

壳聚糖基质在体内骨缺损建模条件下的有效性实验评价 (初步报告)

EXPERIMENTAL EVALUATION OF THE EFFICIENCY OF CHITOSAN MATRIXES UNDER CONDITIONS OF MODELING OF BONE DEFECT *IN VIVO* (preliminary message)

© S.V. Vissarionov¹, M.S. Asadulaev¹, A.S. Shabunin^{1, 2}, V.E. Yudin², M.B. Paneiakh³,
P.V. Popryadukhin², Yu.A. Novosad², V.A. Gordienko³, A.G. Aganesov⁴

¹ H. Turner National Medical Research Center for Children's Orthopedics and Trauma Surgery,
Saint Petersburg, Russia;

² Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia;

³ Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia;

⁴ Russian Scientific Center of Surgery named after academician B.V. Petrovsky, Moscow, Russia

■ For citation: Vissarionov SV, Asadulaev MS, Shabunin AS, et al. Experimental evaluation of the efficiency of chitosan matrixes under conditions of modeling of bone defect in vivo (preliminary message). *Pediatric Traumatology, Orthopaedics and Reconstructive Surgery*. 2020;8(1):53-62. <https://doi.org/10.17816/PTORS16480>

Received: 17.10.2019

Revised: 04.02.2020

Accepted: 10.03.2020

论证: 尽管骨塑材料的研究范围很广, 但它不仅具有骨的传导性, 而且还具有骨的诱导性, 这是现代医学材料科学中一个非常热门的课题。本文对壳聚糖-羟基磷灰石复合骨塑材料的有效性进行了实验评价。

目的是研究壳聚糖基海绵植入物及其与羟基磷灰石纳米颗粒的复合材料(重量为50%)对经髂骨缺损区早期成骨的影响。

材料与方法。在主要组中, 以壳聚糖及其复合羟基磷灰石纳米颗粒为基质的海绵植入物的重量为50%。在对照组中, 种植体被使用, 替换用商业Reprobone骨塑材料。材料于第28天植入兔穿透缺陷损区。

结果。壳聚糖材料在骨组织中的高吸收率和沿缺损边缘的网状纤维组织的活性增殖被证实。羟基磷灰石壳聚糖植入组软骨和骨痂形成明显。壳聚糖和羟基磷灰石植入物具有无菌作用。

结论。所获得的数据表明了所研究材料的骨传导性以及在这方面进一步发展的前景。

关键词: 骨缺损; 生物可吸收医用材料; 实验; 缺陷建模; 创伤学; 整形外科。

Background. Despite the wide range of studies, the development of osteoplastic material, which has not only osteoconductive but also osteoinductive properties, remains an extremely topical issue in modern medical materials science. This work is devoted to experimental evaluation of the effectiveness of synthetic osteoplastic composite material based on chitosan and hydroxyapatite.

Aim. This study aimed to determine the effects of spongy implants based on chitosan and its composite with hydroxyapatite nanoparticles in an amount of 50 wt. % on early osteogenesis in the area of the through defect of the ileum.

Materials and methods. The studied materials were sponge implants based on chitosan and its composite with hydroxyapatite nanoparticles in an amount of 50 wt. %. Comparison groups include those without implant placement and those with replacement with commercial Reprobone osteoplastic material. Materials were implanted into the zone of the through defect of the ileum of rabbits for a period of 28 days.

Results. A high rate of resorption of materials based on chitosan in bone tissue and active growth of reticulofibrotic bone tissue along the edges of the defect was established, and the formation of cartilaginous islands and bone marrow was recorded in the group of chitosan implants with hydroxyapatite. The aseptic effect was observed with the use of implants made of chitosan and hydroxyapatite.

Conclusions. The data obtained allow us to argue about the osteoconductivity of the studied materials and the prospects for further development in this direction.

Keywords: bone defect; bioresorbable material; experiment; defect modeling; traumatology; orthopedics.

骨科创伤医师实践中最重要的任务之一是各种病因的骨缺损的填充[1, 2]。目前, 传统上采用自体骨进行骨缺损的骨移植, 目前仍是替代不同部位骨缺损的金标准[3, 4]。然而, 专家们在移植收集供体创面方面, 特别是在术后阶段, 往往会面临一些与并发症发展相关的问题。同时, 值得关注的痛苦等消极现象在术后伤口的面积, 感染性并发症, 血肿移植领域的收集、骨折的捐赠者骨骼, 骨骼结构和皮肤的外观缺陷, 以及有限的捐赠者资源[5]。此外, 需要注意的是, 骨质疏松症通常是伴随骨密度降低而来的, 这是寻找骨塑形材料替代品的一个原因。

