

# КОСТНЫЕ ИМПЛАНТАТЫ НА ОСНОВЕ СКАФФОЛДОВ И КЛЕТОЧНЫХ СИСТЕМ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ (ОБЗОР)

УДК 57.089.002.3:616.7–089.843

Поступила 23.07.2014 г.



**Д.С. Кузнецова**, аспирант<sup>1</sup>; младший научный сотрудник НИИ биомедицинских технологий<sup>2</sup>;

**П.С. Тимашев**, к.х.н., старший научный сотрудник<sup>3</sup>;

**В.Н. Баграташвили**, д.ф.-м.н., профессор, руководитель отдела лазерной атомно-молекулярной технологии<sup>3</sup>;

**Е.В. Загайнова**, д.м.н., директор НИИ биомедицинских технологий<sup>2</sup>; зав. кафедрой биомедицины<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского — Национальный исследовательский университет, Н. Новгород, 603950, проспект Гагарина, 23;

<sup>2</sup>Нижегородская государственная медицинская академия, Н. Новгород, 603000, пл. Минина и Пожарского, 10/1;

<sup>3</sup>Отделение перспективных лазерных технологий Института проблем лазерных и информационных технологий РАН, г. Троицк, Московская область, 142092, ул. Пионерская, 2

Рассмотрены современные тенденции тканевой инженерии, в том числе в челюстно-лицевой хирургии, в основе которых лежит использование скаффолдов, аутологичных стволовых клеток и биоактивных веществ. Отражены преимущества и недостатки основных используемых материалов для синтеза скаффолдов — трехмерных пористых или волокнистых матриц, выполняющих функцию механического каркаса для клеток. К таким материалам относятся натуральные полимеры (коллаген, целлюлоза, фибронектин, хитозан, альгинат и агароза, фиброин), синтетические полимеры (полилактид, полигликолид, поликапролактон, поливиниловый спирт) и биокерамика (гидроксиапатит, трикальций фосфат и биоактивные стекла). Показаны методы получения матриц, особое внимание уделено инновационным технологиям быстрого прототипирования — процесса формирования трехмерного объекта по цифровой модели, из которых наиболее применимыми для биополимеров являются лазерная стереолитография, селективное лазерное спекание, моделирование методом наплавления и 3D-печать. Большое место отведено использованию биоактивных веществ в процессе получения биоинженерных конструкций на основе скаффолдов — посадке стволовых клеток на матрицы перед трансплантацией их в место дефекта. Особое значение придается актуальному направлению клеточной биологии — использованию мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (наиболее распространенных клеток, применяемых в регенерации костных тканей), в частности представлены доступные источники их выделения и варианты направленной остеогенной дифференцировки. Освещены особенности и цели включения биоактивных веществ в структуру скаффолда — не только индуцировать остеогенную дифференцировку, но и привлечь собственные стволовые клетки организма, а также стимулировать ангиогенез.

**Ключевые слова:** тканевая инженерия; дефекты костной ткани; скаффолд; мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки; клеточная терапия.

## English

## Scaffold- and Cell System-Based Bone Grafts in Tissue Engineering (Review)

**D.S. Kuznetsova**, Postgraduate<sup>1</sup>; Junior Research, Scientific Research Institute of Biomedical Technologies<sup>2</sup>;

**P.S. Timashev**, PhD, Senior Research Worker<sup>3</sup>;

**V.N. Bagratashvili**, D.Phys-Math.Sc., Professor, Head of Laser Atomic and Molecular Technology Unit<sup>3</sup>;

**E.V. Zagaynova**, D.Med.Sc., Director of Scientific Research Institute of Biomedical Technologies<sup>2</sup>;  
Head of the Department of Biomedicine<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Lobachevsky State University of Nizhni Novgorod — National Research University, Prospekt Gagarina, 23, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603950;

<sup>2</sup>Nizhny Novgorod State Medical Academy, Minin and Pozharsky Square, 10/1, Nizhny Novgorod, Russian Federation, 603005;

<sup>3</sup>The Department of Advanced Laser Technologies, Institute on Laser and Information Technologies, Russian Academy of Sciences, Pionerskaya St., 2, Troitsk, Moscow region, Russian Federation, 142092

The review considers the current trends in tissue engineering including maxillofacial surgery based on the use of scaffolds, autologous stem cells and bioactive substances. The authors have shown the advantages and disadvantages of basic materials used for scaffold synthesis —

**Для контактов:** Кузнецова Дарья Сергеевна, e-mail: [daria.s.kuznetsova@gmail.com](mailto:daria.s.kuznetsova@gmail.com)

three-dimensional porous or fiber matrices serving as a mechanical frame for cells; among such materials there are natural polymers (collagen, cellulose, fibronectin, chitosan, alginate and agarose, fibroin), synthetic polymers (polylactide, polyglycolide, polycaprolactone, polyvinyl alcohol) and bioceramics (hydroxyapatite, tricalcium phosphate and bioactive glasses). There have been demonstrated the matrix techniques, special attention being paid to innovative technologies of rapid prototyping — the process of 3D-imaging according to a digital model. The most applicable of these techniques for biopolymers are laser stereolithography, selective laser sintering, fused deposition modeling, and 3D-printing. Great emphasis has been put on the use of bioactive substances in the process of obtaining scaffold-based bioengineered constructions — setting of stem cells on matrices before their transplantation to the defect area. Special attention has been given to a current trend of cellular biology — the application of multipotent mesenchymal stromal cells (most common marrow cells used in bone tissue regeneration), in particular, the available sources of their isolation and the variants of directed osteogenic differentiation have been presented. The review covers the characteristics and aims of bioactive substance inclusion in scaffold structure — not only to induce osteogenic differentiation, but also to attract new stem cells of a carrier, as well as promote angiogenesis.

**Key words:** tissue engineering; bone tissue defects; scaffold; multipotent mesenchymal stromal cells; cell therapy.

Лечение дефектов костных тканей, полученных в результате механических травм, врожденных аномалий или хирургических вмешательств, продолжает оставаться актуальной медицинской и социальной проблемой. Восстановлением и замещением поврежденной костной ткани занимается тканевая инженерия, которая входит в число главных междисциплинарных областей [1]. Первые разработки по устранению костных дефектов можно отнести к 70-м годам XX в., когда были предприняты попытки использования собственной (аутологичной) кости. Этот метод остается широко распространенным и на сегодняшний день [2], однако хорошо известны его недостатки: ограничение объема трансплантата, повреждение донорского участка, различие в структуре и биомеханике частей скелета [3], инфицирование и иммунологическое отторжение трансплантата [4]. Использование синтетического биоинертного материала (полимеры, фосфаты кальция, пластмассы, металлы и т.д.) ксеногенного и аллопластического происхождения частично решает проблемы размера и формы, обеспечения механической прочности и иных специфических требований к имплантатам, но их остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства все же значительно уступают аутологичным или аллогенным материалам [2]. В настоящее время данная проблема решается производством индивидуальных имплантатов с добавлением биоактивных веществ на основе скаффолдов из синтетических биорезорбируемых материалов, которые заселяются аутологичными стволовыми клетками пациента, вследствие чего с большой точностью по структурным и биомеханическим особенностям соответствуют поврежденному участку, а также не имеют иммунологического отторжения [5]. Таким образом, пластика костных дефектов объединяет сложные технологии, ключевыми компонентами которых являются скаффолды, аутологичные стволовые клетки и биоактивные вещества [1].

### Скаффолды в тканевой инженерии

Скаффолды представляют собой трехмерные пористые или волокнистые матрицы, основная функция которых состоит в обеспечении механического каркаса для клеток [6]. В идеале скаффолды должны обладать рядом свойств, позволяющих достигнуть формирова-

ния полноценной костной ткани. Такими свойствами являются: наличие адгезивной поверхности, способствующей пролиферации и дифференцировке клеток; биосовместимость и отсутствие иммунологического отторжения; нетоксичность; биodeградация, скорость которой соответствовала бы росту собственной ткани; оптимальный размер пор для пространственного распределения клеток, васкуляризации, а также диффузии питательных веществ и удаления продуктов жизнедеятельности [7].

**Основные материалы для получения скаффолдов.** Выбор материала — один из важнейших этапов пластики костных дефектов. Исходя из того факта, что скаффолды выполняют функции, аналогичные функциям внеклеточного матрикса, основополагающим фактором при выборе материала является его способность к частичной имитации внеклеточного матрикса [1]. В целом можно выделить три основные группы материалов, применяемых при изготовлении скаффолдов: природные полимеры, синтетические полимеры и керамика [8, 9].

