

УДК 616.71-74:616-08-035

**МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ МАТРИЦ-НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ТКАНЕВЫХ
ЭКВИВАЛЕНТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ****Ларионов П.М., Терещенко В.П., Кирилова И.А.***ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии
им. Я.Л. Цивьяна», Новосибирск, e-mail: tervp@ngs.ru*

Тканевая инженерия костной ткани ищет альтернативное решение восстановления целостности кости. В основе метода лежит создание тканеинженерного эквивалента костной ткани с помощью стволовых клеток, остеогенных факторов и матриц – носителей этих клеток. Процесс создания тканеинженерного аналога костной ткани начинается с производства матрицы для культивирования клеток. В статье выполнен анализ наиболее перспективных методов изготовления клеточных матриц – электроспиннинга, импринт-литографии и различных вариантов 3D-печати. Рассмотренные технологии обеспечивают полный контроль над микроархитектоникой конечной продукции, что создает выгодные условия для существования на них клеток. С помощью 3D-печати возможен контроль и над макроструктурой, что обеспечивает возможность создания персонализированных изделий. Физико-механические свойства конструкций зависят не только от структуры и метода создания, но и от использованных материалов. Наиболее передовые исследования направлены на сочетание различных методов в процессе создания клеточных матриц с целью наиболее приближенной имитации натурального внеклеточного матрикса.

Ключевые слова: тканевая инженерия костной ткани, клеточная матрица, электроспиннинг, 3D-печать, импринт-литография

**METHODS OF CREATING SCAFFOLDS-CARRIERS
FOR BONE TISSUE EQUIVALENTS****Larionov P.M., Tereschenko V.P., Kirilova I.A.***Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics n.a. Ya.L. Tsviyana, Novosibirsk,
e-mail: tervp@ngs.ru*

For production of tissue engineered bone equivalent advisable to create scaffolds similar in structure to natural extracellular matrix of the bone. This will provide optimal conditions for the cells, and produce favorable physico-mechanical properties of the final construction. This review article gives an analysis of the most promising methods for the manufacture of cell scaffolds – electrospinning, imprint-lithography, 3D-printing. The above technologies provides full control over the final microarchitectonics of cell scaffolds. With the help of 3D-printing is possible to control macrostructure that provides the ability to create personalized products. Physical and mechanical properties of the structures depend not only on the structure of scaffolds and the method of creation, but also the materials used. The most advanced research is focused on the combination of different methods in the process of creating cell scaffolds for the most approximate imitation of natural extracellular matrix.

Keywords: bone tissue engineering, cell scaffold, electrospinning, 3D-printing, imprint-lithography

По данным всемирной организации здравоохранения, ежегодно в мире происходит около 50 млн несмертельных травм, приводящих к проблемам опорно-двигательного аппарата и служащих причинами инвалидности [4]. В России около 16% костных травм лечится оперативным путем, т.е. путем имплантации в организм металлоконструкций [2], а также костно-пластических материалов, включая использование аутокости [1]. Последний подход связан с дополнительной травмой донорской кости, увеличением периода послеоперационного восстановления, а главное не гарантирует положительного результата.

Регенеративная медицина предлагает альтернативный метод лечения костных дефектов. Главным преимуществом предлагаемого подхода является теоретическая возможность полного восстановления ана-

томической целостности кости. Основой метода являются три составляющие: стволовые клетки, остеогенные факторы, способные направить клетки по костному пути развития и матрица – носитель и подложка для этих клеток.

На данный момент известно, что для культивирования клеток лучше всего подходят подложки, имитирующие натуральный внеклеточный матрикс кости [21]. Таким образом, ученые натолкнулись на проблему создания матриц с поверхностью, структурированной на микро- и наноуровне, подобно внеклеточному матриксу. Будучи микро-структурированной, матрица также должна обладать физико-механическими свойствами, сопоставимыми со зрелой костью, это позволяет восстановить опорную функцию кости, а также обладать высокой пористостью для обеспечения проникновения клеток внутрь конструкции.