第二常见的骨缺损替换材料是同种异基因移植[1, 3, 6-8]。然而, 尽管有现代处理生物材料的方法, 这种替代骨缺损的方法仍有传播艾滋病毒以及乙型和丙型肝炎的风险。此外, 与受体体内同种异基因移植的吸收和重塑相关的问题仍然与相关[5]。

对骨重塑和组织工程的生理机制的详细研究导致了新型人工种植体作为骨塑材料的发展[3]。除了上述对正在开发的新合成材料的要求外, 还可以列出一些一般的必要条件, 包括易用性、可达性、延展性以及骨诱导和骨传导性能的存在[3, 9]。

组织工程的目标是利用以聚合物、干细胞和生物调节剂为主的合成材料为基础的各种基质(脚手架)来再生组织, 包括骨

组织[1, 10]。理想的脚手架应包含足够细胞粘附和生长的小梁间空间, 以确保营养物质和代谢物的运输。移植物的降解速率不应超过正常骨组织的再生速率。植入物的机械性能必须与可能的载荷相一致, 不能导致缺陷边缘区域的额外损伤[11]。

尽管各种骨替代材料的成分和性能各不相同, 但在今天已经不可能从这些材料中找出《理想的》, 适用于手术的各个领域[10]。在开发修复缺损的生物材料时, 应考虑骨组织的修复再生机制。骨替代材料不仅应作为骨形成(骨传导)和促进骨细胞成熟(骨诱导)的骨架, 还应在适当的修复性再生阶段启动这些过程。

壳聚糖是一种很有前途的生物医学应用聚合物[12-15]。它是一种由天然聚合物甲壳素脱乙酰得到的杂多糖。壳聚糖具有许多诱人的理化和生物学特性, 尤其是生物可吸收性、生物相容性、止血性, 它缺乏细胞毒性[16]。壳聚糖吸收的产物是D-氨基葡萄糖, 它是滑膜液的正常成分, 可以促进 Ca^{2+} 在骨组织中的正常沉积。所有这些积极的特性的结合, 使我们能够谈论壳聚糖在骨组织再生手术中的应用前景。

羟基磷灰石(HA)是骨组织的正常成分, 提供其强度。羟基磷灰石位于胶原纤维束之间, 呈平行定向板状。含有纳米HA的复合生物材料具有修复和合成自身骨组织的巨大潜力[17-19]。想法使用HA复合材料作

为骨移植体现在各种各样的工作在现代材料科学的方向《生物医学》[18, 20-23], 因此, 海绵的改性壳聚糖矩阵使用HA可以承诺解决的问题的目标不仅加强植入物的强度特征, 但也形成一个结构更接近原生。

虽然目前正在进行广泛的活体外研究以评估新材料的各个方面, 但由于这一过程的复杂性, 目前还无法对活体外、原位和在硅片进行修复骨生成的全面研究。对骨缺损修复性再生进行充分评估的唯一选择是体内试验。

目的是研究壳聚糖基海绵植入物及其与羟基磷灰石纳米颗粒的复合材料(重量为50%)对经髂骨缺损区早期成骨的影响。

材料与方法

研究的材料是用3%的壳聚糖溶液(德国Heppe, 平均分子量为168kDa, 脱乙酰度为90%) 在2%的乙酸中冻干, 然后在10%的NaOH溶液中浸出转化为基本形态。以类似的方法制备了壳聚糖海绵, 此外, 在初始壳聚糖溶液中加入重量为50%的HA纳米颗粒(俄罗斯联邦国家统一企业Institute of Silicate Chemistry of Russian Academy of Sciences)。将海绵制成直径4-5毫米, 高度1厘米的圆柱体, 然后用高压灭菌法灭菌。Reprobone (Ceramisis有限公司,

英国) 用于临床实践, 包括60% HA和40% 磷酸 β -三钙, 被用作商业比较材料。

本实验以18只雌性栗鼠种的兔为研究对象, 年龄8~12个月, 平均体重2000~2500克, 在联邦国家统一企业《Rappolovo实验动物保育所》繁育(2018年6月19日兽医学证书编号0150967号247)。这项工作是在国家血液学医学研究中心的实验室进行的, 儿童创伤和矫形外科以G. I. Turner命名, 符合国际上对这类研究的要求。

将两个直径为5mm的通孔放置在相距1cm处, 模拟髂损伤(见图1)。实验研究总时间为28天。这是因为在2-4周后, 骨吸收停止, 破骨细胞发生凋亡和吞噬作用。之后会有一个短暂的休息期, 形成的腔被成骨细胞覆盖, 在接下来的3个月里充满类骨质。

总的来说, 在所有实验动物组, 16个缺陷填充海绵材料基于壳聚糖16穿孔洞充满了壳聚糖与羟基磷灰石, 16的积极控制射孔孔Reprobone材料和16负对照组模拟的缺陷, 在建模后, 穿孔仍空心(见下表)。Ceramisis生产的Reprobone材料由HA(60%)和磷酸三钙(40%)组成。

