

**VILNIAUS UNIVERSITETAS
MEDICINOS FAKULTETAS
ODONTOLOGIJOS INSTITUTAS**

Lukas Naktinis

V kursas, 1 grupė

Magistro baigiamasis darbas

**Trimačių osteokonduktyvių ir osteoinduktyvių karkasų poveikio kaulo
regeneracijos procesams įvertinimas *in vitro* ir *in vivo***

**Evaluation of the Effect of Three-Dimensional Osteoconductive and
Osteoinductive Scaffolds on the Bone Regeneration Process In Vitro and In
Vivo**

Darbo vadovė: Dr. Asist. Ieva Gendvilienė

Vilnius

2023

TURINYS

1. SANTRAUKA.....	3
2. SUMMARY	4
3. ĮVADAS	7
3.1. Tyrimo tikslas.....	7
3.2. Tyrimo uždaviniai	7
3.3. Hipotezės	8
4. LITERATŪROS APŽVALGA	8
5. MEDŽIAGOS IR METODAI	16
5.1. Karkasų gamyboje ir <i>in vitro</i> tyrimuose naudotos medžiagos	16
5.2. Filamentų gamyba.....	16
5.3. Karkasų gamyba	17
5.4. DPKL ir endotelio ląstelių (EL) išskyrimas.....	18
5.5. Konstrukto gamyba	18
5.6. DPKL išskirtų signalinių molekulių analizė	18
5.7. EL migracijos analizė.....	19
5.8. <i>In vivo</i> tyrimo imtis ir grupės.....	19
5.9. Chirurginės operacijos ir pooperacinė eiga.....	19
5.10. Mikrokompiuterinės tomografijos (mikroKT) analizė	21
5.11. Histologinė analizė.....	21
5.12. Statistinė analizė.....	21
6. REZULTATAI.....	22
6.1. DPKL išskirtų signalinių molekulių analizės rezultatai.....	22
6.2. EL migracijos analizės rezultatai.....	23
6.3. MikroKT analizės rezultatai	23
6.4. Histologinės analizės rezultatai.....	25
7. REZULTATŲ APTARIMAS.....	27
8. IŠVADOS.....	30
9. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS	31
10. LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	32
11. PRIEDAI.....	41

Trimačių osteokonduktyvių ir osteoinduktyvių karkasų poveikio kaulo regeneracijos procesams įvertinimas *in vitro* ir *in vivo*

1. SANTRAUKA

Problemos aktualumas ir darbo tikslas. Kaulinių defektų atstatymas yra viena iš dažniausiai atliekamų operacijų medicinoje ir odontologijoje. Dėl turimų autogeninio kaulo trūkumų tęsiasi intensyvios pažangių kaulinių pakaitalų paieškos. Šio tyrimo tikslas – įvertinti kompozitinių polilaktinės rūgšties (PLR) ir PLR/biostiklo 45S5 (BS) karkasų bei jų konstrukčių, papildytų dantų pulpos kamieninėmis ląstelėmis (DPKL) ar jų išskirtu tarpląsteliniu užpildu (TU), poveikį kaulo regeneracijos procesams *in vitro* ir *in vivo*.

Medžiagos ir metodai. PLR ir PLR/BS karkasai pagaminti lydyto nusėdimo modeliavimo spausdintuvu. Naudojant iš Wistar žiurkių išskirtą DPKL suspensiją pagaminti PLR-DPKL, PLR-TU, PLR/BS-DPKL ir PLR/BS-TU konstruktai. PLR ir PLR/BS karkasų poveikis potencialiam organizmo atsakui vertintas atliekant ant šių karkasų inkubuotų DPKL sekretomų analizę. Konstrukčių poveikis angiogenezei vertintas atliekant endotelio ląstelių (EL) migracijos analizę. Karkasų ir konstrukčių poveikis naujo kaulo formavimuisi vertintas Wistar žiurkių kaukolių kritinio dydžio kauliniuose defektuose, atlikus defektų mikrokompiuterinės tomografijos ir histologinę analizę.

Rezultatai. Ant PLR ir PLR/BS karkasų inkubuotų DPKL sekretomuose identifikuota 11 signalinių molekulių, dalyvaujančių uždegiminiame atsake, žaizdos gijime, osteogenezės ir angiogenezės reguliavime, ląstelių kalcio jonų homeostazėje. EL statistiškai reikšmingai daugiau migravo ant PLR/BS karkasų, lyginant su PLR grupe. *In vivo* rezultatai parodė, kad didžiausias kaulo kiekis susidarė PLR/BS karkasais ir PLR/BS-TU konstruktais užpildytuose defektuose.

Išvados. Tirtų karkasų poveikis organizmui susijęs su uždegiminiu atsaku, žaizdos gijimu, osteogenezės ir angiogenezės reguliavimu, ląstelių kalcio jonų homeostaze. PLR/BS karkasai ir konstruktai parodė didesnę angioindukcinį potencialą *in vitro* bei didesnę naujo kaulo formavimąsi *in vivo*, lyginant su PLR karkasais ir konstruktais. Reikalingi tolimesni tyrimai, siekiant gerinti PLR/BS karkasų savybes.

Raktiniai žodžiai: trimatis spausdinimas; kaulo regeneracija; polilaktinė rūgštis; biostiklas 45S5; kamieninės ląstelės; tarpląstelinis užpildas.

Evaluation of the Effect of Three-Dimensional Osteoconductive and Osteoinductive Scaffolds on the Bone Regeneration Process *In Vitro* and *In Vivo*

2. SUMMARY

Relevance and aim of the study. The reconstruction of bone defects is one of the most frequently performed surgeries in medicine and dentistry. Due to autologous bone's shortcomings, the search for advanced bone substitutes continues. This study aimed to evaluate the effects of three-dimensional polylactic acid (PLA) and PLA/bioglass 45S5 (BG) scaffolds and their constructs, supplemented with dental pulp stem cells (DPSC) or their extracellular matrix (ECM), on bone regeneration process *in vitro* and *in vivo*.

Materials and methods. PLA and PLA/BG scaffolds were made using a fused deposition modelling printer. Using DPSC suspension isolated from Wistar rats, PLA-DPSC, PLA-ECM, PLA/BG-DPSC and PLA/BG-ECM constructs were made. *In vitro* cytokine evaluation in DPSC secretomes and vertical endothelial cells (EC) migration were carried out. The scaffolds' and constructs' effect on new bone formation was assessed in Wistar rats' critical-size calvarial bone defects by micro-computed tomography and histological analysis.

Results. Secretomes of DPSC incubated on PLA and PLA/BG scaffolds contained 11 signaling molecules involved in the inflammatory response, wound healing, regulation of osteogenesis and angiogenesis, and cellular calcium ion homeostasis. There was a statistically significantly higher EC migration on PLA/BG scaffolds than in PLA group. The highest bone amount formed in defects filled with PLA/BG and PLA/BG-ECM samples.

Conclusions. The scaffolds' effect on organism response was related to inflammatory process, wound healing, regulation of osteogenesis and angiogenesis, and cellular calcium ion homeostasis. PLA/BG scaffolds and constructs showed higher angiogenic potential *in vitro* and new bone formation *in vivo* than PLA scaffolds and constructs. Further research is needed to continue improving PLA/BG scaffolds' properties.

Keywords: three-dimensional printing; bone regeneration; polylactic acid; bioglass 45S5; stem cells; extracellular matrix.

SANTRUMPŲ SĄRAŠAS

AIMP-1 – audinių metalopeptidazės-1 inhibitorius

Bio-Oss – Geistlich Bio-Oss®

BS – biostiklas 45S5

CCL-5 – C-C motyvo chemokino ligandas-5

CINC – citokinų indukuojamas neutrofilų chemoatraktantas

CXCL10 – C-X-C motyvo chemokino ligandas-10

CX3CL1 – C-X3-C motyvo chemokino ligandas-1

DPKL – dantų pulpos kamieninės ląstelės

EL – endotelio ląstelės

IL-1ra – interleukinas-1ra

IL-6 – interleukinas-6

JAV – Jungtinės Amerikos Valstijos

KEAF – kraujagyslių endotelio augimo faktorius

LNM – lydyto nusėdimo modeliavimas

MikroKT – mikrokompiuterinė tomografija

PLR – polilaktinė rūgštis

rEL – raudonai fluorescuojančios endotelio ląstelės

tTLAM-1 – tirpioji tarpląstelinės adhezijos molekulė-1

TU – tarpląstelinis užpildas

3D – trimatis

LIST OF ABBREVIATIONS

BG – bioglass 45S5

DPSC – dental pulp stem cells

EC – endothelial cells

ECM – extracellular matrix

PLA – polylactic acid

3. ĮVADAS

Kaulo augmentacija – procedūra, be kurios dauguma šiuolaikinės chirurgijos sričių yra neįsivaizduojamos. Kaulinius defektus reikalinga atstatyti pašalinus didelės apimties cistas, navikus bei po traumų ar uždegimų, tačiau odontologijoje bene dažniausia kaulo augmentacijos priežastis – sąlygų, būtinų sėkmingai implantacijai, sudarymas. Netekus dantų įvyksta žandikaulio alveolinės ataugos rezorbcija bei kokybiniai kaulo pokyčiai, o tai gali lemti sunkumus norint atstatyti prarastus dantis implantais [1]. Nustatyta, kad net 50 proc. odontologijoje atliekamų dantų implantacijų metu kartu atliekama ir kaulo augmentacija [2]. Esama statistika rodo, kad kasmet atliekama apie 2,2 mln. kaulo augmentacijos procedūrų, kurių bendra vertė siekia 664 mln. Jungtinių Amerikos Valstijų (JAV) dolerių, ir prognozuojama, kad operacijų, atliekamų atstatant kaulinius defektus, skaičius kasmet augs 13 proc. [3]. Nors rinkoje siūloma didelė kaulo pakaitalų įvairovė, autogeninis kaulas vis dar laikomas auksiniu standartu [4]. Nepaisant to, dėl riboto autogeninio kaulo donorinių sričių pasirinkimo ir galimų papildomos operacijos komplikacijų bei augančios rinkos tebevyksta naujų kaulo pakaitalų tyrimai, kurių metu siekiama pagaminti medžiagą, savybėmis kuo artimesnę autogeniniam kaului. Šiais laikais vis sparčiau besivystanti trimačio (3D) spausdinimo technologija atveria naujas galimybes ypač tikslaus dizaino, konkretiems kauliniams defektams pritaikytų karkasų gamybai, o tobulėjanti audinių inžinerija leidžia į sudėtį įtraukti naujo kaulo formavimąsi skatinančias medžiagas. 3D spausdinimo technologija pagaminti kompozitiniai karkasai, sudėtyje turintys polilaktinės rūgšties (PLR), biostiklo 45S5 (BS) ir šių karkasų konstruktai, papildyti dantų pulpos kamieninėmis ląstelėmis (DPKL) ar jų pagamintu tarpląstelinio užpildu (TU), gali būti perspektyvūs kaulo pakaitalai, naudojami kaulinių defektų atstatyme.

3.1. Tyrimo tikslas

Įvertinti 3D kompozitinių PLR ir PLR/BS karkasų bei konstrukto, papildyto DPKL ar jų išskirtu TU, poveikį potencialiam organizmo atsakui ir angiogenezei *in vitro* bei naujo kaulo formavimuisi *in vivo*.

3.2. Tyrimo uždaviniai

1. Ištirti PLR ir PLR/BS karkasų ir jų konstrukto, papildyto DPKL, poveikį potencialiam organizmo atsakui ir angiogenezei *in vitro*;
2. Ištirti PLR, PLR/BS karkasų ir jų konstrukto, papildyto DPKL ar jų išskirtu TU, poveikį naujo kaulo formavimuisi Wistar žiurkių kritinio dydžio kaukolių defektuose;
3. Palyginti tiriamųjų grupių poveikį naujo kaulo formavimuisi *in vivo* su teigiama kontroline grupe (Geistlich Bio-Oss®).

3.3. Hipotezės

1. PLR ir PLR/BS karkasai ir konstruktai pasižymi savybėmis, turinčiomis teigiamą poveikį kaulo regeneracijos procesams *in vitro*.
2. PLR ir PLR/BS karkasai ir konstruktai turi teigiamą poveikį naujo kaulo formavimuisi Wistar žiurkių kritinio dydžio kaukolių defektuose. Konstruktais užpildytuose defektuose susiformuos didesnis naujo kaulo kiekis, nei tos pačios medžiagos karkasais užpildytuose defektuose.
3. PLR ir PLR/BS karkasai, papildyti DPKL ar jų išskirtu TU, parodys panašius į Geistlich Bio-Oss[®] granulėmis užpildytų defektų rezultatus.

4. LITERATŪROS APŽVALGA

Žmogaus kaulinis audinys pasižymi puikiomis regeneracinėmis savybėmis, tačiau jos yra ribotos, todėl didesnių kaulinių defektų atsistatymui natūralių mechanizmų nebepakanka [5]. Šiuolaikinėje chirurgijoje netekto kaulo atstatymas yra itin svarbi procedūra – tai puikiai iliustruoja faktas, kad JAV kaulinis audinys yra antras dažniausiai persodinamas transplantas po kraujo perpylimo [6]. Atkurti netekto ar nesamo kaulo tūrį gali prireikti po kaulų lūžių, vėluojančio ar netaisyklingo lūžgalių susijungimo, pašalinus cistas, navikus, netekus dantų bei dėl kitų priežasčių [6,7]. Prognozuojama, kad kaulinių defektų atstatymo procedūrų skaičius pasaulyje kasmet augs 13 proc. [3]. Nepaisant didelio ir sparčiai augančio atliekamų kaulo augmentacijų skaičiaus bei rinkoje esančios kaulo pakaitalų pasiūlos, idealus kaulo pakaitalas dar nerastas, todėl ši chirurginė procedūra ir jos rezultatų prognozavimas vis dar lieka iššūkiu. Šiuo metu egzistuoja keletas skirtingų kaulinių transplantų tipų, kuriuos galima pasirinkti atliekant kaulo augmentaciją.

Istoriškai pirmiausia pradėtas naudoti autogeninis kaulinis transplantas. Tai yra kaulinis audinys, gaunamas iš to paties individo, kuriam bus persodinamas. Pagal sritį, iš kurios paaimamas, autogeninis kaulas gali būti skirstomas į ekstraoralini (iš klubakaulio keteros, šėvikaulio, šonkaulių ir t.t.) arba intraoralini (iš viršutinio žandikaulio gumburo, apatinio žandikaulio vainikinės ataugos ar kampo, smakro simfizės) [8]. Dantų implantacijos, sinuso dugno pakėlimo ir kitų intraoralinių chirurginių procedūrų metu dažniausiai renkamosi intraoralines donorines sritis [9]. Naudojant tokį autogeninį kaulą užtenka vietinės nejautros, nereikalinga hospitalizacija, o pacientai patiria mažesnę diskomfortą, rečiau susiduria su komplikacijomis [10]. Kiti privalumai – lokalizacija arti recipientinės srities, trumpesnė operacijos trukmė, mažesnės anestetiko sąnaudos. Nepaisant to, intraoralinėse srityse esančio kaulo kiekis gali būti nepakankamas [11], todėl atstatant didelės apimties defektus gali prireikti kaulo iš ekstraoralinių donorinių sričių (įprastai iš klubakaulio keteros) [12].

Dėl pačios prigimties autogeninis kaulas pasižymi reikšmingais privalumais. Kadangi donoras ir recipientas yra tas pats organizmas, šis transplantas yra visiškai histologiškai suderinamas. Taip pat autogeninis kaulas yra osteoinduktyvus [13]. Tai yra savybė skatinti mezenchiminių ląstelių migraciją, proliferaciją ir diferenciaciją į osteoblastus ir chondroblastus. Osteoindukciją inicijuoja įvairūs transplante esantys augimo faktoriai, tokie kaip kaulo morfogenetiniai baltymai ir kraujagyslių endotelio augimo faktorius (KEAF) [13]. Dar autogeninis kaulas pasižymi osteokondukcija – dėl savo struktūros jis veikia kaip karkasas, sudarantis tinkamas sąlygas į jį įaugti šeimininko organizmo ląstelėms, būtinoms kaulo formavimuisi. Svarbu, kad autogeninis transplantas pats turi visus reikalingus ląstelinius elementus ir medžiagas, leidžiančias vyksti *de novo* osteogenezei, t.y. naujo kaulinio audinio gamybai [13]. Visos šios savybės lemia tai, kad autogeninis kaulas vis dar vadinamas auksiniu standartu ir laikomas atskaitos tašku, savotiška kartele, su kuria lyginami kiti kaulo pakaitalai [14]. Literatūroje teigiama, kad naudojant autogeninį kaulą alveolinėje ataugoje susiformuoja didžiausias naujo kaulo tūris, lyginant su alternatyvomis [15]. Nepaisant rezultatų, autogeninio kaulo naudojimas turi trūkumų, kurie kyla iš papildomos operacijos poreikio. Galimos donorinės srities komplikacijos – skausmas, infekcija, operacinės srities ir šalia esančių dantų parestzija, donorinės srities randėjimas, nekrozė [16,17]. Literatūroje nurodomas komplikacijų dažnis stipriai varijuoja, bet Clavero ir Lundgren tyrimas parodė bene didžiausius skaičius – donorine autogeninio kaulo sritimi pasirinkus smakrą, praėjus 1-2 sav. po operacijos, net 76 proc. pacientų jautė donorinės srities parestziją, o po 18 mėn. 52 proc. pacientų vis dar skundėsi pojūčio sutrikimais [18]. Taip pat susiduriama ir su papildomomis laiko sąnaudomis. Dėl minėtų problemų, su kuriomis galima susidurti atliekant kaulo augmentaciją autogeniniais transplantais, dažnai renkamosi alternatyvias medžiagas.