**1. Природные полимеры.** Как следует из названия, эти материалы получают из натуральных источников. Как правило, они состоят из полимерной сети, которая может содержать до 99% воды. В результате этого натуральные полимеры называют гидрогелями, их способность набухания в воде позволяет имитировать высоко гидратированное состояние живых тканей [10, 11]. Другой причиной, по которой природные полимеры представляют особую ценность в тканевой инженерии, является их структура, сильно схожая со структурой внеклеточного матрикса, что способствует повышению остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств матриц [9]. Группа природных полимеров включает полипептиды, полисахариды, сложные полиэферы, а также их комбинации [12]. Рассмотрим наиболее распространенные из них подробнее.

**Коллаген** — один из наиболее распространенных природных материалов, на основе которых получают скаффолды. Это фибриллярный белок, составляющий основу соединительной ткани организма и обеспечивающий ее прочность и эластичность. Вместе с гидроксипатитом коллаген служит одним из двух основных компонентов кости [13]. Поскольку коллаген является «родным» для организма млекопитающих, он нашел

широкое применение как в биомедицинских, так и в коммерческих технологиях [14–20]. Такие преимущества, как биосовместимость, способность к адгезии, волокнистая структура и хорошая сочетаемость с другими материалами, позволяют использовать данный материал для получения скаффолдов в тканевой инженерии [21–23]. Наиболее часто применяемым является коллаген 1-го типа [21, 24]. В качестве костно-пластического материала может выступать как нативный коллаген, так и денатурированный, в виде желатина. Кроме того, путем обработки нативного коллагена можно получить большое разнообразие его форм для дальнейшего изготовления скаффолдов: от пористых губок до волокнистых решеток [8, 21].

Однако данный материал имеет и существенные недостатки. Коллаген в связи с его белковой природой представляет собой хорошо биоразлагаемый материал, который в результате катаболических процессов, в том числе воздействия специфических коллагеназ и фагоцитоза, имеет очень высокую скорость биodeградации. Данный недостаток устраняется введением сшивок между полипептидных цепей [25]. Второй проблемой является наличие по краям тройной спирали коллагена коротких неспиральных последовательностей, теплопептидов, обладающих иммуногенными свойствами [25–27]. Ферментативная экстракция протеазами позволяет избавиться от нежелательных доменов, не затрагивая при этом тройную спираль коллагена. Третий недостаток включает плохие механические свойства, что очень важно для обеспечения каркасной функции скаффолдов. Этот вопрос также пытаются решать путем химической модификации материала [21, 25].

*Целлюлоза* — наиболее распространенный в природе полисахарид, являющийся основным компонентом клеточных стенок высших растений и представляющий собой повторяющийся остаток  $\beta$ -глюкозы [28, 29]. Как и коллаген, целлюлоза в качестве материала для тканевой инженерии показала хорошую биосовместимость, способность к клеточной адгезии, высокую степень гидрофильности [11, 29, 30]. Кроме того, данный материал имеет значительный порог прочности при растяжении, а также легко поддается механической обработке [31].

Главными недостатками целлюлозы являются плохая биodeградация вследствие отсутствия у человека специфических ферментов гидролаз для ее расщепления и высокая плотность наночибрилл, что ограничивает заселение скаффолда нужными клетками [11, 30, 32]. Для устранения этих недостатков в качестве строительного материала используют производные целлюлозы, включающие карбоксиметилцеллюлозу, гидроксиэтилцеллюлозу, гидроксипропилцеллюлозу, гидроксипропилметилцеллюлозу и ацетат целлюлозы [33, 34].

*Фибронектин* — один из ключевых белков межклеточного матрикса, структурный гликопротеин, синтезируемый и выделяемый в межклеточное пространство многими видами клеток. Он состоит из двух идентичных полипептидных цепей, соединенных дисульфидными мостиками у C-концов. Фибронектин способен связывать коллаген, протеоглики, гиалурионовую кислоту, углеводы плазматических мембран, гепарин, фермент

трансглутаминазу и, соответственно, может выполнять интегрирующую функцию в организации межклеточного вещества, а также увеличивать клеточную адгезию за счет способности связываться с трансмембранными интегринами [35, 36]. Контролируемая скорость биodeградации, отсутствие токсичности и воспалительных реакций позволяют использовать фибронектин в тканевой инженерии [12].

*Хитозан* — производное линейного полисахарида, макромолекулы которого состоят из случайно связанных  $\beta$ -(1-4)-D-глюкозаминовых звеньев и N-ацетил-D-глюкозамина. Данный материал обычно получают из хитина, встречающегося в составе оболочек ракообразных, кутикулы насекомых и клеточной стенки грибов [8, 37].

Ряд преимуществ делают хитозан широко используемым в тканевой инженерии. В отличие от синтетических материалов этот природный полимер растворим при  $\text{pH} < 5,5$  и, соответственно, не требует жестких условий обработки [8, 11]. Наличие боковых катионных групп для присоединения к другим молекулам позволяет комбинировать хитозан с различными биоактивными веществами. Также этот полимер показывает хорошую биосовместимость, отсутствие иммунологического отторжения и, что очень важно, противомикробные свойства в отношении некоторых бактерий и грибов [38–40]. Механизм, обуславливающий эту способность, до конца не выявлен. По некоторым предположениям, катионные группы хитозана могут связываться с анионными группами клеточной стенки бактерий, нарушая транспорт веществ и подавляя биосинтез, что приводит к гибели бактерий [41].

Главным недостатком этого природного полимера является низкий уровень механической прочности, что решается комбинированием хитозана с другими материалами [8].

*Альгинат и агароза* — линейные полисахариды, выделяемые из красных и бурых водорослей. Обычно эти полисахариды используют вместе для улучшения механических и адгезивных свойств [8, 42]. Альгинат представляет собой сочетание таких мономеров, как  $\beta$ -D-маннуриновая кислота и  $\alpha$ -L-гулуриновая кислота, а агароза состоит из  $\beta$ -D-галактопиранозы и 3,6-ангидридо- $\alpha$ -1-галактопиранозы. В присутствии двухвалентных катионов, таких как  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  и  $\text{Sr}^{2+}$ , эти полисахариды подвергаются ионотропному гелеобразованию [43]. В целом материал показывает хорошую биосовместимость, пористость, оптимальную для клеточной миграции и доставки питательных веществ, а также поддержание хондрогенной дифференцировки [8, 42, 44]. Однако биodeградация альгината и агарозы является довольно медленным и мало контролируемым процессом [8].

*Фиброин* — фибриллярный белок, составляющий основу нитей паутины и коконов насекомых, в частности шелка тутового шелкопряда. Данный белок обладает рядом свойств, делающих его привлекательным материалом в тканевой инженерии для регенерации костной ткани [45]. Эти свойства включают хорошую биосовместимость, высокую степень жест-

кости и прочности, биодegradацию, универсальность в обработке для биомедицинских приложений [46–48]. Размер пор и механические свойства фиброиновых скаффолдов можно контролировать путем изменения концентрации фиброина и размера частиц порообразователя. К тому же данный материал не требует дополнительной стабилизации химическими сшивками. Недостатком фиброиновых матриц является невысокая скорость биодegradации, которой не всегда достаточно для замещения новообразованной костной тканью дефекта, что успешно решается химической модификацией [46, 48].

2. *Синтетические полимеры.* Анализ свойств натуральных полимеров показывает, что одним из объединяющих их недостатков является малая механическая прочность. Если учитывать факт, что каркасная функция — это главная функция скаффолдов, то данный недостаток представляется существенной проблемой при регенерации костных тканей [6]. Альтернативой натуральным материалам служат синтетические полимеры. Благодаря большому количеству методов синтеза и обработки материалов можно легко получить как необходимую форму, так и широкий спектр физико-химических свойств матриц [49].

Синтетические полимеры в основном делят на две группы: биодegradируемые и небидegradируемые. Биодegradируемые материалы включают полилактид, полигликолид, их сополимер полилактогликолид, поликапролактон, полицианоакрилат и др. В группу небидegradируемых полимеров входят поливиниловый спирт, полигидроксиэтилметакрилат, поли-N-изопропилакриламид и др. [49].

*Полилактид* — биодegradируемый, термопластичный, алифатический полиэфир, который может быть получен путем поликонденсации молочной кислоты и полимеризации лактида — димера молочной кислоты. В производстве обычно используют комбинацию этих методов [50]. Лактид обладает оптической активностью и может существовать в виде стереоизомеров L-лактида, D-лактида и рацемических форм LD-лактида. Соответственно, в зависимости от того, из какой формы состоит полилактид, меняются его характеристики. L- и D-лактиды имеют высокую степень кристалличности и схожие физико-химические свойства, LD-лактид представляет собой аморфный материал [51]. Полученный из L-лактида полимер имеет очень низкую скорость биодegradации (полное разложение может происходить в течение нескольких лет). Полилактид из LD-лактида как аморфный материал имеет, напротив, высокую скорость биодegradации, но его механические свойства достаточно низкие. Сопolíмеры L-лактида и LD-лактида придают полилактиду механическую прочность и приемлемую скорость дегradации [52]. Еще одним плюсом полилактида является хорошая биосовместимость [49].

