

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«УРАЛЬСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ТРАВМАТОЛОГИИ И ОРТОПЕДИИ им. В. Д. ЧАКЛИНА»
Министерство здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи

Макарова Эмилия Борисовна

**Экспериментальное обоснование замещения дефектов
костной ткани пористыми титановыми имплантатами
с углеродсодержащими
нерезорбируемыми нанопокровтиями**

14.03.03 – патологическая физиология

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора медицинских наук

Научный консультант:
доктор медицинских наук,
профессор, академик РАН
Ю. М. Захаров

Екатеринбург
2015

ОГЛАВЛЕНИЕ

Оглавление	2
ВВЕДЕНИЕ	6
ГЛАВА 1. Анализ подходов к проблеме замещения дефектов костной ткани (обзор литературы)	14
1.1. Актуальность разработки костных имплантатов	14
1.2. Классификация современных материалов для замещения кости	16
1.3. Реакция тканей на металлические имплантаты	20
1.3.1. Локальные реакции на частицы износа и коррозии металлов	24
1.3.2. Влияние частиц износа и коррозии металлов на остеобласты и фибробласты	26
1.3.3. Влияние частицы износа и коррозии металлов на макрофаги и остеокласты	28
1.3.4. Влияние частицы износа и коррозии металлов на лимфоциты	31
1.3.5. Диагностика специфических реакций на металлические имплантаты	33
1.4. Титан и его сплавы – материалы для костных имплантатов	34
1.5. Характеристики поверхности и их влияние на остеоинтеграцию имплантатов	43
1.6. Модификация поверхности титановых имплантатов алмазоподобными пленками	45
1.7. Обоснование применения биокompозита «прилипающая фракция клеток костного мозга – пористая титановая матрица с алмазоподобной пленкой» для стимуляции остеогенеза	48
1.8. Обоснование сочетанного применения костного морфогенетического белка-2 и пористых титановых имплантатов с алмазоподобной пленкой для замещения дефектов костной ткани	52
1.9. Обоснование применения наночастиц гидроксиапатита, внедренных в поры титанового имплантата с алмазоподобной пленкой, для замещения дефекта костной ткани	56
1.10. Заключение	58
ГЛАВА 2. Материалы и методы исследования	60
2.1. Дизайн исследования	60
2.2. Характеристика и способы получения используемых имплантатов	63
2.3. Методы исследования in vitro	68
2.4. Методы исследования in vivo	71
2.4.1. Насыщение пористых имплантатов миелокариоцитами, костным морфогенетическим белком, гидроксиапатитом	71
2.4.2. Методика оперативного вмешательства	72
2.4.3. Лабораторные и инструментальные методы исследования	74

2.4.3.1.	Лучевые методы исследования	74
2.4.3.2.	Лабораторные методы исследования	75
2.5.	Статистические методы исследования	81
ГЛАВА 3. Изучение остеоинтеграции пористых титановых имплантатов и пористых титановых имплантатов, модифицированных углеродсодержащими пленками		82
3.1.	Изучение биосовместимости композита «титан-углеродсодержащие пленки» in vitro	82
3.2.	Исследования in vivo	89
3.2.1.	Регенерация краевых дефектов метафизов большеберцовых и бедренных костей, не заполненных имплантатами	89
3.2.2.	Закономерности репаративного остеогенеза при внедрении пористых имплантатов	93
3.2.3.	Особенности репаративного остеогенеза при остеоинтеграции пористых титановых имплантатов	95
3.2.4.	Особенности репаративного остеогенеза при остеоинтеграции пористых титановых имплантатов с углеродсодержащими пленками	111
3.3.	Обсуждение полученных результатов	118
3.4.	Заключение	124
ГЛАВА 4. Реакция тканей организма на формирование краевых дефектов большеберцовых и бедренных костей и внедрение в них пористых - титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами		127
4.1.	Состав периферической крови после формирования краевых дефектов большеберцовых и бедренных костей обеих тазовых конечностей у кроликов и внедрения пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами, в кости правой конечности	127
4.2.	Морфофункциональное состояние костного мозга	133
4.2.1.	Морфофункциональное состояние костного мозга кроликов после формирования краевых дефектов метафизов большеберцовых и бедренных костей	133
4.2.2.	Состав кроветворного костного мозга кроликов после внедрения в дефекты метафизов большеберцовых и бедренных костей пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами	137
4.2.3.	Колониеобразующая способность костного мозга кроликов после формирования краевых дефектов метафизов большеберцовых и бедренных костей	140
4.2.4.	Колониеобразующая способность костного мозга кроликов после внедрения в дефекты метафизов большеберцовых и бедренных костей пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами	142

4.3.	Динамика фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови после формирования краевых дефектов большеберцовых и бедренных костей обеих тазовых конечностей у кроликов и внедрения пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами, в кости правой конечности	143
4.4.	Динамика показателей минерального обмена в периферической крови после формирования краевых дефектов большеберцовых и бедренных костей обеих тазовых конечностей у кроликов и внедрения пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами, в кости правой конечности	143
4.5.	Некоторые особенности метаболизма костной и мышечной тканей после формирования краевых дефектов большеберцовых и бедренных костей обеих тазовых конечностей у кроликов и внедрения пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами, в кости правой конечности	145
4.5.1.	Метаболизм костной ткани после формирования краевых дефектов метафизов большеберцовых и бедренных костей	146
4.5.2.	Метаболизм костной ткани после внедрения в дефекты метафизов большеберцовых и бедренных костей пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами	147
4.5.3.	Метаболизм скелетной мышечной ткани при формировании краевых дефектов большеберцовых и бедренных костей у кроликов обеих конечностей и внедрения пористых титановых имплантатов в кости правой конечности	149
4.6.	Состояние регионарных лимфатических узлов после формирования краевых дефектов костей	151
4.6.1.	Состояние регионарных лимфатических узлов после формирования краевых дефектов костей	151
4.6.2.	Состояние регионарных лимфатических узлов после замещения краевых дефектов костей пористыми титановыми имплантатами	156
4.7.	Морфология селезенки после формирования краевых дефектов большеберцовых и бедренных костей тазовых конечностей у кроликов и внедрения пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами, в кости правой конечности	162
4.8.	Обсуждение полученных результатов	167
4.9.	Заключение	182
ГЛАВА 5. Повышение эффективности остеointеграции пористых титановых имплантатов		183
5.1.	Оптимизация структуры имплантатов модификацией пористости титановых имплантатов с нерезорбируемыми углеродными алмазоподобными пленками	183
5.2.	Применение клеточных технологий для оптимизации остеointеграции пористых титановых имплантатов	187

5.3. Сочетанное применение пористых титановых имплантатов и рекомбинантного костного морфогенетического белка-2 для индукции остеогенеза	192
5.4. Сочетанное применение пористых титановых имплантатов, с алмазоподобной пленкой и гидроксиапатита	198
5.5. Заключение	207
ГЛАВА 6. Математическое моделирование механических свойств бедренной кости при формировании в ней краевого дефекта и внедрения в дефект пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами	210
6.1. Физические характеристики материалов	210
6.2. Тестирование модели	212
6.3. Заключение	219
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	221
ВЫВОДЫ	238
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ	240
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	243
Приложение А	288
Приложение В	294

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Проблема замещения дефектов костных тканей костно-пластическими материалами, восполняющими утраченный объем, и поиск факторов, стимулирующих репаративные процессы, несмотря на свою долгую историю, далеки от решения и актуальны для современной реконструктивной хирургии и фундаментальных исследований в области гистологии [10, 62, 95, 13, 132, 137, 86, 142].

Количество выполненных операций по восстановлению костных дефектов, возникающих в результате замедленной консолидации переломов, травм, воспалительных процессов, после удаления новообразований и оперативных вмешательств с использованием имплантатов и костных трансплантатов, постоянно растет во всем мире [86]. Костная ткань по количеству трансплантаций отстает только от переливаний компонентов крови [36], что обусловлено ростом уровня травматизма и тяжести травм, ростом заболеваемости с поражением костно-мышечной системы и соединительной ткани, внедрением в практическую медицину новых технологий, усложнением техники и объема реконструктивно-восстановительных операций в травматологии и ортопедии [169, 86, 39, 155, 199, 30].

Результат интеграции имплантата зависит от целого комплекса характеристик – дизайна самого имплантата; материала, из которого изготовлен имплантат; характеристик его поверхности; нагрузок, действующих на имплантат, которые определяются весом пациента, его физической активностью и др.; хирургической техники; состояния ткани костного ложа [48, 47, 59, 36, 137, 86, 142]. По современным представлениям [334] для успешного замещения дефектов костной ткани необходимо взаимодействие трех компонентов – остеогенных клеток, факторов роста, трехмерной резорбируемой матрицы. Возможно предварительное насыщение трехмерной матрицы стимуляторами костеобразования или остеогенными клетками в достаточном количестве. Однако предпочтительным подходом считается использование остеоиндукторов, влияющих на собственные клетки-предшественницы, в сочетании с резорбируемыми имплантатами – трехмерными синтетическими матрицами, стимулирующими остеогенез, за счет своих химических и структурных особенностей [334]. Наиболее близки описанному идеальному имплантату – аутоотрансплантаты, но использование аутоотрансплантатов ограничивается дополнительной травмой и кровопотерей и не избавляет от развития осложнений с тяжелой степенью выраженности клинических проявлений в 8,6%, со средней и легкой степенью выраженности – в 20,6% [193]. Существующие имплантаты не отвечают всем требованиям регенеративной хирургии и пока не способны заменить аутоотрансплантаты. Исследования в данной области материаловедения активно ведутся, но

сложности пока не преодолены. Так, например, при использовании аллокости присутствует риск инфицирования реципиента, остеоиндуктивные свойства аллокости значительно изменяются в зависимости от обработки, положительный результат получают в 69%, ограничены возможности его получения; резорбирующаяся керамика на основе β -трикальцийфосфата и гидроксиапатитита обладает остеокондуктивными, но не остеоиндуктивными свойствами и т.д. [193]. В связи с этим большое распространение в практической медицине получили инертные нерезорбируемые материалы и наибольшее распространение в ортопедии и травматологии имеют имплантаты из металлов.

Распространенность титана и его сплавов в качестве материалов для изготовления костных имплантатов, пластин, элементов крепления, используемых в ортопедии и травматологии, челюстно-лицевой хирургии, стоматологии, определяется, прежде всего, высокой биосовместимостью титана [27], способностью к остеоинтеграции, отсутствием выраженной цитотоксичности по отношению к клеткам остеобластического дифферона, способностью мезенхимальных стволовых клеток адгезировать, пролиферировать и дифференцироваться на поверхности титана [120, 78, 66, 184, 38].

Однако биомеханическое несоответствие между монолитным имплантом и окружающей его костной тканью приводит к появлению напряженно деформированного состояния на границе кость-имплантат, ухудшая процесс заживления кости, снижая площадь кортикальной кости, нарушая процессы ремоделирования прилегающей костной ткани, активируя процессы резорбции, прилежащей к имплантату, кости. Применение пористых металлических матриц, имеющих меньшую жесткость по сравнению с монолитными имплантатами, позволяет приблизиться к решению данной проблемы [89, 235, 482].

В разработке способов улучшения остеоинтеграции имплантатов и продления сроков их функционирования возможны два принципиальных подхода: технические усовершенствования (применение новых и модернизация используемых средств фиксации, применение новых костно-замещающих материалов) и управление репаративными процессами костной ткани (стимуляция с применением остеоиндукторов, клеточных технологий, факторов роста, оптимизация за счет использования кондуктивных материалов) [65].

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в технологии изготовления пористых имплантатов ортопедического профиля, остается много научных и технических задач, требующих решения. Таких как определение оптимального размера пор, объема порового пространства, увеличивающаяся коррозия при применении пористого металла, прочность пористых материалов и др. Для остеоинтеграции любых имплантатов желательно, чтобы их поверхность обладала остеокондуктивными свойствами, а так же активировала процесс остеогенеза. Оригинальные исследования свойств углеродных алмазоподобных пленок

показали, что такие пленки направленно действуют на дифференцирование клеток костного мозга в остеогенном направлении и способствуют формированию внеклеточного матрикса и его минерализации [441, 564, 442, 443, 521]. Однако свойства пористых титановых матриц с углеродсодержащими нерезорбируемыми покрытиями, в качестве материала для замещения костных дефектов, до сих пор не были исследованы.

Цель – экспериментальная разработка и обоснование применения нового композитного материала «пористых титановых имплантатов, покрытых углеродсодержащими нерезорбируемыми алмазоподобными пленками», для замещения ими дефектов костной ткани без и в комбинации данных имплантатов с адгезировавшей на их поверхности прилипающей фракцией клеток аутологичного костного мозга или с рекомбинантным человеческим морфогенетическим белком-2.