Viena iš autogeninio transplanto alternatyvų yra alogenis kaulas – jis gaunamas iš kito tos pačios rūšies organizmo su skirtingu genotipu. Tokio transplanto privalumai kyla iš to, kad panaikinamas antros operacinės srities poreikis. Lyginant su autogeniniu kaulu, alogenis transplanto naudojimas mažina nepakankamo kaulo kiekio problemą, panaikina donorinės srities komplikacijų riziką bei trumpina operacijos trukmę – kitaip sakant, galima tikėtis didesnio komforto pooperacinio laikotarpio metu. Prieš naudojimą, siekiant sumažinti imuninio atsako riziką ir prailginti galiojimo laiką, alogeniniai transplantai būna specialiai apdorojami. Šiuo metu naudojami šviežiai užšaldyti, sausai užšaldyti arba demineralizuoti sausai užšaldyti alogeniniai transplantai [19]. Šviežiai ir sausai užšaldytas alogenis kaulas veikia kaip osteokondukcinis karkasas, tuo tarpu papildoma demineralizavimo procedūra suaktyvina transplante esantį kaulo morfogenetinį baltymą, todėl demineralizuoti sausai užšaldyti alogeniniai transplantai dar pasižymi osteoinduktyvumu. Nepaisant to, reikšmingo skirtumo tarp kaulinių defektų atsistatymo naudojant demineralizuotą sausai užšaldytą arba sausai užšaldytą alogeninį kaulą nenustatyta [20],

o dėl tinkamiausio apdirbimo būdo taip pat nesutariama [21]. Sisteminės apžvalgos duomenys parodė, kad alveolinės ataugos kauliniams defektams atstatyti naudojant alogenines medžiagas, naujo kaulo susiformuoja apie 33 proc. defekto tūrio, tuo tarpu autogeninio kaulo naudojimas lėmė vidutiniškai 51 proc. defekto tūrio atsistatymą [15]. Regeneracinės alogeninio kaulo savybės gali varijuoti priklausomai nuo donoro ypatybių (amžiaus, sisteminių ligų) [22]. Taip pat, nepaisant griežtai reguliuojamos donorų atrankos, alogeninių medžiagų apdorojimo technologijų ir laikymo sąlygų, išlieka infekcijos tikimybė [23]. Įrodyta, kad alogeniniu kaulu įmanoma perduoti pavojingų infekcinių ligų sukėlėjus, pavyzdžiui, hepatito C ir žmogaus imunodeficito virusą [24]. Augmentacijos metu vietoje autogeninio kaulo naudojant alogeninį, išauga procedūros kaina, o faktas, kad alogeninis transplantas yra medžiaga, gauta iš kito žmogaus, kai kuriems pacientams gali kelti abejones. Alogeninio kaulo rinką stipriai sugriežtino Europos Parlamento ir Tarybos direktyva 2004/23/EB, o donuojamų audinių trūkumas kasmet didėja [25]. Šios priemonės Europoje lėmė mažėjančią alogeninių kaulo pakaitalų populiarumą ir didėjančią susidomėjimą kitomis medžiagomis.

Kaulo augmentacijai taip pat gali būti naudojamas ksenogeninis kaulas. Šiuo terminu apibūdinamas kaulas, gaunamas iš kitos rūšies organizmų, dažniausiai galvijų ir kiaulių. Siekiant panaikinti infekcijos ar imuninių reakcijų riziką ksenogeniniai transplantai dar griežčiau apdirbami ir sterilizuojami, nei alogeniniai. Be to, didesnis ksenogeninio kaulo donorų kiekis lemia platesnį prieinamumą prie šio tipo transplantų ir mažesnę kainą [26]. Apdirbimo technologijų poveikis lemia, kad ksenogeninis kaulas taip pat pasižymi tik osteokondukcinėmis savybėmis. Nepaisant to, sisteminės apžvalgos rezultatai parodė, kad ksenogeninių transplantų naudojimas alveolinės ataugos kaulo augmentacijoje lemia didesnę naujai susidariusio kaulo kiekį, nei naudojant alogeninius transplantus [27]. Vienas dažniausiai burnos chirurgijoje naudojamų ksenogeninių kaulo pakaitalų yra Bio-Oss® (Bio-Oss) (Geistlich Pharmaceutical, Wolhusen, Šveicarija) [28]. Ši medžiaga išgaunama iš galvijų spongiozinio kaulo pašalinant organinius komponentus ir sterilizuojant gama spinduliais. Bio-Oss tiekiamas dviejų skirtingų dydžių granulėmis, o jo sudėtyje pagrindė sudaro kalcio ir fosforo junginiai. Bio-Oss pasižymi glaudaus kontakto su naujai susiformavusiu kaulu sudarymu ir dideliu sėkmės procentu, implantacijos ir kaulo augmentacijos metu naudojant šią medžiagą [29]. Neaišku, ar Bio-Oss geba pilnai rezorbuotis – klinikinio tyrimo metu nepakitęs, į kaulą integravusios Bio-Oss granulės buvo aptiktos praėjus 11 metų po žandinio sinuso dugno pakėlimo operacijos [30]. Lėta dalelių rezorbcija išlaiko nedidelių defektų tūrį ir suteikia puikias osteokondukcines savybes, tačiau pilnas defekto užpildymas kaulu lemtų optimaliausius mechaninius buvusios defekto srities parametrus. Be to, naudojant Bio-Oss kyla formos ir tūrio išlaikymo problemos šia medžiaga užpildant didelės apimties defektus [31,32]. Galima daryti prielaidą, kad granulės nesuteikia optimalių mechaninių savybių ir stabilumo jomis

užpildant defektus, esančius didelės fiziologinės apkrovos srityse [33]. Galiausiai, Bio-Oss yra sąlyginai brangi medžiaga, o gyvūninės kilmės medžiagų naudojimas kelia bioetinius klausimus.

Savo kilme labiausiai nuo žmogaus organizmo „nutolę“ yra aloplastiniai transplantai. Tai yra sintetiniai arba iš koralų bei dumblių hidroksiapatito išgauti kaulo pakaitalai [26]. Dirbtinė aloplastinių transplantų kilmė leidžia tiksliau reguliuoti gamybą ir kokybę, panaikinti infekcijų riziką, sukurti turį išlaikančius transplantus ir, svarbiausia, modifikuoti transplantų sudėtį ir struktūrą. Būtent pastaroji savybė lemia didelį susidomėjimą šiais kaulo pakaitalais. Audinių inžinerijos ir medžiagų mokslo laimėjimai leidžia atlikti naujų 3D karkasų tyrimus, į sudėtį įtraukiant vis kitas medžiagas ir keičiant mikrostruktūrą [34], taip vis gerinant transplantų savybes ir artėjant prie idealumo. Žinant tai, nenuostabu, kad aloplastiniai kaulo pakaitalai ateityje gali tapti pirmo pasirinkimo medžiagomis, naudojamomis kaulo augmentacijoje [22]. Aloplastiniai transplantai daugiausia gaminami iš medžiagų, kurios yra pagrindinės kaulo sudedamosios dalys, pavyzdžiui, įvairūs junginiai su kalciumu ir fosfatais [25], bet šiais transplantais nebūtinai stengiamasi atkartoti natūralaus kaulo struktūrą. Skirtingų gamintojų aloplastinių transplantų sudėtys ir struktūros skiriasi, todėl atitinkamai kinta jų osteokondukcinės savybės. Šiuo metu JAV naudojimui patvirtinti 87 aloplastiniai kaulo pakaitalai [22]. Juos sudarančios medžiagos – beta trikalčio fosfatas, hidroksiapatitas, bifazinis kalcio fosfatas, kalcio sulfatas, kalcio fosfatas. Nepaisant sintetinių kaulo pakaitalų privalumų ir perspektyvų, vis dar trūksta dokumentuotų klinikinių tyrimų, patvirtinančių aloplastinių pakaitalų efektyvumą, ir tai yra viena iš priežasčių, kodėl aloplastiniai transplantai rinkoje užima labai nedidelę dalį [25]. Tačiau tęsiasi tyrimai, ieškant geriausio gamybos būdo ir sudėties.

Norint pagaminti idealiomis savybėmis pasižymintį kaulo pakaitalą, svarbu turėti supratimą apie natūralų žmogaus kaulą. Tai yra kompozitinė medžiaga, kurią sudaro kaulinės ląstelės, apsuptos tarpląstelinis užpildu. Šis užpildas sudarytas iš 65-70 proc. neorganinio komponento (daugiausia hidroksiapatito) ir 25-30 proc. organinio komponento, kuris yra išsidėstęs tinkliškai ir daugiausia sudarytas iš I tipo kolageno bei elastino. Kaulinės ląstelės kontroliuoja organinių komponentų mineralizaciją [35,36]. Struktūriškai kaulą galima išskirti į du tipus. Išorinė kaulo dalis, vadinama kortikaliniu kaulu, yra tanki bei tvirta – jos kompresinis stiprumas skirtingose organizmo vietose svyruoja tarp 130-190 MPa [37]. Vidinė dalis – trabekulinis kaulas – turi 50-90 proc. porėtumą ir pasižymi didesniu elastingumu [34]. Santykis tarp kortikalinio ir trabekulinio kaulo įvairiose organizmo (bei žandikaulių) srityse stipriai varijuoja, be to, organinės dalies kaulėjimo greitis skirtinguose kauluose taip pat skiriasi [34]. Dėl minėtų kaulo skirtumų svarbu atrasti tokį kaulo pakaitalų gaminimo būdą, kuris leistų pritaikyti karkasą ne tik prie pažeidimo formos, bet ir prie vidinės struktūros.

Kiekvieną kaulo augmentacijai sukurtą karkasą galima įvertinti pagal teorines idealaus karkaso savybes. Visų pirma, karkasas ir jo irimo produktai turi būti biosuderinami – nesukelti uždegimo ar atmetimo reakcijos [38]. Kita svarbi savybė – kontroliuojama biodegradacija [39]: karkasas turi irti ir taip ilgainiui būti pakeistas recipiento audiniais, tačiau irimas turi būti ne per greitas, kad būtų išlaikomas srities struktūrinis vientisumas. Idealus karkasas turėtų pasižymėti dideliu bioaktyvumu [40] – osteokundukcijos ir osteoindukcijos savybėmis. Ne mažiau svarbi yra optimali karkaso mikroarchitektūra. Reikalingos tokio dydžio ir tankio poros, kurios didintų karkaso-organizmo ląstelių kontakto plotą, sudarytų sąlygas tikslinių ląstelių migracijai, deguonies, maistinių ir šalinimo medžiagų patekimui į ir iš karkaso [41]. Tyrimuose *in vitro* ir *in vivo* įrodyta, kad karkasai su apie 300-500 μm dydžio poromis skatina osteogenezę, tuo tarpu 100 μm dydžio poros palankesnės chondrogenzei [38,42]. Galiausiai idealus karkasas savo mechaniniais parametrais turi būti kuo panašesnis į natūralų kaulą – turėti 100-230 MPa kompresinį stiprumą, 7-30 GPa Jungo elastiškumo modulį [38]. Toks karkasas apkrovos metu išlaikytų struktūrinį vientisumą, efektyviai paskirstytų krūvį, atkartotų fiziologinę kaulinio audinio aplinką. Be viso to, didelis privalumas, jei karkasas būtų patogus naudojimui operacijų metu. Akivaizdu, kad visų minėtų savybių derinimas tarpusavyje yra didelis iššūkis, ypač turint omenyje, kad kai kurios jų (pavyzdžiui, porėtumas ir tvirtumas) yra atvirkščiai proporcingos. Be to, tampa aišku, kad būtina įvertinti ne tik karkaso sudėtį, bet ir struktūrą bei mechanines savybes, todėl labai svarbu pasirinkti tinkamą karkaso gamybos būdą.

3D karkasų gamyboje naudojama daugybė skirtingų metodų ir jų derinių, pavyzdžiui, kompresinis modeliavimas, džiovinimas šalčiu, elektrospiningas, bet naudojant šias ir kitas įprastines technologijas susiduriama su problemomis gaminant preciziškai tikslios mikrostruktūros karkasus [35]. Sparčiai tobulėjantis 3D spausdinimas į karkasų gamybą atnešė itin svarbius pokyčius. Atsirado galimybė stipriai pagerinti mikro- ir makrostruktūros tikslumą, išspręsti porų dydžio, formos ir tarpusavio jungimosi problemas [34], o programinės įrangos naudojimas palengvina struktūrų projektavimą. Be to, 3D spausdinimas atveria galimybes individualaus defekto formą atitinkančių karkasų gamybai [35]. 3D spausdintuvu karkasą galima pagaminti keletu skirtingų metodų. Vienas iš jų – lydyto nusėdimo modeliavimas (LNM) – biomedžiagų gamyboje yra vienas plačiausiai naudojamų, nes pasižymi geru tikslumu ir atkartojamumu spausdinant sudėtingas geometrines formas [43], nedidele kaina, žema gamybos temperatūra ir energijos sąnaudomis [44]. LNM metodu karkasas gaminamas įkaitinant medžiagos filamentą ir per specialų antgalį ant pagrindo formuojant dvimatę formą, palaipsniui atitraukiant antgalį nuo platformos [40]. Taip pasluoksniui gaunamas norimos formos 3D karkasas [45].

Polilaktinė rūgštis (PLR) yra viena dažniausiai 3D spausdinime LNM būdu naudojamų medžiagų [46]. Egzistuoja dvi jos stereoizomerinės formos: pagrindinę dalį sudaranti poli-L-

laktinė rūgštis ir poli-D-laktinė rūgštis [47]. Šis termoplastiškas polimeras yra ekologiškas, kadangi gaunamas iš natūralių šaltinių ir gali būti pilnai perdirbamas [40], o jo savybės lemia puikias pritaikymo audinių inžinerijoje galimybes. PLR naudojama kaip sudėtinė ortopedinių protezų, vaistų pernešimo sistemų dalis [47], jos biosuderinamumas įrodytas klinikiniais tyrimais [48]. Santykinai didelis PLR Jungo elastiškumo modulis yra palankus biomechanškai [36]. Be to, PLR hidrolizės būdu degradoja į pieno rūgštį, kuri yra netoksiška, natūraliai žmogaus organizme randama medžiaga [49]. Vienas iš PLR trūkumų yra hidrofobiškumas, nes tai riboja ląstelių prisitvirtinimą prie PLR paviršiaus [47]. Dar hidrofobiškumas ir didelė molekulinė masė lemia lėtą biodegradaciją [50] – nustatyta, kad iš poli-L-laktinės rūgšties izomerų sudarytos PLR yrimas žmogaus organizme trunka iki 4 metų [51], o kaulinis audinys geba regeneruoti per 12-18 savaitių. Ši savybė tiktų vaistų pernešimo sistemoms, kuomet reikalingas lėtas vaistinės medžiagos išsiskyrimas, tuo tarpu kaulo regeneracijoje lėtas yrimas yra trūkumas, nes karkaso biodegradacija, žymiai lėtesnė, nei kaulo gebėjimas atsistatyti, trukdo naujo kaulo formavimuisi [52]. Be to, yrimo metu išsiskirianti pieno rūgštis mažina aplinkos pH ir sudaro kaulinio audinio formavimuisi žalingas aplinkos sąlygas [53]. Keičiant PLR stereoizomerų santykį kinta molekulinė masė, todėl taip galima daryti įtaką biodegradacijos greičiui [54] ir mechaninėms savybėms [55]. Tyrimo su žiurkėmis metu nustatyta, kad PLR karkasai su padidintu poli-D-laktinės rūgšties izomerų kiekiu visiškai degradavo per 72 savaites (apie pusantų metų) [56]. Degradacija greitėja dėl mažesnės poli-D-laktinės rūgšties molekulinės masės, tačiau toks pokytis lemia prastėjančias mechanines savybes [57]. Nepaisant to, dėl esminių privalumų PLR yra geras pasirinkimas kaip pagrindinė sudedamoji LNM būdu pagaminto kompozitinio 3D karkaso dalis, o siekiant švelninti ar kompensuoti PLR trūkumus ir pridėti pageidaujamas savybes į karkasų sudėtį įtraukiamos kitos medžiagos.