Недостаток данного полимера заключается в плохой смачиваемости и, соответственно, неравномерном распределении клеток. Продуктами его распада являются  $\text{CO}_2$  и вода, что приводит к локальному закислению. Не исключены воспалительные реакции при введении по-

лилактида в организм. Также этот материал показывает недостаточную прочность при сжатии [49, 53].

*Полигликолид* — это самый простой линейный алифатический полиэфир, представляющий собой полимер гликолевой кислоты [54]. От полилактида он отличается высокой степенью кристалличности из-за отсутствия в структуре боковых метильных групп и низкой скоростью дегradации. В регенерации костных тканей обычно используют сополимер полилактида и полигликолида — полилактогликолид. Данный сополимер является довольно привлекательным материалом для тканевой инженерии по причине хорошей биосовместимости, возможности модулирования скорости биодegradации. К тому же под воздействием подсаженных клеток полилактогликолид разлагается на мономеры — природные метаболиты, такие как молочная и гликолевая кислоты, хотя это может вызывать и негативные последствия в связи с нежелательным закислением [45].

В целом использование различных комбинаций стереоизомеров полилактида, сополимеризации полилактида и полигликолида направлено на регуляцию скорости биодegradации скаффолдов [45].

*Поликапролактон* — биодegradируемый, полукристаллический, алифатический полиэфир, в качестве его мономера выступает капролактон [55]. Данный материал обладает хорошими механическими свойствами, биосовместимостью, а также довольно легок в обработке [56]. Однако из-за внутренней гидрофобной структуры и отсутствия биоактивных функциональных групп поликапролактон представляет собой не очень благоприятную среду для роста клеток, что ограничивает применение этого полимера в тканевой инженерии [55, 57]. На данный момент многие методики направлены на модификацию поверхности поликапролактона адгезивными материалами [55, 56].

*Поливиниловый спирт* — материал из группы небидegradируемых синтетических полимеров, он представляет собой термопластичный полимер, получаемый путем гидролиза сложных поливиниловых эфиров [49]. Поливиниловый спирт — механически стабильный и гибкий материал, растворяющийся в воде при достаточно высоких температурах — порядка  $70^\circ\text{C}$  [49, 58]. В список его достоинств можно также включить высокую степень гидрофильности и полупроницаемость для кислорода и питательных веществ [59].

Несмотря на прекрасные механические качества, отсутствие биодegradации, как и у всех материалов этой группы, является серьезным ограничением в использовании данного полимера [49].

3. *Биокерамика.* Включает в себя группу инертных и полуинертных материалов, имеющих керамическую природу. В тканевой инженерии наиболее часто встречаются такие керамические материалы, как гидроксипатит, трикальций фосфат, биоактивные стекла различного состава [49]. Все материалы данной группы показывают отличную биосовместимость за счет их присутствия в минеральной фазе костной ткани [60].

*Гидроксиапатит* — основная минеральная составляющая костной ткани [61]. В качестве материала для костной регенерации этот минерал показывает вы-

сокую степень биосовместимости, а также хорошие остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства [49, 62, 63]. В чистом виде для получения скаффолдов гидроксиапатит практически не используется в связи с плохими механическими свойствами, отсутствием пористой структуры, малой скоростью биодеградации и хрупкостью [49, 63]. В настоящее время гидроксиапатит широко применяется в тканевой инженерии в качестве дополнительного материала для увеличения остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств скаффолдов.

*Трикальций фосфат* представляет собой третичный фосфат кальция, также известный как костяная зола. Данный фосфат служит богатым источником кальция и фосфора, которые находятся в доступной для клеток форме [64]. В связи с этим в отличие от гидроксиапатита трикальций фосфат является хорошо биодеградируемым материалом [65]. В остальном этот материал имеет схожие свойства с гидроксиапатитом [49].

*Биоактивные стекла* — это группа поверхностно-активных стеклокерамических биоматериалов, основными компонентами которых являются  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$  и  $\text{P}_2\text{O}_5$  [66]. Показано, что после имплантации на поверхности биоактивных стекол происходит ряд специфических реакций, приводящих к образованию аморфного фосфата кальция или кристаллического гидроксиапатита, что благоприятно для формирования костной ткани [67]. К тому же данный материал имеет способность к высвобождению критических концентраций ионов Si, Ca, P и Na, которые индуцируют остеогенез, а путем изменения концентрации различных компонентов можно адаптировать скорость деградации скаффолдов [67, 68]. Ограничивающим фактором в использовании биоактивных стекол является их низкая прочность и хрупкость, что на данный момент решается оптимизацией состава, обработки и условий спекания [67].

**4. Комбинация материалов.** В целом стоит отметить, что при синтезе скаффолдов очень редко используется какой-либо один компонент. Чаще всего для оптимизации параметров и получения необходимых характеристик матриц при изготовлении используют комбинацию нескольких материалов, имеющих разные свойства [69]. Например, стабильность полимеров, обладающих недостаточной механической прочностью, может быть усилена путем добавления прочных полимеров. Аналогичным образом к материалам, которые имеют слабые остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства, могут быть добавлены более биоактивные полимеры [11].

**Методы получения скаффолдов.** Вторым важным шагом после подбора материала является принятие решения об использовании того или иного метода получения скаффолдов с заданными свойствами. В настоящее время существует огромное количество технологий, позволяющих получать матрицы нужной формы, размера и состава.

**1. Методы, основанные на использовании растворителей и высоких температур.** Для изготовления волоконных и пористых структур из биодеградируемых

натуральных и синтетических полимеров используют такие методы, как электроспиннинг, фазоразделение, лиофилизация, газовое вспенивание, выщелачивание [70].

*Электроспиннинг* позволяет под действием электростатических сил вытягивать наноразмерные волокна нужного диаметра из жидкости или расплава и формировать из них скаффолды [71]. Степень механической прочности таких волоконных матриц не высока, а размер пор ограничивается диаметром волокон [72].

Методом *фазоразделения* при создании определенных температурных условий можно добиться получения двух фракций, полимеробедненной и полимербогатой, которые распределены диффузно по отношению друг к другу. После удаления растворителя и, соответственно, полимеробедненной фракции оставшаяся полимербогатая фракция затвердевает, формируя волокнистые и пористые структуры [73]. Контроль внутренней морфологии скаффолдов, получаемых данным методом, мало осуществим [74].

Метод *лиофилизации* основан на принципе сублимации. Раствор полимера подвергают воздействию низких температур, а затем удаляют растворитель в вакуумной камере возгонкой или сублимацией [75]. Размер пор можно регулировать изменением скорости замораживания раствора полимера и pH, но главное преимущество метода в том, что он не требует высоких температур и отдельной стадии выщелачивания. Длительное время обработки и относительно малый размер пор ограничивают использование метода лиофилизации [75, 76].

Путем *газового вспенивания* можно получить пористые скаффолды без использования органических растворителей и высоких температур. Сущность метода заключается в том, что полимер насыщается газом в камере высокого давления, а затем вспенивается путем понижения давления. Таким образом формируется структура, пористость которой контролируется скоростью сброса давления и количеством растворенного газа [77]. Недостатком данного метода являются плохие механические свойства скаффолдов, а также недостаточная взаимосвязь пор [78].

С помощью метода *выщелачивания* получают раствор полимера и смешивают его с водорастворимыми солями (хлорид натрия, цитрат натрия и др.). Затем данную смесь заливают в сосуд требуемой формы и удаляют растворитель выпариванием или лиофилизацией. Частицы соли вымываются, образуется пористая структура. Данный метод прост в осуществлении, к тому же размер пор скаффолдов поддается легкому контролю. Однако форма пор ограничена кубической формой кристаллов соли, а трудность удаления растворителя из внутренних пор скаффолда ограничивает его толщину [79, 80].

В целом все основанные на использовании растворителей и высоких температур методы отличаются несколькими общими недостатками. Во-первых, формирование внутренней структуры скаффолдов является малоконтролируемым процессом и получить матрицы точно заданной морфологии нет возможности. Во-вто-

рых, многие технологии нуждаются в использовании органических растворителей, таких как хлороформ или хлористый метилен [81]. Удаление этих веществ и их следов из полимерных структур требует применения дорогостоящих и не всегда эффективных процедур, которые к тому же могут проводиться при повышенных температурах, в результате чего наблюдается снижение физико-химических и механических свойств матриц. Кроме того, применение высоких температур ограничивает включение биоактивных веществ.

На данный момент существует группа крайне актуальных технологий, направленных на решение данной проблемы, — быстрое прототипирование [82].

**2. Быстрое прототипирование.** Данный метод представляет собой процесс формирования трехмерного объекта практически любой формы по цифровой модели. Быстрое прототипирование может осуществляться разными способами с использованием разнообразных материалов, но любой из этих способов базируется на принципе послойного синтеза твердого объекта [83]. В настоящее время существует большое количество технологий прототипирования, однако наиболее применимыми для биополимеров являются лазерная стереолитография, селективное лазерное спекание, моделирование методом наплавления и 3D-печать [83–85].