Задачи исследования

1. Изучить особенности культивирования прилипающей фракции клеток костного мозга на образцах пористого титана и пористого титана с нанопленками (алмазоподобной и композитной состава углерод-азот).
2. Изучить закономерности остеогенеза при замещении дефектов костной ткани пористыми титановыми имплантатами с углеродсодержащими нерезорбируемыми пленками (алмазоподобной или композитной состава углерод-азот), насыщенных прилипающей фракцией миелокариоцитов.
3. Изучить закономерности остеогенеза при замещении дефектов костной ткани пористыми титановыми имплантатами с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой, насыщенными костным морфогенетическим белком-2, связанным с деминерализованным лиофилизированным костным матриксом и гиалуроновой кислотой.
4. Изучить закономерности остеогенеза при замещении дефектов костной ткани пористыми титановыми имплантатами с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой, насыщенными наночастицами гидроксиапатита.
5. Исследовать реакцию тканей организма: костной ткани, скелетных мышц, периферической крови, костного мозга, лимфатических узлов, селезенки на внедрение пористых титановых имплантатов с углеродсодержащими нерезорбируемыми пленками (алмазоподобной или композитной состава углерод-азот), насыщенных прилипающей фракцией миелокариоцитов.
6. Определить оптимальную объемную долю пор титановых имплантатов, насыщенных прилипающей фракцией миелокариоцитов, для достижения максимальной прочности композита «новообразованная костная ткань – пористая титановая матрица».

7. Построить компьютерную модель бедренной кости для изучения напряженно-деформированного состояния костных структур бедренной кости с внедренным пористым титановым имплантатом.

Научная новизна

Впервые *in vitro* изучены биологические свойства пористого титана, полученного методом компактирования, и композитов – «пористый титан, алмазоподобная нерезорбируемая пленка» и «пористый титан, композитная (состава углерод-азот) нерезорбируемая пленка».

На уровне мировой новизны выявлен в эксперименте *in vivo* стимулирующий эффект на остеогенез «пористого титана с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой», насыщенного прилипающей фракцией аутомиелокариоцитов. Раскрыты некоторые молекулярные механизмы регулирования репаративной регенерации, изучены морфологические закономерности репаративной регенерации в дефекте кости при заполнении его оригинальными имплантатами – «пористый титан с алмазоподобными нерезорбируемыми пленками», насыщенными миелокариоцитами. Проведен сравнительный анализ морфологических, морфометрических, гистохимических, биохимических изменений и выявлены особенности остеогенеза, определена прочность на разрыв новообразованной костной ткани в интерфейсе «костное ложе – имплантат». Произведена оценка местной реакции тканей на внедрение имплантатов после пластики дефектов костной ткани «пористым титаном с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой», «пористым титаном с композитной углеродсодержащей нерезорбируемой пленкой», «пористым титаном» (все имплантаты предварительно насыщены прилипающей фракцией миелокариоцитов). Обосновано применение «пористого титана с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой» для замещения дефектов костной ткани (Пат. 90678 РФ).

Установлены особенности течения регенераторного процесса, показано оптимизирующее влияние применения прилипающей фракции клеток аутологичного костного мозга на остеогенез при трансплантации их в дефект костной ткани на «пористом титане с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой» в качестве носителя. Обосновано применение «пористого титана с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой» в качестве скэффолда для прилипающей фракции миелокариоцитов.

Выявлены особенности течения регенераторного процесса. Показана эффективность применения «пористого титана с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой» в сочетании с рекомбинантным человеческим костным морфогенетическим белком-2 на деминерализованном костном матриксе и гиалуроновой кислоте в качестве носителя. Обосновано в эксперименте применение эффективной дозы костного морфогенетического белка-2, стимулирующей репаративный остеогенез при лечении дефектов длинных трубчатых костей.

Установлены особенности течения регенераторного процесса, выявлено торможение остеогенеза, местное легкое раздражающее действие на ранних сроках наблюдения при внедрении в дефект костной ткани «пористого титана с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой» в сочетании с наночастицами синтетического гидроксиапатита.

Проведена комплексная оценка реакций тканей организма на внедрение в дефекты кости имплантатов из «пористого титана с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой», насыщенных прилипающей фракцией миелокариоцитов аутологичного костного мозга, «пористого титана с композитной углеродсодержащей (углерод-азот) нерезорбируемой пленкой», насыщенных прилипающей фракцией миелокариоцитов аутологичного костного мозга, «пористого титана», насыщенного прилипающей фракцией миелокариоцитов аутологичного костного мозга.

Определена пористость для титановой матрицы, изготовленной методом компактирования – не более 40%, обеспечивающая достаточную прочность имплантатов в области, испытывающей значительную нагрузку (большеберцовая или бедренная кости).

Созданы компьютерные модели бедренной кости с искусственно созданным дефектом и с дефектом, заполненным пористым имплантатом. Использование таких моделей позволяет оценивать напряжения, возникающие в кости при формировании дефектов (в зависимости от размера, формы и локализации дефекта) и после замещения дефектов имплантатами. Полученные значения напряжений позволяют рассчитывать коэффициенты риска при внедрении имплантатов определенной формы и размера.

Теоретическая значимость

В исследовании *in vitro* не выявлено токсичности «пористого титана с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой» и «пористого титана с композитной углеродсодержащей нерезорбируемой пленкой». Показано, что фибробластоподобные клетки костного мозга адгезируют на поверхность данных материалов, пролиферируют на них, синтезируют экстрацеллюлярный матрикс, колонизируют внутреннее поровое пространство, формируя единую структуру, состоящую из клеток и компонентов внеклеточного матрикса, полностью покрывающую внутреннюю поверхность пор данных имплантатов.

В результате комплексного изучения *in vivo* выявлены особенности течения репаративного остеогенеза и раскрыты некоторые механизмы его регуляции при имплантации нового материала – «пористого титана с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой», и его сочетанного использования со стимуляторами остеогенеза – прилипающей фракцией миелокариоцитов и рекомбинантным костным морфогенетическим белком-2. Показано участие в регуляции репаративного процесса как локальных регуляторных факторов – костного морфогенетического белка-2, так и системных гормонов – инсулиноподобного фактора роста-I.

Практическая значимость

Обосновано применение «алмазоподобной нерезорбируемой пленки», нанесенной на костные имплантаты, для оптимизации остеогенеза в костной ране (Патенты 129795, 133406, 133407, 133717, 135251, 151211, 154335, 154362 РФ).

Показана целесообразность совместного применения «пористого титана с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой» и в качестве стимуляторов остеогенеза – прилипающей фракции клеток аутологичного костного мозга, предварительно увеличенных в количестве культивированием их в порах титановых имплантатов; костного морфогенетического белка-2 (на декальцинированном костном матриксе и гиалуроновой кислоте в качестве носителей), внедренного в поры имплантата.

Определена пористость для титановой матрицы, изготовленной методом компактирования – не более 40%, обеспечивающая достаточную прочность имплантатов в области, испытывающей значительную нагрузку (большеберцовая или бедренная кости).

Разработан способ оценки в эксперименте прочности на разрыв костного регенерата в интерфейсе «костное ложе – имплантат» (Пат. 2471248 РФ).

Разработан способ насыщения пористых титановых имплантатов прилипающей фракцией миелокариоцитов, и показана его эффективность для стимуляции репаративного остеогенеза.

Реализация результатов работы

Результаты исследования остеointegrации «пористого титана с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой» позволили предложить его в качестве нового имплантационного материала для изготовления имплантатов костной ткани.

Разработаны «Протокол клинических испытаний пористых титановых имплантатов с алмазоподобными пленками для замещения дефектов костной ткани и артродезирования суставов», «Индивидуальная регистрационная карта (ИРК) пациента», «Инструкция по применению пористых титановых имплантатов с алмазоподобными пленками».

Результаты диссертационного исследования внедрены на базе отдела травматологии-ортопедии №2 ФГБУ «Уральского научно-исследовательского института травматологии и ортопедии им. В.Д.Чаклина» МЗ РФ, травматологического отделения ГБУЗ Свердловской области «Городской больницы №1 города Нижний Тагил»; используются в лекционном курсе усовершенствования врачей травматологов-ортопедов по программе «Травматология, ортопедия и экстремальная хирургия», проводимого на базе ФГБУ «УНИИТО им. В.Д. Чаклина» МЗ РФ, в учебном процессе на кафедре нормальной физиологии ФГБОУ ВПО «Южно-Уральского государственного медицинского университета» МЗ РФ.

Положения, выносимые на защиту

1. На основании комплексного изучения, включающего морфологическое, морфометрическое, гистохимические, биомеханическое исследования закономерностей репаративной регенерации в дефекте кости при заполнении его оригинальными имплантатами – «пористый титан с алмазоподобными нерезорбируемыми пленками», насыщенными прилипающей фракцией миелокариоцитов, было доказано стимулирующее действие алмазоподобной пленки на остеогенез: ускорение остеointеграции, образование более прочной костной ткани в интерфейсе «костное ложе – имплантат», образование более зрелой костной ткани во внутреннем поровом пространстве имплантата, уменьшение дистрофических и склеротических изменений в костном ложе и новообразованной костной ткани, по сравнению с пористым титаном, насыщенным миелокариоцитами, но не покрытым алмазоподобными нерезорбируемыми пленками.
2. Внедрение «пористого титана с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой» минимизирует реакцию тканей организма (регионарных лимфатических узлов, селезенки, костного мозга, периферической крови) на имплантацию по сравнению с пористым титаном.
3. Сочетанное применение «пористого титана с алмазоподобными нерезорбируемыми пленками» со стимуляторами остеогенеза – прилипающей фракцией миелокариоцитов аутологичного костного мозга или рекомбинантным человеческим костным морфогенетическим белком-2, оптимизирует процессы остеогенеза на ранних сроках наблюдения.

Апробация работы и публикации

Основные положения и результаты исследования доложены и обсуждены на 8th international conference on modification of materials with particle beams and plasma flows (Tomsk, 2006); 3 юбилейной Урало-Сибирской научно-промышленной выставке «Научно-промышленная политика и перспективы развития Урала и Сибири» (Екатеринбург, 2007); New Diamond and Nano Carbons: International Conference (Osaka, Japan, 2007); Нано-2009: Третьей Всероссийской конференции по наноматериалам (Екатеринбург, 2009); 9-ой Международной конференции «Пленки и Покрытия» (Санкт-Петербург, 2009); Научной сессии Института физики металлов УрО РАН по итогам 2008 года (Екатеринбург, 2009); на научно-практической конференции «Лабораторная медицина в свете Концепции развития здравоохранения России до 2020 года» (Москва, 2009), XIV Российском национальном конгрессе: Человек и его здоровье (Санкт-Петербург, 2009), 10th International Conference on Modification of Materials with Particle Beams and Plasma Flows: Proceedings (Tomsk, 2010); в Материалах научно-практической конференции с международным участием «Илизаровские чтения», посвященной 90-летию со дня рождения акад. Г.А. Илизарова, 60-летию метода Илизарова, 40-летию РНЦ «ВТО»

(Курган, 2011); V Троицкой конференции «Медицинская физика и инновации в медицине» (ТКФМ-5) (Троицк Московской области, 2012); Всероссийской науч.-прак. конф. «Технологии оптимизации процесса регенерации в травматологии, ортопедии и нейрохирургии» (Саратов, 2013); на «Иммунологических чтениях в г. Челябинске» (Челябинск, 2014); Чаклинских чтениях (Екатеринбург 2012, 2015), на IV межрегиональной научно-практической конференции «Клеточные технологии практическому здравоохранению» (Екатеринбург, 2015).

По теме диссертации опубликовано 68 печатных работ, из них 11 в изданиях, рекомендованных ВАК, 5 в рецензируемых зарубежных журналах, 2 монографии, получено 10 патентов на изобретения РФ.

За разработку «Имплантат из пористого материала на основе титана с покрытием» присуждена серебряная медаль на 40-й Международной выставке изобретений «Inventions Geneva» (2012).

Диссертация выполнена по плану научно-исследовательских работ ФГБУ «УНИИТО им. В.Д. Чаклина» Минздрава России, номер государственной регистрации 01201154522.

Исследования были поддержаны проектами: проект РФФИ №08-03-99080 «Разработка технологии изготовления эффективных биоимплантатов на основе пористого титана с наночастицами гидроксиапатита и нанокompозитными CNx покрытиями для восстановительной хирургии (2008-2009 гг.). Соглашение НТ-8 по проекту «Нанокompозитные покрытия на основе алмазоподобного углерода для повышения эффективности титановых биоимплантатов», в соответствии с Постановлением Правительства Свердловской области от 30.11.2007 № 1187-ПП (2008-2009 гг.). Проект по программе Президиума УрО РАН «Фундаментальные науки - медицине» №12-П-2-1012 «Разработка технологии и создание имплантатов на основе пористых металлических матриц модифицированных пленками алмазоподобного углерода, моделирование процессов заселения имплантатов биоструктурами и экспериментальное обоснование их применения в медицине» (2012-2014 гг.). Проект РФФИ № 13-02-96031 «Научное прогнозирование прочностных свойств композита пористая металлическая матрица - костная ткань на основе кинетики его формирования при остеоинтеграции» (2013-2014 гг.).

Объем и структура работы

Диссертация изложена на 323 страницах машинописного текста и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, 4 глав собственных результатов, заключения, выводов, списка литературы, приложений А, Б. Работа проиллюстрирована 72 рисунками (микрофотографиями, электронными микрофотографиями), 40 таблицами. Библиографический указатель включает 569 источников литературы, из них 200 отечественных, 369 зарубежных.