Iš PLR pagamintiems karkasams privalumų gali suteikti biostiklas 45S5 (BS). Tai yra viena iš bioaktyvaus stiklo rūšių, sudaryta iš 45 proc. SiO_2 , 24,5 proc. Na_2O , 24,5 proc. CaO ir 6 proc. P_2O_5 pagal molekulinę masę [58]. Nors nuo BS atradimo praėjo daugiau nei keturi dešimtmečiai, šios medžiagos savybės lemia tai, kad audinių inžinerijoje ji vis dar laikoma viena iš perspektyviausių [59]. Pagrindinė naudinga BS savybė – bioaktyvumas, kuris *in vivo* yra didžiausias iš visos biokeraminių medžiagų grupės [56]. Pagal bioaktyvumą BS yra priskiriamas A klasei, nes pasižymi ne tik osteokondukcija, bet ir osteoindukcija [60]. BS turi porėtą, į trabekulinio kaulo panašią struktūrą, o tai skatina ląstelių migraciją [38]. Išskirtinai stiprų BS bioaktyvumą sukelia du mechanizmai. Tirpdamas audinių skystyje BS virsta hidroksikarbonato apatitu, kuris dėl panašumų į kaulo mineralus sąveikauja su audiniuose esančiu kolagenu ir skatina osteogeninių ląstelių prisitvirtinimą bei proliferaciją [56,61]. Be to, tirpimo metu išsiskiriantys silicio ir kalcio katijonai skatina osteoblastų genų raišką, todėl didėja šių ląstelių aktyvumas ir greitėja kaulo

regeneravimas [56,62]. Minėti katijonai dar prisideda prie naujų kraujagyslių formavimosi [63], o tai itin svarbu kaulo gijimui ir naujo kaulo gamybai, kadangi šie audiniai tampa efektyviai aprūpinami deguonimi ir maistinėmis medžiagomis. Tyrimai parodė, kad BS ryšį su kaulu suformuoja labai greitai – keleto dienų eigoje [64]. Taip pat patvirtintas priešbakterinis ir priešuždegiminis BS veikimas, nors jų mechanizmai dar nėra aiškūs [65,66]. Iš kitos pusės, BS reakcijų su audinių skysčiu metu išsiskiriantys natrio ir kalcio jonai didina aplinkos pH, o tai žaloja organizmo ląsteles [60]. Nors literatūroje aprašyta keletas būdų šarminės aplinkos problemai išspręsti, pavyzdžiui, BS sudėtyje esančio Na_2O pakeitimas stronciu [65], gaminant PLR/BS karkasus šis trūkumas tampa privalumu, kadangi šarminiai jonai neutralizuoja pieno rūgštį, išsiskiriančią PLR yrimo metu [56]. Taip pat dėl šarminės aplinkos sudarymo ir hidrofiliškumo BS įtraukimas į PLR karkasus spartina biodegradaciją, o jos greitis priklauso nuo BS kiekio karkaso sudėtyje [38]. Tyrime *in vitro* nustatyta, kad PLR karkasai su 50 proc. BS kiekiu pasižymėjo labai stipriu bioaktyvumu, bet tokie karkasai biodegradavo vos per 7 dienas. Tame pačiame tyrime padaryta išvada, kad 30 proc. BS kiekis PLR karkase lemia optimaliausią biodegradacijos ir bioaktyvumo santykį [67]. Pagrindinis BS trūkumas yra trapumas [38] – tai ir greita biodegradacija yra priežastys, dėl kurių tik iš BS sudaryti karkasai nėra tinkami kaulo regeneracijai. Įvairių polimerų, pavyzdžiui, PLR, įtraukimas į sudėtį kompensuoja netenkinančias mechanines BS savybes [34,56]. Įvertinant BS ir PLR privalumus bei trūkumus, galima teigti, kad šios medžiagos puikiai papildo viena kitą, o jų derinys turi didelį potencialą audinių inžinerijoje.

Net ir turint omenyje anksčiau minėtų medžiagų perspektyvas, verta prisiminti audinių inžinerijos triadą, t.y., komponentus, iš kurių susidaro sėkmingas audinių regeneracijai naudojamas produktas: karkasas, ląstelės ir biologiškai aktyvios molekulės [68]. PLR/BS karkasai turi tik vieną šios triados komponentą. Teoriškai, tokį karkasą papildant kaulo regeneraciją skatinančiomis ląstelėmis ir bioaktyviomis medžiagomis, galima gauti dar daugiau potencialo turinčius kaulo pakaitalus. Jau kurį laiką mokslininkų dėmesio centre yra kamieninės ląstelės, pasižyminčios gebėjimu diferencijuoti į skirtingų audinių ląsteles ir atsinaujinti [69,70]. Atlikti tyrimai parodė, kad kamieninės ląstelės egzistuoja visuose organizmo audiniuose ir organuose, tame tarpe ir dantyse, o dantys ir periodontas yra vienos geriausių sričių kamieninių ląstelių išgavimui, nes šios struktūros aktyviai formuojasi po žmogaus gimimo [71]. Kamieninės ląstelės gali būti išskiriamos iš dantų folikulų, besiformuojančių nuolatinių dantų, periodonto raiščio, dantų pulpos. Dantų pulpos kamieninės ląstelės (DPKL) yra ypač patrauklus pasirinkimas. Jas galima išskirti minimaliai invazyviai arba visiškai išvengti invazinių procedūrų, išskiriant iš pašalintų dantų [72]. Nors ilgalaikio DPKL užšaldymo technologijos dar vystomos, esami duomenys rodo, kad DPKL ilgai išlaiko gyvybingumą ir gali būti užšaldomos iki dvejų metų, neprarandant proliferacijos ir diferenciacijos galimybių [73,74]. Lyginant su regeneracinėje medicinoje plačiai

naudojamomis kaulų čiulpų mezenchiminėmis kamieninėmis ląstelėmis, DPKL proliferuoja 30-50 kartų sparčiau [74]. Be to, įrodyta, kad DPKL geba sąveikauti su biologiškai suderinamais karkasais ir diferencijuoti į osteoblastus [69,74]. Su gyvūnais atlikti tyrimai parodė puikius rezultatus regeneruojant netektą kaulą DPKL turinčiais pakaitalais. Pavyzdžiui, triušių kaukolės skliauto defektuose, užpildytuose Bio-Oss ir DPKL, susidarė reikšmingai didesnis kaulo kiekis, nei užpildytuose tik Bio-Oss [4]. Tačiau iš kitų organizmų gautos kamieninės ląstelės gali sukelti imuninį recipiento atsaką [75]. Kaip ir kitos kamieninės ląstelės, DPKL ne tik yra veikiamos aplinkos faktorių, kurie nulemia šių ląstelių diferenciacijos kryptį, bet ir pačios pasižymi parakrininiu poveikiu – išskiria biologiškai aktyvias medžiagas, galinčias skatinti kaulo regeneraciją [4,76]. Šiomis medžiagomis papildyti karkasai ne tik lemia greitesnę kaulinio audinio atsikūrimą, bet ir skatina angiogenezę [77]. Kaulinių transplantų papildymui naudojamos įvairios bioaktyvios medžiagos: pavieniai augimo faktoriai, tarpląstelinio užpildo (TU) baltymai, signalinės molekulės [77]. Pastaruoju metu daug dėmesio sulaukia iš ląstelių kultūrų išgautas TU, kadangi jį sudaro skirtingų bioaktyvių medžiagų visuma, geriau nei pavienės medžiagos atkartojanti natūralią audinio aplinką [75]. Įrodyta, kad DPKL išskirtas TU yra osteoinduktyvus [78]. Dar svarbu tai, kad išskiriant TU pašalinamos kamieninės ląstelės ir taip minimalizuojama imuninio atsako rizika [75]. Be to, yra nuomonių, kad ne pats kamieninių ląstelių buvimas, o jų gaminamas TU lemia audinių atsistatymą ir homeostazę [79]. Tyrimo su žiurkėmis metu nustatytas reikšmingai didesnis naujai susiformavusio kaulo kiekis defektuose, užpildytuose PLR/DPKL konstruktais, nei užpildytuose tik PLR karkasais [80]. Remiantis moksline literatūra apie DPKL ir TU, šios medžiagos turi didelį potencialą kaip sudėtinės kaulo regeneracijai naudojamų karkasų dalys.

Nors literatūroje gausu darbų apie PLR/BS karkasų poveikį naujo kaulo formavimuisi, svarbu tiriamų karkasų poveikį organizmui išnagrinėti visapusiškai, t.y., neapsiriboti vien susiformavusio kaulo kiekio analize, bet įvertinti karkasų įtaką kitiems ne mažiau svarbiems organizmo procesams, pavyzdžiui, angiogenezei, kuri yra neatsiejama kokybiškos osteogenezės dalis. Taip pat literatūroje nerasta tyrimų, kuriuose būtų vertintas PLR ir PLR/BS karkasų ir konstrukčių poveikis kaulo regeneracijai lyginant su jau klinikinėje praktikoje naudojamomis medžiagomis. Šio tyrimo metu siekiama įvertinti moderniu 3D spausdinimo metodu (LNM) pagamintų karkasų, susidedančių iš biosuderinamų medžiagų (PLR, BS), bei jų konstrukčių su DPKL ar jų išskirtu TU, poveikį potencialiam organizmo atsakui ir angiogenezei *in vitro* bei naujo kaulo formavimuisi *in vivo*, galiausiai – suteikti svarbios informacijos ateities tyrimams ir žengti dar vieną žingsnį idealaus kaulo pakaitalo paieškose.

5. MEDŽIAGOS IR METODAI

5.1. Karkasų gamyboje ir *in vitro* tyrimuose naudotos medžiagos

1 lentelė. Karkasų gamyboje ir *in vitro* tyrimuose naudotos medžiagos.

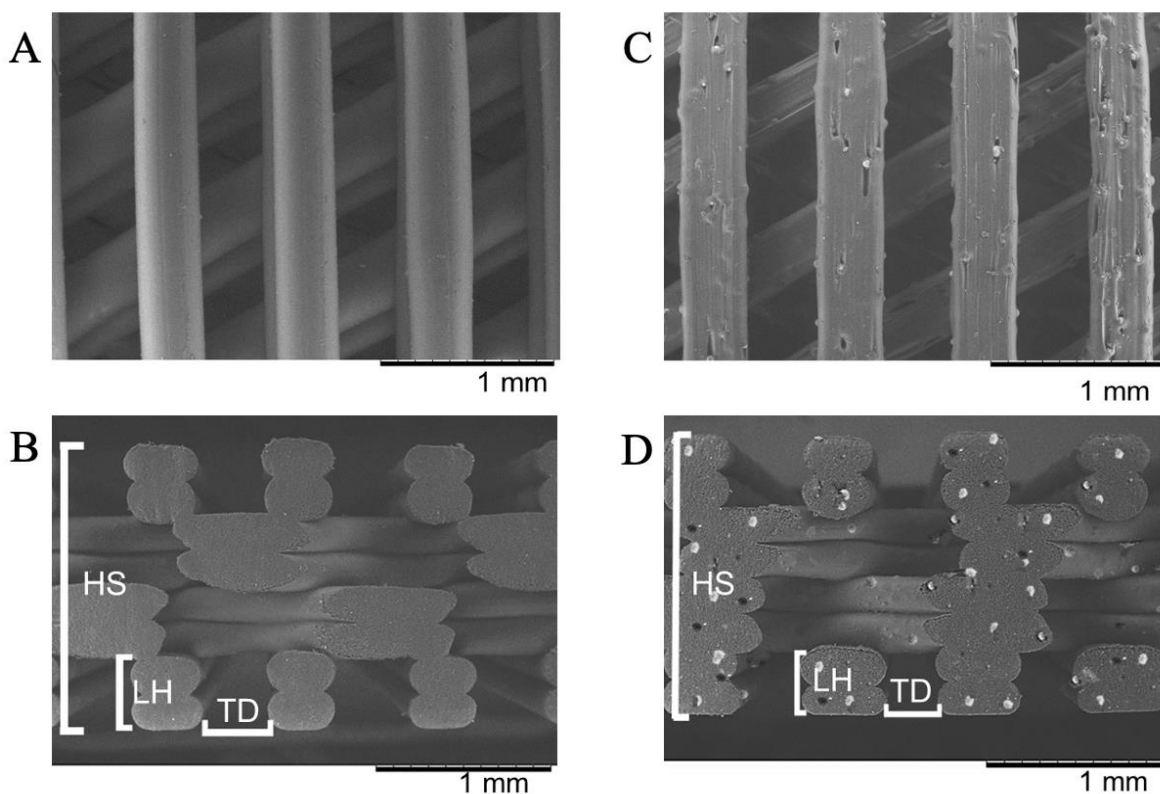
Medžiaga	Gamintojas
Polilaktinės rūgšties granulės (L/D polimeras, molekulinė masė 42,700 g/mol, dalelių dydis 100-800 μm)	STP Chem Solutions Co., Ltd., Nonthaburi, Tailandas
Biostiklo 45S5 granulės (dalelių dydis 38-75 μm)	XL Sci-Tech, Inc., Richland, JAV
Geistlich Bio-Oss® granulės (dalelių dydis 0,25-1 mm)	Geistlich Pharmaceutical, Wolhusen, Šveicarija
Iskovo modifikuota Dulbecco terpė	Gibco, Billings, JAV
Fetalinis veršelio serumas	Gibco, Billings, JAV
Magnetinės dalelės, padengtos ožkos IgG antikūnais	New England Biolabs Inc., Ipswich, JAV
Dulbecco fosfatinio buferio tirpalas	Gibco, Billings, JAV
Vandeninis amonio hidroksido tirpalas (10 proc.)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, JAV
„Proteome Profiler Rat Cytokine Array Kit, Panel A“ komplektas	R&D Systems, Minneapolis, JAV
„pLJM1-mCherry“ plazmidė	Addgene, Watertown, JAV
Vandeninis paraformaldehido tirpalas (4 proc.)	Thermo Scientific Chemicals, Waltham, JAV
Kristalinis violetas	Thermo Scientific Chemicals, Waltham, JAV

5.2. Filamentų gamyba

Kompozitiniai PLR/BS filamentai pagaminti iš PLR ir BS granulių mišinio (masės santykis 9:1). PLR filamentų gamybai naudotos tik PLR granulės. Siekiant panaikinti drėgmę mišiniai laikyti sandariuose maišeliuose su silicio gelio granulėmis. Filamentai pagaminti karšto lydymosi ekstruzijos būdu naudojant stalinį ekstruderį „Filabot Original“ (Filabot HQ, Barre, JAV), prieš gaminimą jį įkaitinus iki 142 °C. Mišiniai įpilti į talpą ir leisti per ekstruderį, kurio temperatūra filamentų gaminimo metu buvo 137–142 °C. Gauti filamentai savadarbiu reguliuojamo greičio suktuku susukti į rites.

5.3. Karkasų gamyba

PLR ir PLR/BS karkasų mikroarchitektūra sukurta naudojant „AutoCAD 2017” programinį paketą. Suplanuoti karkasai, turintys 4 aukštus. Kiekvieną aukštą sudaro 2 filamentų sluoksniai (filamento plotis 0,4 mm, storis 0,2 mm). Mikroarchitektūra suplanuota taip, kad aukščiau esantis aukštas su žemiau esančiu aukštu suformuotų 60° kampą, taip gaunant vidutiniškai 0,45 mm skersmens šešiakampio formos poras. Karkasų porėtumas – 48 proc. Modeliai išsaugoti STL formatu ir per programinę įrangą „Slic3r 1.2.8“ konvertuoti į G kodą. Naudojant paruoštus filamentus, karkasai atspausdinti 3D LNM spausdintuvu „Pharaoh XD 20” (Mass Portal, Ryga, Latvija), parinkus 0,4 mm ekstrudero skersmenį, 200-210 °C temperatūrą ir 35 mm/s spausdinimo greitį. Spausdintuvo galvutė x, y ir z ašimis kontroliuota kompiuteriu. Atspausdinti 3 x 3 x 0,16 cm dydžio karkasai (1 pav.). *In vitro* tyrimams karkasai padalinti į 1 x 1 x 0,16 cm kvadrato formos fragmentus. Naudojant lazerio šviesos filamentų fabrikacijos metodą iš atspausdintų karkasų išpjauti 5,5 mm skersmens apskritimo formos karkasai, kurie naudoti tyrimams *in vivo*. Karkasai sterilizuoti etileno oksido dujomis, po to keturias dienas vykdyta karkasų aeracija.