Метод *лазерной стереолитографии* базируется на процессе фотополимеризации. Для получения матриц данным способом используют жидкий фотополимер, способный затвердевать под воздействием лазерного излучения. Формирование скаффолдов происходит послойно, при этом первый слой облученного фотополимера прикреплен к двигающейся платформе, которая после каждого цикла полимеризации перемещается на высоту одного слоя для дальнейшей обработки [85, 86]. В качестве биополимеров, подходящих для лазерной стереолитографии, могут выступать как модифицированные синтетические (поликапролактон, полилактид, полипропилен фумарат), так и некоторые натуральные полимеры (альгинат, хитозан, гиалуроновая кислота, фибрин), которые, однако, нуждаются в добавлении дополнительных агентов для межмолекулярных сшивок [86–88].

Существует усовершенствованная технология лазерной стереолитографии — двухфотонная фотополимеризация. В данном случае материал полимеризуется в результате почти одновременного поглощения двух фотонов под воздействием фемтосекундного лазера [86, 89, 90]. Двухфотонное поглощение реализуется в очень малом 3D-объеме в окрестности фокуса, позволяя таким образом добиться гораздо большего пространственного разрешения формируемого объекта [91].

*Селективное лазерное спекание*, как и предыдущий метод, позволяет получать 3D-объекты с точно заданной структурой по цифровой модели. Для изготовления скаффолдов данным методом необходим порошковый термопластический материал, способный к плавлению под воздействием инфракрасного лазерного излучения. Такой материал помещают на платформу, после чего лазерный пучок формирует нижний слой заданного

объекта. Далее платформа опускается на высоту одного слоя и цикл повторяется [92, 93]. Пространственное разрешение объекта зависит от диаметра лазерного пучка. Полиамид, полистирол и полипропилен являются основными термопластическими материалами для селективного лазерного спекания. В связи с небольшим количеством подходящих полимеров для получения скаффолдов идет разработка модификаций данного метода [92].

Поверхностное селективное лазерное спекание — новый подход к формированию объектов, в котором отсутствует температурное воздействие непосредственно на полимер, что позволяет использовать большее количество материалов, включая биоактивные добавки [94]. Принципиальное отличие такого подхода заключается в том, что на поверхность частиц полимера наносится небольшое количество сенсibiliзирующего материала (например, углерода), который способен к интенсивному поглощению лазерного излучения ближней инфракрасной области. Непосредственное воздействие лазера осуществляется только на частицы сенсibiliзатора, а полимер и включенные в него биоактивные вещества остаются в неизменном состоянии [94, 95].

При *моделировании методом наплавления* объект формируется путем послойного укладывания расплавленной нити из используемого материала. Для этого в экструзионную головку подается полимер и разогревается до необходимого состояния. Затем экструзионная головка с высокой точностью помещает материал на поддерживающую платформу, которая после этого опускается на высоту одного слоя. Процесс нанесения расплавленной нити повторяется [96, 97]. Для данного метода подходят практически любые термопластические полимеры. В некоторых работах показана возможность получения образцов из таких материалов, как поликапролактон, полипропилен, их комбинации с гидроксипатитом и трикальций фосфатом [98–100]. Однако в моделировании методом наплавления нерешенным остается вопрос о разрушающем действии высоких температур на биоактивные вещества.

*3D-печать.* В настоящее время данный термин используется как синоним быстрого прототипирования, однако изначально 3D-печать обозначала одну конкретную технологию получения трехмерных объектов. Эта технология заключается в избирательном нанесении связующей жидкости печатающей головкой на слой порошка нужного материала. Затем на «склеенный» участок 3D-объекта наносится новый пласт полимера и процесс повторяется [82, 97]. В целом методом 3D-печати может быть обработано большое количество разнообразных материалов (синтетические полимеры, керамика, композиты и др.). Ключевым моментом в данном подходе является выбор связующего вещества, в качестве которого могут выступать как органические (хлороформ), так и неорганические вещества (нитрат алюминия, серебро) [82, 101]. Объекты, полученные методом 3D-печати, обычно имеют значительную пористость и требуют постобработки, что может служить в некоторых случаях недостатком [101].

## Клеточные системы и биоактивные вещества в тканевой инженерии костных имплантатов

Клеточный подход в тканевой инженерии заключается в предварительной посадке стволовых клеток на скаффолды перед трансплантацией матриц в место дефекта. Показано, что такие костные имплантаты в целом обладают лучшей интеграцией с тканями хозяина, а за счет аутологичности клеток отсутствует иммунный ответ [1, 3].

**Доступные источники стволовых клеток взрослого организма.** Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) костного мозга являются одними из наиболее распространенных клеток, используемых в регенерации костных тканей [3, 102]. Как следует из названия, источник данного типа клеток — костный мозг. Одна из основных функций мезенхимальных клеток костного мозга представляет собой формирование стромального и гемопозиндуцирующего микроокружения. Общими свойствами ММСК костного мозга являются фибробластоподобная морфология, высокий пролиферативный потенциал, способность к адгезии, легкоиндуцируемая дифференцировка в остеогенном, хондрогенном и адипогенном направлениях [102]. Также показана возможность получения кардиомиоцито- и нейроподобных клеток [103, 104]. Еще одно очень важное свойство ММСК костного мозга — их способность к секреции широкого спектра биоактивных веществ, усиливающих тканевую регенерацию [102].

Альтернативой ММСК костного мозга могут выступать мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани. Жировая ткань состоит из адипоцитов и гетерогенной популяции клеток — стромальной сосудистой фракции, которая окружает и поддерживает адипоциты. Данная фракция в свою очередь содержит преадипоциты, эндотелиальные клетки сосудов и их предшественники, Т- и В-лимфоциты, тучные клетки, макрофаги, а главное, мезенхимальные стромальные клетки [105]. ММСК жировой ткани и костного мозга имеют схожий иммунофенотип, морфологию, а также способность к направленной дифференцировке [3].

Существует еще один гораздо менее изученный источник ММСК — пульпа зуба [3, 106]. Показано, что данные клетки также способны к остеогенной дифференцировке и регенерации костной ткани, а их пролиферативная активность не уступает ММСК костного мозга [106]. Забор материала для выделения таких клеток может быть легко произведен во время стоматологических операций [3].

В настоящее время наиболее часто используемым источником ММСК является костный мозг. Однако процедура выделения клеток из него представляет собой инвазивную болезненную операцию, которая ведет к образованию нового дефекта в донорском участке. В отличие от этого жировая ткань может быть получена минимально-инвазивным способом — липэктомией или липосакцией.

Установлено, что оба типа клеток экспрессируют классические маркеры ММСК (CD73, CD90, CD105,

CD166), а также ангиогенные цитокины [107–109]. Более того, ряд исследований позволяет сделать вывод о том, что ММСК из жировой ткани имеют более высокий пролиферативный потенциал и более низкий коэффициент старения, чем ММСК костного мозга, а также генетическую и морфологическую стабильность в долгосрочной культуре [105, 110].

Тем не менее в некоторых работах по сравнению остеогенного потенциала стромальных клеток из разных источников сообщается о неоднозначных результатах [105, 111–117]. Ряд исследований показывает, что ММСК костного мозга имеют более высокий остеогенный потенциал, чем ММСК жировой ткани [105, 113–115]. В то же время другие авторы утверждают, что способность к остеогенной дифференцировке стромальных клеток костного мозга незначительно больше, а вероятно, и меньше, чем стромальных клеток жировой ткани [105, 111, 112, 116, 117].

В связи с этим вопрос о том, какой тип ММСК лучше подходит для решения задач тканевой инженерии, остается открытым.

**Направленная остеогенная дифференцировка ММСК.** Дифференцировка ММСК *in vitro* во многом зависит от условий их культивирования. Добиться поддержания направленной остеогенной дифференцировки можно путем добавления в среду культивирования различных веществ-индукторов остеогенеза. В группу таких веществ входят дексаметазон, аскорбиновая кислота, органические фосфаты, в частности  $\beta$ -глицерофосфат, дигидроксивитамин D<sub>3</sub>, некоторые белки семейства костных морфогенетических белков (BMP) [118].