Методы, применяемые для создания клеточных матриц в тканевой инженерии костной ткани

Размер большинства клеток колеблется от 8 до 40 мкм. В последних исследованиях показано, что наилучшие условия для жизнедеятельности клеток создаются, когда размеры структур подложки сопоставимы с размерами самих клеток [11]. Таким образом, метод создания матриц для культивирования клеток должен обеспечивать возможность их структурирования на микро- и наноуровнях. Более того, материалы, используемые для создания матриц-носителей клеток, могут обеспечивать ряд необходимых свойств при создании аналога кости, например остеоиндуктивность и биосовместимость.

Среди аппаратных методов, способных выполнить поставленную задачу, можно выделить электроспиннинг, импринт-литографию и 3D-печать.

Электроспиннинг

При процессе электроспиннинга из шприца с иглой на приемный коллектор подается раствор полимера, который формируется действием электрического поля. Диаметр струи зависит от следующих основных условий, свойств раствора полимера, скорости подачи раствора полимера, расстояния от конца иглы до приемного коллектора, диаметра иглы, скорости вращения коллектора, напряжения электрического поля. В результате на коллекторе собираются фибриллы полимера с различным диаметром и различной направленностью.

Данный метод не только технически прост, но и имеет ряд преимуществ. Так, для электроспиннинга показана возможность использования практически любых материалов синтетических и биологических полимеров. Среди них синтетические биорезорбируемые полимеры – полилактид-ко-гликолид [6], полиэтилен оксид [32], поликапролактон [36], полилактиды [16]. Натуральные полимеры и их мономеры – хитозан [20], коллаген I типа [26], желатин [36], эластин [42]. Неорганические соединения внеклеточного матрикса кости – β – трикальций фосфат [14], гидроксиапатит [24], а также углеродные нанотрубки [44]. Основным вопросом остается выбор нетоксичного растворителя для подготовки композитных растворов, которые в дальнейшем подвергнутся процессу электроспиннинга.

С помощью электроспиннинга возможно структурирование матриц на микро- и наноуровнях [13]. А также создание, как

параллельных, так и разнонаправленных фибрилл даже в одной конструкции [15].

Отдельного внимания заслуживает работа ученых из Южной Кореи, которым методом электроспиннинга удалось создать объемную 3D-конструкцию аналога кости [18]. Для сравнения – в других работах были получены 2D-структурированные пленки.

На данный момент физико-механические свойства полученных на электроспиннинге конструкций не достигают требований, выдвигаемых к тканеинженерному аналогу костной ткани. Таким образом, требуется дальнейший поиск материалов и техник для применения электроспиннинга.

Импринт-литография

Импринт-литография заключается в нанесении отпечатка штампом произвольной формы на пленку из желаемого материала. Данный метод позволяет быстро получать большое количество 3D-структурированных плоских матриц. При комбинировании множества подобных пленок возможно получение объемной структурированной конструкции. Разрешение метода начинается от десятков нанометров. Наносимый штамп отпечаток может быть практически любой формы, что крайне выгодно при имитировании микроархитектоники костной ткани.

В связи со сложностью формирования достаточно объемных конструкций из структурированных пленок импринт-литография не получила широкого распространения при производстве тканеинженерного аналога костной ткани.

Показана возможность использования полилактида и поликапролактона для получения клеточных матриц методом импринт-литографии и возможность применения данных матриц для культивирования клеток [3, 9].

3D-печать

В то время как микроархитектоника матриц, созданных с помощью электроспиннинга и импринт-литографии, поддается контролю, их макроархитектоника ограничена процессом создания.

3D-печать способна создавать персонализированные конструкции под конкретный костный дефект с помощью компьютерных методов визуализации – МСКТ и МРТ. Таким образом, с появлением 3D-печати появилась возможность контроля строения матриц и на макроуровне.

Обычно процесс 3D-печати включает следующие шаги: создание компьютерной 3D-модели с заданной микро- и макроархитектоникой, перенос модели на аппарат 3D-печати и далее сама печать.