ГЛАВА 1

АНАЛИЗ ПОДХОДОВ К ПРОБЛЕМЕ ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ

Обзор литературы

1.1. Актуальность разработки костных имплантатов

Динамика уровня травматизма в Российской Федерации, а также заболеваемость с поражением костно-мышечной системы и соединительной ткани на 1000 человек населения показывает устойчивую тенденцию к увеличению в период с 1990 по 2013 годы (таблица 1.1) [169, 39, 199, 155, 30]. В структуре первичной заболеваемости населения Российской Федерации в 2013 году травмы, отравления и другие последствия воздействия внешних причин, занимали 2-е место (11,6%) вслед за болезнями органов дыхания (42,3%), а болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани – 8-е место (4,0%).

В Европейском регионе по данным ВОЗ непреднамеренный травматизм обуславливает до 14-16% всех утраченных лет здоровой жизни (DALYs) и имеет устойчивую тенденцию роста [102, 197].

Таблица 1.1 – Динамика травматизма населения Российской Федерации и заболеваемость с поражением костно-мышечной системы и соединительной ткани в 1990-2013 гг. (на 1000 населения)
(зарегистрировано пациентов с диагнозом, установленным впервые в жизни) *

Анализируемый год	Травмы, отравления и некоторые другие последствия воздействия внешних причин	Болезни костно-мышечной системы и соединительной ткани
1990	85,2	24,8
2000	86,2	30,6
2005	90,2	33,3
2010	91,7	33,5
2013	92,6	32,3

* по данным Статистического сборника Беларусь и Россия. 2009, РСЖ, 2014

В Российской Федерации доля лиц пожилого и старческого возраста (соответственно 60-75 и 75-85 лет) увеличивается и близка к данному показателю в США и Западной Европе и превышает 20% численности населения страны, что составляет ~ 30 млн. человек [192]. С увеличением возраста структура заболеваемости меняется: состояние здоровья таких пациентов характеризуется накоплением патологии на фоне повышения частоты инволюционных процессов, таких как остеопороз. В связи с этим проблема травматизма среди пожилых пациентов приобретает большую значимость. Из ~15 млн. человек, ежегодно получающих травмы в России, 70% – это пожилые люди [197]. Экспертами ВОЗ было доказано, что треть людей старше 65-и лет и половина – старше 80-и лет, не менее чем один раз

в году переносят падение. В 30% это приводит к травмам (переломам костей, вывихам и др.) [57]. Для пострадавших пожилых пациентов, характерна более длительная госпитализация и более высокая летальность [57, 197].

По данным медико-статистических исследований в Российской Федерации, как и во всем мире, происходит изменение характера и увеличение тяжести травм [61]. Поли- и высокоэнергетические травмы, открытые переломы зачастую сопровождаются асептическим некрозом костной ткани, нарушением регионарного кровоснабжения и микроциркуляции, что значительно ухудшает исходы лечения даже при использовании самых передовых методов и приводит к значительной частоте посттравматических осложнений [134]. При этом отмечается тенденция роста инвалидизации. В результате в структуре причин первичной инвалидности лиц среднего и молодого возраста в Российской Федерации костные дефекты, ложные суставы и неправильно сросшиеся переломы занимают 3-е место [20]. Так, темп прироста первичной инвалидности с повреждениями опорно-двигательного аппарата за период 2004-2006 годы составил 23% [134].

К основным причинам развития инвалидности относятся заболевания, вызванные нарушением регенерации костной ткани (выявляются в 65,4%), гнойно-септическими осложнениями (выявляются в 13,7%) и посттравматические дегенеративно-дистрофические поражения крупных суставов нижних конечностей – 20,9% [134].

Постоянно растет во всем мире количество выполненных операций по восстановлению костных дефектов, возникающих в результате замедленной консолидации переломов, травм, воспалительных процессов, после удаления новообразований и оперативных вмешательств с использованием имплантатов и костных трансплантатов. Количество трансплантаций костной ткани отстает только от переливаний препаратов крови [36]. Только в Европе ежегодно осуществляется около 400 000 операций по восстановлению костных дефектов, в США – более 600 000 в год [334], в мире ежегодно осуществляется ~ 2,2 миллиона ортопедических операций с применением аутотрансплантатов или аллотрансплантатов [384, 305, 349, 262]. По данным компании «Orthoworld» мировые продажи имплантатов в 2012 году превысили 43,1 млрд. долларов, что больше на 15 млрд. долларов показателя 2002 года. [197].

Ожидается, что продажа имплантатов в 2015 году в Российской Федерации будет осуществлена на сумму ~ 6,5 млрд. рублей [136].

Таким образом, проблема замещения дефектов костных тканей костно-пластическими материалами, восполняющими утраченный объем кости, и поиска факторов, инициирующих репаративные процессы, несмотря на свою долгую историю, далека от решения и актуальна для современной реконструктивной хирургии и фундаментальных исследований в области морфологии [59, 64, 13, 105].

1.2. Классификация современных материалов для замещения кости

Основные ортопедические имплантаты, используемые в настоящее время, – это протезы для замены суставов, устройства для стабилизации переломов и имплантаты или трансплантаты для замещения дефектов костной ткани.

Материал для изготовления костных имплантатов должен быть биосовместимым, не иммуногенным, не канцерогенным, иметь приемлемую механическую прочность, износостойкость, циклоустойкость, пластичность, сопротивление усталости, быть стерилизуемым и доступным в необходимом количестве. Имплантаты и трансплантаты должны не только замещать объем дефекта кости, утраченной в результате травмы или патологического процесса, но и брать на себя ее опорную и структурообразующую функцию, интегрироваться с костным ложем, активно участвовать в регуляции репаративного остеогенеза, то есть создавать оптимальные условия для протекания процессов репарации, а также стимулировать репаративный остеогенез и реваскуляризацию зоны дефекта [143, 95, 239, 349].

Остеопластические материалы классифицируют по источнику на натуральные – имеющие биологическое происхождение (кость и продукты размножения остеогенных клеток), и аллопластические, включающие синтетические, полусинтетические и композиционные материалы.

По видовой принадлежности материалы, имеющие биологическое происхождение, разделяются на аутогенные, аллогенные, ксеногенные. Материал называется аутогенным, если его донором являлся сам пациент, аллогенным и ксеногенным, если донорами были другой индивидуум данного вида или другого вида соответственно.

Костные трансплантаты по структуре костной ткани могут быть кортикальными, губчатыми или кортикально-губчатыми, последние являются предпочтительными для реконструктивной хирургии, поскольку кортикальная часть имплантата обеспечивает прочность, а губчатая создает благоприятные условия для васкуляризации и остеогенеза [35,36].

По способу подготовки трансплантаты могут быть необработанными, замороженными, лиофилизированными, деминерализованными, облученными [301].

Отдельную группу представляют васкуляризованные трансплантаты. В 1975 была выполнена первая пересадка васкуляризованного аллотрансплантата [445]. В последующем метод васкуляризованных костно-мышечных лоскутов и реваскуляризации костных аутоотрансплантатов с созданием сосудистых анастомозов начали активно применять в онкологии и ортопедии [552, 413, 269, 324, 206]. При использовании васкуляризованных костно-мышечных аутоотрансплантатов (на кожной, сухожильной или мышечной ножке) и реваскуляризованных костных аутоотрансплантатов сократилось количество переломов трансплантатов, не сращений между трансплантатами и костным ложем, рассасываний

донорской кости и ее инфицирования [104, 269]. Однако в США в 1984 году появилось первое, а в 1985 году – второе сообщение о передаче HIV-1, позже – о передаче HVC с аллотрансплантами костей. После чего была разработана программа, целью которой было исследование в области пересадки тканей, разработка способов подготовки аллотрансплантатов, обеспечивающих безопасность при использовании аллотрансплантатов и предотвращение передачи инфекций [430].

Синтетические материалы получают химическим синтезом, поэтому они имеют относительно стандартные свойства и чистоту. Неорганическим синтезом получают материалы чаще всего имеющие в составе кальций и фосфор. Среди них медленно деградируемые материалы – гранулированный гидроксиапатит, биостекла, биоситалл. Данные препараты *in vivo* не подвергаются растворению и остеокластической резорбции на протяжении 3-5 лет. Быстродеградируемые материалы – трикальцийфосфат. Органическим синтезом получают полимеры и сополимеры. Полимеры резорбируемые, например, D, L-полилактид, полигликолевая кислота [119], являясь хорошими носителями для линии мезенхимальных клеток, деградируют в организме с большой скоростью; нерезорбируемые – например, полиметилметакрилат, полиамид, их физико-механические свойства близки к свойствам костной ткани. Однако адгезия мезенхимальных клеток на их поверхность происходит хуже, чем на поверхность титана. Вещества данной группы подвержены физико-химическому «старению», при этом иногда образуются токсические вещества [35, 36]. Соплимеры, например, этиленгликоля, имеют уникальную микроструктуру сходную с коллагеновыми фибриллами, но быстро резорбируются в организме в связи, с чем применение их крайне ограничено [184].

Полусинтетические материалы получают методом химической, термической, физической обработки натуральных материалов, включая минералы и кораллы.

Композиционные материалы состоят из нескольких компонентов органической матрицы (например, коллагена, желатина, фибринового клея, гиалуроновой кислоты, достоинства – сродство к данным материалам остеогенных клеток, недостаток – механическая нестойкость) или неорганической матрицы (например, пористый металл, гидроксиапатит) и дополнительных компонентов – органических (например, сульфатированные гликозаминогликаны, гиалуроновая кислота, аминокислоты, факторы роста) или неорганических (например, гидроксиапатит) [32, 172, 132, 76].

По способности влиять на регенерацию костной ткани в 1988 году Edward S.Cohen разделил материалы на остеокондуктивные, остеоиндуктивные, остеонейтральные и материалы для направленной тканевой регенерации [35, 36].

Остеокондуктивные материалы являются пассивным матриксом для образующейся de novo кости [268]. Эффект от внедрения таких материалов обозначают как пассивная стимуляция [65, 359]. Эта группа включает в себя материалы, как естественного, так и искусственного происхождения. По характеру ответа тканей на их внедрение такие материалы разделяют на биотолерантные, биоинертные и биоактивные [444, 268]. Для биотолерантных материалов (полиметилметакрилат, нержавеющие стали, Co-Cr-Mo сплавы) характерно существование дистанционного остеогенеза: физиологический ответ организма в виде образования фиброзной капсулы, которая изолирует данные материалы от контакта с живыми тканями. Биоинертные материалы (керамики: V_2O_5 , ZrO_2 , Al_2O_3 ; Ta, Ti) обычно не вызывают образование фиброзного слоя толщиной более 50 мкм и выраженных реакций со стороны костной и лимфоидных тканей [505, 316]. Биоактивные материалы (кальций фосфатные соединения, сульфат кальция, биостекло) образуют химическую связь с окружающей тканью [331, 330].

Остеоиндуктивные материалы – матрицы, содержащие вещества, способные активировать остеогенез. В настоящее время выделяют несколько механизмов стимуляции репаративной регенерации кости – трансплантация детерминированных остеогенных клеток-предшественниц (остеобластический остеогенез); остеоиндукция – воздействие специфическими индукторами, такими как костные морфогенетические белки (КМБ) -2, -4, -6, -7, способными инициировать дифференцировку плюрипотентных стволовых соединительнотканых клеток в остеогенном направлении; и, наконец, стимулированный остеогенез – воздействие веществами, увеличивающими новообразование костной ткани (такими как трансформирующий фактор роста- β (TGF- β), инсулиноподобный фактор роста (IGF) -I, -II, фактор роста фибробластов (FGF) - α , - β , фактор роста тромбоцитов (PDGF) и др.) [82, 65, 529, 434, 530, 528, 357, 358, 555, 315].

Остеонейтральные материалы – это инертные материалы, которые используются только для заполнения пространства и характеризуются как нетоксичные биологически совместимые «чужеродные тела в толще тканей» (цельные металлические имплантаты и фиксаторы, изделия из биоситалла, непористого гидроксиапатита), вокруг которых образуется соединительно-волокнистая ткань различной толщины [330].

Направленная тканевая регенерация — метод, примененный в 1983 году, основан на установке резорбируемых или нерезорбируемых мембран между мягкими и твердыми тканями в качестве физического барьера способного предотвратить быстрое

заращение мягкими тканями костного дефекта и негативное влияние этого на формирование костной ткани [11, 243, 227, 393].

По степени диссоциации и способности к резорбции фагоцитами все материалы делятся на резорбируемые, которые деградируют в организме хозяина, и не резорбируемые. Выделяют материалы с высокой и низкой степенью резорбции. Материалы и имплантаты из титана и циркония в наименьшей степени подвержены диссоциации в биологических средах и резорбции остеокластами [131].

Биорезорбируемые или биodeградируемые материалы постепенно рассасываются в организме и замещаются костной тканью – это оптимальное решение проблемы замещения дефектов костной ткани. Практически все материалы биологического происхождения (коллаген, деминерализованная кость, гидроксиапатит, кораллы), а также синтетические трикальций фосфат и костный цемент подвержены как растворению и диссоциации в биологической среде, так и остеокластической резорбции. Успех их применения во многом зависит от скорости их деградации, которая в идеале должна совпадать со скоростью регенерации новой ткани. На практике регенерация кости часто не успевает за деградацией искусственного матрикса или, наоборот, скорость резорбции материала слишком низкая. Кроме того, продукты резорбции могут вызывать воспалительные реакции в организме [331].