Дексаметазон относится к стероидным гормонам-глюкокортикоидам. Считается, что данный гормон индуцирует остеогенез за счет стимулирования экспрессии гена белка Остерикс (OSX), цинк-содержащего фактора транскрипции, отсутствие которого приводит к резкому замедлению или прекращению образования костного матрикса [119, 120]. Органические фосфаты поддерживают остеогенез, играя определенную роль в минерализации, а также регуляции деятельности остеобластов за счет индуцирования экспрессии генов некоторых остеогенных маркеров, таких как остеопонтин. Аскорбиновая кислота и дигидроксивитамин D<sub>3</sub>, вероятно, имеют влияние на остеогенез через увеличение активности щелочной фосфатазы и усиление синтеза остеокальцина [118, 121]. Другая группа веществ для направленной остеогенной дифференцировки включает некоторые белки семейства BMP. В целом BMP — это многофункциональные цитокины, принадлежащие к суперсемейству трансформирующего фактора роста (TGF- $\beta$ ) и играющие значительную роль в регуляции пролиферации, дифференцировки и апоптоза различных типов клеток. Считается, что в индукции остеогенеза ключевое значение имеют BMP2 и BMP7 [122].

**Включение биоактивных веществ в структуру скаффолда.** Еще одной задачей тканевой инженерии является включение биоактивных веществ в структуру скаффолда для их постепенного высвобождения в процессе биорезорбции материала.

Биоактивные вещества в идеале должны не только индуцировать остеогенную дифференцировку, но и привлекать новые стволовые клетки носителя, а также стимулировать ангиогенез. В группу данных веществ входят в основном различные ростовые факторы (TGF- $\beta$ , в том числе и BMP, IGF, FGF, PDGF, VEGF и др.) [123–125]. Системное введение факторов роста обычно является малоэффективным, а иногда и опасным вследствие их короткого времени жизни (особенно в физиологических средах), неизбирательного биораспределения, потенциальной токсичности и риска канцерогенной активности [125]. Таким образом, включение биоактивных веществ в скаффолд решает несколько основных задач: локализованная доставка оптимальной концентрации ростовых факторов внутрь имплантата, сохранение биологической активности молекул, контролируемое высвобождение веществ в течение необходимого периода времени [123].

Первый вариант доставки ростовых факторов включает их непосредственное инкорпорирование в структуру скаффолда [123]. Для этого белки обычно иммобилизуют через ковалентное или нековалентное связывание с полимером матриц. Нековалентное связывание включает физический захват, адсорбцию или ионное комплексообразование. Однако использование таких систем ограничено из-за сложности регулирования высвобождения крупных белковых молекул [125].

Второй вариант включения биоактивных веществ в скаффолд состоит в инкапсуляции ростовых факторов в системы лекарственной доставки (микросферы, липосомы, гидрогели и др.) [125, 126]. Как и сами скаффолды, системы доставки должны иметь регулируемую скорость биодеградации, отсутствие токсичности и влияния на структуру матриц [126]. В целом в качестве материалов для микросфер могут выступать те же самые биодеградируемые полимеры, используемые при синтезе матриц (полилактид, полигликолид, полиэтиленгликоль, желатин, целлюлоза и др.) [127–129].

Стоит отметить, что включение биоактивных веществ в материал скаффолдов значительно сужает круг методов обработки полимеров в связи с тем, что влияние растворителей и высоких температур оказывает разрушающее действие на биомолекулы.

Объединение клеточного подхода с включением биоактивных веществ — ростовых факторов — говорит о том, что данные технологии в целом направлены на заполнение скаффолдов предварительно преддифференцированными в остеогенном направлении ММСК, привлечение собственных стволовых клеток, запуск остеогенеза и васкуляризацию имплантата.

**Заключение.** Восстановление нормальной формы, архитектуры и функций костной ткани в случае ее повреждения представляет собой особую задачу в тканевой инженерии. Успех проведенной операции по устранению дефекта зависит от большого числа факторов. Крайне важную роль играют не только экспериментальные исследования, но и углубленные фундаментальные знания биохимических реакций организма. Кроме того, результаты комплексного использования разных технологий получения скаффолдов, работы с клеточными

системами и стимулирования остеогенеза убедительно свидетельствуют, насколько значимым для успешного решения таких масштабных проблем является объединение большого числа междисциплинарных наук.

**Финансирование.** Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований в рамках научного проекта №13-02-12101 офи-м, гранта Правительства РФ №11.G34.31.0017.

**Конфликт интересов.** У авторов нет конфликта интересов.

## Литература/References

1. Chan B.P., Leong K.W. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *Eur Spine J* 2008; 17(Suppl 4): 467–479, <http://dx.doi.org/10.1007/s00586-008-0745-3>.
2. Bauer T.W., Muschler G.F. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res* 2000; 10–27.
3. Bhumiratana S., Vunjak-Novakovic G. Concise review: personalized human bone grafts for reconstructing head and face. *Stem Cells Transl Med* 2012; 1(1): 64–69, <http://dx.doi.org/10.5966/sctm.2011-0020>.
4. Eppley B.L., Pietrzak W.S., Blanton M.W. Allograft and alloplastic bone substitutes: a review of science and technology for the craniomaxillofacial surgeon. *J Craniofac Surg* 2005; 16(6): 981–989, <http://dx.doi.org/10.1097/01.scs.0000179662.38172.dd>.
5. Grayson W.L., Frohlich M., Yeager K., Bhumiratana S., Chan M.E., Cannizzaro C., Wan L.Q., Liu X.S., Guo X.E., Vunjak-Novakovic G. Engineering anatomically shaped human bone grafts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107(8): 3299–3304, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0905439106>.
6. Stella J.A., D'Amore A., Wagner W.R., Sacks M.S. On the biomechanical function of scaffolds for engineering load-bearing soft tissues. *Acta Biomater* 2010; 6(7): 2365–2381, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.001>.
7. Chen G., Ushida T., Tateish T. Scaffold design for tissue engineering. *Macromol Biosci* 2002; 2: 67–77.
8. Amoabediny Gh., Salehi-Nik N., Heli B. *The role of biodegradable engineered scaffold in tissue engineering*. In: Biomaterials Science and Engineering. Ed. by Pignatello R. InTech; 2011; p. 153–172.
9. Stephanie M. Willerth, Shelly E. Sakiyama-Elbert. Approaches to neural tissue engineering using scaffolds for drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(4–5): 325–338, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.014>.
10. Ratner B.D., Bryant S.J. Biomaterials: where we have been and where we are going. *Annu Rev Biomed Eng* 2004; 6: 41–75.
11. Ko H.F., Sfeir C., Kumta P.N. Novel synthesis strategies for natural polymer and composite biomaterials as potential scaffolds for tissue engineering. *Philos Trans A Math Phys Eng Sci* 2010; 368(1917): 1981–1997, <http://dx.doi.org/10.1098/rsta.2010.0009>.
12. Rosso F., Marino G., Giordano A., Barbarisi M., Parmeggiani D., Barbarisi A. Smart materials as scaffolds for tissue engineering. *J Cell Physiol* 2005; 203(3): 465–470, <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20270>.
13. O'Brien F.J. Biomaterials and scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 2011; 14(3): 88–95.
14. Brodsky B., Persikov A.V. Molecular structure of the

collagen triple helix. *Adv Protein Chem* 2005; 70: 301–339, [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70009-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70009-7).

15. Persikov A.V., Ramshaw J.A.M., Brodsky B. Collagen model peptides: sequence dependence of triple-helix stability. *Biopolymers* 2000; 55(6): 436–450, [http://dx.doi.org/10.1002/1097-0282\(2000\)55:6<436::AID-BIP1019>3.0.CO;2-D](http://dx.doi.org/10.1002/1097-0282(2000)55:6<436::AID-BIP1019>3.0.CO;2-D).

16. Bhattacharjee A., Bansa M. Collagen structure: the madras triple helix and the current scenario. *IUBMB Life* 2005; 57(3): 161–172, <http://dx.doi.org/10.1080/15216540500090710>.

17. Berisio R., Vitagliano L., Mazzarella L., Zagari A. Recent progress on collagen triple helix structure, stability and assembly. *Protein Pept Lett* 2002; 9(2): 107–116, <http://dx.doi.org/10.2174/0929866023408922>.

18. Jenkins C.L., Raines R.T. Insights on the conformational stability of collagen. *Nat Prod Rep* 2002; 19(1): 49–59.

19. Gelse K., Pöschl E., Aigner T. Collagens — structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev* 2003; 55(12): 1531–1546, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2003.08.002>.

20. Lee C.H., Singla A., Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 2001; 221(1–2): 1–22, [http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173\(01\)00691-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0378-5173(01)00691-3).

21. Glowacki J., Mizuno S. Collagen scaffolds for tissue engineering. *Biopolymers* 2008; 89(5): 338–344, <http://dx.doi.org/10.1002/bip.20871>.

22. Cooperman L., Michaeli D. The immunogenicity of injectable collagen. I. A 1-year prospective study. *J Am Acad Dermatol* 1984; 10(4): 638–646.

23. DeLustro F., Condell R.A., Nguyen M.A., McPherson J.M. A comparative study of the biologic and immunologic response to medical devices derived from dermal collagen. *J Biomed Mater Res* 1986; 20(1): 109–120.