1 pav. Pagamintų karkasų nuotraukos, padarytos per skenuojantį elektroninį mikroskopą. A – PLR karkaso vaizdas iš viršaus; B – PLR karkaso skerspjūvis; C – PLR/BS karkaso vaizdas iš viršaus; D – PLR/BS karkaso skerspjūvis. Dėl skerspjūvio vizualizavimo karkasai lazeriu perpjauti 1 mm nuo krašto. HS – karkaso aukštis; LH – aukšto aukštis; TD – atstumas tarp filamentų.

5.4. DPKL ir endotelio ląstelių (EL) išskyrimas

Ekperimentiniam tyrimui, kurio metu naudoti bandomieji gyvūnai, leidimą išdavė Lietuvos Respublikos Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos Etikos komisija (leidimo nr. G2-40, 2016-03-18) (1 priedas).

DPKL išskirtos iš 3 mėn. amžiaus Wistar bandomųjų žiurkių priekinių kandžių pulpų audinių mėginių, sukarpytų į iki 1 mm³ gabalėlius ir suspenduotų Iskovo modifikuotoje Dulbecco terpėje, turinčioje 10 proc. fetalinio veršelio serumo. Tuomet mėginiai centrifuguoti 10 min. 1500 apskukų per minutę greičiu naudojant centrifugą „IEC CL10“ (Thermo Scientific, Breda, Nyderlandai). Nupiltas supernatantas, pakartota ląstelių mėginio suspendavimo ir centrifugavimo procedūra. Dar kartą pašalinus supernatantą ląstelės vėl suspenduotos ir perkeltos į auginimo indus. Ląstelėms suformavus 70-80 proc. monosluoksnį, naudojant aparatą „KingFisher mL“ (Thermo Scientific, Breda, Nyderlandai) atlikta DPKL gryninimo procedūra. Jos metu naudotos antikūnais dengtos magnetinės dalelės, o gryninimas atliktas vadovaujantis dalelių gamintojo rekomendacijomis. EL išgautos iš Wistar žiurkių plaučių Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre.

5.5. Konstruktų gamyba

Ant PLR ir PLR/BS karkasų užsėta DPKL suspensija (tankis 4000 ląstelių/cm²). Praėjus 24 val. po karkasų užsėjimo augimo terpė pakeista osteogeninę diferenciaciją skatinančia terpe. Joje karkasai inkubuoti 21 dieną, kas 2-3 dienas pakeičiant pusę terpės tūrio, aplinkoje palaikant 37 °C temperatūrą ir 5 proc. CO₂ koncentraciją. Praėjus inkubacijos periodui gauti PLR-DPKL ir PLR/BS-DPKL konstruktai. Dalis šių konstruktų naudoti tyrime *in vivo*.

Likę konstruktai du kartus plauti fosfatiniu buferiu ir užšaldyti šaldiklyje -80 °C temperatūroje. Išimti iš šaldiklio konstruktai palikti, kad atšiltų, tuomet plauti dejonizuotu vandeniu ir vėl užšaldyti. Užšaldymo-atšildymo-plovimo ciklai atlikti 5 kartus. Po to konstruktai 20 min. laikyti 25 mM amonio hidroksido tirpale, galiausiai šešis kartus plauti dejonizuotu vandeniu. Tokiu būdu pagaminti PLR-TU ir PLR/BS-TU konstruktai.

5.6. DPKL išskirtų signalinių molekulių analizė

Siekiant įvertinti DPKL reakciją į lydinius, iš kurių pagaminti karkasai, atlikta DPKL signalinių molekulių (citokinių, chemokinių, augimo faktorių) analizė. Ant PLR ir PLR/BS karkasų užsėta DPKL suspensija (tankis 4000 ląstelių/cm²). Karkasai suspensijoje inkubuoti 7 dienas, kas 2-3 dienas pakeičiant pusę terpės tūrio, aplinkoje palaikant 37 °C temperatūrą ir 5 proc. CO₂ koncentraciją. Po numatyto laiko, naudojant „Proteome Profiler Rat Cytokine Array Kit, Panel A“ komplektą, atlikta DPKL sekretomuose esančių signalinių molekulių analizė. Naudojant

„STRING“ duomenų bazę (naudojimo data 2023 m. vasario 19 d.) sudarytas tinklas, parodantis identifikuotų molekulių dalyvavimą biologiniuose procesuose ir tarpusavio ryšius.

5.7. EL migracijos analizė

Dalies išskirtų EL genai modifikuoti naudojant lentivirusus, transdukcijos būdu į ląsteles pernešant plazmidę pLJM1-mCherry. Taip sukurta raudonai fluorescuojančių endotelio ląstelių (rEL) kultūra, kurios monoslouksnis naudotas kokybinėje EL migracijos analizėje.

Kiekybinei EL migracijos analizei įvertinti PLR ir PLR/BS karkasai perkelti į EL monoslouksnį. Po 72 val. karkasai išimti iš monoslouksnio ir 15 min. fiksuoti kambario temperatūros 4 proc. paraformaldehido tirpale. Tuomet karkasai tris kartus plauti fosfatinu buferiu ir nudažyti kristaliniu violetu. Atlikta karkasų spektrofotometrinė analizė, vertinant 590 nm bangų ilgio absorbciją.

Kokybinė migracijos analizė atlikta perkeliant PLR-DPKL ir PLR/BS-DPKL konstruktus į rEL monoslouksnį. Praėjus 3 val. nuo perkėlimo konstruktai išimti iš monoslouksnio, du kartus plauti fosfatinu buferiu ir analizuoti invertuotu fluorescenciniu mikroskopu „Olympus IX51“ (Olympus, Tokijas, Japonija). Tuomet konstruktai grąžinti į rEL monoslouksnį. Konstruktų plovimas ir analizė kartota po 72 val. nuo pirmojo perkėlimo į monoslouksnį.

5.8. *In vivo* tyrimo imtis ir grupės

In vivo tyrimo imtį sudarė 32 Wistar bandomosios žiurkės (amžius – 4 mėnesiai, vidutinis svoris – 300 g). Tiriamoji imtis apskaičiuota *a-priori* naudojant „G*Power 3.1.9.7“ programą (vieno faktoriaus ANOVA, α – 0,05, galingumas – 0,8, efekto dydis – 0,75). Remiantis analizės rezultatais, sudarytos 4 tiriamosios grupės po 8 gyvūnus (4 patelės ir 4 patinėlius), parinktus atsitiktiniu būdu. Kiekvienoje grupėje esančių gyvūnų kaukolės skliauto kauliniai defektai užpildyti skirtingomis medžiagomis:

I grupė: kaulinis defektas paliktas tuščias (neigiama kontrolė) ir Bio-Oss (teigiama kontrolė);

II grupė: PLR ir PLR/BS;

III grupė: PLR-DPKL ir PLR-TU;

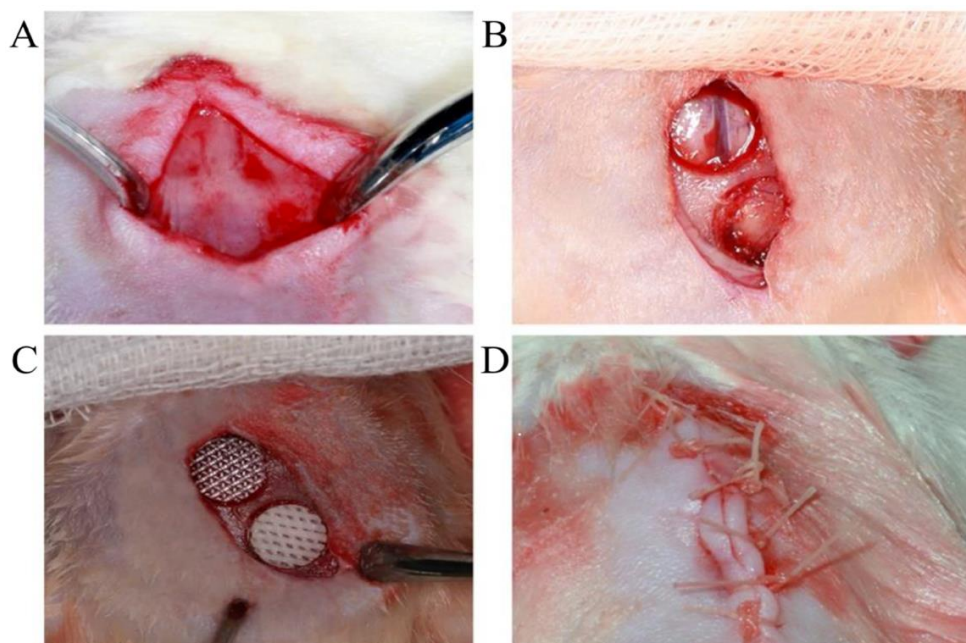
IV grupė: PLR/BS-DPKL ir PLR/BS-TU.

5.9. Chirurginės operacijos ir pooperacinė eiga

Chirurginės Wistar bandomųjų žiurkių operacijos atliktos Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biochemijos instituto Biologinių modelių skyriuje. Procedūros atliktos pagal I. Gendvilienės disertacijoje aprašytą metodiką [81].

Bendroji anestezija atlikta į pilvaplėvės ertmę suleidžiant 2,4 ml/kg ketamino hidrochlorido (100 mg/ml; Rotexmedica GmbH, Trittau, Vokietija) ir 5 mg/kg ksilazino (20 mg/ml; Alfasan,

Woerden, Nyderlandai). Operacinės srities (skalpo) kailis nuskustas, sritis dezinfekuota oktanidino hidrochlorido ir fenoksietanolio purškalu (1 mg/20 mg/ml; Schülke & Mayr GmbH, Norderstedt, Vokietija). Atlikta vietinė aplikacinė nejautra lidokaino purškalu (4,6 mg/dozėje; EGIS Pharmaceuticals PLC, Budapeštas, Vengrija) ir infiltracinė nejautra išilgai sagitalinės kaukolės siūlės suleidžiant 2 proc. lidokaino tirpalo (20mg/ml; Baxter Holding B.V., Utrecht, Nyderlandai). Padarytas 1,5 cm ilgio pjūvis per odą, poodį ir antkaulį išilgai sagitalinės kaukolės siūlės nuo nosikaulių iki lambdinės siūlės, pjūvio galuose padaryti 0,5 cm ilgio horizontalūs atpalaiduojantys pjūviai. Atkeltas odos-antkaulio lopas (2 A pav.). Naudojant 5,5 mm išorinio diametro trepaną (Hager & Meisinger GmbH, Neuss, Vokietija) 800 apsisukimų per minutę greičiu, aušinant steriliu fiziologiniu tirpalu (1 lašas per sekundę), kaukolėje suformuoti du kritinio dydžio defektai, tarp defektų paliekant mažiausiai 1,5 mm tarpą. Iš defektų pašalinti kauliniai fragmentai, praplauta steriliu fiziologiniu tirpalu (2 B pav.). Į defektus įdėtos medžiagos, priskirtos operuojamo gyvūno grupei (2 C pav.). Operacijos pabaigoje antkaulis ir oda pasluoksniui susiūti pavienėmis besirezorbuojančiomis siūlėmis (Vicryl 5/0 Ethicon®, Johnson & Johnson, Amersfoort, Nyderlandai) (2 D pav.).



2 pav. Bandomųjų gyvūnų operacijos eiga. A – atkeltas odos-antkaulio lopas; B – atlikti du kritinio dydžio kauliniai defektai; C – defektai užpildyti tiriamosiomis medžiagomis; D – žaizda susiūta.

Po operacijų gyvūnai laikyti atskiruose narveliuose su sąlygomis laisvai pasiekti maistą ir vandenį. Po operacijos praėjus 3 val. ir kitas tris dienas 2 k./d. po oda buvo ležiama 0,01 mg/kg buprenorfino hidrochlorido (0,3 mg/ml; Richter Pharma AG, Wels, Austrija). Praėjus 8 sav. po operacijų gyvūnai eutanazuoti CO₂ dujomis. Kaukolės perkeltos į talpas su 10 proc. formalino buferiniu tirpalu.

5.10. Mikrokompiuterinės tomografijos (mikroKT) analizė

MikroKT analizė atlikta pagal I. Gendvilienės disertacijoje aprašytą metodiką [81].

Žiurkių kaukolėse suformuotų kaulinių defektų mikroKT tyrimai atlikti bendradarbiaujant su Kauno technologijos universiteto Prof. K. Baršausko ultragarso mokslo instituto mokslininkais. Naudotas 3D mikrokompiuterinis tomografas RayScan 250E (RayScan Technologies GmbH, Meersburg, Vokietija). Parinktas 10-250 kV mikrofokusinis rentgeno spindulių šaltinis ir plokščias 2048x2048 pikselių detektorius. Naudota 100 kV įtampa, 200 mA srovė, 666 ms integracijos laikas, 20 µm vokselio dydis. Kiekvieno skenavimo metu atlikta 1800 projekcijų.

Naujo kaulo tūris (mm³) apskaičiuotas naudojant „Avizo 9.7.0“ programą (Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, JAV), sukūrus specialų algoritmą. Kaulinio defekto vieta apibrėžta 5,5 mm skersmens apskritimu. Apskritimo centre nubrėžti vektoriai, statmeni kaukolės plokštumai, pagal kuriuos apskaičiuotas naujai susiformavusio kaulo tūris. Kaulinis audinys nuo kitų audinių diferencijuotas pagal medžiagos tankį nurodančios pilkumo skalės parametrus.

5.11. Histologinė analizė

Histologinė analizė atlikta pagal I. Gendvilienės disertacijoje aprašytą metodiką [81].

Po mikroKT analizės kaukolės dekalcifikuotos laikant jas 10 proc. etilendiamintetraacto rūgšties ir 10 proc. formalino tirpale (pH 7,0-7,4) 14 dienų. Po to kiekvieno kaulinio defekto srityse atlikti penki pjūviai – per defekto vidurį ir 1,3 mm bei 2,6 mm nuo vidurio linijos į abi puses. Gauti segmentai fiksuoti parafine. Kiekviename segmente padaryti penki 3 µm storio išilginiai pjūviai ir gauti mėginiai dažyti hematoksilino ir eozino mišiniu. Mėginiai analizuoti šviesiniu mikroskopu „Olympus BX41TF“ (Olympus Optical Co. LTD, Tokijas, Japonija). Kokybinės analizės metu kaulinio defekto srityje vertintas naujai susiformavęs kaulas, jungiamojo audinio formavimasis. Kiekybinės analizės metu, naudojant „Aperio ImageScope“ programą (Leica Biosystems GmbH, Nussloch, Vokietija), apskaičiuotas naujai susiformavusio kaulo plotas (mm²).