И, наконец, все материалы, применяемые для имплантации в костную ткань, могут быть монолитными или пористыми.

Несомненно, одними из эффективных и наиболее широко используемых остеопластических материалов, проверенных многолетним применением в клинической практике, являются свободные невааскуляризованные аутоотрансплантаты. К существенным достоинствам аутоотрансплантатов относятся: абсолютная биосовместимость, отсутствие иммуногенности, быстрая ревааскуляризация, содержание аутологичных остеогенных клеток-предшественниц, формирование органотипичной костной ткани, отсутствие риска передачи инфекции и механическая стабильность [359]. К недостаткам аутоотрансплантатов относятся: гибель большей части остеогенных клеток после трансплантации [36], нецелесообразность использования больших (более 8 см) трансплантатов из-за большой вероятности их резорбции, отсутствие приживления трансплантата в реципиентном ложе при неудовлетворительном кровоснабжении последнего, рубцовые изменения прилежащих мягких тканей, вероятность резорбции аутоотрансплантата до восстановления костного дефекта [5, 76]. При использовании в челюстно-лицевой хирургии при замещении дефекта челюсти аутоотрансплантатом из гребня подвздошной кости доказана резорбция корней зубов в 2,8% случаев (анализ историй болезней 250 пациентов) [491], ограниченность объема необходимого пластического материала, нанесение дополнительной травмы пациенту при заборе аутокости. По данным B.N.Summers и

S.M.Eisenstein (1989), 25% из 290 обследованных пациентов предъявляли жалобы на хронические боли, плохо поддающиеся лечению в месте забора материала – гребне подвздошной кости, особенно если для трансплантата забирали участки подвздошной кости через всю толщину гребня [508].

По современным представлениям для успешной регенерации костной ткани необходимо взаимодействие трех компонентов – остеогенных клеток, факторов роста, трехмерной резорбируемой матрицы. Возможно предварительное насыщение трехмерной матрицы стимуляторами костеобразования или остеогенными клетками в достаточном количестве. Однако предпочтительным подходом считается использование остеоиндукторов, влияющих на собственные клетки-предшественницы в сочетании с резорбируемыми трехмерными синтетическими матрицами, стимулирующими остеогенез, за счет своих химических и структурных особенностей [334]. Наиболее близки описанному идеальному имплантату – аутоотрансплантаты. Существующие имплантаты не отвечают всем требованиям регенеративной хирургии и не способны заменить аутоотрансплантаты. Исследования в данной области материаловедения активно ведутся, но пока не преодолены сложности, большое распространение в практической медицине получили инертные нерезорбируемые материалы. Наибольшее распространение в ортопедии и травматологии имеют имплантаты из металлов.

1.3. Реакция тканей на металлические имплантаты

В 1988 году в США ~ 11 миллионов человек уже имели, по крайней мере, один имплантат. Устройства для фиксации переломов и искусственные суставы составляли из них ~ 44%. Наличие одной или более проблем, связанных с ортопедическими имплантатами, испытывали по данным В. Krecisz (2006) 5% пациентов [371]. По данным М.Yaszemski (2004), значительно большее количество пациентов указывали на существование проблем после операций, связанных с устройствами для фиксации переломов (33,2%) и связанных с искусственными суставами (31,6%) [233]. Считается, что в течение 15-20 лет после тотального эндопротезирования крупного сустава асептическое расшатывание эндопротеза практически неизбежно [486]. Особенно большую обеспокоенность вызывают долгосрочные биологические эффекты продуктов коррозии и частиц износа имплантатов у молодых пациентов, подвергающихся ортопедическим операциям с внедрением металлических имплантатов [360].

Наиболее частой причиной удаления костных имплантов по клиническим показаниям является ухудшение их физических свойств в результате коррозии металлов в биологических жидкостях, усталостное разрушение имплантата в процессе эксплуатации с образованием продуктов износа и реакции организма на продукты коррозии и износа имплантатов [501, 390,

307, 233]. Количество сообщений об осложнениях после применения металлических имплантов или их компонентов, связанных с реакциями на металлы, увеличивается [107, 378, 377, 361, 379] и намного превышает существовавшие ранее прогнозы [517].

Исследования по улучшению свойства металлических имплантатов активно ведутся. Для уменьшения образования частиц износа и коррозии предложено использование кованных, а не отлитых деталей имплантатов, использование покрытий [41], применение сплавов с высоким содержанием углерода [414], при этом ожидается, что количество металлических имплантов будет уменьшаться, уступая место керамике и полимерам [13]. Однако в настоящее время металлы, такие как нержавеющие стали, молибденовые, кобальт – хромовые сплавы, титан и его сплавы широко используют в качестве нерезорбируемых материалов для костных имплантатов [120, 78, 482, 535, 326, 486]; тантал и ниобий имеют хорошую биосовместимость с костной тканью, однако, являясь достаточно дорогими металлами, менее распространены в имплантологии [224, 486].

Ретроспективный анализ причин неудач тотального эндопротезирования коленного сустава на основании 318-ти случаев выявил, что в 64,4% имелось более одной определенной причины развития нестабильности эндопротеза крупного сустава [472]. В качестве основной причины несостоятельности имплантатов в 4,1% [370] рассматривалось асептическое расшатывание имплантатов, при первичном эндопротезировании – 10-15% [246]; в 70% случаев – при ревизионном эндопротезировании тазобедренного сустава и 44% – при ревизионном эндопротезировании коленного сустава [379]. К основным патофизиологическим механизмам асептической нестабильности относят прямое токсическое влияние металлов на остеогенные клетки, воспалительную реакцию периимплантационных тканей на частицы износа имплантатов и ионы металлов (образующиеся в результате коррозии) или иммунное воспаление с активацией метаболизма костной ткани, остеолиз в области интерфейса кость-имплантат [246, 379].

Рабочей группой по аллергическим реакциям на имплантаты при Немецком обществе травматологов и ортопедов (DGO) разработана «Консенсусная классификация патологии эндопротезов крупных суставов», позже дополненная гистопатологическими критериями аллергических реакций на имплантаты [372], которая может быть использована для характеристики реакций на металлические имплантаты. По этиологии выделено 4 типа патологии прилежащих мягких тканей при несостоятельности имплантатов (классификация приведена с небольшими дополнениями):

I тип – износ имплантата с образованием частиц износа.

По характеру морфологического субстрата выделяют два подтипа:

- в перипротезных тканях выявляют значительное количество лимфоцитов. Механизм – развитие аллергических реакций на металлы, входящие в состав имплантатов (с подтверждением положительным стандартизованным кожным тестом);
- преобладание некрозов в перипротезных тканях с образованием гранул, скоплений лимфоцитов. Механизм – прямое токсическое влияние металлов на остеогенные клетки, воспалительная реакция периимплантационных тканей на частицы износа имплантатов и ионы металлов.

II тип – инфекционный. Механизм – образование биопленок на поверхности имплантатов.

III комбинированный – представляет комбинацию I и II типов.

IV – индифферентный тип (механически/функциональный), например, неправильное позиционирование имплантата.

По характеру морфологического субстрата выделяют два подтипа:

- В перипротезных тканях преобладают лимфоциты. Отмечается развитие аллергических реакций на имплантаты с подтверждением положительным стандартизованным кожным тестом.
- В периимплантационной области преобладает фиброз с наличием 20- β -катенин положительных фибробластов в периимплантационной области.

Исследования показали, что основной корродирующей поверхностью являются поверхности головки и шейки эндопротеза. Так, увеличение угла наклона чашки ($>55^\circ$ во фронтальной плоскости) может привести к повышению концентрации в сыворотке периферической крови кобальта (в 9,8-53,6 раза) и хрома (в 9,5-30,5 раза), по-видимому, от значительного износа поверхности в интерфейсе [241]. Биомеханические факторы, такие как микроподвижность, могут играть роль в индукции асептической нестабильности имплантатов, но также косвенно увеличивают формирование дополнительных частиц изнашивания [379].

В периимплантационной костной ткани могут обнаруживаться следующие патологические изменения: остеомиелит, склероз, остеопении, некротические изменения кости.

Крайне важны механические причины – несостоятельность имплантатов, инфекционные осложнения, токсическое влияние металлов, а также изменение в геноме, вызванные продолжительным присутствием частиц износа в тканях организма. Однако настоящий обзор посвящен анализу неспецифических воспалительных и иммунологических реакций в ответ на присутствие частиц износа и коррозии, а также их эффектам на остеогенные клетки.

Продукты коррозии металлов присутствуют в тканях организма преимущественно в качестве оксидов (Cr_2O_3 , CoO , TiO_2 , Al_2O_3 и др.), гидроокисей ($\text{Cr}(\text{OH})_3$, $\text{Co}(\text{OH})_2$ и др.),

фосфатов (CrPO_4 , $\text{Co}_3(\text{PO}_4)_2$), встречаются в виде коллоидных комплексов, неорганических солей, органических соединений (например, гемосидерина), свободных ионов. Частицы износа металлов имеют свои особенности: небольшие размеры (часто менее 50 нм), многочисленность (при внедрении имплантата тазобедренного сустава с парой трения металл-металл за год образуется от $6,7 \times 10^{12}$ до $2,5 \times 10^{14}$ металлических частиц износа [360]), и, как следствие, большую общую площадь поверхности и химическую активность [527, 232, 486].

Благодаря своим малым размерам частицы износа ~10 - 150 нм могут проникать в клетки путем эндоцитоза [314], частицы >150 нм могут быть фагоцитированы макрофагами [360, 222]. Некоторые ионы металлов, способны проникать через неповрежденные мембранные каналы, так Cr(VI) легко проходит через анионные каналы. Трансмембранный транспортировщик двухвалентных металлов (divalent metal transporter - DMT-1) и белок макрофагов, ассоциированный с естественной устойчивостью (natural resistance-associated macrophage protein - NRAM), расположенный на мембранах фагосом, могут облегчить проникновение Co(II) и Ni(II) в клетки. Fe(III), Al(III), Cr(III) и V могут проникать в клетки, используя рецепторы для трансферрина [360]. Еще один путь проникновения ионов металлов в клетку – образование комплексов с белками, с последующим эндоцитозом или пиноцитозом [544]. Эти механизмы рецепторно опосредованы [486].

Частицы износа, поглощенные макрофагами, или попавшие в лимфатические и кровеносные сосуды, распространяются системно. В литературе появилось большое количество сообщений об увеличении в периферической крови у пациентов после эндопротезирования крупных суставов концентрации металлов (хрома, кобальта) [220, 360, 395, 560, 383]. Особенно интересны результаты динамичного наблюдения за пациентами с имплантатами в течение длительного времени (7-10 лет) [395, 383]. Авторами было показано незначительное увеличение концентрации хрома в периферической крови в течение 3-х лет у 44-х пациентов после тотального эндопротезирования тазобедренного сустава (трущаяся пара металл-металл). Однако у 25% пациентов концентрация хрома увеличивалась значительно и продолжала увеличиваться в течение семи лет [395]. При обследовании 75-и пациентов после первичного тотального эндопротезирования тазобедренных суставов (материалы имплантатов содержали кобальт, хром, титана) через 120 месяцев после операции в периферической крови было выявлено увеличение концентрации кобальта в 3,2 раза, по сравнению с уровнем до операции, хрома – в 3,9 раза, титана – в 18 раз [383]. Исследования, выполненные в Англии, показали, что концентрация хрома в периферической крови через 4 года после тотального эндопротезирования тазобедренного сустава (пара трения металл-металл) составляла 4,6-6,5 мг/л и была сопоставима со средними концентрациями хрома в периферической крови у сотрудников, работающих во вредных условиях – 5,98 мг/л [383].

Продукты износа металлических имплантатов обнаруживают в лимфатических узлах, печени и селезенке [527, 471, 245]. У пациентов с неудовлетворительными исходами протезирования тазобедренных и коленных суставов в парааортальных лимфатических узлах частицы износа были обнаружены в 68% случаев, в 38% частицы износа обнаружены в селезенке и печени, где они располагались преимущественно в макрофагах [527]. В обзоре [472] упоминаются 15 отдельных ссылок на исследования, в которых было зарегистрировано наличие частиц износа имплантатов в лимфатических узлах и отдаленных органах (селезенка, печень, почки, легкие).

Частицы износа и коррозии металлических имплантатов могут вызывать локальные, либо системные эффекты. В данном обзоре кратко представлены данные о локальных реакциях тканей на частицы износа и коррозии металлов.

1.3.1. Локальные реакции на частицы износа и коррозии металлов

Количество сообщений о неблагоприятных эффектах продуктов коррозии и частиц износа, связанных с использованием имплантатов значительно [396, 246, 547, 486, 312, 372, 404, 379]. Особенно это относится к протезам с трущейся парой металл-металл. Эти протезы имеют привлекательные механические характеристики, в связи с чем еще недавно широко использовались, особенно у молодых пациентов [190]. Однако в ходе наблюдений за пациентами был выявлен целый спектр изменений таких как некроз, воспаление прилежащих мягких тканей, остеолит, расшатывание компонентов протеза, вероятно обусловленных частицами износа и ионами металлов, обнаруженными в перипротезных тканях [404]. В настоящее время эндопротезы тазобедренного сустава с парой трения металл-металл из высокоуглеродистых сплавов (молибдена-хрома-кобальта) используют крайне редко [1]. Авторы отмечают, что патогенез этих изменений может быть связан, как с прямой цитотоксичностью ионов металлов, так и с развитием повышенной чувствительности к металлам имплантата.