24. Chunlin Y., Hillas P.J., Báez J.A., Nokelainen M., Balan J., Tang J., Spiro R., Polarek J.W. The application of recombinant human collagen in tissue engineering. *Bio Drugs* 2004; 18(2): 103–119.

25. Chevally B., Herbage D. Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med Biol Eng Comput* 2000; 38(2): 211–218.

26. Orgel J.P., Wess T.J., Miller A. The in situ conformation and axial location of the intermolecular cross-linked non-helical tetrapeptides of type I collagen. *Structure* 2000; 8(2): 137–142.

27. Eyre D.R., Wu J.J. Collagen cross-links. *Top Curr Chem* 2005; 247: 207–209.

28. Entcheva E., Bien H., Yin L., Chung C.-Y., Farrell M., Kostov Y. Functional cardiac cell constructs on cellulose-base scaffolding. *Biomaterials* 2004; 25(26): 5753–5762, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.024>.

29. Shi Q., Li Y., Sun J., Zhang H., Chen L., Chen B., Yang H., Wang Z. The osteogenesis of bacterial cellulose scaffold loaded with bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* 2012; 33(28): 6644–6649, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.05.071>.

30. Zaborowska M., Bodin A., Bäckdahl H., Popp J., Goldstein A., Gatenholm P. Microporous bacterial cellulose as a potential scaffold for bone regeneration. *Acta Biomater* 2010; 6(7): 2540–2547, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2010.01.004>.

31. Müller F.A., Müller L., Hofmann I., Greil P., Wenzel M.M., Staudenmaier R. Cellulose-based scaffold materials for cartilage tissue engineering. *Biomaterials* 2006; 27(21): 3955–3963, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.02.031>.

32. Backdahl H., Helenius G., Bodin A., Nannmark U., Johansson B.R., Risberg B. Mechanical properties of bacterial cellulose and interactions with smooth muscle cells. *Biomaterials* 2006; 27: 2141–2149.

33. Helenius G., Bäckdahl H., Bodin A., Nannmark U., Gatenholm P., Risberg B. In vivo biocompatibility of bacterial cellulose. *J Biomed Mater Res A* 2006; 76A(2): 431–438, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.30570>.

34. Liu S., Tao D., Zhang L. Cellulose scaffold: a green template for the controlling synthesis of magnetic inorganic nanoparticles. *Powder Technology* 2012; 217: 502–509, <http://dx.doi.org/10.1016/j.powtec.2011.11.010>.

35. Биохимия. Под ред. Северина Е.С. М: ГЭОТАР-Медиа; 2003; 715 с. *Biokhimiya* [Biochemistry]. Pod red. Severina E.S. [Severin E.S. (editor)]. Moscow: GEOTAR-Media; 2003; 715 p.

36. Ebner R., Lackner J.M., Waldhauser W., Major R., Czarnowska E., Kustosz R., Lacki P., Major B. Biocompatible TiN-based novel nanocrystalline films. *Bulletin of the Polish Academy of Science* 2006; 2: 167–173.

37. Khor E., Lim L.Y. Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials* 2003; 24(13): 2339–2349, [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00026-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00026-7).

38. Venkatesan J., Kim S.K. Chitosan composites for bone tissue engineering — an overview. *Mar Drugs* 2010; 8(8): 2252–2266, <http://dx.doi.org/10.3390/md8082252>.

39. No H.K., Park N.Y., Lee S.H., Meyers S.P. Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *Int J Food Microbiol* 2002; 74(1–2): 65–72.

40. Costa-Pinto A.R., Reis R.L., Neves N.M. Scaffolds based bone tissue engineering: the role of chitosan. *Tissue Eng Part B Rev* 2011; 17(5): 331–347, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.teb.2010.0704>.

41. Rabea E.I., Badawy M.E.T., Stevens C.V., Smagghe G., Steurbaut W. Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules* 2003; 4(6): 1457–1465, <http://dx.doi.org/10.1021/bm034130m>.

42. Sun J., Tan H. Alginate-based biomaterials for regenerative medicine applications. *Materials* 2013, 6(4): 1285–1309.

43. Mano J.F., Silva G.A., Azevedo H.S., Malafaya P.B., Sousa R.A., Silva S.S., Boesel L.F., Oliveira J.M., Santos T.C., Marques A.P., Neves N.M., Reis R.L. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends. *J R Soc Interface* 2007; 4(17): 999–1030, <http://dx.doi.org/10.1098/rsif.2007.0220>.

44. Awad H.A., Wickham M.Q., Leddy H.A., Gimble J.M., Guillaud F. Chondrogenic differentiation of adipose-derived adult stem cells in agarose, alginate, and gelatin scaffolds. *Biomaterials* 2004; 25(16): 3211–3222, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.045>.

45. Willerth S.M., Sakiyama-Elbert S.E. *Combining stem cells and biomaterial scaffolds for constructing tissues and cell delivery*. StemBook. Cambridge (MA): Harvard Stem Cell Institute; 2008.

46. Kim H.J., Kim U.J., Kim H.S., Li C., Wada M., Leisk G.G., Kaplan D.L. Bone tissue engineering with premineralized silk scaffolds. *Bone* 2008; 42(6): 1226–1234, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bone.2008.02.007>.

47. Correia C., Bhumiratana S., Yan L.P., Oliveira A.L., Gimble J.M., Rockwood D., Kaplan D.L., Sousa R.A., Reis R.L., Vunjak-Novakovic G. Development of silk-based scaffolds for