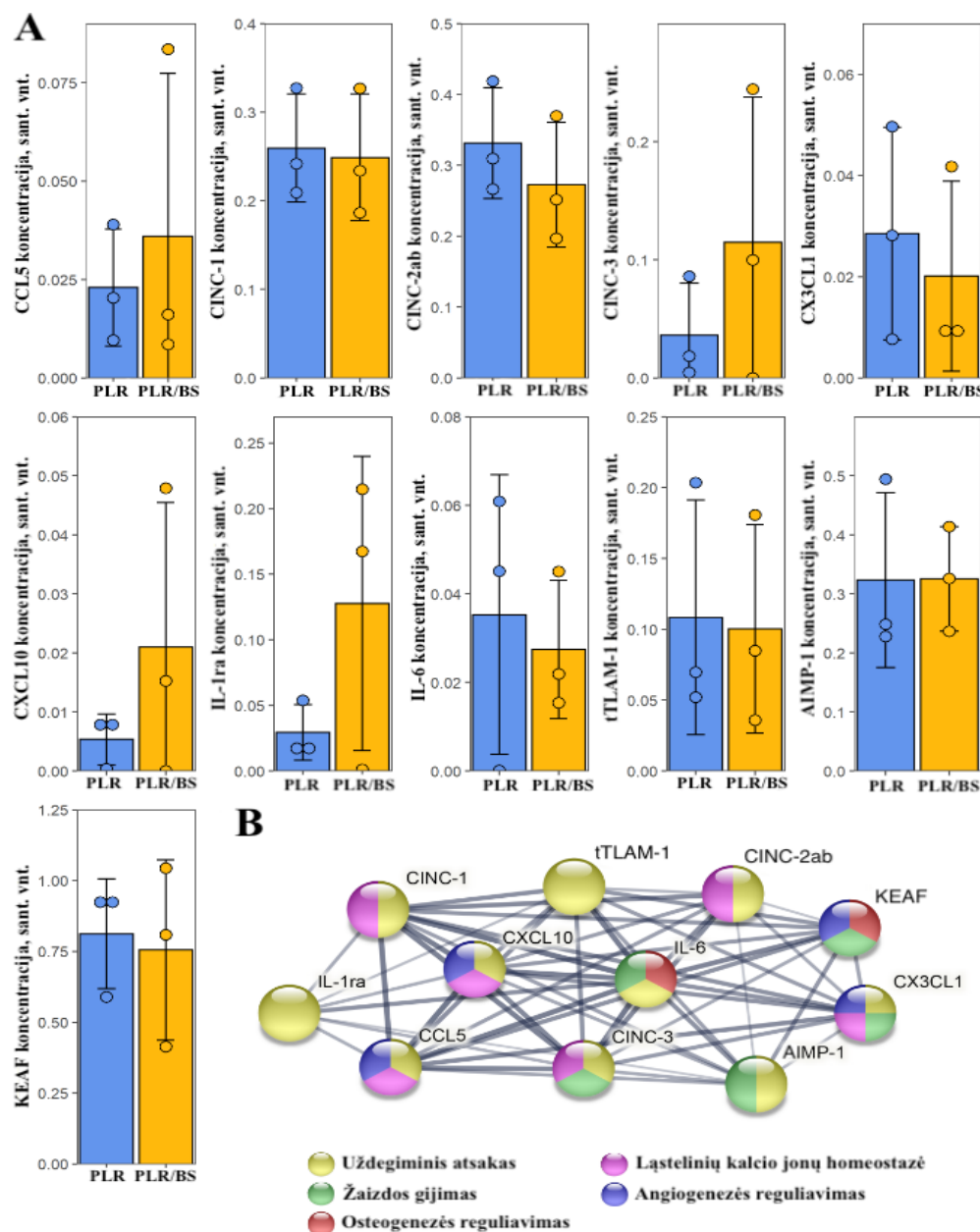
5.12. Statistinė analizė

Gautų duomenų analizė atlikta naudojant „SPSS 29.0“ programą (IBM Corp., Armonk, JAV). Duomenų pasiskirstymui ir variacijai įvertinti atlikti Shapiro-Wilk bei Levene's testai. Duomenys pateikti kaip mediana ± standartinis nuokrypis. Duomenų skirtumai tarp grupių lyginti naudojant vieno faktoriaus ANOVA ir Tukey HSD testus, o tarp lyčių – naudojant Student's T testą. Skirtumai tarp duomenų laikyti statistiškai patikimais, kai paklaidos tikimybės (p) reikšmė gauta mažesnė nei 0,05.

6. REZULTATAI

6.1. DPKL išskirtų signalinių molekulių analizės rezultatai

Ant PLR ir PLR/BS karkasų inkubuotų DPKL sekretomuose identifikuota 11 vienodų signalinių molekulių: C-C motyvo chemokino ligandas-5 (CCL5), citokinų indukuojamiems neutrofilų chemoatraktantams (CINC) priklausantys baltymai (CINC-1, CINC-2ab, CINC-3), C-X3-C motyvo chemokino ligandas-1 (CX3CL1), C-X-C motyvo chemokino ligandas-10 (CXCL10), interleukinas-1ra (IL-1ra), interleukinas-6 (IL-6), tirpioji tarpląstelinės adhezijos molekulė-1 (tTLAM-1), audinių metalopeptidazės-1 inhibitorius (AIMP-1) ir KEAF (3 A pav.).

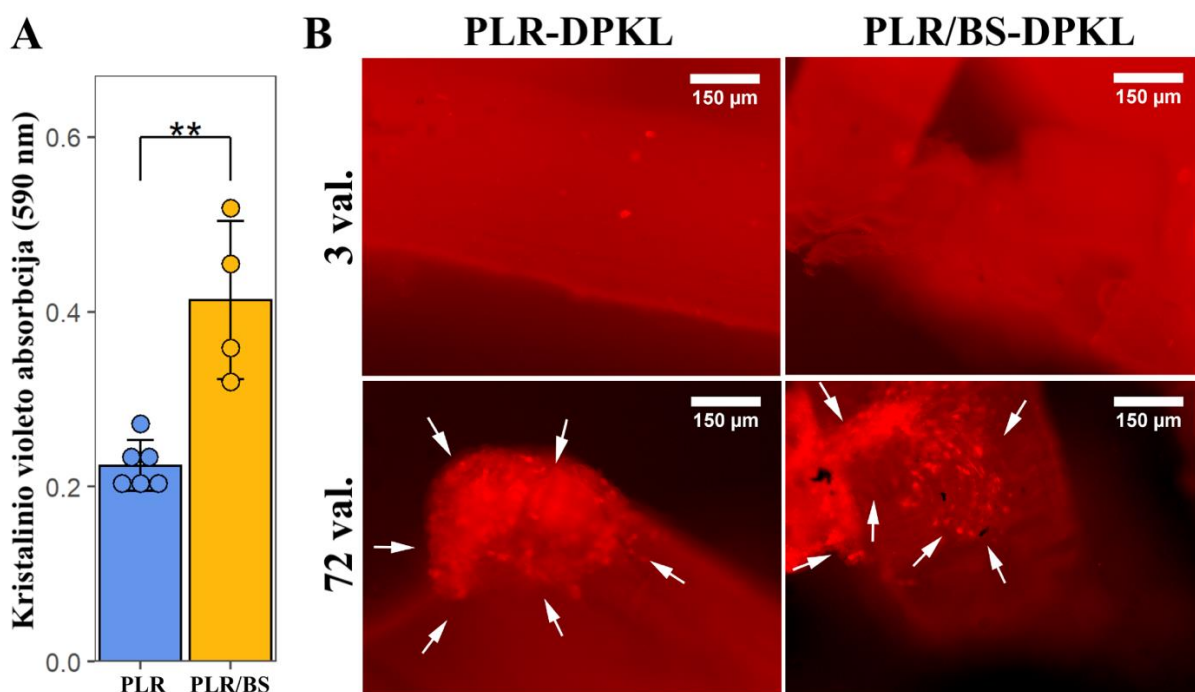


3 pav. A – kiekybinė ant PLR ir PLR/BS karkasų inkubuotų DPKL sekretomuose identifikuotų signalinių molekulių analizė. Duomenys normalizuoti pagal teigiamos kontrolės vidutinės vertes. B – identifikuotų molekulių sąveikų tinklas, sudarytas pagal „STRING“ duomenų bazę.

Statistiškai reikšmingų skirtumų tarp signalinių molekulių kiekių PLR ir PLR/BS sekretuose nerasta. Abiejose grupėse KEAF kiekis buvo didžiausias iš visų išskirtų molekulių. Naudojantis „STRING“ duomenų baze nustatyta, kad identifikuotos signalinės molekulės dalyvauja biologiniuose procesuose, susijusiuose su uždegiminiu atsaku, ląstelių kalcio jonų homeostaze, žaizdų gijimu, osteogenezės ir angiogenezės reguliavimu (3 B pav.).

6.2. EL migracijos analizės rezultatai

Kiekybinės EL migracijos analizės rezultatai parodė, kad PLR/BS karkasai sukėlė statistiškai reikšmingai didesnę EL migraciją, nei karkasai, pagaminti tik iš PLR (4 A pav.). Kokybinės analizės duomenimis per pirmąsias 3 val. ląstelių migracija neįvyko nė ant vieno iš tirtų konstrukty, tačiau po 72 val. nuo kontakto su ląstelėmis ant konstrukty buvo matomos į kraujagysles panašios struktūros, suformuotos iš rEL (4 B pav.). Be to, ant PLR/BS-DPKL konstrukty buvo matoma vertikali rEL migracija.

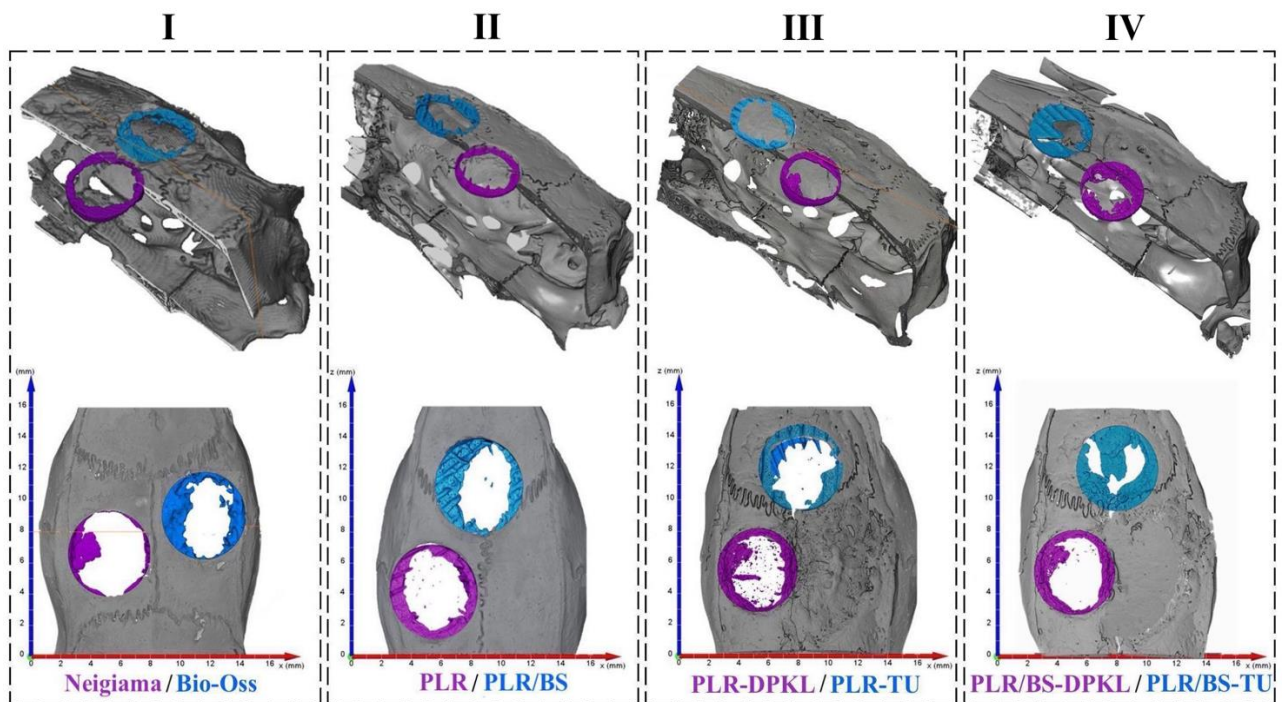


4 pav. EL migracijos tyrimo rezultatai. A – kiekybinės EL migracijos ant PLR ir PLR/BS karkasų analizės duomenys. ** nurodo statistiškai reikšmingą skirtumą tarp grupių ($p < 0,01$); B – kokybinės EL migracijos ant PLR-DPKL ir PLR/BS-DPKL konstrukty analizės nuotraukos po 3 val. ir 72 val. nuo pirmojo kontakto su rEL. Rodyklėmis pažymėtos iš rEL suformuotos struktūros.

6.3. MikroKT analizės rezultatai

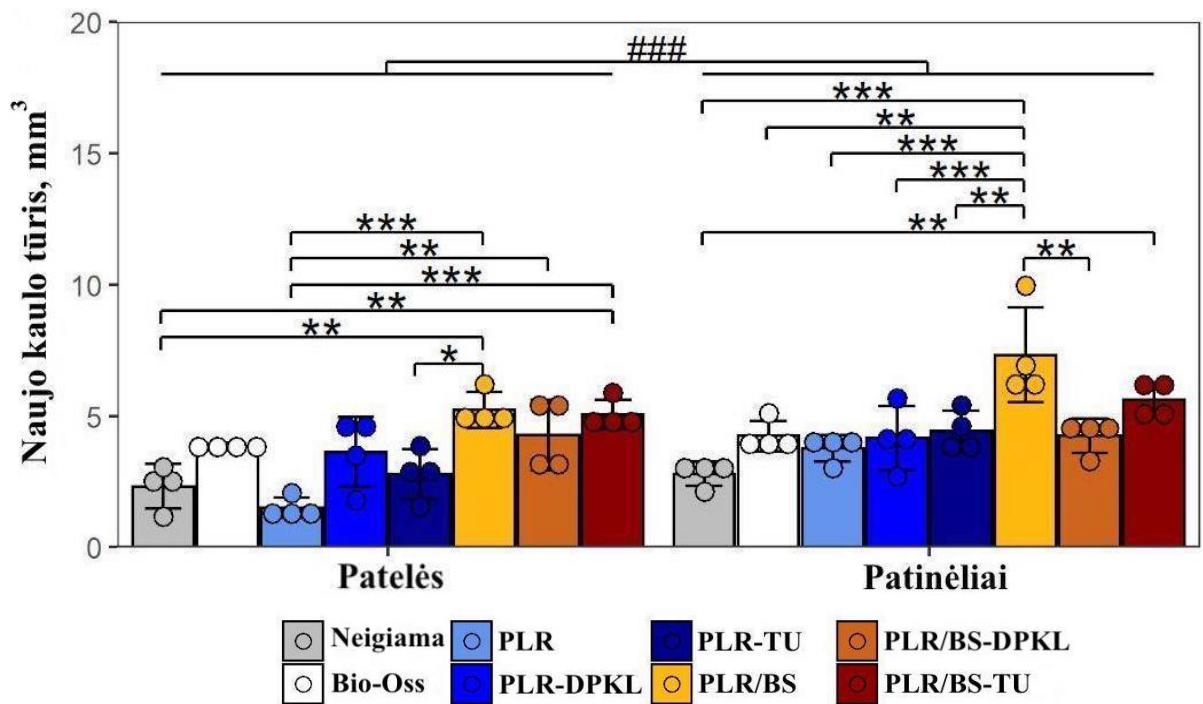
Praėjus 8 sav. po operacijų žiurkių kaukolės ir jose suformuoti defektai mikroKT tyrimų metu vizualizuoti 3D rekonstrukcijomis (5 pav.). Gautuose vaizduose matomas naujo kaulo

formavimasis visų tiriamųjų grupių kauliniuose defektuose. Nė viename iš defektų nebuvo matomas pilnas atsistatymas kaulu. Kai kuriuose iš vizualizuotų defektų matomi naujai susiformavusio kaulo plotai, atskiri nuo defektų kraštuose susiformavusio kaulo.



5 pav. MikroKT tyrimo 3D rekonstrukcijų vaizdai iš šono ir iš viršaus. Kokybinės mikroKT analizės duomenys. I, II, III ir IV nurodo atitinkamas gyvūnų grupes, violetinė ir mėlyna spalvos žymi naujai susiformavusį kaulą skirtinguose defektuose.

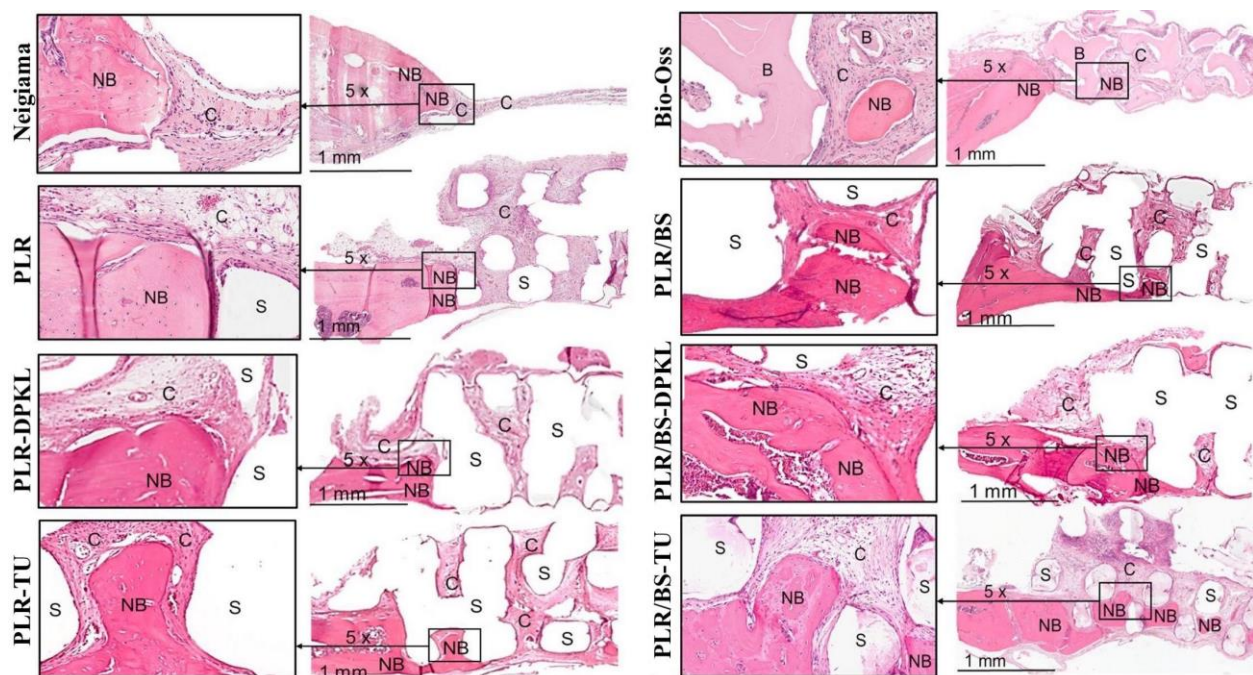
Vertinant kiekybinės mikroKT analizės duomenis nustatyta, kad visose grupėse patelių defektuose susiformavo statistiškai reikšmingai mažesnis naujo kaulo tūris, lyginant su patinėliais (6 pav.). Abiejose lytyse daugiausia naujo kaulo tūrio susiformavo PLR/BS užpildytuose defektuose. Patinėlių kauliniuose defektuose, užpildytuose PLR/BS karkasais, susiformavusio kaulo tūris ($7,33 \pm 1,55 \text{ mm}^3$) buvo statistiškai reikšmingai didesnis, nei kitų grupių defektuose, išskyrus PLR/BS-TU grupę ($5,6 \pm 0,55 \text{ mm}^3$). Patelių defektuose, užpildytuose PLR/BS karkasais, statistiškai reikšmingi skirtumai aptikti tik lyginant su PLR ir PLR-TU rezultatais. Nors abiejų lyčių defektuose, užpildytuose PLR-DPKL ir PLR-TU, susiformavo didesnis naujo kaulo tūris, nei defektuose su PLR karkasais, statistiškai reikšmingų skirtumų tarp šių grupių nerasta.