В ретроспективном исследовании (проанализировано 14 случаев) основной причиной ревизий при асептическом расшатывании тотальном эндопротезировании тазобедренных суставов с парой трения металл-металл реактивные изменения перипротезных тканей были определены в 64,3% случаев [370]. В другом исследовании проанализированы 56 случаев, причиной нестабильности суставов в 80% названы реактивные изменения перипротезных тканей [312], в исследовании [396] (проанализированы 52 случая) реактивные изменения перипротезных тканей в 86% являлись причиной нестабильности крупных суставов.

К факторам способствующим развитию реакции относят большую площадь контакта, количество частиц износа, наличие значительной механической нагрузки [326]. Однако развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа на металлы возможно у предрасположенных пациентов при внедрении любых металлических имплантатов. Так, в литературе описано развитие реакции гиперчувствительности замедленного типа (подтвержденной выраженной реакцией в кожном тесте на Ni и Cr) при установке клипа (по поводу аневризмы сосудов головного мозга) и проволоки (для фиксации костного лоскута), изготовленных из сплава содержащего Ni и Cr. Гистологическое исследование тканей, прилежащих к клипу и проволоке, подтвердило развитие аллергической реакции IV типа. Клинически реакция на имплантаты проявлялась нестерпимым зудом [481].

Гистологические исследования, периимплантационных мягких тканей выявили признаки воспалительной реакции, имеющей некоторые особенности – наличие лимфоцитарной инфильтрации, иногда локализующейся периваскулярно, и накопление плазматических клеток [486]. Подробно характеризованные в литературе хронические неспецифические гранулемы периимплантационных тканей (по терминологии специальной англо-язычной литературы – «псевдоопухоли» или «воспалительные псевдоопухоли», металлозы, асептические лимфоцитарные васкулиты, асептические лимфоцитарно ассоциированные периваскулярные поражения (aseptic lymphocytic vasculitis-associated lesions – ALVAL) [312], неблагоприятные реакции на металлических частицы износа (adverse reaction to metal debris – ARMD) [486]) соответствуют двум морфологическим подтипам реакций перипротезных мягких тканей вышеприведенной классификации.

Первый вариант гранулематозного воспаления в периимплантационных тканях развивается в присутствии ионов металлов в тканях (таких как Co^{+2} и Cr^{+4}) [396], но с незначительным износом элементов эндопротезов [469]. Данный тип гранулем обнаруживают в 11,1% [328] при обследовании пациентов (108 человек) с тотальным эндопротезированием тазобедренного сустава (пара трения металл-металл, протезы с головкой большого диаметра – 44 мм); при анализе случаев ревизионного эндопротезирования – в 52% [396] – 69% случаев [404].

Гистологической особенностью воспаления является наличие наряду с макрофагами лимфоцитов и плазматических клеток, что характерно для продуктивного воспаления, в основе которого лежат иммунопатологические механизмы [109], преимущественно реакции гиперчувствительности замедленного типа; значительно реже (в случае, когда ионы металлов выступают в качестве гаптенов и, связываясь с белками организма, запускают аутоиммунные процессы) развивается гиперчувствительность немедленного типа [450, 496].

Фенотип лимфоцитов, выявляемых в тканях – CD3⁺, CD20⁺, плазматические клетки [396]. В зоне инфильтрации выявляют Т-хелперы (преимущественно Th1 лимфоциты, синтезирующие интерферон- γ (ИФ- γ), фактор некроза опухоли- β (ФНО- β), интерлейкин-2 (ИЛ-2) [332, 333, 319, 323, 322, 379]) и Т-цитотоксичные/супрессоры (в соотношении 7:1) [472]. Лимфоциты в перипротезных тканях при реэндопротезировании тазобедренных суставов располагаются в виде агрегатов (обнаруживаются в 37%); диффузных лимфоцитарных периваскулярных инфильтратов из Т- и В-лимфоцитов с массивной экссудацией фибрина, скоплениями макрофагов с включениями частиц износа, инфильтрацией тканей эозинофилами и очагами некроза, с реактивными изменениями эндотелия кровеносных и лимфатических сосудов (ALVAL) [267, 370, 547] (1,85% [328] – 15% [404]); диффузных лимфоцитарных инфильтратах без периваскулярной инфильтрации лимфоцитами (обнаруживаются в 17%) [404].

При высоких показателях износа элементов эндопротеза развивается второй вариант неспецифического гранулематозного воспаления, который носит особенно агрессивный характер, быстро приобретает локально деструктивные черты с образованием областей некроза мягких тканей (в 1/2 случаев) и требует немедленной замены сустава у большинства пациентов. Макроскопически выявляется большое количество металлических частиц в мягких тканях (металлоз). Локально часто повышена концентрация коллагеназ, ИЛ-1 и ФНО- α , которые опосредуют остеолиз костной ткани вокруг имплантата. Хронические неспецифические гранулемы периимплантационных тканей в этом случае образуются преимущественно клетками моноцитарно/макрофагальной системы, имеющих фенотип HLA-DR⁺/CD14⁺/CD68⁺ [396] с расположенными внутриклеточно частицами износа металла и незначительным количеством CD3⁺лимфоцитов. Такие гранулемы были выявлены в 12% [396] – 31% [404] случаев ревизионных эндопротезирований тазобедренных суставов. Реакцию организма авторы связывают с прямым токсическим эффектом ионов металлов [396].

1.3.2. Влияние частиц износа и коррозии металлов на остеобласты и фибробласты

In vitro было исследовано влияние Al³⁺, Co²⁺, Cr³⁺, Fe³⁺, Mo⁵⁺, Ni²⁺, V³⁺ на остеобласты и фибробласты. При концентрациях 0,01 мМ металлы не проявили токсических свойств. Наиболее токсичные металлы Co Ni и V снижали жизнеспособность (LC₅₀), пролиферацию (IC₅₀), а также изменяли морфологию остеобластов и фибробластов при концентрациях <1 мМ, вызывая утерю ламеллоподий, филоподий, изменение формы клеток. Остальные металлы вызывали те же патологические изменения в концентрациях более >5 мМ. Только Co и V продемонстрировали токсичность in vitro в концентрациях, которые обнаруживали в

синовиальной жидкости и тканевой жидкости перипротезных тканей (V в концентрации 0,1 мМ, Co - 0,8 мМ были токсичны для фибробластов; V в концентрации 0,4 мМ, Co – 0,8 мМ токсичны для остеобластов) [319]. Был определен рейтинг токсичности ионов металлов на линию MG-63 человеческих остеобластов (оцениваемый по LC_{50}) $Na^{+1} < Cr^{+3} < Mg^{+2} < Mo^{+5} < Al^{+3} < Ta < Co^{+2} < Ni^{+2} < Fe^{+3} < Cu^{+2} < Mn < V^{+3}$ [211, 321].

Цитостатический эффект и морфологические изменения остеоцитов под влиянием Co^{+2} и Ni^{+2} был подтвержден на другой линии клеток (MLO-Y4) [354]. Культивирование с Co^{+2} приводило преимущественно к некротическим изменениям в остеоцитах, а с Ni^{+2} к апоптозу остеоцитов. Один из вероятных механизмов токсического действия – инициация оксидативного стресса ионами Co^{2+} и Cr^{3+} в остеобластах [568] (реакцию оценивали по концентрации глутатиона, активности супероксиддисмутазы, каталазы).

При культивировании остеобластоподобных клеток (Saos-2) человека в присутствии Co^{2+} , Cr^{3+} происходила не только редукция пролиферативной и функциональной активности клеток. Также в присутствии ионов металлов остеобласты в значительных количествах синтезировали провоспалительные цитокины (ФНО- α , IL- β 1 и ИЛ-6, ИЛ-8) и факторы остеокластогенеза – лиганд рецептора активатора ядерного фактора каппа β (RANKL) и макрофагальный колониестимулирующий фактор (M-CSF) [211, 379, 568]. Возможно данный эффект определяется метаболическим состоянием остеобластов, от которого, как было доказано, зависит уровень экспрессии генов остеотропных регуляторных белков остеобластами: при низком уровне метаболической активности экспрессия гена, кодирующего RANKL увеличивается, а соотношение остеопротегерин (OPG)/RANKL снижается [375]. В остеобластах человека при контакте с Co^{2+} и Cr^{3+} снижалась экспрессия щелочной фосфатазы (ЩФ) [290], синтез коллагена I типа и остеокальцина остеобластами [486] и значительно увеличивалась экспрессия матричной металлопротеиназы-1 (MMP-1) [379], которая совместно с другими цинкзависимыми металлопротеиназами и коллагеназами разрушала слой эндоста, покрывающего минерализованную кость и экстрацеллюлярный матрикс костной ткани [336].

Снижение концентрации остеокальцина в перипротезных тканях было выявлено в исследованиях, выполненных *in vivo* у пациентов, перенесших ревизию в связи с асептическим расшатыванием эндопротеза после тотального эндопротезирования тазобедренного сустава по сравнению с пациентами, перенесших первичное эндопротезирование тазобедренного сустава [486]. Известно, что в состав остеокальцина входят три остатка карбоксилированной глутаминовой кислоты, которые связывают ионы кальция, способствуя *in vivo* накоплению последнего в костной ткани и ее последующей минерализации [65].

Таким образом, Co^{+2} , Cr^{3+} и V^{+3} с большой долей вероятности могут быть причиной снижения количества и функции остеогенных клеток в перипротезной костной ткани, в том числе синтетической (синтез коллагена I типа, остеокальцина).

Данный процесс усугубляется увеличением количества и функциональной активности остеокластов в результате действия провоспалительных цитокинов и факторов остеокластогенеза [365]. Суммарный эффект воздействия частиц и ионов металлов в периимплантационной области – снижение костеобразования остеобластами и активация деструкции (лизиса) костной ткани в результате деятельности матричных металлопротеиназ, коллагеназ и остеокластов, а при уменьшении концентрации остеокальцина – задержка минерализации костной ткани.

Клетки соединительной ткани (фибробласты) активно вовлечены в остеокластогенез посредством образования цитокинов. В ответ на контакт с частицами износа или коррозии металлов в фибробластах увеличилась экспрессия генов и секреция цитокинов. Наиболее значительно увеличилась концентрация следующих цитокинов – ФНО- α , ИЛ-1 β , -6, -8, VEGF (сосудистый эндотелиальный фактор роста), металлопротеиназы-1 (MMP-1), циклооксигеназы-1, -2 (COX-1,-2), TGF- β 1, RANKL, OPG [369, 377].

1.3.3. Влияние частицы износа и коррозии металлов на макрофаги и остеокласты

Роль остеокластов является ведущей в лакунарной резорбции костной ткани. Значимость других клеток, потенциально способных к резорбции кости (как минимум, *in vitro*) и имеющих единую клетку-предшественницу моноцитарной линии с остеокластами, но имеющих и свои функциональные и цитохимические особенности (моноциты/макрофаги, гигантские многоядерные клетки (MNGC), экспрессирующие тартрат резистентную кислую фосфатазу и витронектин, синовиальные макрофаги (двух типов: А – макрофагоподобные клетки, тип В – фибробластоподобные клетки [215]), в резорбции кости обсуждается, также как и вопрос пластичности между этими типами клеток [215, 379]. И некоторые факты, кажется, подтверждают участие макрофагов в деструкции кости (по крайней мере, при патологии). Так, при исследовании фрагментов интерфейса кости, полученных в результате ревизионного эндопротезирования, в зоне лизиса было выявлено, что остеокласты покрывают $7,7 \pm 1,8$ % поверхности кости, а макрофаги – $19,3 \pm 5,2$ % ее поверхности. При изучении областей интерфейса кости с рентгенологическими признаками остеолита значения площади, занятой макрофагами, были еще более высокими – $33,4 \pm 8,6\%$ [353, 472]. Однако большая часть исследователей склоняется к тому, что эти клетки не резорбируют костную ткань и не способны к трансдифференцированию [379].

Представленные в литературе результаты влияния частиц износа и ионов металлов на макрофаги и остеокласты достаточно противоречивы.

С одной стороны, имеются многочисленные исследования, свидетельствующие об активации макрофагов при фагоцитозе частиц износа протезов [310, 212, 254, 472]. Этот процесс сопровождается экспрессией молекул адгезии с обязательным представлением CD11b (α M β 2) [208] и происходит с участием двух каскадов: PAMPs (Toll – подобные рецепторы – патоген-ассоциированные молекулярные структуры – транскрипционный фактор NF κ -B – активация генов цитокинов – синтез процитокинов и цитокинов); DAMPs (Toll – подобные рецепторы – «эндогенные лиганды, ассоциированные с опасностью» – дестабилизация лизосом – активация NADPH – увеличение количества активных форм кислорода – формирование мультибелка (Nalp3 – Asc) – расщепление про-каспазы-1 с образованием каспазы-1 – образование из проИЛ-1 – ИЛ-1, из проИЛ-18 – ИЛ-18 и др.) [379]. В результате происходит синтез большого числа преимущественно провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 β , -6, -8, -11, -18, -33, ФНО- α , TGF- β) [254, 379], исключение – ИЛ-10, простагландинов (PGE₂, PGF₂), гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), металлопротеиназ и коллагеназ [310], индуцирующей оксид азота синтазы [418], которые влияют на остеокластогенез, дифференцировку остеокластов и их активность непосредственно, или опосредованно индуцируют экспрессию клетками-мишенями (клетками мезенхимальной линии, активированными Т-лимфоцитами и др.) RANKL [366, 216, 335, 472, 234].