Существует несколько технологий 3D-печати, которые отличаются методами создания конструкции, а также материалами, используемыми для производства. Некоторые из них будут описаны ниже более подробно.

Склеивание порошкового материала

Суть метода заключается в нанесении клеящего раствора на слой порошка только в местах проекции будущей конструкции. После нанесения одного слоя, сверху насыпается новый слой порошка, который также подвергается склеиванию лишь в местах проекции будущей фигуры. Так, слой за слоем создается склеенная конструкция, сложенная несклеенным порошком.

Данная технология имеет разрешение в 50 мкм. Одним из ее преимуществ является возможность создания крупных соединяющихся пор, что способствует инфильтрации конструкции клетками [41]. Сам процесс происходит при комнатной температуре, что делает возможным добавление в конструкцию биологических агентов, например, белков [39].

В качестве порошка использовали синтетические полимеры: поликапролактон, полилактид, полилактид-ко-гликолид с органическим растворителем как клеящим материалом [12, 39, 41]. А также белки – желатин и декстран с водой как клеящим материалом [37, 43].

В качестве порошка для данного метода широкое распространение получил гидроксиапатит. При добавлении к гидроксиапатиту порогена и склеивании его синтетическим полимером возможно создание керамики с пористостью до 90%. Такие конструкции демонстрируют выраженные osteoconductive свойства [38].

Достоинством метода является возможность использования широкого спектра материалов, недостатком остается низкое разрешение печати.

Экструзионная технология

Экструзионные 3D-принтеры создают модель слой за слоем с помощью расплавленного термопластика. Главные критерии материалов для данного вида печати – это температура плавления и реология расплавленного пластика.

С помощью данной технологии удается контролировать размеры элементов в слое, расстояние между элементами в слое, а также толщину самого слоя. Это позволяет создавать конструкции с заданным размером пор, соединениями между порами и желаемой микроархитектоникой.

Ключевое достоинство метода заключается в возможности создания структур с достаточно высокой пористостью при этом не теряя достаточной механической прочности. Сложность метода состоит в необходимости нагрева материалов до температуры плавления, что делает невозможным применение целых классов материалов, нестабильных при нагревании, например, белков.

Наибольшее распространение для печати биосовместимых объектов с помощью данной технологии получил поликапролактон, в связи со своей низкой температурой плавления (около 60 °C) и высокой термической стабильностью [23]. Печать с помощью полилактида-ко-гликолида более затруднительна, поскольку для получения необходимой реологии расплавленного полимера необходима температура в 110–140 °C [35]. Для получения композитных материалов с помощью данного метода показана возможность добавления в конструкцию коллагена [17], трикальций фосфатов [40], гидроксиапатита [35] и желатина [25].

Стереолитография

Основа метода заключается в полимеризации фотополимера с помощью ультрафиолета. Слой создается, когда проектор засвечивает ванну с фотополимером лишь в местах проекции будущей фигуры. Далее опора опускается и засвечивается новый слой. В конце готовый объект остается в окружении непolyмеризованной жидкости.

На процесс печати влияют как качества самого фотополимера так и интенсивность подаваемого света. На данный момент метод достиг высокого разрешения печати (около 1,2 мкм), что позволяет создавать объекты с крайне сложной внутренней микроархитектоникой.

Недостатком метода является небольшое количество биосовместимых фотополимеров, возможных к применению. Показана возможность применения полипропилен фумарата и диэтил фумарата для создания 3D клеточных матриц [19, 33]. Однако механические свойства полученных конструкций оказались недостаточными для использования их в нуждах тканевой инженерии костной ткани.

В более поздних исследованиях была доказана возможность использования поликапролактона и полилактида при стереолитографии, примечательно, что в жидком фотополимере заранее размешивали живые клетки для инкапсуляции их в матрицу [29, 34], что можно назвать биопечатью. В качестве адьюванта к фотополимеру возмож-

но использование костного морфогенетического белка [7].