所有对动物的操作均在充分止痛的情况下进行。以1:1的比例盐酸替来他明/唑拉西泮(zoletil100, 法国, Vibrac)和塞拉嗪(Rometar, Bioveta, 捷克共和国)

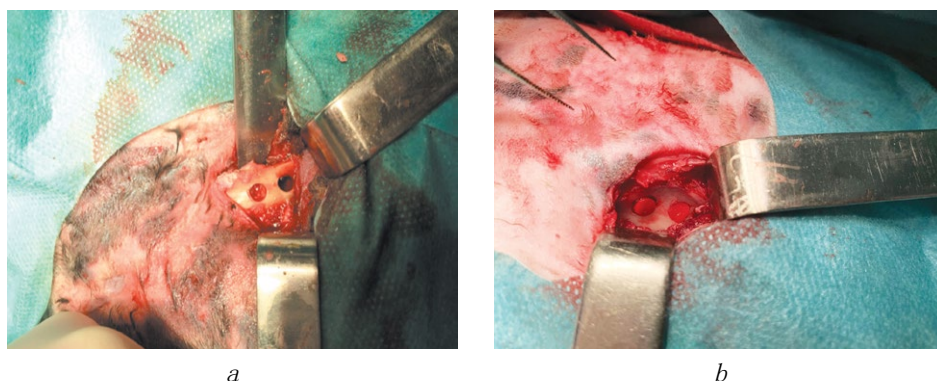


图1. 模拟缺陷区外观: a—研究材料植入前的缺陷区; b—壳聚糖植入海绵材料的缺陷区

混合麻醉动物。麻醉诱导剂量为0.15ml Zoletil 100 / 1kg动物体重，0.1ml Rometar / 1kg动物体重。维持剂量是初始剂量的一半。为了计算制剂的用量，对实验动物进行了预称重。

动物进入手术麻醉阶段后，准备好手术场地剪毛、剃毛，皮肤三次皮肤消毒液暴露5分钟，用无菌片限定干预区。再采用0.1%盐酸利多卡因溶液浸润麻醉。

从背部表面触诊骨盆骨的脊柱。然后，在无菌条件下，用横膈膜手术刀在盆腔骨芒上做2.5 cm长的皮肤切口。盆腔骨分离明显而直接。切开后，骨膜直接用锉刀将髂骨翼骨化。骨在软组织保护下用Buyalsky伤口勺。

在操作过程中，将直径为5毫米的无菌刀具固定在钻头上，与髂骨平面成90°角。用测角仪测量射孔孔眼。将钻头与骨平面成90°角固定后，在髂骨翼穿孔。每侧重

复操作2次，造成两处骨缺损，缺损处直径5 mm，相距10 mm，按照实验组的要求用实验材料填充。

根据植入材料形成4个实验组，得到6对不同的材料组合，考虑到动物的个体差异，将其放置在不同的缺陷区域，以避免交叉暴露（见表）。总共有16个髂骨缺损在一组合成材料中被模拟，阳性和阴性对照。

这是方便髂骨骨缺损的填充海绵壳聚糖和壳聚糖海绵与羟磷灰石：解剖镊子的帮助下，材料很容易压缩和放置在一个骨缺损，之后，在5秒内恢复原始形式和材料密度和完全填充骨缺损。所有这些都伴有骨缺损的机械止血。

当植入Reprobone材料为颗粒状时，用镊子将种植体（5-6个颗粒）放入骨缺损处并压紧。在这个病例中，材料位于骨缺损的对面。需要注意的是，在缝合伤口时，穿孔区域的髂骨边缘仍有出血。

动物阴性对照组模拟以后在造模后穿孔保持中空。

然后止血，分层缝合伤口。术后3天每天使用消毒剂处理伤口。术前、术后肌肉注射头孢呋辛30mg / kg。

在研究期间，每天都对动物进行检查。在实验的第28天，为了显示和评估髂翼骨缺损区域的影像学，我们对其进行了正面和侧面的数字放射学投影。在指定的时间结束后，按照国际动物人道处理标准将动物带离实验，进行尸检，并从缺陷区域采集尸检样本。

实验样本有效性的主要指标是对缺陷区域尸检样本的形态学评价结果，即：确定移植吸收的程度，评估骨损伤区域炎症反应的严重程度和活性，通过软骨性岛的存在

动物成群分布

动物组	材料和本地化	动物数量
ChS/CM	左边: CHs, 2件 右边: CM, 2件	3
ChS/ChSH	左边: CHs, 2件 右边: ChSH, 2件	3
ChSH/CM	左边: ChSH, 2件 右边: CM, 2件	3
ChS/CGWT	左边: CHs, 2件 右边: 控制, 不治疗, 2件	3
ChSH/CGWT	左边: ChSH, 2件 右边: 控制, 不治疗, 2件	3
CM/CGWT	左边: CM, 2件 右边: 控制, 不治疗, 2件	3
	一共	18