Центральную роль в привлечении и активации эффекторов врожденного иммунитета отводят хемокинам (ИЛ-8, моноцитарный хемотаксический протеин-1 (MCP-1) макрофагальный воспалительный белок 1 (CCL-2) (MIP-1), и MIP-1 α (CCL3), «тимусом и активацией регулируемому хемокину» CCL17/TARC и человеческому макрофагальному хемокину (CCL22/MDC)), экспрессируемым макрофагами, фибробластами, остеобластами после воздействия частиц износа (таких как, CoCr), как в перипротезных тканях, так и в культурах тканей. Блокирование CCR4 рецепторов на клетках-предшественниках остеокластов приводит к снижению количества остеокластов в интерфейсе кость-имплантат и уменьшению остеолита [379].

RANKL и провоспалительные цитокины способны запустить два независимых сигнальных пути, активирующих процесс образования, дифференциации, выживания и функциональной активности остеокластов. Для осуществления ранней стадии остеокластогенеза необходим дополнительный сигнал в виде M-CSF [149]. Первый (критический) путь осуществляется посредством взаимодействия рецептора RANK на поверхности клеток-предшественниц остеокластов или на остеокластах с его лигандом –

RANKL [435]. Мыши, нокаутированные по гену, кодирующему RANKL, защищены от разрушения кости даже при наличии воспаления [512, 513]. В результате взаимодействия RANK-RANKL возможен запуск двух каскадов реакций с участием белков адаптеров: адаптерный белок, связанный с рецептором ФНО (TRAF-6) – митоген-активируемые протеинкиназы (МАРК) – транскрипция генов *c-fos* и *c-jun*, контролирующих пролиферацию и дифференцировку клеток. По мнению Ikeda et al. (2004) RANKL-индуцированный остеокластогенез осуществляется в основном через активацию *c-jun* сигнального пути [345]. Второй каскад: TRAF2 – ИКК (ингибитор киназного комплекса каппа- β) – фосфорилирование и отсоединение киназного комплекса от транскрипционного фактора NF κ - β – транслокация NF κ - β из цитоплазмы в ядро – увеличение экспрессии протеина NFATc1- триггера, запускающего транскрипцию генов *c-fos* и *c-jun* [79].

Помимо пролиферации и дифференциации клеток-предшественниц RANKL контролирует выживание остеокластов [486] и регулирует уровень в клетках катепсина К (фермента, непосредственно осуществляющего деструкцию костной ткани [258]). Параллельно RANKL индуцирует экспрессию гена ИФ- β в клетках-предшественниках остеокластов. Под действием ИФ- β происходит торможение фактора *c-fos* и задерживается дифференцировка предшественниц остеокластов [79]. Вероятно, данный механизм существует для ограничения деструктивных процессов, инициируемых RANKL.

Участие RANKL в активации остеокластогенеза при развитии реакции на частицы износа металлических имплантатов подтверждается следующим экспериментом: культивирование кроветворных-клеток предшественниц с частицами Со и Сг стимулировало остеокластогенез *in vitro*, а добавление анти-RANKL антител к культуре клеток нивелировало эффект частиц металла [394].

Считается, что провоспалительные цитокины – ФНО- α , ИЛ-6, ИЛ-11, TGF- β – могут индуцировать остеокластогенез непосредственно [486].

С другой стороны имеются указания на токсичность для зрелых остеокластов частиц Со и Сг индукции апоптоза частицами Ti и CoCr [394]. Причем концентрации, вызывающие токсический эффект *in vitro*, клинически значимы, поскольку эквивалентны концентрациям Со, которые были обнаружены в синовиальной жидкости при тотальном эндопротезировании тазобедренного сустава имплантатов с парой трения металл-металл. Полученные *in vitro* результаты находят подтверждение и в исследованиях, выполненных *in vivo*. У пациентов с асептической нестабильностью тазобедренных суставов в периимплантационных тканях была доказана активация ферментов, ассоциированных с апоптозом макрофагов, гигантских многоядерных клеток, Т-лимфоцитов – каспазы-3 [378, 377].

Представлено несколько вероятных механизмов токсического влияния металлов на фагоцитирующие клетки, к которым принадлежат макрофаги и остеокласты, последние сохранили способность к фагоцитозу, хотя и очень редуцированную. Поглощенные фагоцитами частицы металлов подвергаются атаке со стороны ферментных систем клетки с целью деградации инородного тела с последующим его выведением из организма. Однако в случае фагоцитоза металлических частиц (Cr, Ni, Co, Ti и др.) под действием перекиси водорода, гидроксильных радикалов, супероксиданиона, $\text{HClO}^\cdot$ в клетках образуются ионы металлов и свободные радикалы (в основном активные формы кислорода), которые могут повреждать хромосомы, белки и липиды [486].

Генотоксичные эффекты частиц износа металлов, опосредованы либо прямым действием – атаками образованных свободных радикалов, вызывающими разрыв ДНК, или косвенным действием – ингибированием ДНК-полимеразы, что в свою очередь уменьшает точность репликации ДНК, нарушая синтез и функцию последней [265].

В клетке Me^{+x} может связываться с определенными участками РНК, ДНК, белков. Химически модифицируя РНК и ядерные белки, которые регулируют репликацию ДНК, могут вызвать экспрессию обычно подавляемых частей генома [459, 544].

Блокирование на уровне мРНК и нарушение синтеза ферментов приводят к нарушению метаболизма и образованию канцерогенов [544].

Таким образом, одной из сложнейших проблем для ортопедов является развитие перимплантационного асептического остеолизиса, обусловленного нарушением баланса остеогенеза и резорбции кости. Под влиянием частиц износа и коррозии металлов может произойти как уменьшение образования остеобластов и их функции, так и увеличение резорбции костной ткани остеокластами, активированными макрофагами, а также может произойти разрушение внеклеточного матрикса металлопротеиназами. В результате развивается остеолизис, который проявляется диффузным истончением кортикальной пластинки или очаговыми изменениями [79, 486, 379]. В связи с пониманием механизмов развития остеолизиса в перипротезной области введено понятие «индивидуальной чувствительности» к перипротезному остеолизису [431].

1.3.4. Влияние частицы износа и коррозии металлов на лимфоциты

Гистологической особенностью асептических перимплантационных инфильтратов является присутствие лимфоцитов в количестве 4-23% [472]. Однако смешанный характер (лимфоцитарно-макрофагальный) инфильтрата и сложности диагностики специфических аллергий на металлы, вероятно, часто приводят к недооценке роли реакции адаптивной иммунной системы на металлы. Предположения о существовании аллергии на металлы

высказывали еще в 70-е годы прошлого века. В 1975 году с использованием патч-теста были обследованы 50 пациентов с эндопротезами тазобедренного сустава с парой трения металл-металл. 19 из них были чувствительны к одному или более из протестированных металлов – Cr, Co, Ni, Mo, V и Ti. К металлам в патч-тесте из 23 пациентов с нестабильностью эндопротеза были чувствительны 15 пациентов. Авторами был сделан вывод, что имплантаты с парой трения металл-металл могут вызвать аллергию [278]. Позже развитие гиперчувствительности замедленного типа к металлам была подтверждена в многочисленных исследованиях [452, 313, 377, 472, 297]. Было показано, что уже через 1 год после эндопротезирования крупного сустава количество пациентов с гиперчувствительностью замедленного типа на металлы увеличивается на 6,5% [297]. При этом «продолжительность жизни» эндопротезов крупных суставов при развитии гиперчувствительности замедленного типа или наличии анамнестических указаний на контактные дерматиты на металлы снижается в 1,5 раза [313].

При индукции иммунного ответа ионы и наночастицы металлов выступают в качестве гаптенов. После взаимодействия с белками организма они приобретают свойства антигенов. Оказалось, что наночастицы (например, TiO_2) также образуют с альбуминами крови стабильные металлоорганические комплексы, обладающие свойствами антигенов [535].

Обследование пациентов с первичным тотальным эндопротезированием тазобедренного сустава выявило значительно повышенную пролиферативную активность Th1 лимфоцитов периферической крови в ответ на контакт с ионами металлов или комплексы металлы-белки сыворотки крови. У 7-и из 15-и обследованных был выявлен пролиферативный ответ лимфоцитов на контакт с ионами Cr^{+3} , Ni^{+2} , Co^{+2} , Ti^{+3} и повышенная экспрессия активационных молекул на их цитоплазматической мембране. Интенсивность ответа на ионы хрома была на порядок выше, чем на ионы титана. По мнению авторов, полученные результаты свидетельствуют о развитии специфического иммунного ответа на частицы износа имплантатов [337, 340, 340]. При контакте с частицами износа T- и B-лимфоцитов пациентов, имеющих в анамнезе реакцию на металлы, в 100% было отмечено увеличение пролиферации и активация лимфоцитов (выявляемой по экспрессии CD25+, CD69+ на Ni^{+2} [322].

Позже в перипротезных тканях было показано увеличение экспрессии мРНК цитокинов, синтезируемых Th1-лимфоцитами – ИФ- γ , ФНО- α и рецептора к ИЛ-2. In vitro Th1, сенсibilизированные металлами, синтезируют ИЛ-3, GM-CSF, ФНО, фактор запрещающий миграцию – MIF. Результат действия этих цитокинов in vivo – увеличение продукции лейкоцитов крови, задержка мигрировавших в очаг, клеток в области, инфильтрированной лимфоцитами. Мигрировавшие макрофаги активируются и дополнительно мобилизуют лимфоциты; процесс приобретает характер замкнутого круга, в котором интенсивность воспалительного процесса нарастает [267, 323].

Между Т-лимфоцитами и остеобластами легко возникает и, вероятно, существует в физиологических условиях взаимодействие. Об этом свидетельствует экспрессия лигандов (CD54/ICAM-1, CD166/ALCAM, МНС-II и др.) на трех линиях человеческих остеобластов для взаимодействия с человеческими лимфоцитами, часто выраженные конституционально, а также способность остеобластов представлять суперантиген лимфоцитам. Т-лимфоциты при сокультивировании способны стимулировать человеческие остеобласты (NHOb, hFOB1) и клетки остеосаркомы (SaOS-2) к продукции интерлейкина-6. Преактивация ИЛ-17, концентрация которого повышена при несостоятельности эндопротезов [416], значительно увеличивала эффект лимфоцитов на остеобласты [502]. Т-лимфоциты, активированные комбинацией цитокинов, не только экспрессируют RANKL значительно увеличивая остеокластогенез в культуре CD14⁺ предшественников, но и уменьшают экспрессию ИФ- γ , критического ингибитора остеокластогенеза [435].

В настоящее время известно, что в физиологических условиях основными продуцентами RANKL являются клетки линии остеобластов. Однако было доказано, что активированные Т-лимфоциты (преимущественно CD4⁺лимфоциты) и В-лимфоциты критически вовлечены в регулирование потери костной ткани *in vivo* при пародонтозе, ювенильном ревматоидном артрите, постовариэктомическом и постменопаузальном остеопорозе, экспрессируя RANKL [149, 513, 514]. На модели ревматоидного артрита была доказана роль субпопуляции лимфоцитов, синтезирующих ИЛ-17, в развитии аутоиммунного воспаления. ИЛ-17 является мощным индуктором образования провоспалительных цитокинов (ФНО, ИЛ-1, -6, -8) стромальными, эпителиальными, эндотелиальными клетками [149].

Итак, активированные Т-лимфоциты контролируют оба пути образования остеокластов (через RANKL и провоспалительные цитокины), а через экспрессию ИФ- γ способны критически ингибировать остеокластогенез.

Таким образом, металлические частицы износа и коррозии металлов могут вызывать серьезные неблагоприятные эффекты в перимплантационной области, индуцируя неспецифическое воспаление, специфические аллергические реакции на металлы.

1.3.5. Диагностика специфических реакций на металлические имплантаты

Диагностика специфической гиперчувствительности замедленного типа (IV) к металлам, чаще всего имеющая место в перимплантационной области, затруднена из-за отсутствия специфических клинических симптомов и разработанных протоколов исследования.

Клинические признаки реакции на металлы, в том числе аллергического характера, включают следующие проявления в области, расположенной над имплантатами — это

дерматиты, проявляющиеся широким диапазоном кожных реакций: отек, эритема, экзематозные рецидивирующие высыпания, зуд, иногда выраженный; симптомы крапивницы – волдыри, наполненные серозным содержимым; фистулы (с серозным стерильным отделяемым); васкулиты. Могут присутствовать и общие симптомы, такие как головная боль, астения, артралгия, миалгия [166, 320, 371, 391]. Поскольку все перечисленные симптомы неспецифичны, такие пациенты чаще всего обращаются и лечатся у дерматологов. По признанию большинства исследователей, пока только исключение всех других причин, наличие анамнестических данных о чувствительности к металлам и наличие асептического расшатывания имплантата (особенно, рецидивирующее или затрагивающее несколько имплантатов) могут вызвать подозрение на развитие реакции (специфической или неспецифической) на материал имплантата.