3D-плоттинг/биооплоттинг

Данная технология основана на инъекции раствора из шприца в жидкий приемный коллектор, плотность которого совпадает с плотностью раствора в шприце. Коллектор также может содержать и полимеризующие вещества. Процесс может быть выполнен как при комнатной температуре, так и при повышенной. Данный метод особенно подходит для создания мягких матриц из гидрогелей.

Первыми в данной технологии были использованы натуральные полимеры, такие как агар, желатин, полимеризующим веществом для которых выступал Ca^{2+} [22, 30].

Преимуществом метода является возможность использования большого количества биосовместимых материалов и низкая температура процесса. Недостатки заключаются в невозможности создания достаточно твердых конструкций в связи с использованием гидрогелей, а следовательно, и в невозможности формирования сложной микроархитектуры конструкций. Разрешение метода находится в районе 400 мкм [8].

Биоплоттинг повторяет данный метод, но к растворам полимеров также добавляют суспензии клеток, например, в альгинатом геле. Данная технология позволяет достичь равномерного распределения клеток и сигнальных молекул в конструкции, что особенно важно для дальнейшего формирования ткани.

Биоплоттинг может быть использован с полилактидом-ко-гликолидом [28], трикальций фосфатами [28], хитозаном [28], гидроксиапатитом [28], коллагеном [27], поликапролактоном [5]. Следует отметить, что в перечисленных работах наблюдается сохранение жизнеспособности клеток, прошедших через процесс биопечати вне зависимости от вида использованного материала.

Заключение

На сегодняшний день технологии тканевой инженерии костной ткани позволяют создавать клеточные матрицы, достаточно приближенные по своей структуре к натуральному внеклеточному матриксу кости.

Каждый из представленных методов имеет как достоинства, так и недостатки.

Электроспиннинг при достаточно хорошо изученном контроле за микроархитектоникой не имеет возможности управлять макроструктурой конечной продукции. С данным методом возможно использова-

ние множества биосовместимых материалов, но крайне затруднительно получение конструкций с прочностью, достаточной для выполнения опорной функции кости.

Импринт-литография способна задать практически любую микроархитектуру клеточной матрицы. Но возможность создания 3D-конструкций с помощью данного метода крайне ограничена.

3D-печать обеспечивает всесторонний контроль за структурой получаемых конструкций. Использование различных материалов при 3D-печати зачастую ограничено технологией создания. Дальнейшее развитие технологий 3D-печати необходимо для повышения разрешения, усложнения форм и увеличения прочности получаемых конструкций.

Вдобавок, следует отметить перспективность сочетания различных методов, таких как электроспиннинг, импринт-литография и 3D-печать, при производстве одной конструкции [10]. Данный подход целесообразен в связи со сложным строением кости на макро- и микроуровнях.

Таким образом, при дальнейшем развитии и комбинировании различных методов станет возможно создание образца наиболее эффективно имитирующего строение и физико-механические свойства естественного внеклеточного матрикса кости, что позволит создать перспективный тканеинженерный эквивалент костной ткани.

Ввиду большого количества нарабатываемых материалов и методов, возможных к применению на данный момент, дальнейшее производство должно двигаться по пути тщательной отработки протоколов создания готовой продукции, содержание которых будет зависеть от конкретного создаваемого вида конструкций.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ проекта № 15-29-04849.