注: ChS — 壳聚糖海绵; ChSH — 羟基磷灰石壳聚糖海绵; CM — 商业Reprobone材料; CGWT — 对照组, 未治疗。

(或缺失)确定缺损区域的再生阶段,并将其转化为网状纤维骨组织。

为了充分比较实验数据,考虑到动物的个体特征,这些操作在两侧进行,并且在每一侧建立两个骨缺损模型。同时,为了避免交叉效应,只将同一类型的材料植入相邻的缺陷中。

获得的尸检样本在EDTA基础上溶液(溶液B, Bio Vitrum, 俄罗斯)中脱钙45天,然后在Thermo Scientific Excelsior AS作为组织处理器(Thermo Fisher Scientific, 英国)中通过浓度不断增加的醇类12小时。在英国Thermo Fisher Scientific的Thermo science Histo Star站进行石蜡填充,在Microm HM 430切片力(Thermo Fisher Scientific, 英国)进行石蜡切片切割。

根据Van Gieson (Bio Vitrum, 俄罗斯)的方法,将获得的切片用曙红、Mayer苏木精和Picrofuchsin在自动组织学工作站Microm HMS 740上进行染色。组织学标本染色后,利用德国Carl Zeiss制作的Axio Lab. A1型显微镜光镜进行形态学检查。

结果

在实验过程中,动物的行为没有明显的偏差,研究材料的植入过程也没有致命的后果和任何并发症。

由于视觉评估手术治疗领域的宏观制剂动物后退出了实验和解剖是在手术后第28天,没有巨大骨缺损的植入区壳聚糖海绵材料。

在植入Reprobone材料的阳性对照组中发现了0.2 mm大小的骨缺损和植入的合成材料样本。

在阴性对照组,对手术区域的宏观评估显示存在0.3 mm大小的骨缺损。

壳聚糖海绵的原始形态材料尚未被鉴定。在阳性对照组的动物中,植入的样本几乎保持了它们原来的外观。

在尸检样本的组织学检查中,获得了以下数据。

- 有穿孔的阴性对照组(图2)。

在骨缺损区有大量坏死碎屑,并有多多个密集的中性白细胞。视野范围内的骨膜和横纹肌组织的小碎片,伴有局灶性淋巴组织细胞浸润和单个的巨大多核细胞,毗邻缺损区和周围骨组织。

- 阳性对照组采用Reprobone材料。

在被研究的材料中,在实验的第28天,板状骨组织髂骨翼有一个很大的缺损,填充了一种海绵状的、明显的嗜曙红的材料。在海绵细胞中,观察到明显的混合细胞渗出反应;中性粒细胞的渗出物主要集中在物质的周围,可见细微的团块性衰变。在海绵的中央和旁中心细胞中,渗出物主要由淋巴细