6 pav. Naujai susiformavusio kaulo tūris (mm^3) bandomųjų žiurkių kaukolės skliauto kritinio dydžio defektuose pagal grupes ir lytį. Kiekybinės mikroKT analizės duomenys. *, ** ir *** nurodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp grupių, atitinkamai $p < 0,05$, $p < 0,01$ ir $p < 0,001$. ### nurodo statistiškai reikšmingą skirtumą toje pačioje grupėje tarp lyčių ($p < 0,001$).

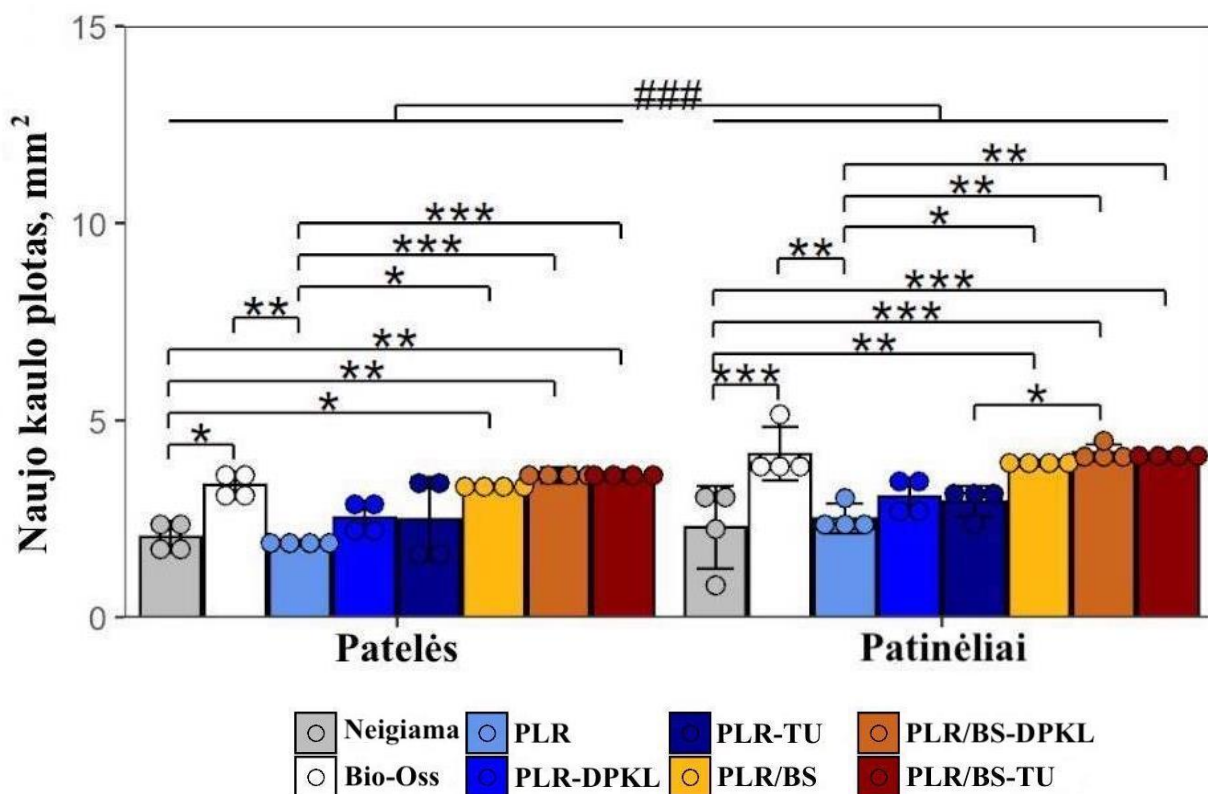
6.4. Histologinės analizės rezultatai

Histologinei analizei paruoštuose mėginiuose buvo matomas kaulinis audinys, jungiamasis audinys, Bio-Oss granulės ir nesuirę karkasų fragmentai (7 pav.). Nė vienas kritinio dydžio defektas nebuvo pilnai atstatytas naujai susiformavusiu kaulu. Neigiamos kontrolės grupėje link defekto centro susiformavo daugiau kaulo, nei kitose grupėse, tačiau šio kaulo storis buvo 0,1-0,3 mm. Defektuose, kurie buvo užpildyti medžiagomis, naujo kaulo storis siekė 0,3-1 mm, bet šis kaulas daugiau koncentravosi ties defektų kraštais. Buvo matomas naujo kaulo formavimasis tarp PLR-TU, PLR/BS, PLR/BS-DPKL ir PLR/BS-TU karkasų filamentų. PLR/BS-TU ir Bio-Oss grupėje buvo matomi naujo kaulo plotai, besiformavę link defekto centro ir neturėję kontakto su periferijoje buvusiu nauju kaulu.



7 pav. Hematokslinu ir eozinu nudažytų histologinių mėginių nuotraukos, atliktos per šviesinį mikroskopą. Kokybinės histologinės analizės duomenys. NB – naujai susiformavęs kaulas, B – Bio-Oss granulės, C – jungiamasis audinys, S – suirusių karkasų sritys ir karkasų fragmentai.

Kiekybinės histologinės analizės duomenys parodė, kad, vertinant abi lytis kartu, didžiausias kaulo plotas susiformavo defektus užpildžius Bio-Oss ($3,75 \pm 0,6 \text{ mm}^2$), PLR/BS-DPKL ($3,9 \pm 0,34 \text{ mm}^2$) ir PLR/BS-TU ($3,86 \pm 0,27 \text{ mm}^2$) (8 pav.). Nepaisant to, visose grupėse patelių defektuose susiformavo statistiškai reikšmingai mažesnis naujo kaulo plotas, lyginant su patinėliais. Nenustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų lyginant iš tų pačių filamentų pagamintus karkasus ir konstruktus, t.y., lyginant PLR karkasus su PLR-DPKL ir PLR-TU konstruktais bei PLR/BS karkasus su PLR/BS-DPKL ir PLR/BS-TU konstruktais. Defektuose, užpildytuose konstruktais, naujo kaulo susiformavo nežymiai daugiau, nei defektuose su tų pačių medžiagų karkasais. Tuo tarpu defektuose, užpildytuose iš PLR/BS pagamintais karkasais ir konstruktais, susiformavo statistiškai reikšmingai didesnis kaulo plotas, nei PLR karkasais užpildytuose defektuose.



8 pav. Naujai susiformavusio kaulo plotas (mm²) bandomųjų gyvūnų kaukolės skliauto kritinio dydžio defektuose pagal grupes ir lytį. Kiekybinės histologinės analizės duomenys. *, ** ir *** nurodo statistiškai reikšmingus skirtumus tarp grupių, atitinkamai $p < 0,05$, $p < 0,01$ ir $p < 0,001$. ### nurodo statistiškai reikšmingą skirtumą toje pačioje grupėje tarp lyčių ($p < 0,001$).

7. REZULTATŲ APTARIMAS

Šio darbo metu atliktą tiriamųjų karkasų poveikio kaulo regeneracijos procesams įvertinimą galima padalinti į *in vitro* bei *in vivo* dalis. *In vitro* tyrimų metu pirmiausia siekta įvertinti pagamintų karkasų ir konstrukty su DPKL poveikį potencialiam organizmo atsakai. Ant PLR ir PLR/BS karkasų inkubuotų DPKL sekretuose nenustatyta statistiškai reikšmingų skirtumų tarp išskirtų signalinių molekulių kiekių, o procesai, su kuriais susijusios identifikuotos molekulės, yra normali kaulo regeneracijos dalis. Abiejų grupių sekretuose KEAF kiekis buvo didžiausias iš visų identifikuotų molekulių. KEAF yra vienas svarbiausių augimo faktorių, skatinančių EL migraciją ir kraujagyslių vystymąsi [82]. Gauti rezultatai rodo, kad DPKL, kontaktuodamos su abiejų rūšių karkasais, geba efektyviai sintetinti šią medžiagą. Visos kitos sekretuose identifikuotos molekulės, be kitų procesų, dalyvauja uždegiminiame atsake. Bet kokio svetimkūnio implantacija į organizmą sukelia tam tikro lygio imuninę reakciją, ir svarbu suprasti, kad tai yra integrali kaulo atsistatymo proceso dalis, t.y., osteoregeneracija nėra vien tik žaizdos atsistatymas kaulu [83]. *In vitro* rezultatai neparodė statistiškai reikšmingų skirtumų tarp uždegime dalyvaujančių signalinių molekulių kiekių PLR/BS ir PLR karkasų grupių sekretuose.

Teoriškai BS turėtų mažinti PLR sukeltą uždegimo reakciją neutralizuodamas rūgštinius PLR irimo produktus [84]. Gautus rezultatus galima paaiškinti tuo, kad sekretomai analizuoti praėjus 7 d. po DPKL kontakto su karkasais, o tiek laiko galėjo neužtekti, kad sąlyginai lėtos PLR biodegradacijos metu išsiskirtų pakankamas irimo produktų kiekis ir būtų sukeltas didesnis uždegimas. S. Sultan su bendraautoriais atlikto *in vivo* tyrimo metu, praėjus 7 d. po PLR ir PLR/BS karkasų implantavimo į žiurkių kaulinius defektus, abiejų karkasų srityse vyko panašios apimties uždegimo reakcijos, o po 14 d. PLR/BS srityje uždegiminis atsakas buvo mažesnis, nei apie PLR karkasus [85]. Galima manyti, kad *in vitro* DPKL sekretomų analizės kartojus po 14 d. ar dar ilgesnio laiko tarpo, būtų gauti reikšmingi skirtumai tarp uždegime dalyvaujančių bioaktyvių molekulių kiekių.

Sekretomų analizės metu gauti dideli KEAF kiekiai paskatino tęsti karkasų poveikio angiogenezei įvertinimą. Angiogeneze yra itin svarbi kokybiško kaulinio audinio formavimosi dalis – kraujagyslės tiekia deguonį ir maistines medžiagas, būtinas defekto gijime dalyvaujančioms ląstelėms. Šiame tyrime atlikta EL migracijos analizė leido netiesiogiai įvertinti medžiagų, iš kurių pagaminti karkasai, poveikį angiogenezei. Toks įvertinimas svarbus, nes nors BS angiogenezės potencialas yra pripažintas, neaišku, ar šios savybės išlieka inkorporavus BS į PLR sudėtį. R. Day su kolegomis atliktas *in vivo* tyrimas parodė, kad iš polilaktinės-ko-glikolinės rūgšties (angl. *polylactic-co-glycolic acid*) ir BS pagaminti karkasai angiogenezę sukėlė efektyviau, nei tik iš minėto polimero pagaminti karkasai [86]. Tačiau svarbu pabrėžti, kad šiame tyrime karkasai buvo sudaryti iš kito polimero bei skirtingo BS kiekio karkasų sudėtyje. Be to, karkasai gaminti kompresinio liejimo arba termiškai indukuotos fazių separacijos metodais. Šie būdai nesuteikia galimybių pagaminti kontroliuojamos architektūros karkasus. Trumpai tariant, egzistuoja daugybė kintamųjų, galinčių daryti įtaką karkaso angiogenezės potencialui, todėl tikslinga įvertinti kiekvieno skirtingus parametrus turinčio karkaso poveikį angiogenezei. Atlikto tyrimo duomenys parodė, kad BS įtraukimas į PLR karkasus masės santykiu 1:9 reikšmingai paskatina EL migraciją. Tai netiesiogiai įrodo, kad BS, esantis PLR sudėtyje, išlaiko angiogenezę skatinančias savybes ar bent padidina PLR potencialą skatinti naujų kraujagyslių formavimąsi. Be to, kaip matoma tirtų karkasų fotografijose, atliktose per skenuojantį elektroninį mikroskopą (1 pav.), PLR/BS karkasai yra šiurkštesni, o tai taip pat galėjo paskatinti didesnę EL prisitvirtinimą. Šiurkštus karkasų paviršius morfologiškai labiau primena kaulą ir skatina osteoblastų, kamieninių ląstelių, endotelio ląstelių adheziją ir proliferaciją [87]. Siekiant tiksliau atkartoti natūralią organizmo aplinką žaizdos gijimo metu, kokybinė EL migracijos analizė atlikta su PLR ir PLR/BS karkasais, papildytais DPKL. Nors į kraujagysles panašių struktūrų formavimasis vyko ant abiejų grupių konstrukty, vertikali rEL migracija buvo matoma tik PLR/BS-DPKL grupėje. Šis pastebėjimas koreliuoja su kiekybinės analizės rezultatais.

In vivo mikroKT ir histologinės analizės duomenimis, didžiausias kaulo kiekis susidarė defektus užpildžius PLR/BS karkasais ir PLR/BS-TU konstruktais, o PLR/BS karkasai ir konstruktai sukėlė didesnę naujo kaulo formavimąsi, nei PLR karkasai ir konstruktai. PLR/BS karkasų pranašumas ypač akivaizdus vertinant naujai susiformavusio kaulo tūrį patinėlių defektuose. Daugelis *in vivo* tyrimų parodė, kad BS papildyti PLR karkasai pagal defektuose susiformavusio naujo kaulo kiekį lenkia grynos PLR karkasus [88–90]. Biostiklas PLR karkasui suteikia osteoinduktyvumą, didina hidrofiliškumą bei neutralizuoja rūgštinius irimo produktus [91], o tai paaiškina gautus šio tyrimo rezultatus. Be to, didesnis PLR/BS karkasų šiurkštumas taip pat galėjo prisidėti prie geresnių PLR/BS rezultatų. Kokybinės histologinės analizės duomenimis, tik Bio-Oss ir PLR/BS-TU grupėje buvo matomi naujai susiformavusio kaulo plotai, neturėję kontakto su nauju kaulu periferijoje. Karkasų, padengtų TU, sudėtyje gausu bioaktyvių molekulių, skatinančių kamieninių ląstelių migraciją ir osteogeninę diferenciaciją [92], todėl galėjo būti sukeltas histologinio ištyrimo metu identifikuotų atskirų osteogenezės židinių formavimasis. Nors DPKL padengti karkasai sudėtyje taip pat turėjo tarpląstelinio užpildo, mėginiuose, paruoštuose histologiniam ištyrimui, nebuvo matoma atskirai nuo periferijos susidariusio kaulo. Arčiau link konstrukto centro buvusios DPKL galėjo žūti dėl maistinių medžiagų stygiaus [93], o žuvimo metu kilusi uždegiminė reakcija galėjo slopinti osteogenezę [94]. Karkasų papildymas DPKL ar TU sukėlė tik nežymiai didesnę naujo kaulo kiekio formavimąsi. Didžioji dalis *in vivo* tyrimų, kuriuose lygintas DPKL padengtų ir nepadengtų karkasų sukeltas kaulo atsistatymas, parodė reikšmingai geresnius rezultatus DPKL karkasų grupėse [95,96]. Tačiau S. Annibali su kolegomis atlikto *in vivo* tyrimo metu taip pat nerasta reikšmingų skirtumų tarp DPKL padengtų ir nepadengtų karkasų [97]. Yra tikimybė, kad operacinės srities mikroaplinka nebuvo optimali pakankamam DPKL osteoblastiniam aktyvumui sukurti. Pavyzdžiui, nustatyta, kad T limfocitai geba slopinti donorinių kamieninių ląstelių dalyvavimą osteogenezėje [98]. Nepalanki mikroaplinka galėjo sąlygoti konstrukto sukeltos kaulinio audinio regeneracijos lėtėjimą ar net kaulo rezorbciją. Norint geriau suprasti DPKL ir jų TU poveikį kaulo regeneracijai, reikalinga atlikti ilgesnės trukmės *in vivo* tyrimus bei vertinti kaulinio audinio atsistatymo dinamiką.