Список литературы

1. Костно-пластические биоматериалы и их физико-механические свойства / И.А. Кирилова, В.Т. Подорожная, Е.В. Легостаева, Ю.П. Шаркеев, П.В. Уваркин, А.М. Аронов // Хирургия позвоночника. – 2010. № 1. – С. 81–87.
2. Современные принципы и технологии остеосинтеза костей конечностей, таза и позвоночника: сб. ст. Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, Санкт-Петербург, 2015 г.
3. Создание тканеинженерного эквивалента костной ткани и перспективы его использования в травматологии и ортопедии/ Ларионов П.М., Садовой М.А., Самохин А.Г., Рожнова О.М., Гусев А.Ф., Принц В.Я., Селезнев В.А., Голлод С.В., Принц А.В., Корнеев И.А., Комонов А.И., Мамонова Е.В., Малютина Ю.Н., Багаев В.А.// Хирургия позвоночника. – 2014. – № 1. – С. 77–85.
4. Электронный ресурс: официальный сайт Всемирной Организации Здравоохранения. .
5. 3D-printing of composite tissue with complex shape applied to ear regeneration./ Lee J-S, Hong J.M., Jung J.W., Shim J-H, Oh J-H, Cho D-W.// Biofabrication. – 2014. – Vol. 6.

6. A. Haider, K.C. Gupta, Kang, PLGA/nHA hybrid nanofiber scaffold as a nanocargo carrier of insulin for accelerating bone tissue regeneration// *Nanoscale Reserch Letters*. – 2014. Vol. 9. – P. 12. <http://link.springer.com/sci-hub.org/article/10.1186/1556-276X-9-314/fulltext.html> – ContactOfAuthor21.
7. Bone regeneration using a microstereolithography-produced customized poly (propylene fumarate)/ diethyl fumarate photopolymer 3D scaffold incorporating BMP-2 loaded PLGA microspheres./ Lee JW, Kang KS, Lee SH, Kim J-Y, Lee B-K, Cho D-W// *Biomaterials*. – 2011. Vol. 32. – P. 744–752.
8. Bone repair by cellseeded 3D-bioploted composite scaffolds made of collagen treated tricalciumphosphate or tricalcium-phosphatechitosan collagen hydrogel or PLGA in ovine critical-sized calvarial defects./ Haberstroh K., Ritter K., Kuschnierz J., Bormann K.H., Kaps C., Carvalho C., et al. // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. – 2010. Vol. 93. – P. 520–530.
9. Bottom-up approach to construct microfabricated multi-layer scaffolds for bone tissue engineering/ M.J. Lima, R.P. Pirraco, R.A. Sousa, N.M. Neves, A.P. Marques, M. Bhattacharya, V.M. Correlo, R.L. Reis// *Biomed Microdevices*. – 2014. Vol. 16. – P. 13.
10. Combining technologies to create bioactive hybrid scaffolds for bone tissue engineering/ A. Nandakumar, A. Baradas, J. Boer, L. Moroni, C. Blitterswijk, P. Habibovic// *Biomater*. – 2013. Vol. 3. – P. 13.
11. Dahlin, R.L., Kasper, F.K., Mikos, Polymeric Nanofibers in tissue engineering.// *Tissue Engineering*. – 2011. Vol. 17.
12. Effect of pore size and void fraction on cellular adhesion, proliferation, and matrix deposition/ Zeltinger J., Sherwood J.K., Graham D.A., Müller R., Griffith L.G.// *Tissue Eng*. – 2001. Vol. 7. – P. 557–572.
13. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering/ F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna// *Biomaterials*. – 2005. Vol. 26. – P. 2603–2610.
14. Electrospun composite poly(L-lactic acid)/tricalcium phosphate scaffolds induce proliferation and osteogenic differentiation of human adipose-derived stem cells./ McCullen S.D., Zhu Y.Z., Bernacki S.H., Narayan R.J., Pourdeyhimi B., Gorga R.E., Lobo E.G.// *Biomedical Materials*. – 2009. Vol. 4. – P. 9.
15. Electrospun Nanofiber Scaffolds with Gradients in Fiber Organization/ K. Khandalavala, J. Jiang, F.D. Shuler, J. Xie// *Journal of Visualized Experiments*. – 2015. Vol. 98. – P. 1–8.