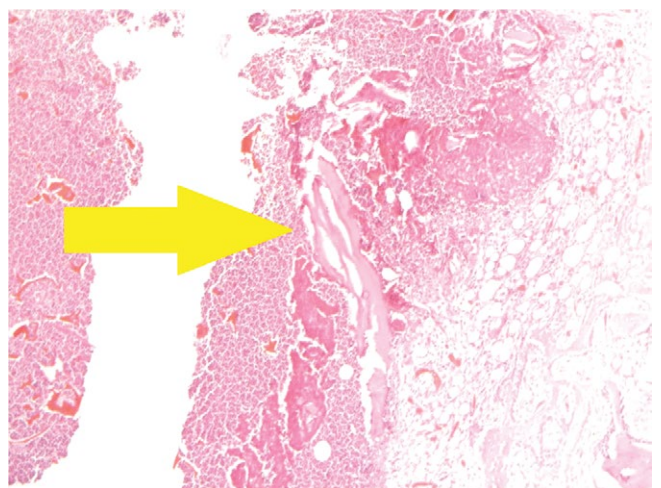


图2。对照组:坏死性碎屑,伴密集嗜中性白细胞浸润,骨束及骨膜相邻。苏木精和伊红染色,放大×40倍

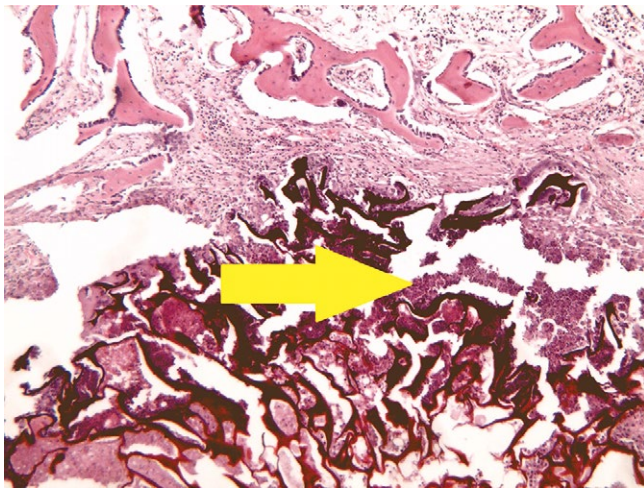


图 3。阳性对照组：Reprobone海绵样结构充填骨缺损区。在异物的细胞中一中性白细胞的明显浸润。苏木精和伊红染色，放大×40倍

胞和巨噬细胞组成。在骨组织和异物之间，可见粗纤维结缔组织的《边缘》，其病灶为淋巴巨噬细胞浸润，伴以异物等巨大多核细胞的混合物（图3）。骨膜有肉芽肿性炎症形成的征象。

• 以壳聚糖为基材的海绵材料组（图4）。

在第28天的缺损区，可见充满纤维软骨的区域。在缺陷区域没有发现合成材料测试样品的元素。在骨缺损边缘可见纤维软骨向网状纤维骨组织的转变。

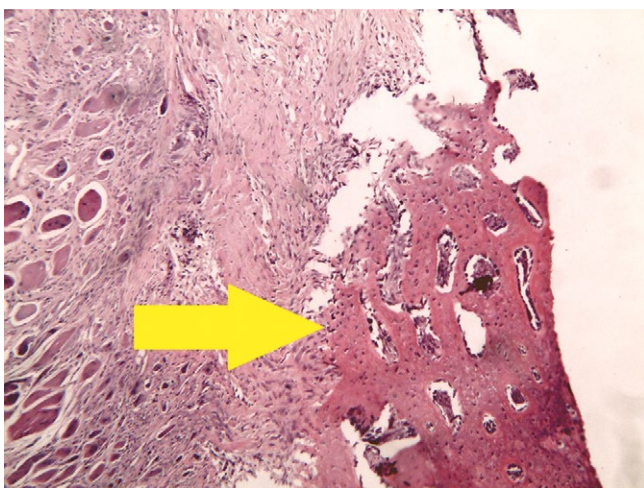


图 4。壳聚糖组：沿网状纤维组织缺损边缘增殖。苏木精和伊红染色，放大×40倍

• 一组以壳聚糖和羟基磷灰石为基材的海绵材料（图5）。

第28天，在缺损区观察到一个充满粗纤维结缔组织的区域，在小病灶周围有大量的异物巨细胞形成。骨痂与粗纤维结缔组织相邻，有少量较大的软骨《岛》。

讨论

在工作过程中，可以在实验动物中建立髂翼骨缺损的实验模型，并对各种植入物作为骨塑材料的使用进行对比分析。

阴性对照组在骨缺损未填充的情况下，在形态学检查标本的缺损区，发现有坏死的腐质伴密集的中性白细胞浸润。

阳性对照组的特征是极低的样品反复吸收。由于缺陷是在实验中模拟出来的，而根据定义，这并不是临界的，所以这组中较低的再吸收率对修复过程起到了限制作用。此外，在组织学检查中，在缺损区有渗出反应，在肉芽肿性炎症中发现了巨大的多核细胞，如邻近骨膜的异物，这表明在愈合的早期阶段，组织对这种材料有

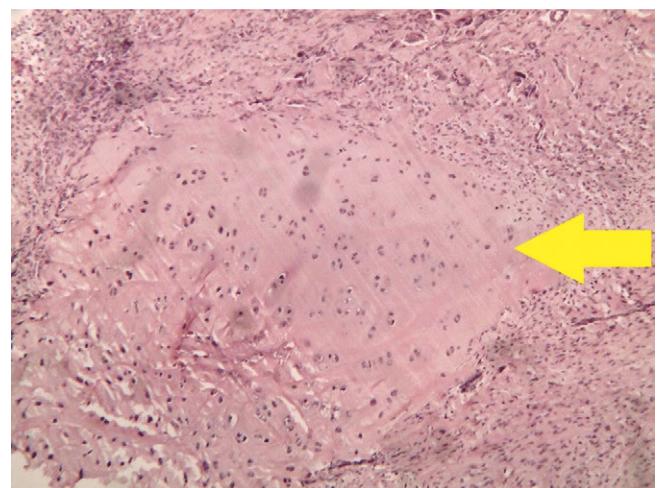


图 5。羟基磷灰石壳聚糖假体组：骨缺损区粗纤维组织间的软骨性岛。苏木精和伊红染色，放大×40倍

负性反应。然而，这种类型的反应也可能是由于术中伤口感染的细菌制剂。

羟基磷灰石壳聚糖海绵材料具有较高的再吸收率。在初始形态中，宏观制剂上没有检测到样品；植入材料的残留仅通过对缺损区活检样本的形态学研究来确定。

本实验引入阶段的壳聚糖海绵材料由于具有海绵结构，使用方便。由于初始材料的高弹性特性，使用直径略大于缺陷初始孔的圆柱形试样可以在缺陷区实现试样的紧密固定，对边缘的影响极小。