Įdomu, kad šio tyrimo metu patelių kauliniuose defektuose nustatytas statistiškai reikšmingai mažesnis naujai susiformavusio kaulo kiekis, lyginant su patinėliais. Kaulo regeneracijos skirtumai tarp lyčių žinomi ne tik bandomosiose žiurkėse, bet ir kituose žinduoliuose, tame tarpe ir žmonėse [99]. Atsižvelgiant į reikšmingą klinikinę lyties, kaip rizikos veiksnio kaulo regeneracijoje, svarbą, literatūroje randama stebėtinai mažai tyrimų su gyvūnais, nagrinėjusių kaulo regeneracijos skirtumus tarp lyčių ir šių skirtumų priežastis. Žiurkių patelių kaulų čiulpuose nustatytas reikšmingai mažesnis mezenchiminių kamieninių ląstelių kiekis, lyginant su patinėliais [99]. Mažesnis kamieninių ląstelių kiekis gali lemti prastesnes regeneracines kaulo savybes ir

paiškinti rezultatuose matomus skirtumus tarp lyčių. Tačiau statistiškai reikšmingi skirtumai tarp lyčių buvo stebimi ir grupėse, kuriose kauliniai defektai užpildyti konstruktais su DPKL ar jų išskirtu TU. Prastesnė patelių kaulo regeneracija dar aiškinama po menopauzės sumažėjančiu estrogeno kiekiu [100]. Tačiau šiame tyrime chirurginės procedūros atliktos su 4 mėn. amžiaus žiurkėmis, o kaulo regeneracija vertinta žiurkėms pasiekus 6 mėn. amžių, taigi, tyrimo metu žiurkės buvo vaisingo amžiaus. Galima daryti prielaidą, kad prastesnė kaulo regeneracija žiurkių patelėse nėra vien tik mažesnio kaulų čiulpu kamieninių ląstelių kiekio ar menopauzės sąlygotų hormoninių pokyčių rezultatas, o tikrosios šio reiškinio priežastys vis dar nėra aiškios. Chirurginėse procedūrose naudotą vienodą žiurkių patinėlių ir patelių skaičių ir rezultatų išskirtumą pagal lytis galima laikyti vienu iš šio tyrimo privalumų, literatūroje aptinkamu gan retai. Net 80 proc. bandymų su gyvūnais atlikti tiriant tik vyriškos lyties individus [101]. Yra nuomonių, kad tyrimai tik su vienos lyties gyvūnais nereprezentuoja visos populiacijos ir gali neparodyti tikrojo rezultato [102]. Ši teiginį puikiai iliustruoja duomenys, gauti atlikto tyrimo metu – jei tyrime būtų naudojamos tik vyriškos lyties žiurkės, tuomet PLR/BS ir PLR/BS-TU karkasais užpildytų defektų rezultatai būtų parodę dar didesnę konkurencingumą Bio-Oss granulėmis užpildytiems defektams. Svarbu, kad būsimų tyrimų metu būtų išlaikomas vienodas abiejų lyčių skaičius, o karkasų savybės būtų gerinamos atsižvelgiant į abiejų lyčių rezultatus.

Magistro baigiamojo darbo atlikimo metu intereso konfliktų nekilo.

Padėka: Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovei dr. Ievai Gendvilienei už skirtą laiką, žinias bei kantrybę, taip pat dr. Mildai Alksnei ir visai DIGITORR komandai už bendradarbiavimą.

8. IŠVADOS

1. Tirtų karkasų poveikis organizmui susijęs su uždegiminiu atsaku, žaizdos gijimu, osteogenezės ir angiogenezės reguliavimu, ląstelinių kalcio jonų homeostaze. Polilaktinės rūgšties/biostiklo 45S5 karkasai ir konstruktai parodė didesnę angioindukcinį potencialą *in vitro*, lyginant su polilaktinės rūgšties karkasais ir konstruktais.
2. Tirti karkasai turi teigiamą poveikį naujo kaulo formavimuisi *in vivo*. Polilaktinės rūgšties/biostiklo 45S5 karkasai ir konstruktai parodė didesnę osteoregeneracinį potencialą, lyginant su polilaktinės rūgšties karkasais ir konstruktais. Konstruktai nesukėlė reikšmingai didesnio naujo kaulo kiekio formavimosi, nei tos pačios medžiagos karkasai.
3. Iš tirtų medžiagų, polilaktinės rūgšties/biostiklo 45S5 karkasai ir polilaktinės rūgšties/biostiklo 45S5–tarpląstelinio užpildo konstruktai sukėlė didžiausią naujo kaulo formavimąsi *in vivo*, o šiomis medžiagomis užpildytuose defektuose susiformavo panašus kaulo kiekis, kaip Geistlich Bio-Oss[®] granulėmis užpildytuose defektuose.

9. PRAKTINĖS REKOMENDACIJOS

Reikalingi tyrimai, siekiant toliau gerinti polilaktinės rūgšties/biostiklo 45S5 karkasų osteokonducines ir osteoinducines savybes bei sudaryti vienodai efektyvų kaulo regeneracijos poveikį abiejoms lytims. Norint geriau įvertinti tarpląstelinio užpildo poveikį kaulo regeneracijai, reikalingi ilgesnės trukmės tyrimai.

10. LITERATŪROS ŠARAŠAS

1. Jung RE, Ioannidis A, F H CH. Alveolar ridge preservation in the esthetic zone. 2018.
2. Cha HS, Kim JW, Hwang JH, Ahn KM. Frequency of bone graft in implant surgery. *Maxillofac Plast Reconstr Surg.* 2016 Dec;38(1).
3. Ratnayake JTB, Mucalo M, Dias GJ. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends. Vol. 105, *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials.* John Wiley and Sons Inc.; 2017. p. 1285–99.
4. Lee YC, Chan YH, Hsieh SC, Lew WZ, Feng SW. Comparing the Osteogenic Potentials and Bone Regeneration Capacities of Bone Marrow and Dental Pulp Mesenchymal Stem Cells in a Rabbit Calvarial Bone Defect Model. *Int J Mol Sci.* 2019 Oct 10;20(20):5015.
5. Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. Vol. 180, *Biomaterials.* Elsevier Ltd; 2018. p. 143–62.
6. Baldwin P, Li DJ, Auston DA, Mir HS, Yoon RS, Koval KJ. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J Orthop Trauma.* 2019 Apr 1;33(4):203–13.
7. Tolstunov L, Hamrick JFE, Broumand V, Shilo D, Rachmiel A. Bone Augmentation Techniques for Horizontal and Vertical Alveolar Ridge Deficiency in Oral Implantology. Vol. 31, *Oral and Maxillofacial Surgery Clinics of North America.* W.B. Saunders; 2019. p. 163–91.
8. Jakoi AM, Iorio JA, Cahill PJ. Autologous bone graft harvesting: a review of grafts and surgical techniques. Vol. 99, *Musculoskeletal Surgery.* Springer-Verlag Italia s.r.l.; 2015. p. 171–8.
9. Bogdán S, Németh Z, Huszár T, Ujjpál M, Barabás J, Szabó G. Comparison of postoperative complications following bone harvesting from two different donor sites for autologous bone replacement (hipbone and proximal epiphysis of the tibia). *Orv Hetil.* 2009 Feb 1;150(7):305–11.
10. Reininger D, Cobo-Vazquez C, Rosenberg B, Lopez-Quiles J. Alternative intraoral donor sites to the chin and mandibular body-ramus. *J Clin Exp Dent.* 2017;0–0.
11. Sohn HS, Oh JK. Review of bone graft and bone substitutes with an emphasis on fracture surgeries. Vol. 23, *Biomaterials Research.* BioMed Central Ltd.; 2019.
12. Klijn RJ, Meijer GJ, Bronkhorst EM, Jansen JA. Sinus Floor Augmentation Surgery Using Autologous Bone Grafts from Various Donor Sites: A Meta-Analysis of the Total Bone Volume. *Tissue Eng Part B Rev [Internet].* 2009 Dec 3;16(3):295–303. Available from: <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2009.0558>

13. Fillingham Y, Jacobs J, Fillingham v Y, Resident OS, Jacobs v J. Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J.* 2016;98-B(1):6–9.
14. Jordana F, le Visage C, Weiss P. Substituts osseux. *Medecine/Sciences.* 2017 Jan 1;33(1):60–5.
15. Troeltzsch M, Troeltzsch M, Kauffmann P, Gruber R, Brockmeyer P, Moser N, et al. Clinical efficacy of grafting materials in alveolar ridge augmentation: A systematic review. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery.* 2016 Oct 1;44(10):1618–29.
16. Starch-Jensen T, Deluiz D, Deb S, Bruun NH, Tinoco EMB. Harvesting of Autogenous Bone Graft from the Ascending Mandibular Ramus Compared with the Chin Region: a Systematic Review and Meta-Analysis Focusing on Complications and Donor Site Morbidity. *J Oral Maxillofac Res.* 2020 Sep 30;11(3).
17. Yates DM, Brockhoff HC, Finn R, Phillips C. Comparison of intraoral harvest sites for corticocancellous bone grafts. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2013 Mar;71(3):497–504.
18. Clavero J, ;'+ D, Lundgren S. Ramus or Chin Grafts for Maxillary Sinus Inlay and Local Onlay Augmentation: Comparison of Donor Site Morbidity and Complications.
19. Lumetti S, Consolo U, Galli C, Multinu A, Piersanti L, Bellini P, et al. Fresh-Frozen Bone Blocks for Horizontal Ridge Augmentation in the Upper Maxilla: 6-Month Outcomes of a Randomized Controlled Trial. *Clin Implant Dent Relat Res [Internet].* 2014 Feb 1;16(1):116–23. Available from: <https://doi.org/10.1111/j.1708-8208.2012.00458.x>
20. Gothi Rajat, Bansal Mansi, Kaushik Mayur, Prakhask Khattak Braham, Sood Nikhil, Taneja Vishal. A comparative evaluation of freeze dried bone allograft and decalcified freeze dried bone allograft in the treatment of intrabony defects: A clinical and radiographic study. *J Indian Soc Periodontol.* 2015;4(19):411–5.
21. Russell N, Rives A, Pelletier MH, Wang T, Walsh WR. The effect of supercritical carbon dioxide sterilization on the anisotropy of bovine cortical bone. *Cell Tissue Bank [Internet].* 2015;16(1):109–21. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10561-014-9447-8>
22. Fukuba S, Okada M, Nohara K, Iwata T. Alloplastic Bone Substitutes for Periodontal and Bone Regeneration in Dentistry: Current Status and Prospects. *Materials [Internet].* 2021;14(5). Available from: <https://www.mdpi.com/1996-1944/14/5/1096>
23. Zamborsky Radoslav, Svec Andrey, Bohac Martin, Kilian Miroslav, Kokavec Milan. Infection in Bone Allograft Transplants. *Experimental and Clinical Transplantation.* 2016 Oct;14(5):484–90.
24. Gillman CE, Jayasuriya AC. FDA-approved bone grafts and bone graft substitute devices in bone regeneration. Vol. 130, *Materials Science and Engineering C.* Elsevier Ltd; 2021.

25. Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J Clin Periodontol* [Internet]. 2019;46(S21):92–102. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/jcpe.13058>
26. Moussa NT, Dym H. Maxillofacial Bone Grafting Materials. Vol. 64, *Dental Clinics of North America*. W.B. Saunders; 2020. p. 473–90.
27. Troeltzsch M, Troeltzsch M, Kauffmann P, Gruber R, Brockmeyer P, Moser N, et al. Clinical efficacy of grafting materials in alveolar ridge augmentation: A systematic review. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* [Internet]. 2016;44(10):1618–29. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1010518216301627>
28. Lai VJ, Michalek JE, Liu Q, Mealey BL. Ridge preservation following tooth extraction using bovine xenograft compared with porcine xenograft: A randomized controlled clinical trial. *J Periodontol* [Internet]. 2020 Mar 1;91(3):361–8. Available from: <https://doi.org/10.1002/JPER.19-0211>
29. Moreira A de C, Silva JR, Samico R de P, Nishioka GN de M, Nishioka RS. Application of bio-oss in tissue regenerative treatment prior to implant installation: Literature review. Vol. 22, *Brazilian Dental Science*. Universidade Estadual Paulista, Institute of Science and Technology of Sao Jose dos Campos; 2019. p. 147–54.
30. Mordenfeld A, Hallman M, Johansson CB, Albrektsson T. Histological and histomorphometrical analyses of biopsies harvested 11 years after maxillary sinus floor augmentation with deproteinized bovine and autogenous bone. *Clin Oral Implants Res*. 2010 Sep;21(9):961–70.
31. Wang S, Li R, Xu Y, Xia D, Zhu Y, Yoon J, et al. Fabrication and Application of a 3D-Printed Poly- ϵ -Caprolactone Cage Scaffold for Bone Tissue Engineering. Silikas N, editor. *Biomed Res Int* [Internet]. 2020;2020:2087475. Available from: <https://doi.org/10.1155/2020/2087475>
32. Riachi F, Naaman N, Tabarani C, Aboelsaad N, Aboushelib MN, Berberi A, et al. Influence of Material Properties on Rate of Resorption of Two Bone Graft Materials after Sinus Lift Using Radiographic Assessment. Taschieri S, editor. *Int J Dent* [Internet]. 2012;2012:737262. Available from: <https://doi.org/10.1155/2012/737262>
33. Fuchs A, Kreczy D, Brückner T, Gbureck U, Stahlhut P, Bengel M, et al. Bone regeneration capacity of newly developed spherical magnesium phosphate cement granules. *Clin Oral Investig*. 2022 Mar 23;26(3):2619–33.
34. Bisht B, Hope A, Mukherjee A, Paul MK. Advances in the Fabrication of Scaffold and 3D Printing of Biomimetic Bone Graft. Vol. 49, *Annals of Biomedical Engineering*. Springer; 2021. p. 1128–50.
35. Ma H, Feng C, Chang J, Wu C. 3D-printed bioceramic scaffolds: From bone tissue engineering to tumor therapy. *Acta Biomater* [Internet]. 2018;79:37–59. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706118304938>

36. Sultan S, Thomas N, Varghese M, Dalvi Y, Joy S, Hall S, et al. The Design of 3D-Printed Polylactic Acid–Bioglass Composite Scaffold: A Potential Implant Material for Bone Tissue Engineering. *Molecules*. 2022 Oct 25;27(21):7214.
37. Barabaschi GDG, Manoharan V, Li Q, Bertassoni LE. Engineering Pre-vascularized Scaffolds for Bone Regeneration. In 2015. p. 79–94.
38. Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F, et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. Vol. 3, *Bioactive Materials*. KeAi Communications Co.; 2018. p. 278–314.
39. Feng Y, Zhu S, Mei D, Li J, Zhang J, Yang S, et al. Application of 3D Printing Technology in Bone Tissue Engineering: A Review. *Curr Drug Deliv*. 2021 Aug;18(7):847–61.
40. Winarso R, Anggoro PW, Ismail R, Jamari J, Bayuseno AP. Application of fused deposition modeling (FDM) on bone scaffold manufacturing process: A review. *Heliyon* [Internet]. 2022;8(11):e11701. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405844022029899>
41. Haugen HJ, Lyngstadaas SP, Rossi F, Perale G. Bone grafts: which is the ideal biomaterial? *J Clin Periodontol*. 2019 Jun 1;46(S21):92–102.
42. KARAGEORGIU V, KAPLAN D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials*. 2005 Sep;26(27):5474–91.
43. Parulski C, Jennotte O, Lechanteur A, Evrard B. Challenges of fused deposition modeling 3D printing in pharmaceutical applications: Where are we now? *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2021;175:113810. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X21001848>
44. Solomon IJ, Sevvel P, Gunasekaran J. A review on the various processing parameters in FDM. In: *Materials Today: Proceedings*. Elsevier Ltd; 2020. p. 509–14.
45. Daminabo SC, Goel S, Grammatikos SA, Nezhad HY, Thakur VK. Fused deposition modeling-based additive manufacturing (3D printing): techniques for polymer material systems. Vol. 16, *Materials Today Chemistry*. Elsevier Ltd; 2020.
46. Doshi M, Mahale A, Kumar Singh S, Deshmukh S. Printing parameters and materials affecting mechanical properties of FDM-3D printed Parts: Perspective and prospects. *Mater Today Proc* [Internet]. 2022;50:2269–75. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214785321064671>
47. Singhvi MS, Zinjarde SS, Gokhale D v. Polylactic acid: synthesis and biomedical applications. *J Appl Microbiol* [Internet]. 2019 Dec 1;127(6):1612–26. Available from: <https://doi.org/10.1111/jam.14290>
48. Ramot Y, Haim-Zada M, Domb AJ, Nyska A. Biocompatibility and safety of PLA and its copolymers. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2016;107:153–62. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X16300989>

