСТИ
НЕСТЕРОИДНЫХ АНТИВОСПОЛИТЕЛЬНЫХ ПРЕПАРАТОВ ПРИ ИЗЛЕЧЕНЬЕ

ВЕРХНЕЧЕЛЮСТНОГО АЛЬВЕОЛИТА //THEORY AND ANALYTICAL ASPECTS
OF RECENT RESEARCH. – 2023. – Т. 1. – №. 12. – С. 49-57.

16. Rizaev, J. A., Khazratov, A. I., Furkatov Sh, F., Muxtorov, A. A., & Ziyadullaeva, M.
S.

(2023). Clinical and radiological characteristics of periodontic interweaves in patients with
chew recession. European Journal of Interdisciplinary Research and Development, 11,
36-41.

17. Фуркатов Ш. Ф., Хатамова М. А. ПРИМЕНЕНИЯ ВРЕМЕННЫХ НЕСЪЕМНЫХ
ЗУБНЫХ ПРОТЕЗОВ ПРИ ДЕНТАЛЬНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ //АКТУАЛЬНЫЕ
ВОПРОСЫ СТОМАТОЛОГИИ. – 2023. – С. 814-820.

18. Rizaev, J. A., Rustamova, D. A., Khazratov, A. I., & Furkatov, S. F. (2022). The need
of
patients with systemic vasculitis and coronavirus infection in the treatment of periodontal
diseases. Applied Information Aspects of Medicine (Prikladnye informacionnye aspekty
meditsiny), 25(4), 40-45.



19. Bekmurotov L. R. et al. Cardiovascular diseases in patients with diabetes mellitus //Ta'lim

va rivojlanish tahlili onlayn ilmiy jurnali. – 2023. – T. 3. – №. 1. – С. 193-198.

20. Akmal o'g'li J. E., Umar o'g'li B. X. Radiation Research Methods as a Criterion For Assessing the Quality of Osteoregenerative After Sinus Lift //Best Journal of Innovation in Science, Research and Development. – 2024. – T. 3. – №. 2. – С. 920-923.

21. Исхакова, З. Ш., Исхакова, Ф. Ш., Нарзиева, Д. Б., Абдуллаев, Т. З., & Фуркатов, Ш.

Ф. (2023). Использование остеогенного материала для замещения полостных дефектов челюстей. Formation of psychology and pedagogy as interdisciplinary sciences, 2(15), 43-48.