在羟基磷灰石壳聚糖海绵组中，由于异物的引入，出现了相当高的吸收度和轻微的慢性炎症表现。与此同时，在缺损区域发现了软骨组织的胰岛，证实了骨诱导的刺激，以及骨痂的迹象。

结果表明，壳聚糖海绵植入物在形态学研究方面是最佳的。除了在实验中最大的吸收率外，网状纤维骨组织的形成和相邻组织完全没有阴性反应的痕迹也被注意到。与此同时，材料的快速再吸收可能是一个显著的缺点。由于本研究的目的是对材料的组织反应和骨诱导特性进行定性评估，因此对不重要的缺陷进行建模是可以接受的，并使我们能够在更短的时间内对其进行评估。然而，在严重骨缺损的情况下，包括一个明显较长的恢复期，样本的过快吸收成为一个急剧的负面因素。

这一结果与其他壳聚糖和壳聚糖-羟基磷灰石多孔基质用于骨缺损修复的生物吸收研究结果相关[13, 17, 18]。在[18]中，由于研究材料具有普遍的相似性，其HA的大小和浓度明显超过了我们的研究中相应的参数，因此，记录到相邻组织的阴性反应更为明显。使用浓度为50质量%的HA纳米颗粒可获得较不脆的材料，与密度更大、更脆的

商用类似物相比，这确保了使用和固定的方便性，以及相邻组织的更积极的反应，并提高了研究材料的骨传导率。

研究的局限性

本研究的局限性包括以下几点。

- 研究了所研制材料对修复性成骨早期的影响。由于实验时间短，我们无法对其长期影响得出明确的结论，也无法充分比较材料使用的积极和消极方面与较长吸收期(Reprobone材料组)。
- 手术介入区造影的目的是控制植入法区。此外，它具有概括性质；因此，不可能可靠地量化缺陷区域的变化。
- 初始缺陷的大小和位置不允许我们对海绵体材料在缺陷区域的机械载荷作用下的粘弹性性能的正负影响做出假设。

结论

本研究的结果可以评价基于羟基磷灰石壳聚糖海绵的实验材料的生物学特性，以及与阳性对照和阴性对照相比的生物吸收情况。这些材料在骨再生过程中的积极作用和邻近组织对种植体的轻微负面反应得到了证实。此外，我们还发现，骨组织中壳聚糖海绵材料的再吸收速度非常快，根据缺陷的大小和上述材料的应用方法，可以有正的值，也可以有负的值。同时，与其他研究材料相比，壳聚糖对骨组织再生的刺激作用最强，而比例中的羟基磷灰石壳聚糖海绵对骨诱导的刺激作用最弱。使用羟基磷灰石壳聚糖海绵时也要注意无菌效果。

研究结果表明，有必要对材料进行进一步的研究和细化。通过冷冻干燥结合其效率

获得研究材料的简单过程，我们可以讨论在基于羟基磷灰石壳聚糖海绵的复合材料组织工程结构的骨植入方向的进一步发展前景。

附加信息

资金来源。俄罗斯科学基金会19-7330003资助。

利益冲突。作者没有利益冲突。

伦理审查。这项试点研究得到了当地伦理委员会的批准。提取从记录19-1号的伦理委员会会议之时价的联邦国家预算机构《儿童骨科研究所后G. I. Turner》从01日07月2019年俄罗斯卫生部。

作者贡献

S. V. Vissarionov — 方法论的发展，研究设计和文章的写作。

M. S. Asadulaev — 参与研究设计的开发，外科手术的准备和实施，实验数据的处理，文章的写作。

A. S. Shabunin — 参与研发设计，处理实验数据，维护相关文档，撰写文章正文。

V. E. Yudin — 研究材料的开发。

M. B. Paneiakh — 制作组织学制剂，对材料进行形态学检查，撰写文章正文。

P. V. Popryadukhin — 测试材料的开发和生产。

Yu. A. Novosad — 试验材料的开发和生产，参与外科手术。

V. A. Gordienko — 参与外科手术干预，撰写文章正文。

A. G. Aganesov — 参与研发，设计和处理实验数据。

谢意的表示。我们表达我们的感谢帮助和协助开展科学研究人员的实验Natalya Borisovna Fomina, 以及实验室实验手术的员—操作单位的负责人 Olga Konstantinovna Kartseva, Tatiana Petrovna Maslennikova (俄罗斯科学院硅酸盐化学研究所), x射线实验室助理, 以及放射科医生 Tatyana Valerievna Murashko, 圣彼得堡国立儿科医科大学学生 — Lola Aydarovna Davletova, Andrey Mikhailovich Fedyuk, Petr Leonidovich Suschinsky, Biika Narimanovna Atabieva圣彼得堡国立儿科医科大学的临床住院医师。