- tissue engineering of bone from human adipose-derived stem cells. *Acta Biomater* 2012; 8(7): 2483–2492, <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.03.019>.
48. Mandal B.B., Grinberg A., Gil E.S., Panilaitis B., Kaplan D.L. High-strength silk protein scaffolds for bone repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012; 109(20): 7699–7704, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1119474109>.
49. Garg T., Singh O., Arora S., Murthy R. Scaffold: a novel carrier for cell and drug delivery. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 2012; 29(1): 1–63, <http://dx.doi.org/10.1615/CritRevTherDrugCarrierSyst.v29.i1.10>.
50. Pavia F.C., Rigogliuso S., La Carrubba V., Mannella G.A., Ghersi G., Brucato V. Poly lactic acid based scaffolds for vascular tissue engineering. *Chemical Engineering Transactions* 2012; 27: 409–414.
51. Xiao L., Wang B., Yang G., Gauthier M. *Poly(lactic acid)-based biomaterials: synthesis, modification and applications*. In: Biomedical science, engineering and technology. Ed. by Dhanjoo N. Ghista. InTech; 2012; p. 247–282, <http://dx.doi.org/10.5772/23927>.
52. Kallela I., Tulamo R.-M., Hietanen J., Pohjonen T., Suuronen R., Lindqvist C. Fixation of mandibular body osteotomies using biodegradable amorphous self-reinforced (70L:30DL) polylactide or metal lag screws: an experimental study in sheep. *J Craniomaxillofac Surg* 1999; 27(2): 124–133.
53. Lyons F., Partap S., O'Brien F.J. Part 1: scaffolds and surfaces. *Technol Health Care* 2008; 16(4): 305–317.
54. Kerimoğlu O., Alarçin E. Poly(lactic-co-glycolic acid) based drug delivery devices for tissue engineering and regenerative medicine. *ANKEM Derg* 2012; 26(2): 86–98, <http://dx.doi.org/10.5222/ankem.2012.086>.
55. Gloria A., Causa F., Russo T., Battista E., Della Moglie R., Zeppetelli S., De Santis R., Netti P.A., Ambrosio L. Three-dimensional poly( $\epsilon$ -caprolactone) bioactive scaffolds with controlled structural and surface properties. *Biomacromolecules* 2012; 13(11): 3510–3521, <http://dx.doi.org/10.1021/bm300818y>.
56. Mei N., Chen G., Zhou P., Chen X., Shao Z.Z., Pan L.F., Wu C.G. Biocompatibility of poly( $\epsilon$ -caprolactone) scaffold modified by chitosan — the fibroblasts proliferation in vitro. *J Biomater Appl* 2005; 19(4): 323–339, <http://dx.doi.org/10.1177/0885328205048630>.
57. Zhu Y., Gao C.Y., Shen J.Y. Surface modification of polycaprolactone with poly(methacrylic acid) and gelatin covalent immobilization for promoting its cytocompatibility. *Biomaterials* 2002; 23(24): 4889–4895, [http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00247-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00247-8).
58. Ng K.W., Wanivenhaus F., Chen T., Hsu H.C., Allon A.A., Abrams V.D., Torzilli P.A., Warren R.F., Maher S.A. A novel macroporous polyvinyl alcohol scaffold promotes chondrocyte migration and interface formation in an in vitro cartilage defect model. *Tissue Eng Part A* 2012; 18(11–12): 1273–1281, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0276>.
59. Shuai C., Mao Z., Lu H., Nie Y., Hu H., Peng S. Fabrication of porous polyvinyl alcohol scaffold for bone tissue engineering via selective laser sintering. *Biofabrication* 2013; 5(1): 015014, <http://dx.doi.org/10.1088/1758-5082/5/1/015014>.
60. Bellucci D., Sola A., Cannillo V. A revised replication method for bioceramic scaffolds. *Bioceram Dev Appl* 2011; 1: 110401.
61. Leukers B., Gülkan H., Irsen S.H., Milz S., Tille C., Schieker M., Seitz H. Hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering made by 3D printing. *J Mater Sci Mater Med* 2005; 16(12): 1121–1124, <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-005-4716-5>.
62. Marra K.G., Szem J.W., Kumta P.N., DiMilla P.A., Weiss L.E. In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res* 1999; 47(3): 324–335, [http://dx.doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4636\(19991205\)47:3<324::AID-JBM6>3.0.CO;2-Y](http://dx.doi.org/10.1002/(SICI)1097-4636(19991205)47:3<324::AID-JBM6>3.0.CO;2-Y).
63. Zhao H., Wang G., Hu S., Cui J., Ren N., Liu D., Liu H., Cao C., Wang J., Wang Z. In vitro biomimetic construction of hydroxyapatite-porcine acellular dermal matrix composite scaffold for MC3T3-E1 preosteoblast culture. *Tissue Eng Part A* 2011; 17(5–6): 765–776, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEA.2010.0196>.
64. Sulaiman S.B., Keong T.K., Cheng C.H., Saim A.B., Idrus R.B. Tricalcium phosphate/hydroxyapatite (TCP-HA) bone scaffold as potential candidate for the formation of tissue engineered bone. *Indian J Med Res* 2013; 137(6): 1093–1101.
65. Tarafder S., Balla V.K., Davies N.M., Bandyopadhyay A., Bose S. Microwave-sintered 3D printed tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med* 2013; 7(8): 631–641, <http://dx.doi.org/10.1002/term.555>.
66. Farooq I., Imran Z., Farooq U., Leghari A., Ali H. Bioactive glass: a material for the future. *World J Dent* 2012; 3(2): 199–201.
67. Fu Q., Saiz E., Rahaman M.N., Tomsia A.P. Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives. *Mater Sci Eng C* 2011; 31(7): 1245–1256, <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2011.04.022>.
68. Boccaccini A.R., Blaker J.J. Bioactive composite materials for tissue engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices* 2005; 2(3): 303–317, <http://dx.doi.org/10.1586/17434440.2.3.303>.
69. Gleeson J.P., O'Brien F.J. Composite scaffolds for orthopaedic regenerative medicine. *Advances in Composite Materials for Medicine and Nanotechnology* 2011; 10: 33–59.
70. Lu T., Li Y., Chen T. Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering. *Int J Nanomedicine* 2013; 8: 337–350, <http://dx.doi.org/10.2147/IJN.S38635>.
71. Woods I., Flanagan T.C. Electrospinning of biomimetic scaffolds for tissue-engineered vascular grafts: threading the path. *Expert Rev Cardiovasc Ther* 2014; 12(7): 815–832, <http://dx.doi.org/10.1586/14779072.2014.925397>.
72. Liang D., Hsiao B.S., Chu B. Functional electrospun nanofibrous scaffolds for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(14): 1392–1412, <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2007.04.021>.
73. Akbarzadeh R., Yousefi A.M. Effects of processing parameters in thermally induced phase separation technique on porous architecture of scaffolds for bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2014; 102(6): 1304–1315, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.33101>.
74. Smith L.A., Beck J.A., Ma P.X. *Nano fibrous scaffolds and their biological effects*. In: Tissue cell and organ engineering. Ed. by Kumar C. Wiley-VCH, Weinheim; 2006; p. 188–215.
75. Li Q., Reed D.A., Min L., Gopinathan G., Li S., Dangaria S.J., Li L., Geng Y., Galang M.T., Gajendrareddy P., Zhou Y., Luan X., Diekwisch T.G. Lyophilized platelet-rich fibrin (PRF) promotes craniofacial bone regeneration through Runx2. *Int J Mol Sci* 2014; 15(5): 8509–8525, <http://dx.doi.org/10.3390/ijms15058509>.
76. Boland E.D., Espy P.G., Bowlin G.L. *Tissue engineering*

scaffolds. In: Encyclopaedia of biomaterials and biomedical engineering. Eds. by Wenk G.E., Bowlin G.L. USA; 2004; p. 1633–1635.

77. Thein-Han W., Xu H.H. Prevascularization of a gas-foaming macroporous calcium phosphate cement scaffold via coculture of human umbilical vein endothelial cells and osteoblasts. *Tissue Eng Part A* 2013; 19(15–16): 1675–1685, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEA.2012.0631>.

78. Ikada Y. *Scope of tissue engineering*. In: Tissue engineering: fundamental and applications. Ed. by Ikada Y. USA: Academic press. 2006; p. 29.

79. Ma L. X., Peter X. Polymeric scaffolds for bone tissue engineering. *Ann Biomed Eng* 2004; 32(3): 477–486.

80. Subia B., Kundu J., Kundu S.C. *Biomaterial scaffold fabrication techniques for potential tissue engineering applications*. In: Tissue Engineering. Ed. by Eberli D. InTech; 2010; p. 141–159.

81. Geliinsky M., Welzel P.B., Simon P., Bernhardt A., König U. Porous three-dimensional scaffolds made of mineralized collagen: preparation and properties of a biomimetic nanocomposite material for tissue engineering of bone. *Chemical Engineering Journal* 2008; 137: 84–96.

82. Bose S., Vahabzadeh S., Bandyopadhyay A. Bone tissue engineering using 3D printing. *Mater Today* 2013; 16(12): 496–504, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mattod.2013.11.017>.

83. Li X., Cui R., Sun L., Aifantis K.E., Fan Y., Feng Q., Cui F., Watari F. 3D-printed biopolymers for tissue engineering application. *International Journal of Polymer Science* 2014; Article ID 829145.

84. Hollister S.J. Porous scaffold design for tissue engineering. *Nat Mater* 2005; 4(7): 518–524, <http://dx.doi.org/10.1038/nmat1421>.

85. Melchels F.P., Feijen J., Grijpma D.W. A review on stereolithography and its applications in biomedical engineering. *Biomaterials* 2010; 31(24): 6121–6130, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.04.050>.

86. Skoog S.A., Goering P.L., Narayan R.J. Stereolithography in tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med* 2014; 25(3): 845–856, <http://dx.doi.org/10.1007/s10856-013-5107-y>.

87. Kang H.W., Cho D.W. Development of an indirect stereolithography technology for scaffold fabrication with a wide range of biomaterial selectivity. *Tissue Eng Part C Methods* 2012; 18(9): 719–29, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.TEC.2011.0621>.

88. Leach J.B., Bivens K.A., Collins C.N., Schmidt C.E. Development of photocrosslinkable hyaluronic acid-polyethylene glycol-peptide composite hydrogels for soft tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2004; 70(1): 74–82, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.a.30063>.

89. Narayan R.J., Doraiswamy A., Chrisey D.B., Chichkov B.N. Medical prototyping using two photon polymerization. *Mater Today* 2010; 13(12): 42–48, [http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021\(10\)70223-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1369-7021(10)70223-6).

90. Kurselis K., Kiyun R., Bagratashvili V.N., Popov V.K., Chichkov B.N. 3D fabrication of all-polymer conductive microstructures by two photon polymerization. *Opt Express* 2013; 21(25): 31029–3135, <http://dx.doi.org/10.1364/OE.21.031029>.

91. Obata K., El-Tamer A., Koch L., Hinze U., Chichkov B.N. High-aspect 3D two-photon polymerization structuring with widened objective working range (WOW-2PP). *Light: Science & Applications* 2013; 2: e116.

92. Mazzoli A. Selective laser sintering in biomedical engineering. *Med Biol Eng Comput* 2013; 51(3): 245–256, <http://dx.doi.org/10.1007/s11517-012-1001-x>.

93. Capel A.J., Edmondson S., Christie S.D., Goodridge R.D., Bibb R.J., Thurstans M. Design and additive manufacture for flow chemistry. *Lab Chip* 2013; 13(23): 4583–4590, <http://dx.doi.org/10.1039/c3lc50844g>.

94. Antonov E.N., Bagratashvili V.N., Whitaker M.J., Barry J.J., Shakesheff K.M., Kononov A.N., Popov V.K., Howdle S.M. Three-dimensional bioactive and biodegradable scaffolds fabricated by surface-selective laser sintering. *Adv Mater* 2005; 17(3): 327–330, <http://dx.doi.org/10.1002/adma.200400838>.

95. Bukharova T.B., Antonov E.N., Popov V.K., Fatkhudinov T.Kh., Popova A.V., Volkov A.V., Bochkova S.A., Bagratashvili V.N., Gol'dshtein D.V. Biocompatibility of tissue engineering constructions from porous polylactide carriers obtained by the method of selective laser sintering and bone marrow-derived multipotent stromal cells. *Bull Exp Biol Med* 2010; 149(1): 148–153, <http://dx.doi.org/10.1007/s10517-010-0895-2>.