49. Koons GL, Diba M, Mikos AG. Materials design for bone-tissue engineering. *Nat Rev Mater* [Internet]. 2020;5(8):584–603. Available from: <https://doi.org/10.1038/s41578-020-0204-2>
50. Maadani AM, Salahinejad E. Performance comparison of PLA- and PLGA-coated porous bioceramic scaffolds: Mechanical, biodegradability, bioactivity, delivery and biocompatibility assessments. Vol. 351, *Journal of Controlled Release*. Elsevier B.V.; 2022. p. 1–7.
51. Ishii D, Ying TH, Mahara A, Murakami S, Yamaoka T, Lee W ki, et al. In Vivo Tissue Response and Degradation Behavior of PLLA and Stereocomplexed PLA Nanofibers. *Biomacromolecules*. 2009 Feb 9;10(2):237–42.
52. Feng P, Jia J, Liu M, Peng S, Zhao Z, Shuai C. Degradation mechanisms and acceleration strategies of poly (lactic acid) scaffold for bone regeneration. *Mater Des*. 2021 Nov;210:110066.
53. Mohamed S, Shamaz BH. Bone Tissue Engineering and Bony Scaffolds. *Int J Dent Oral Health*. 2015;1(1):01–6.
54. Fukushima K, Kimura Y. An efficient solid-state polycondensation method for synthesizing stereocomplexed poly(lactic acid)s with high molecular weight. *J Polym Sci A Polym Chem*. 2008 Jun 1;46(11):3714–22.
55. Farah S, Anderson DG, Langer R. Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. 2016;107:367–92. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0169409X16302058>
56. Rizwan M, Hamdi M, Basirun WJ. Bioglass® 45S5-based composites for bone tissue engineering and functional applications. *J Biomed Mater Res A* [Internet]. 2017 Nov 1;105(11):3197–223. Available from: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36156>
57. Capuana E, Lopresti F, Ceraulo M, la Carrubba V. Poly-l-Lactic Acid (PLLA)-Based Biomaterials for Regenerative Medicine: A Review on Processing and Applications. *Polymers (Basel)*. 2022 Mar 14;14(6):1153.
58. Hench LL. The story of Bioglass®. *J Mater Sci Mater Med*. 2006 Nov 22;17(11):967–78.
59. Rezabeigi E, Wood-Adams PM, Drew RAL. Synthesis of 45S5 Bioglass® via a straightforward organic, nitrate-free sol–gel process. *Materials Science and Engineering: C* [Internet]. 2014;40:248–52. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493114001684>
60. Sugumaran V, Krishnamoorthy E, Kamalakkannan A, Ramachandran RC, Subramanian B. Unscrambling the Influence of Sodium Cation on the Structure, Bioactivity, and Erythrocyte Compatibility of 45S5 Bioactive Glass. *ACS Appl Bio Mater*. 2022 Apr 18;5(4):1576–90.

61. Porwal H, Grasso S, Cordero-Arias L, Li C, Boccaccini AR, Reece MJ. Processing and bioactivity of 45S5 Bioglass®-graphene nanoplatelets composites. *J Mater Sci Mater Med*. 2014 Jun 12;25(6):1403–13.
62. Hench LL. Genetic design of bioactive glass. *J Eur Ceram Soc*. 2009 Apr;29(7):1257–65.
63. Jones JR. New trends in bioactive scaffolds: The importance of nanostructure. *J Eur Ceram Soc*. 2009 Apr;29(7):1275–81.
64. Huang J. Design and Development of Ceramics and Glasses. In: *Biology and Engineering of Stem Cell Niches*. Elsevier; 2017. p. 315–29.
65. Farag MM, Abd-Allah WM, Ahmed HYA. Study of the dual effect of gamma irradiation and strontium substitution on bioactivity, cytotoxicity, and antimicrobial properties of 45S5 bioglass. *J Biomed Mater Res A [Internet]*. 2017 Jun 1;105(6):1646–55. Available from: <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36035>
66. Porwal H, Grasso S, Cordero-Arias L, Li C, Boccaccini AR, Reece MJ. Processing and bioactivity of 45S5 Bioglass®-graphene nanoplatelets composites. *J Mater Sci Mater Med*. 2014 Jun 12;25(6):1403–13.
67. Vergnol G, Ginsac N, Rivory P, Meille S, Chenal JM, Balvay S, et al. In vitro and in vivo evaluation of a polylactic acid-bioactive glass composite for bone fixation devices. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 2016 Jan;104(1):180–91.
68. Almouemen N, Kelly HM, O’Leary C. Tissue Engineering: Understanding the Role of Biomaterials and Biophysical Forces on Cell Functionality Through Computational and Structural Biotechnology Analytical Methods. *Comput Struct Biotechnol J*. 2019;17:591–8.
69. Ferrarotti F, Romano F, Gamba MN, Quirico A, Giraudi M, Audagna M, et al. Human intrabony defect regeneration with micrografts containing dental pulp stem cells: A randomized controlled clinical trial. *J Clin Periodontol*. 2018 Jul;45(7):841–50.
70. Buduru SD, Gulei D, Zimta AA, Tigu AB, Cenariu D, Berindan-Neagoe I. The Potential of Different Origin Stem Cells in Modulating Oral Bone Regeneration Processes. *Cells*. 2019 Jan 8;8(1):29.
71. Huang GTJ, Gronthos S, Shi S. Mesenchymal Stem Cells Derived from Dental Tissues vs . Those from Other Sources: Their Biology and Role in Regenerative Medicine. *J Dent Res*. 2009 Sep 18;88(9):792–806.
72. Tatsuhiro F, Seiko T, Yusuke T, Reiko TT, Kazuhito S. Dental Pulp Stem Cell-Derived, Scaffold-Free Constructs for Bone Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2018 Jun 22;19(7):1846.
73. Conde MCM, Chisini LA, Grazioli G, Francia A, Carvalho RV de, Alcázar JCB, et al. Does Cryopreservation Affect the Biological Properties of Stem Cells from Dental Tissues? A Systematic Review. *Braz Dent J*. 2016 Dec;27(6):633–40.

74. Liu P, Zhang Y, Ma Y, Tan S, Ren B, Liu S, et al. Application of dental pulp stem cells in oral maxillofacial tissue engineering. *Int J Med Sci.* 2022;19(2):310–20.
75. Kim YS, Majid M, Melchiorri AJ, Mikos AG. Applications of decellularized extracellular matrix in bone and cartilage tissue engineering. *Bioeng Transl Med.* 2019 Jan 26;4(1):83–95.
76. Hiraki T, Kunimatsu R, Nakajima K, Abe T, Yamada S, Rikitake K, et al. Stem cell-derived conditioned media from human exfoliated deciduous teeth promote bone regeneration. *Oral Dis.* 2020 Mar 6;26(2):381–90.
77. Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. Vol. 180, *Biomaterials.* Elsevier Ltd; 2018. p. 143–62.
78. Nowwarote N, Petit S, Ferre FC, Dingli F, Laigle V, Loew D, et al. Extracellular Matrix Derived From Dental Pulp Stem Cells Promotes Mineralization. *Front Bioeng Biotechnol.* 2021;9:740712.
79. Bousnaki M, Bakopoulou A, Pich A, Papachristou E, Kritis A, Koidis P. Mapping the Secretome of Dental Pulp Stem Cells Under Variable Microenvironmental Conditions. *Stem Cell Rev Rep.* 2022 Apr 22;18(4):1372–407.
80. Gendviliene I, Simoliunas E, Alksne M, Dibart S, Jasiuniene E, Cicenas V, et al. Effect of extracellular matrix and dental pulp stem cells on bone regeneration with 3D printed PLA/HA composite scaffolds. *Eur Cell Mater.* 2021;41:204–15.
81. Gendviliene I. Development and evaluation of the innovative 3D printed scaffolds for bone regeneration in vitro and in vivo. [Lithuania]: Vilnius University; 2021.
82. Hu K, Olsen BR. Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *Journal of Clinical Investigation.* 2016 Jan 5;126(2):509–26.
83. Trindade R, Albrektsson T, Tengvall P, Wennerberg A. Foreign Body Reaction to Biomaterials: On Mechanisms for Buildup and Breakdown of Osseointegration. *Clin Implant Dent Relat Res.* 2016 Feb;18(1):192–203.
84. Mohamed S, Shamaz BH. Bone Tissue Engineering and Bony Scaffolds. *Int J Dent Oral Health.* 2015;1(1):01–6.
85. Sultan S, Thomas N, Varghese M, Dalvi Y, Joy S, Hall S, et al. The Design of 3D-Printed Polylactic Acid–Bioglass Composite Scaffold: A Potential Implant Material for Bone Tissue Engineering. *Molecules.* 2022 Oct 25;27(21):7214.
86. Day RM, Maquet V, Boccaccini AR, Jérôme R, Forbes A. In vitro and in vivo analysis of macroporous biodegradable poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds containing bioactive glass. *J Biomed Mater Res A.* 2005 Dec 15;75A(4):778–87.
87. Woźniak MJ, Chlanda A, Oberbek P, Heljak M, Czarnecka K, Janeta M, et al. Binary bioactive glass composite scaffolds for bone tissue engineering—Structure and

- mechanical properties in micro and nano scale. A preliminary study. *Micron*. 2019 Apr;119:64–71.
88. Eldesoqi K, Henrich D, El-Kady AM, Arbid MS, Abd El-Hady BM, Marzi I, et al. Safety Evaluation of a Bioglass–Polylactic Acid Composite Scaffold Seeded with Progenitor Cells in a Rat Skull Critical-Size Bone Defect. *PLoS One* [Internet]. 2014 Feb 3;9(2):e87642-. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0087642>
 89. Barbeck M, Serra T, Booms P, Stojanovic S, Najman S, Engel E, et al. Analysis of the in vitro degradation and the in vivo tissue response to bi-layered 3D-printed scaffolds combining PLA and biphasic PLA/bioglass components – Guidance of the inflammatory response as basis for osteochondral regeneration. *Bioact Mater*. 2017 Dec;2(4):208–23.
 90. Lu W, Ji K, Kirkham J, Yan Y, Boccaccini AR, Kellett M, et al. Bone tissue engineering by using a combination of polymer/Bioglass composites with human adipose-derived stem cells. *Cell Tissue Res*. 2014 Apr 10;356(1):97–107.
 91. Söhling N, Al Zoghool S, Schätzlein E, Neijhoft J, Costa Oliveira KM, Leppik L, et al. In vitro Evaluation of a 20% Bioglass-Containing 3D printable PLA Composite for Bone Tissue Engineering. *Int J Bioprint*. 2022 Aug 18;8(4).
 92. Wu YH, Chiu YC, Lin YH, Ho CC, Shie MY, Chen YW. 3D-Printed Bioactive Calcium Silicate/Poly- ϵ -Caprolactone Bioscaffolds Modified with Biomimetic Extracellular Matrices for Bone Regeneration. *Int J Mol Sci*. 2019 Feb 21;20(4):942.
 93. Šponer P, Kučera T, Diaz-Garcia D, Filip S. The role of mesenchymal stem cells in bone repair and regeneration. *European Journal of Orthopaedic Surgery & Traumatology*. 2014 Apr 8;24(3):257–62.
 94. Rai NK, Tripathi K, Sharma D, Shukla VK. Apoptosis: A Basic Physiologic Process in Wound Healing. *Int J Low Extrem Wounds*. 2005 Sep 29;4(3):138–44.
 95. Chamieh F, Collignon AM, Coyac BR, Lesieur J, Ribes S, Sadoine J, et al. Accelerated craniofacial bone regeneration through dense collagen gel scaffolds seeded with dental pulp stem cells. *Sci Rep*. 2016 Dec 9;6(1):38814.
 96. Wongsupa N, Nuntanaranont T, Kamolmattayakul S, Thuaksuban N. Assessment of bone regeneration of a tissue-engineered bone complex using human dental pulp stem cells/poly(ϵ -caprolactone)-biphasic calcium phosphate scaffold constructs in rabbit calvarial defects. *J Mater Sci Mater Med*. 2017 May 6;28(5):77.
 97. Annibali S, Cicconetti A, Cristalli MP, Giordano G, Trisi P, Pilloni A, et al. A Comparative Morphometric Analysis of Biodegradable Scaffolds as Carriers for Dental Pulp and Periosteal Stem Cells in a Model of Bone Regeneration. *Journal of Craniofacial Surgery*. 2013 May;24(3):866–71.
 98. Liu Y, Wang L, Kikuri T, Akiyama K, Chen C, Xu X, et al. Mesenchymal stem cell–based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN- γ and TNF- α . *Nat Med*. 2011 Dec 20;17(12):1594–601.

99. Strube P, Mehta M, Baerenwaldt A, Trippens J, Wilson CJ, Ode A, et al. Sex-specific compromised bone healing in female rats might be associated with a decrease in mesenchymal stem cell quantity. *Bone*. 2009 Dec;45(6):1065–72.
100. E L ling, Xu W huan, Feng L, Liu Y, Cai D qing, Wen N, et al. Estrogen enhances the bone regeneration potential of periodontal ligament stem cells derived from osteoporotic rats and seeded on nano-hydroxyapatite/collagen/poly(L-lactide). *Int J Mol Med*. 2016 Jun;37(6):1475–86.
101. Plevkova J, Brozmanova M, Harsanyiova J, Sterusky M, Honetschlager J, Buday T. Various Aspects of Sex and Gender Bias in Biomedical Research. *Physiol Res*. 2021 Jan 22;S367–78.
102. Beery AK, Zucker I. Sex bias in neuroscience and biomedical research. Vol. 35, *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2011. p. 565–72.

11. PRIEDAI

1 priedas. Lietuvos Respublikos Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos Etikos komisijos išduotas leidimas atlikti bandymus su gyvūnais.

VALSTYBINĖ MAISTO IR VETERINARIJOS TARNYBA

LEIDIMAS ATLIKTI BANDYMO SU GYVŪNAIS PROCEDŪRŲ PROJEKTĄ

2016-03-4^l Nr. G2-40
Vilnius

Vilniaus universiteto Paštinė
GAUTA

2016-03-23

Nr. GA-1030

Vadovaujantis Lietuvos Respublikos gyvūnų gerovės ir apsaugos įstatymo 16 straipsnio 4 dalimi, Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimais, patvirtintais Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos direktoriaus 2012 m. spalio 31 d. įsakymu Nr. B1-866 „Dėl Mokslo ir mokymo tikslais naudojamų gyvūnų laikymo, priežiūros ir naudojimo reikalavimų patvirtinimo“, Europos konvencija dėl eksperimentiniais ir kitais mokslo tikslais naudojamų stuburinių gyvūnų apsaugos (OL 2004 m. specialusis leidimas, 15 skyrius, 4 tomas, p. 325) ir remiantis Lietuvos bandomųjų gyvūnų naudojimo etikos komisijos prie Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos 2016-03-14 išvada Nr. 2 „Dėl leidimo atlikti bandymus su gyvūnais“,

l e i d i m a

Vilniaus universiteto Biochemijos institutui,
(liko subjektai (-ų), kariniai (-oms) išduotas leidimas atlikti bandymo su gyvūnais procedūrų projektą.

Universiteto g. 3, Vilnius, 211950810,
adresas (-ai), kodas (-ai) Juridinių asmenų registre)


atlikti bandymo su gyvūnais procedūrų projektą

„Kompozitinių karkasų, skirtų kaulo regeneracijai, kūrimas, jų biosuderinamumo bei efektyvumo įvertinimas *in vitro*“,
(bandymo su gyvūnais procedūrų projekto pavadinimas, vadovas, naudogami gyvūnai)

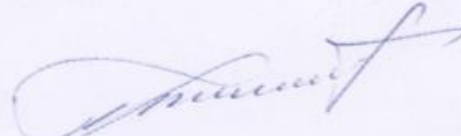
projekto vadovė Virginija Bukelskienė, naudojant 61 žiurkę, 20 triušių.

Vilniaus universiteto Biochemijos institute, Universiteto g. 3, Vilnius.
(bandymo su gyvūnais procedūrų projekto atlikimo vietos pavadinimas, adresas)

Leidimas atlikti bandymo su gyvūnais procedūrų projektą galioja iki 2018 m. gruodžio 31 d.



Direktorius pavaduotojas,
pavadojantis direktorių



Virginijus Jauga