References

1. Анастасиева Е.А., Садовой М.А., Воропаева А.А., Кирилова И.А. Использование ауто- и аллотрансплантатов для замещения костных дефектов при резекциях опухолей костей // Травматология и ортопедия России. – 2017. – Т. 23. – № 3. – С. 148–155. [Anastasieva EA, Sadovoy MA, Voropaeva AA, Kirilova IA. Reconstruction of bone defects after tumor resection by autoand allografts (review of literature). *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2017;(23):148-155. (In Russ.)]
2. Котельников Г.П., Колсанов А.В., Щербовских А.Е. Реконструкция посттравматических и постоперационных дефектов нижней челюсти // Хирургия. Журнал им. Н.И. Пирогова. – 2017. – № 7. – С. 69–72. [Kotel'nikov GP, Kolsanov AV, Shcherbovskikh AE. Reconstruction of posttraumatic and postoperative defects of lower jaw. *Khirurgiya (Mosk)*. 2017;(7):69-72. (In Russ.)]. <https://doi.org/10.17116/hirurgia2017769-72>.
3. Garcia-Gareta E, Coathup MJ, Blunn GW. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration. *Bone*. 2015;81:112-121. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.07.007>.
4. Гайворонский И.В., Губочкин Н.Г., Микитюк С.И., и др. Анатомические обоснования формирования костных трансплантатов на мышечно-сосудистой ножке в нижней трети предплечья и возможностей их перемещения // Вестник Российской военно-медицинской академии. – 2016. – Т. 3. – № 55. – С. 129–134. [Gayvoronskiy IV, Gubochkin NG, Mikityuk SI, et al. Anatomical substantiation of the formation of bone transplants on the musculovascular pedicle in the lower third of the forearm and possibilities of their displacement // *Vestnik Rossiyskoy voenno-meditsinskoy akademii*. – 2016. – T. 3. – No 55. – S. 129-134. (In Russ.)]