96. Schantz J.T., Huttmacher D.W., Chim H., Ng K.W., Lim T.C., Teoh S.H. Induction of ectopic bone formation by using human periosteal cells in combination with a novel scaffold technology. *Cell Transplant* 2002; 11(2): 125–138.

97. Yeong W.Y., Chua C.K., Leong K.F., Chandrasekaran M. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential. *Trends Biotechnol* 2004; 22(12): 643–652, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.10.004>.

98. Zein I., Huttmacher D.W., Tan K.C., Teoh S.H. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2002; 23(4): 1169–1185.

99. Samar J.K., Susmita B., Howard L.H., Amit B. Development of controlled porosity polymer-ceramic composite scaffolds via fused deposition modeling. *Mater Sci Eng C* 2003; 23: 611–620, [http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931\(03\)00052-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0928-4931(03)00052-3).

100. Endres M., Huttmacher D.W., Salgado A.J., Kaps C., Ringe J., Reis R.L., Sittlinger M., Brandwood A., Schantz J.T. Osteogenic induction of human bone marrow-derived mesenchymal progenitor cells in novel synthetic polymer-hydrogel matrices. *Tissue Eng* 2003; 9(4): 689–702, <http://dx.doi.org/10.1089/107632703768247386>.

101. Utela B., Storti D., Anderson R., Ganter M. A review of process development steps for new material systems in three dimensional printing (3DP). *Journal of Manufacturing Processes* 2008; 96–104.

102. Caplan A.I. Adult mesenchymal stem cells for tissue engineering versus regenerative medicine. *J Cell Physiol* 2007; 213(2): 341–347, <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.21200>.

103. Makino S., Fukuda K., Miyoshi S., Konishi F., Kodama H., Pan J., Sano M., Takahashi T., Hori S., Abe H., Hata J., Umezawa A., Ogawa S. Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. *J Clin Invest* 1999; 103: 697–705, <http://dx.doi.org/10.1172/JCI5298>.

104. Kopen G.C., Prockop D.J., Phinney D.G. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96(19): 10711–10716, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.96.19.10711>.

105. Strioga M., Viswanathan S., Darinskas A., Slaby O., Michalek J. Same or not the same? Comparison of adipose

- tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev* 2012; 21(14): 2724–2752, <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2011.0722>.
- 106.** Gronthos S., Mankani M., Brahimi J., Robey P.G., Shi S. Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(25): 13625–13630, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.240309797>.
- 107.** Izadpanah R., Trygg C., Patel B., Kriedt C., Dufour J. Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. *J Cell Biochem* 2006; 99: 1285–1297, <http://dx.doi.org/10.1002/jcb.20904>.
- 108.** Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D.J., Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 2006; 8(4): 315–317.
- 109.** Peng L., Jia Z., Yin X., Zhang X., Liu Y., Chen P., Ma K., Zhou C. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, cartilage, and adipose tissue. *Stem Cells Dev* 2008; 17(4): 761–773, <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2007.0217>.
- 110.** Roemeling-van Rhijn M., Khairoun M., Korevaar S.S., Lievers E., Leuning D.G., Ijzermans J.N., Betjes M.G., Genever P.G., van Kooten C., de Fijter H.J., Rabelink T.J., Baan C.C., Weimar W., Roelofs H., Hoogduijn M.J., Reinders M.E. Human bone marrow- and adipose tissue-derived mesenchymal stromal cells are immunosuppressive in vitro and in a humanized allograft rejection model. *J Stem Cell Res Ther* 2013; 6(1): 20780, <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7633.S6-001>.
- 111.** Rath S.N., Noeaid P., Arkudas A., Beier J.P., Strobel L.A., Brandl A., Roether J.A., Horch R.E., Boccaccini A.R., Kneser U. Adipose- and bone marrow-derived mesenchymal stem cells display different osteogenic differentiation patterns in 3D bioactive glass-based scaffolds. *J Tissue Eng Regen Med* 2013, <http://dx.doi.org/10.1002/term.1849>. [Epub ahead of print].
- 112.** Lee R.H., Kim B., Choi I., Kim H., Choi H.S., Suh K., Bae Y.C., Jung J.S. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue. *Cell Physiol Biochem* 2004; 14(4–6): 311–324, <http://dx.doi.org/10.1159/000080341>.
- 113.** Im G.I., Shin Y.W., Lee K.B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13(10): 845–853, <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2005.05.005>.
- 114.** Noël D., Caton D., Roche S., Bony C., Lehmann S., Casteilla L., Jorgensen C., Cousin B. Cell specific differences between human adipose-derived and mesenchymal-stromal cells despite similar differentiation potentials. *Exp Cell Res* 2008; 314(7): 1575–1584, <http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2007.12.022>.
- 115.** Sakaguchi Y., Sekiya I., Yagishita K., Muneta T. Comparison of human stem cells derived from various mesenchymal tissues: superiority of synovium as a cell source. *Arthritis Rheum* 2005; 52(8): 2521–2529, <http://dx.doi.org/10.1002/art.21212>.
- 116.** Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells* 2006; 24(5): 1294–1301, <http://dx.doi.org/10.1634/stemcells.2005-0342>.
- 117.** De Ugarte D.A., Morizono K., Elbarbary A., Alfonso Z., Zuk P.A., Zhu M., Dragoo J.L., Ashjian P., Thomas B., Benhaim P., Chen I., Fraser J., Hedrick M.H. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells, Tissues, Organs* 2003; 174(3): 101–109, <http://dx.doi.org/10.1159/000071150>.
- 118.** Tuan R.S., Boland G., Tuli R. Adult mesenchymal stem cells and cell-based tissue engineering. *Arthritis Res Ther* 2003; 5(1): 32–45.
- 119.** Birmingham E., Niebur G.L., McHugh P.E., Shaw G., Barry F.P., McNamara L.M. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells is regulated by osteocyte and osteoblast cells in a simplified bone niche. *Eur Cell Mater* 2012; 23: 13–27.
- 120.** Mikami Y., Lee M., Irie S., Honda M.J. Dexamethasone modulates osteogenesis and adipogenesis with regulation of osterix expression in rat calvaria-derived cells. *J Cell Physiol* 2011; 226(3): 739–748, <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.22392>.
- 121.** Kaveh K., Ibrahim R., Bakar M.Z.A., Ibrahim T.A. Mesenchymal stem cells, osteogenic lineage and bone tissue engineering: a review. *Journal of Animal and Veterinary Advances* 2011; 10(17): 2317–2330, <http://dx.doi.org/10.3923/javaa.2011.2317.2330>.
- 122.** Qing W., Guang-Xing C., Lin G., Liu Y. The osteogenic study of tissue engineering bone with BMP2 and BMP7 gene-modified rat adipose-derived stem cell. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012: 410879, <http://dx.doi.org/10.1155/2012/410879>.
- 123.** Hofmann S., Garcia-Fuentes M. *Bioactive scaffolds for the controlled formation of complex skeletal tissues*. In: Regenerative medicine and tissue engineering: cells and biomaterials. Ed. by Eberli D. Rijeka: InTech; 2011; p. 393–432, <http://dx.doi.org/10.5772/22061>.
- 124.** Sundelacruz S., Kaplan D.L. Stem cell-and scaffold-based tissue engineering approaches to osteochondral regenerative medicine. *Semin Cell Dev Biol* 2009; 20(6): 646–655, <http://dx.doi.org/10.1016/j.semcd.2009.03.017>.
- 125.** Luginbuehl V., Meinel L., Merkle H.P., Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; 58(2): 197–208, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpb.2004.03.004>.
- 126.** Liu H., Zhang L., Shi P., Zou Q., Zuo Y., Li Y. Hydroxyapatite/polyurethane scaffold incorporated with drug-loaded ethyl cellulose microspheres for bone regeneration. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 2010; 95(1): 36–46, <http://dx.doi.org/10.1002/jbm.b.31680>.
- 127.** Porter J.R., Ruckh T.T., Popat K.C. Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog* 2009; 25(6): 1539–1560, <http://dx.doi.org/10.1002/btpr.246>.
- 128.** Zhu X.H., Tabata Y., Wang C.H., Tong Y.W. Delivery of basic fibroblast growth factor from gelatin microsphere scaffold for the growth of human umbilical vein endothelial cells. *Tissue Eng Part A* 2008; 14(12): 1939–1947, <http://dx.doi.org/10.1089/ten.tea.2007.0346>.
- 129.** Royce S.M., Askari M., Marra K.G. Incorporation of polymer microspheres within fibrin scaffolds for the controlled delivery of FGF-1. *J Biomater Sci Polym Ed* 2004; 15(10): 1327–1336.