В настоящее время не разработано четких протоколов лабораторного исследования для выявления аллергических реакций на частицы износа или ионы коррозии имплантатов. Для подтверждения гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) на металлы чаще всего используют кожные аппликационные (патч) тесты. В некоторых исследованиях для этих целей применяли реакции бласттрансформации лимфоцитов периферической крови [535, 379], агрегации тромбоцитов, торможения миграции лимфоцитов на соли металлов [166].

Чувствительность наиболее распространенных кожных тестов для выявления гиперчувствительности замедленного типа на металлы, входящие в состав имплантатов, составляет ~ 75%, что снижает значимость патч-тестов. Ряд авторов считает, что данные тесты, были разработаны и утверждены для диагностики контактных дерматитов, и уместность их использования для диагностики чувствительности к металлическим имплантатам (контактирующих с тканями организма) ограничена [291, 284].

Для выявления специфических антител на металлы появились коммерческие наборы для определения иммуноглобулинов IgG, IgE на металлы.

Эти же реакции являются средством для прогностического выявления лиц, имеющих предрасположенность к аллергии на металл (1-2 % населения) [379].

1.4 Титан и его сплавы – материалы для костных имплантатов

Распространенность титана и его сплавов в качестве материалов для изготовления костных имплантатов, пластин, элементов крепления, используемых в ортопедии и травматологии, челюстно-лицевой хирургии, стоматологии, определяется, прежде всего, высокой биотолерантностью титана [27], способностью к остеоинтеграции, отсутствием

цитотоксичности по отношению к клеткам остеобластического дифферона, способностью мезенхимальных стволовых клеток адгезировать, пролиферировать и дифференцироваться на поверхности титана [120, 78, 66, 184, 38]. Инертность изделий из титана (химически активного элемента) определяется образованием на его поверхности оксидной пленки [284, 448] толщиной 4-5 нанометра [35], которая формируется под действием кислорода за миллисекунды, а в течение минуты ее высота увеличивается в 10 раз [538]. При нарушении целостности пленки происходит ее самовосстановление или «репассивирование поверхности».

Чистый титан и его сплавы имеют достаточно высокое соотношение прочности-веса, низкий по сравнению с другими металлами модуль упругости, менее подвержены усталостному разрушению. Однако прочность, сопротивление усталостному разрушению чистого титана уступают аналогичным показателям его сплавов, что сдерживает его более широкое применение в травматологии и ортопедии [130]. В имплантологии титан используется чаще в форме “коммерчески чистого” титана, т.е. содержащего микроэлементы (N, C, H, Fe, O, Ni, Mo, Co, Al, V), которые составляют ~1% от его объема и улучшают его механические свойства, однако снижают биоинертность [326, 284].

В связи с этим одним из перспективных направлений материаловедения является субмикро- и наноструктурирование чистого титана (BT1-0), что позволяет избавиться от токсических примесей, присутствующих в “коммерчески чистом” титане и его сплавах (таких как BT5, -6, -16, Виталиум, Комохром, K40НХМ) и составляющих значительную долю в таких сплавах как кобальт-хром-вольфрам-никелевый (ГОСТ ИСО 5832-5-2010), кобальт-никель-хром-молибденовый (ГОСТ ИСО 5832-6-2010) и значительно увеличить его предел прочности, текучести, упругости [182]. Применение наноструктурированного титана приводит к улучшению остеоинтегративных свойств титановых имплантатов, увеличению зрелости прилежащей к имплантату костной ткани, уменьшению активности процессов ее резорбции [29, 150].

Немаловажное значение имеет и коррозионная стойкость, т.к. металлические имплантаты оказывают шунтирующее, экранирующее и биоэлектрокаталитическое воздействие на окружающие ткани. Коррозионный потенциал, превышающий потенциал физиологической жидкости (~ 400 мВ), предотвращает разрушение пассивирующего слоя, который защищает поверхность металла от коррозии в биологической среде [397]. Коррозионный потенциал титана и его сплавов в несколько раз превышает потенциал физиологической жидкости. Хотя при субмикро- и нанокристаллизации титана отмечают ухудшение качества пассивирующих пленок. С целью снижения коррозионно-электрохимической активности титана, в том числе наноструктурированного проводят дополнительное оксидирование его поверхности для увеличения толщины и прочности оксидного слоя, который и обеспечивает коррозионную

стойкость титана [75, 94, 182]. Однако в условиях циклических механических воздействий, трения, низкого pH, снижения концентрации кислорода в пассивирующем слое TiO_2 образуются дефекты [523] и, несмотря на то, что пассивирующий слой самовосстанавливается, обмен между металлом и биологическими жидкостями происходит (катионы металла выходят в прилежащие ткани, а анионы, например, кислород, из биологической жидкости мигрируют в имплантат). В настоящее время в связи с активным использованием титана и его сплавов для изготовления имплантов накоплен экспериментальный и клинический материал, подтверждающий, что, как и другие металлы, титан подвергается коррозии при внедрении в ткани организма [184, 412]. Оценка интенсивности коррозии дентальных титановых имплантатов выявила, что уже через 3-и месяца в опытной группе содержание титана в прилежащих к титановому имплантату мягких тканях составляло $50.4 \text{ мкг/г} \pm 23.5 \text{ мкг/г}$, в то время как в контрольной группе было $37.1 \text{ мкг/г} \pm 1.0 \text{ мкг/г}$ [412].

Частицы титана могут накапливаться в прилежащих тканях [289] и распространяться макрофагами или с током лимфы и крови по организму. В экспериментах на овцах исследователи обнаружили, что при нестабильности одного дентального титанового имплантата нижней челюсти через 12 недель после имплантации в региональных лимфатических узлах уровень титана повысился в 7-9.4 раз, в легких – в 2.2-3.8 раза [298]. По данным [553] при внедрении титановых имплантатов в лимфатических узлах и ткани легкого были обнаружены концентрации титана $\sim 100\text{-}300 \text{ ppm}$.

Однако титан считался совершенно инертным материалом, не вызывающим негативных эффектов в организме. Потребовалось несколько лет, чтобы в научном мире утвердилось представление о возможности индукции диоксидом титана неспецифического воспаления [541, 545, 544] или развития гиперчувствительности замедленного типа (IV) при внедрении имплантатов из титан, но и в настоящее время не все авторы считают данный вопрос закрытым [497]. Так, в исследовании [326] авторы показали, что все образцы титана и его сплавов (пористый титан (Япония), пористый титан (Россия), прут чистого титана Ti-1, TMZF Al6Nb7, Ti21SRx, TiAl6V4, FG-TiAl6V4 ASTM F 1108), используемые для производства имплантатов содержали определяемые количества Al, Be, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hf, Mn, Mo. Наличие небольших количеств других металлов в титане и его сплавах, например, никеля (до 0,0017% веса) связаны с производственными процессами поэтому, могут быть классифицированы как «примеси». Даже небольшие количества гаптенов могут спровоцировать аллергические реакции у пациентов, имеющих сенсибилизацию к соответствующему металлу (никель, палладий, хром). Однако эти аллергические реакции будут не на титан или его сплавы, а на примеси, содержащиеся в сплавах.

Нельзя не согласиться с авторами, что реакции, обнаруживаемые *in vivo*, могут быть инициированы «примесями», содержащимися в сплавах титана. В данной ситуации необходимо убедительное лабораторное подтверждение специфичности реакции. Проблема заключается в отсутствии разработанных протоколов исследования и стандартизованных образцов аллергенов для проведения кожных аппликационных тестов, реакции бласттрансформации лимфоцитов (MELISA), дегрануляции тучных клеток на титан. Работы в данном направлении проводятся. В качестве аллергена для патч-теста были предложены 0,1% TiCl_4 [429], 0,2% TiCl_4 [440, 284] или 01%, 02% раствор сульфата титана [440], которые могут быть альтернативой окиси титана, используемой для кожных тестов.

Несмотря на определенные сложности лабораторного подтверждения сенсibilизации на титан в литературе появляются сообщения о развитии неспецифических воспалительных реакций или специфических реакций замедленного типа на титановые имплантаты.

Целью исследования A. Siddiqi (2011) был поиск в электронных базах данных (таких как MEDLINE и PUBMED) информации о негативных реакциях на титановые имплантаты, исключение перекрестных ссылок и анализ полученной информации. В результате было отобрано 127 оригинальных сообщений об исследованиях выполненных *in vitro* или наблюдениях *in vivo*. Основная часть статей относилась к ортопедии и была посвящена изучению влияния частиц износа эндопротезов крупных суставов, далее по частоте шли негативные реакции на металлоконструкции для остеосинтеза (пластины, винты), дентальные имплантаты, сердечные кардиостимуляторы. В результате авторы делают заключение, что титан может вызывать повышенную чувствительность у восприимчивых пациентов, что в свою очередь играет решающую роль в развитии асептической несостоятельности имплантатов. По данным K.Müller (2006), при обследовании 54 пациентов с клиническими симптомами чувствительности на металлические имплантаты 37,5% продемонстрировали положительную реакцию на титан в тесте MELISA (реакция бластной трансформации лимфоцитов на металлы) и/или в патч-тесте, 28,6% – неоднозначный результат, 33,9% – отрицательный. После удаления имплантатов у всех 54 пациентов было отмечено значительное клиническое улучшение [421]. В работе A.Sicilia (2008) авторы представили результаты обследования 1500 пациентов с дентальными имплантатами, внедренными в 2002-2004 годах, на наличие аллергических реакции на титан (оценка по внутрикожным и аппликационным тестам). Положительная реакция была выявлена у 0,6% пациентов. Однако в группе пациентов с симптомами аллергии, появившимися после имплантации (18 пациентов) положительные пробы были у 9 (50%), а у пациентов с «необъяснимыми неудачами имплантации» у 5 из восьми (63%). В заключении авторы [496] рекомендуют проводить специфическую диагностику на материал имплантата у

пациентов с подозрением на аллергическую реакцию, а также с «необъяснимыми неудачами имплантации», другое название – «феноменальная группа» (“cluster phenomenon”).

В качестве примера такой «неудачи» может быть представлен отчет о клиническом случае – пациентки с выраженной клинической и рентгенологической картиной отторжения 6 дентальных титановых протезов, повлекшее удаление всех имплантатов. Гистологически была выявлена хроническая воспалительная реакция с выраженным фиброзом, наличием гигантских многоядерных клеток инородного тела в прилежащих мягких тканях [276]. Другой описанный клинический случай демонстрирует отсутствие сращения перелома и появление экземы, локализованной в периоперационной области при развитии сенсибилизации на ионы титана (подтверждено в реакции бластной трансформации лимфоцитов) при использовании титановой пластины для остеосинтеза [516].

Сенсибилизация на титан с развитием реакции гиперчувствительности замедленного типа – результат постоянной стимуляции макрофагов комплексами Ti-белок. Особенностью титана является его высокая химическая активность и, соответственно, активность при взаимодействии с белками. Комплексы Ti-белок поглощают клетки Лангерганса и оседлые макрофаги. Контакт макрофагов (человека и мыши) с частицами титана приводит к образованию «inflammasome» с активацией DAMPs каскада: формированию мультибелка (Nalp3 - Asc) – расщеплению про-каспазы-1 с образованием каспазы-1 – образование из проИЛ-1 – ИЛ-1 и др. [457, 379]. Макрофаги представляют антиген Т-лимфоцитам (CD4+) в комплексе с костимулирующими молекулами и дополнительными сигналами – ИЛ-1, -12. В культурах макрофагов и фибробластов после воздействия титановых частиц выявлено повышение экспрессии MCP-1 [379]. Th1, преобладающие в перипротезных инфильтратах, через цитокины, в свою очередь, активируют незрелые макрофаги. В результате в инфильтрате доминируют гистиоциты, а они синтезируют многочисленные провоспалительные цитокины, в том числе ФНО-α. На участие лимфоцитов в формировании реакции на металлы указывает значительно увеличенная концентрация ИЛ-22 в периферической крови у пациентов с дерматитами на Ni [473]. Лимфоциты способны синтезировать цитокины, ограничивающие воспаление, но постоянный контакт макрофагов с антигеном приводит к росту гранулемы за счет аутоамплификации [154].

Все приведенные отчеты свидетельствуют о редкости развития гиперчувствительности замедленного типа на титан и высокой его коррозионной устойчивости при оптимальных условиях. Так, за 4 недели экспозиции в искусственной тканевой жидкости титановых пластин продукты коррозии, определяемые методом поляризованной электротермической атомно-адсорбционной спектрофотометрии (polarized Zeeman atomic absorption spectrophotometer, Z-5710, Hitachi, Tokyo, Japan) не были выявлены [507].

Специфическая реакция на титан была подтверждена у 0,6% пациентов, имеющих имплантаты из титана [496]. Для сравнения: специфическая реакция на никель была выявлена у 13,1% из обследованных 31 973-х пациентов с внедренными ранее металлическими имплантатами, на кобальт – у 2,4%, на хром – у 1,1% [516].

Однако при неблагоприятных условиях, которые могут иметь физическую или биологическую природу, а особенно при их сочетании, коррозия титана может быть значительной.

К физическим факторам относятся: изменение pH, механическая нагрузка, контакт титана в электролитном растворе (тканевая жидкость) с другими металлами или сплавами (при использовании, например, на костных пластин и винтов из разных металлов [284].