- kin NG, Mikityuk SI. Anatomic substantiation of formation of bone grafts on muscle-pedicle in lower third of the forearm and the possibility of their transplantation. *Vestnik Rossiiskoi voenno-meditsinskoi akademii*. 2016;3(55):129-134. (In Russ.)]
5. Предеин Ю.А., Рерих В.В. Костные и клеточные имплантаты для замещения дефектов кости // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 6. – С. 132–146. [Predein YA, Rerikh VV. Bone and cellular implants for replacement bone defects. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya*. 2016;(6):132-146. (In Russ.)]
6. Лекишвили М.В., Склянчук Е.Д., Акатов В.С., и др. Костнопластические остеоиндуктивные материалы в травматологии и ортопедии // Геней ортопедии. – 2015. – № 4. – С. 61–67. [Lekishvili MV, Sklyanchuk ED, Akatov VS, et al. Osteoplastic osteoinductive materials in traumatology and orthopaedics. *Genii ortopedii*. 2015;(4):61-67. (In Russ.)]
7. Хватов В.Б., Свищев А.В., Ваза А.Ю., и др. Способ изготовления лиофилизированного аллотрансплантата кости // Трансплантология. – 2016. – № 1. – С. 13–18. [Khvatov VB, Svishchev AV, Vaza AY. Sposob Method of manufacturing a lyophilized allograft bone. *Transplantologiya*. 2016;(1):13-18. (In Russ.)]
8. Кирилова И.А., Подорожная В.Т., Шаркеев Ю.П., и др. Свойства деминерализованного костного матрикса для биоинженерии тканей // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2017. – Т. 6. – № 3. – С. 25–36. [Kirilova IA, Podorozhnaya VT, Sharkeev YP, et al. Properties of the demineralized bone matrix for bioengineering of tissue. *Copmplex issues of cardiovascular diseases*. 2017;6(3):25-36. (In Russ.)]
9. Кирилова И.А., Садовой М.А., Подорожная В.Т. Сравнительная характеристика материалов для костной пластики: состав и свойства // Хирургия позвоночника. – 2012. – № 3. – С. 72–83. [Kirilova IA, Sadovoy MA, Podorozhnaya VT. Comparative characteristics of materials for bone grafting: composition and properties. *Spine surgery*. 2012;(3):72-83. (In Russ.)]
10. Кирилова И.А. Деминерализованный костный трансплантат как стимулятор остеогенеза: современные концепции // Хирургия позвоночника. – 2004. – № 3 – С. 105–110. [Kirilova IA. Demineralized bone graft as an osteogenesis stimulator: current literature review. *Spine surgery*. 2004;(3):105-110. (In Russ.)]
11. Roseti L, Parisi V, Petretta M, et al. Scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2017;78:1246-1262. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>.
12. Deepthi S, Venkatesan J, Kim SK, et al. An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2016;93(Pt B):1338-1353. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.03.041>.
13. Balagangadharan K, Dhivya S, Selvamurugan N. Chitosan based nanofibers in bone tissue engineering. *Int J Biol Macromol*. 2017;104(Pt B):1372-1382. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.12.046>.
14. Logith Kumar R, Keshav Narayan A, Dhivya S, et al. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. *Carbohydr Polym*. 2016;151:172-188. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.049>.
15. Dobrovolskaya IP, Yudin VE, Popryadukhin PV, et al. *In vivo* studies of chitosan fiber resorption. *J Appl Cosmetol*. 2015;33:81-87.
16. Rinaudo M. Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog Polym Sci*. 2006;31(7):603-632. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2006.06.001>.
17. Sharma C, Dinda AK, Potdar PD, et al. Fabrication and characterization of novel nano-biocomposite scaffold of chitosan-gelatin-alginate-hydroxyapatite for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2016;64:416-427. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.060>.
18. Zhang J, Liu G, Wu Q, et al. Novel mesoporous hydroxyapatite/chitosan composite for bone repair. *J Biomed Eng*. 2012;9(2):243-251. [https://doi.org/10.1016/s1672-6529\(11\)60117-0](https://doi.org/10.1016/s1672-6529(11)60117-0).
19. Danoux CB, Barbieri D, Yuan H, et al. *In vitro* and *in vivo* bioactivity assessment of a polylactic acid/hydroxyapatite composite for bone regeneration. *Biomater*. 2014;4:e27664. <https://doi.org/10.4161/biom.27664>.
20. Cox SC, Thornby JA, Gibbons GJ, et al. 3D printing of porous hydroxyapatite scaffolds intended for use in bone tissue engineering applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 2015;47:237-247. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.11.024>.
21. Dutta SR, Passi D, Singh P, Bhuibhar A. Ceramic and non-ceramic hydroxyapatite as a bone graft material: a brief review. *Ir J Med Sci*. 2015;184(1):101-106. <https://doi.org/10.1007/s11845-014-1199-8>.
22. Ratnayake JTB, Mucalo M, Dias GJ. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2017;105(5):1285-1299. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33651>.
23. Oliveira HL, Da Rosa WLO, Cuevas-Suárez CE, et al. Histological evaluation of bone repair with hydroxyapatite: a systematic review. *Calcif Tissue Int*. 2017;101(4):341-354. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0294-z>.

Information about the authors

Sergei V. Vissarionov — MD, PhD, D.Sc., Professor, Corresponding Member of RAS, Deputy Director for Research and Academic Affairs, Head of the Department of Spinal Pathology and Neurosurgery, H. Turner National Medical Research Center for Children's Orthopedics and Trauma Surgery, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-4235-5048>. E-mail: vissarionovs@gmail.com.

Marat S. Asadulaev — MD, clinical resident, laboratory assistant in the Laboratory of Experimental Surgery, H. Turner National Medical Research Center for Children's Orthopedics and Trauma Surgery, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-1768-2402>. E-mail: marat.asadulaev@yandex.ru.

Anton S. Shabunin — PhD student, Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University; laboratory assistant in the Laboratory of Experimental Surgery, H. Turner National Medical Research Center for Children's Orthopedics and Trauma Surgery, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-8883-0580>. E-mail: anton-shab@yandex.ru.

Vladimir E. Yudin — Dr. Phys.-Math. Sci., Professor, Director of Laboratory of Polymeric Materials for Tissue Engineering and Transplantology, Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-5517-4767>. E-mail: yudin@hq.macro.ru.

Moisei B. Paneiakh — assistant of the Department of Pathological Anatomy with a course of forensic medicine, Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-2527-9058>.

Pavel V. Popryadukhin — PhD, Senior Researcher of Laboratory of Polymeric Materials for Tissue Engineering and Transplantology, Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0001-5478-5630>. E-mail: pavelpnru@gmail.com.

Yury A. Novosad — student, Peter the Great Saint Petersburg Polytechnic University, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0002-6150-374X>. E-mail: yurynovosad@gmail.com.

Vasili A. Gordienko — Research Assistant of the Laboratory of Experimental Surgery, Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Saint Petersburg, Russia. <https://orcid.org/0000-0003-0590-2137>. E-mail: chet1337@gmail.com.

Aleksandr G. Aganesov — MD, PhD, D.Sc., Professor, Head of the Department of spine surgery of the Russian Scientific Center of Surgery named after academician B.V. Petrovsky, Moscow, Russia. <https://orcid.org/0000-0001-8823-5004>.