16. Electrospun PLLA Nanofiber Scaffolds and Their Use in Combination with BMP-2 for Reconstruction of Bone Defects./ Schofer I M.D., Roessler I P.P., Schaefer J. and oth.// *PLoS ONE*. – 2011. Vol. 6. – P. 1–9.
17. Evaluation of chondrocyte growth in the highly porous scaffolds made by fused deposition manufacturing (FDM) filled with type II collagen/ Yen H-J, Tseng C-S, S-h H, Tsai C-L.// *Biomed Microdevices*. – 2009. Vol.11. – P. 615–624.
18. Fabrication and characterization of 3-dimensional PLGA nanofiber/microfiber composite scaffolds/ S.J. Kima, D.H. Jang, W.H. Parka, B. Min// *Polymer*. – 2010. Vol. 51. – P. 1320–1327.
19. Fabrication of 3D biocompatible/biodegradable micro-scaffolds using dynamic mask projection microstereolithography/ J. Choi, R. Wicker, S. Lee, K. Choi, C. Ha, I. Chung// *Journal of Materials Processing Technology*. – 2009. Vol. 209. – P. 5494–5503.
20. Fabrication, characterization and in vitro drug release behavior of electrospun PLGA/chitosan nanofibrous scaffold/ Z.X. Meng, W. Zheng, L.Li, Y.F. Zheng// *Materials Chemistry and Physics*. – 2011. Vol. 125. – P. 606–611.
21. Faghihi F, Eslaminejad M.B. The effect of nano-scale topography on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells.// *Biomedical papers*. – 2014. – Vol. 158(1). – P. 005–016.
22. Formed 3D bio-scaffolds via rapid prototyping technology./ Maher P., Keatch R., Donnelly K., Paxton J.// 4th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering Springer. – 2009. – P. 2200–2204.
23. Fused deposition modeling of novel scaffold architectures for tissue engineering applications/ Zein I., Hutmacher D.W., Tan K.C., Teoh S.H.// *Biomaterials*. – 2002. Vol. 23. – P. 1169–1185.
24. Greener synthesis of electrospun collagen/ hydroxyapatite composite fibers with an excellent microstructure for bone tissue engineering/ Y. Zhou, H. Yao, J. Wang, D. Wang, Q. Liu, Z. Li// *International Journal of Nanomedicine*. – 2015. Vol.10. – P. 3203–3215.
25. In vitro cell-biological performance and structural characterization of selective laser sintered and plasma surface functionalized polycaprolactone scaffolds for bone regeneration./ Van Bael S., Desmet T., Chai Y.C., Pyka G., Dubrue P., Kruth J.-P., et al.// *Mater Sci Eng C*. – 2013. Vol. 33. – P. 3404–3412.
26. Increasing the pore sizes of bone-mimetic electrospun scaffolds comprised of polycaprolactone, collagen I and hydroxyapatite to enhance cell infiltration/ M.C. Phippsa, W.C. Clem, J.M. Grunda, G.A. Clines, S.L. Bellis// *Biomaterials*. – 2012. Vol. 33. – P. 524–534.
27. Layer by layer three-dimensional tissue epitaxy by cell-laden hydrogel droplets./ Moon S., Hasan S.K., Song Y.S., Xu F., Keles H.O., Manzur F., et al.// *Tissue Eng Part C Methods*. – 2009. Vol. 16. – P. 157–166.
28. Lim T.C., Chian K.S., Leong K.F., Cryogenic prototyping of chitosan scaffolds with controlled micro and macro architecture and their effect on in vivo neo-vascularization and cellular infiltration// *J Biomed Mater Res A*. – 2010. Vol.94. – P. 1303–1311.
29. Melchels F.P., Feijen J., Grijpma D.W., A poly (D, L-lactide) resin for the preparation of tissue engineering scaffolds by stereolithography// *Biomaterials*. – 2009. Vol. 30. – P. 3801–3809.
30. Microdrop Printing of Hydrogel Bioinks into 3D Tissue-Like Geometries./ Pataky K., Braschler T., Negro A., Renaud P., Lutolf M.P., Brugger J.// *Adv Mater*. – 2012. Vol. 24. – P. 391–396.
31. Mineralized biomimetic collagen/alginate/silica composite scaffolds fabricated by a low-temperature bio-plotting process for hard tissue regeneration: fabrication, characterisation and in vitro cellular activities./ Lee H., Kim Y., Kim S., Kim G.// *J Mater Chem B*. – 2014.
32. Nanofibrous Chitosan-Polyethylene Oxide Engineered Scaffolds: A Comparative Study between Simulated Structural Characteristics and Cells Viability/ M.K. Pilehood, M. Dilamin, M. Mirian, H. Sadeghi-Aliabadi, L. Maleknia, P. Nousiainen, A. Harlin// *Biomedical Reserch*. – 2014. – p. 9.
33. Poly (propylene fumarate) bone tissue engineering scaffold fabrication using stereolithography: effects of resin formulations and laser parameters/ Lee K-W, Wang S., Fox B.C., Ritman E.L., Yaszemski M.J., Lu L.// *Biomacromolecules*. – 2007. Vol. 8. – P. 1077–1084.
34. Preparation of poly (ϵ -caprolactone)-based tissue engineering scaffolds by stereolithography/ Elomaa L., Teixeira S., Hakala R., Korhonen H., Grijpma D.W., Seppälä J.V.// *Acta Biomater*. – 2011. Vol. 7. – P. 3850–3856.
35. Rapid-prototyped PLGA/ β -TCP/hydroxyapatite nanocomposite scaffolds in a rabbit femoral defect model/ Kim J., McBride S., Tellis B., Alvarez-Urena P., Song Y-H, Dean D.D., et al.// *Biofabrication*. – 2012. Vol. 4.
36. S. Gautam, A.K. Dinda, N.C. Mishra. Fabrication and characterization of PCL/gelatin composite nanofibrous scaffold for tissue engineering applications by electrospinning method// *Materials Science and Engineering C*. – 2013. Vol. 33. – P. 1228–1235.
37. Scaffold development using 3D printing with a starch-based polymer/ Lam CXF, Mo XM, Teoh SH, Hutmacher DW.// *Mater Sci Eng C*. – 2002. Vol. 20. – P. 49–56.
38. Solid freeform fabrication and characterization of porous calcium polyphosphate structures for tissue engineering purposes./ Shanjani Y., Croos D., Amritha J., Pilliar R.M., Kandel R.A., Toyserkani E. // *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. – 2010. Vol. 93. – P. 510–519.
39. Solid free-form fabrication of drug delivery devices/ Wu B.M., Borland S.W., Giordano R.A., Cima L.G., Sachs E.M., Cima M.J. // *J Control Release*. – 1996. Vol. 40. – P. 77–87.
40. Stimulation of healing within a rabbit calvarial defect by a PCL/PLGA scaffold blended with TCP using solid freeform fabrication technology/ Shim J-H, Moon T-S, Yun M-J, Jeon Y-C, Jeong C-M, Cho D-W, et al.// *J Mater Sci Mater Med*. – 2012. Vol. 23. – P. 2993–3002.
41. Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable polymer scaffold with an intrinsic network of channels/ Kim S.S., Utsunomiya H., Koski J.A., Wu B.M., Cima M.J., Sohn J., et al.// *Ann Surg*. – 1998. – P. 8.
42. The effect of elastin on chondrocyte adhesion and proliferation on poly (3-caprolactone)elastin composites./ An-nabi N., Fathi A., Mithieux S.M., Martens P., Weiss A.S., Dehghani F.// *Biomaterials*. – 2011. Vol. 32. – P. 1517–1525.
43. Threedimensional printing of porous ceramic scaffolds for bone tissue engineering/ Rieder W, Irsen S, Leukers B, Tille C.// *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. – 2005. – Vol. 74. – P. 782–788.
44. Zhang H., Chen Z., Fabrication and Characterization of Electrospun PLGA/MWNTs/Hydroxyapatite Biocomposite Scaffolds for Bone Tissue Engineering// *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. – 2010. – Vol. 25. – P. 241–255.