Так было показано, что коррозия титана в искусственной тканевой жидкости (имеющей следующий состав: 142 mM Na⁺, 5.0 mM K⁺, 1.5 mM Mg²⁺, 2.5 mM Ca²⁺, 147.8 mM Cl⁻, 4.2 mM HCO₃⁻, 1.0 mM HPO₄²⁻, 0.5 mM SO₄²⁻) резко увеличивается при снижении pH (менее 3) и повышении pH (выше 9,0) [507]. Жидкости организма являются буферными растворами, и обычно их pH не снижается ниже 5.2 даже в области воспаления [507] и в лакуне, образованной остеокластом, активно резорбирующим кость, где pH – 4,5-4,8 [137].

Однако использование в растворе искусственной тканевой жидкости молочной кислоты вместо HCl (при прочих равных условиях) увеличивало коррозию титана на 120%. Предполагают, что гидроксильные и карбоксильные группы молочной кислоты, ковалентно связываясь с ионами Ti, подавляют реприцепитацию ионов на поверхность. В результате стабильность и целостность оксидного слоя на образцах титана снижаются, а коррозия ионов Ti в искусственную тканевую жидкость увеличивается. Механическое трение алюминиевыми или нейлоновыми шариками, контакт с другими металлами увеличивали коррозию титана почти в 4 раза [507].

К биологическим факторам относятся наличие аллергии на металлы в анамнезе [320], присутствие микроорганизмов в среде или на поверхности образца (био пленки). При погружении титановой пластины в культуральную среду *C. albicans*, которые в процессе жизнедеятельности понижают pH среды до 3,0 (при концентрации 1×10⁵ КОЕ/мл) и до 2.81 (при концентрации 1×10⁶ КОЕ/мл), коррозия Ti становится выраженной [507]. Такой же эффект может быть получен при образовании слоя микроорганизмов на имплантате (образование био пленки). Этот вид коррозии называют «биокоррозией», ее особенностью является чрезвычайно низкое локальное значение pH в областях контакта био пленки и металла [266, 515].

Эти результаты приобретают особое значение в свете появившихся новых данных о том, что ионы Ti в концентрациях 9 ppm ингибировали экспрессию Runx2, Osterix и коллагена I типа

в остеобластах (MC3T3-E1) и усиливали экспрессию RANKL и OPG в остеобластах и эпителиальных клетках (GE-1) [563]. В остеокластах (RAW264.7) ионы Ti не влияли на уровень мРНК КФтарт и катепсин К. В концентрации 20 ppm ионы Ti снижали жизнеспособность остеобластов, остеокластов, эпителиальных клеток [415]. Данные концентрации являются клинически значимыми – в мягких тканях, прилежащих к зоне имплантации, титан был обнаружен в концентрациях 50-300 ppm [553, 412].

Наночастицы TiO_2 , дозозависимо подавляли жизнеспособность, пролиферацию, адгезию, миграцию, активность ЩФ, экспрессию мРНК остеокальцина и минерализацию линии остеогенных клеток. Данный эффект зависел от размера частиц и возрастал в ряду 14 нм < 108 нм < 196 нм [342].

Эти результаты позволяют предположить, что ионы Ti могут проявить прямые, а также опосредованные, через активацию макрофагов, биологические эффекты на жизнеспособность, пролиферацию и функцию остеобластов и остеокластов, вызывать сенсibilизацию, что в результате оказывает большое влияние на биосовместимость и долговременную стабильность имплантатов.

В исследовании [126] предпринята попытка разработать алгоритм лечения пациентов с сенсibilизацией к металлам. Для решения данной задачи были обследованы 840 пациентов, перенесших протезирование зубов. У 330 были зарегистрированы клинические признаки аллергических реакции со стороны полости рта. Для лабораторного подтверждения диагноза были применены следующие тесты: реакция торможения лимфоцитов, реакция дегрануляции тучных клеток, иммуноферментный анализ на специфические к металлам IgE. Наиболее часто реакция дегрануляции тучных клеток наблюдалась на Ti, Cu, Zn, Cr, Ni, Mn. Методом ИФА были выявлены специфические IgE к титану у 7-и пациентов (0,83%). Пациентам с диагностированной сенсibilизацией к металлам повторное лечение проводили с учетом полученных результатов. При сенсibilизации к хромоникелевым сплавам использовали металлокерамические или золотые протезы, при сенсibilизации к золоту или серебряно-палладиевым сплавам – металлокерамические или фарфоровые протезы.

Большой проблемой в имплантологии остается проблема биомеханического несоответствия между имплантатом и окружающей его костной тканью, которое приводит к появлению напряженно деформированного состояния на границе кость-имплантат, ухудшая процесс заживления кости, снижая площадь кортикальной кости, нарушая процессы ремоделирования прилегающей костной ткани, активируя процессы резорбции, прилежащей к имплантату кости [89, 235, 482]. Кроме того, микроподвижность является мощным фактором инициирующим инфицирование области интерфейса «костное ложе-имплантат», что в свою

очередь приводит к преждевременному снятию аппаратов внешней фиксации по клиническим показаниям или реэндопротезированию суставов [482].

Исходя из вышесказанного, одной из важнейших задач исследователей является получение новых прочных материалов с модулем упругости близким к модулю упругости кости человека. Одним из вариантов решения данной проблемы является использование пористых структур. Изменяя пористость материала, возможно приблизить модуль его упругости к модулю упругости костной ткани. Пористая керамика хрупка и не обладает достаточной прочностью, поэтому чаще используется в качестве покрытий или наполнителей [27, 95, 100, 537, 482], а в качестве пористых материалов для изготовления имплантатов получили распространение пористые металлы.

В результате при внедрении пористых металлических матриц, имеющих меньшую жесткость по сравнению с монолитными имплантатами, напряжение на границе имплантат-кость уменьшается, в результате скорость ремоделирования прилежащей костной ткани снижается за счет уменьшения резорбции кости, увеличивается минерализация, формируется значительно больший объем кортикальной костной ткани [235, 225]. Внедрение имплантатов с пористой поверхностью увеличивает площадь, прилегающую непосредственно к имплантату костной ткани [100] и сдвиговую прочность образующихся композитов «костное ложе-имплантат» [81]. Если титановые матрицы открытопористые, то они прорастают костной тканью с образованием композитов и обеспечивают значительно лучшее механическое сцепление в интерфейсе костное ложе-имплантат, чем при внедрении монолитных имплантатов или имплантатов с закрытопористой структурой [120].

Однако исследования свойств пористых металлических имплантатов выявило значительное увеличение коррозионности и диффузии их в окружающие ткани по сравнению с непористыми имплантатами [465, 482]. Следствием этого могут быть неблагоприятные реакции со стороны организма на внедрение имплантата. Так, пористые имплантаты из нержавеющей стали, например, 316L подвергаются значительной коррозии в физиологических жидкостях и не могут быть применены в клинике [94]. Титан и его сплавы, кобальт-хром-молибденовые сплавы получили широкое распространение при изготовлении пористых изделий в травматологии-ортопедии [348].

При создании пористых конструкций для имплантации важна архитектура матрикса, его механическая прочность, характер и структура системы пор. Эти характеристики оказывают существенное влияние на процесс интеграции пористых имплантатов.

Существует различные способы получения пористых металлов, том числе с использованием технологии, компьютерного 3D моделирования, которая позволяет

изготавливать пористые имплантаты заданной формы, имеющие унифицированную форму и размер пор, равномерно распределенных по объему имплантата [114].

Большинство авторов сходятся во мнении, что для новообразования костной ткани, ее васкуляризации и циркуляции физиологических жидкостей необходима открытая сообщающаяся система пор, при этом диаметр пор должен быть более 100 [348] – 500 мкм [78, 306, 546]. Данный размер пор, возможно, обусловлен топографией ниш, необходимых для дифференцировки мезенхимальных стволовых клеток в остеогенном направлении. Было показано, что это должны быть углубления неправильной формы, сообщающиеся друг с другом, имеющие площадь $\sim 300 \text{ мкм}^2$. На территории данного домена должно располагаться 50-60 остеогенных клеток [186]. Именно на таких территориях три- и бипотентные коммитированные клетки-предшественницы хондроцитов, остеоцитов, адипоцитов способны пролиферировать и дифференцироваться.

Увеличение общего объема и размера пор, а, следовательно, и повышение проницаемости имплантатов увеличивает количество ткани в объеме имплантата, площадь контакта поверхности имплантата с костной тканью, а также минерализацию новообразованной ткани. Однако значительное увеличение размера пор пористых металлических имплантатов приводит к падению предела их прочности, модуля Юнга и относительной деформации образца до разрушения [120, 225]. Геометрия пор также может влиять на упругие свойства пористого материала, особенно при больших значениях пористости [225].

При использовании пористого материала, происходит интервенция костной тканью внутреннего объема, формируется композит кость-имплантат, который должен обладать достаточной прочностью к действующим нагрузкам (сжимающим, растягивающим и сдвиговым). Известно, что сила сцепления имплантата с костной тканью пропорциональна площади поверхности имплантатов, контактирующих с костным ложем. Поэтому структурированные определенным образом поверхности монолитных имплантатов и поверхности пористых имплантатов, имеющие оптимальную для адгезии и пролиферации клеток шероховатость и развитый рельеф, с этой точки зрения обладают преимуществом по сравнению с гладкими поверхностями при прочих равных условиях. Это утверждение подтверждается огромным количеством полученного фактического материала. Особенно следует отметить пористые поверхности, рельеф которых включает в себя выступы и глубокие впадины, благодаря чему они образуют т.н. «замковое» соединение, которое значительно повышает прочность системы кость-имплантат [423].

Наиболее приемлем материал со сквозными взаимосвязанными порами, ориентированными вдоль основных линий нагружения кости [95].

Применение пористых материалов увеличивает риск образования биопленки на поверхности имплантата. Степень риска зависит от химического состава материала, используемого для получения пористых структур. Например, для образования биопленки на пористых титановых имплантатах необходима концентрация микроорганизмов в 2,7 раза выше, чем для образования биопленки на пористых имплантатах из кобальт-хромовых сплавов [257].

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в технологии изготовления пористых имплантатов ортопедического профиля, при применении того или иного материала остается много научных и технических задач, требующих решения.

1.5. Характеристики поверхности и их влияния на остеоинтеграцию имплантатов

Процесс взаимодействия материальной поверхности с тканями организма представляет каскад реакций, приводящий в конечном итоге к интеграции имплантата, и начинается с первых секунд после внедрения имплантата в костный дефект. На первом этапе на поверхность имплантата в течение $t \sim 10^{-3} - 10^{-6}$ с происходит адсорбции молекул альбумина, концентрация которых в сыворотке крови в 100-1000 раз выше концентрации фибронектина и витронектина. Слой альбумина создает условия для адсорбции адгезивных белков внеклеточного матрикса (фибронектина, витронектина, остеонектина, костного сиалопротеина), которые с течением времени замещают альбумин [210, 244, 213].

Последующая адгезия клеток обеспечивается взаимодействием их адгезивных молекул с фрагментами адсорбированных адгезивных белков, такими как аргинин-глицин-аспартатовый комплекс. Покрытие имплантатов аминокислотами приводит к активации остеогенеза в интерфейсе имплантат-кость [35]. Сила фокального контакта клетки с поверхностью и ее подвижность, зависят от плотности адгезировавших на нее белков, т.е. первоначальный этап адгезии белков влияет на последующую адгезию клеток [254, 213].

Последующий процесс костеобразования включает такие этапы как хемотаксис, пролиферация, дифференциация клеток-предшественниц, васкуляризация области регенерата, синтез компонентов экстрацеллюлярного матрикса остеобластами, его организация, реорганизации костного регенерата [74]. Он может протекать по двум механизмам – дистантно и контактно, чаще всего они реализуются параллельно. При дистантном костеобразовании остеогенез осуществляется со стороны костного ложа. Остеогенные клетки пролиферируют, дифференцируются и продуцируют костной матрикс в периимплантной зоне по направлению к поверхности имплантата. Данный тип остеогенеза чаще наблюдается в кортикальной костной ткани. При контактном – за счет мигрирующих на поверхности имплантата остеогенных клеток-предшественниц. Зарождение костной ткани в пористой титановой матрице происходит

одновременно в виде многочисленных разобщенных областей, которые со временем сливаются и заполняют поры полностью [187].

Albrektsson Т. сформулировал комплекс факторов, обуславливающих остеоинтеграцию имплантатов – дизайн самого имплантата; материал, из которого изготовлен имплантат, характеристика поверхности, нагрузки на имплантат; хирургическая техника; состояния ткани костного ложа [35, 205].

К свойствам поверхности, влияющим на остеоинтеграцию, относятся – ее химический состав, рельеф, шероховатость, смачиваемость, поверхностная энергия, зета потенциал [272].

Химический состав во многом определяет жизнеспособность пролиферацию и дифференцировку адгезировавших клеток. Ухудшение метаболизма клеток из-за токсического воздействия элементов подложки влияет на морфологию клеток, а также на их функцию. Имеются данные о токсичности таких элементов как Al, V, Ni, которые входят в состав титановых сплавов [397]. Поэтому в настоящее время интенсивно развиваются технологии защиты металлических поверхностей с помощью биосовместимых покрытий.

Основным параметром шероховатости является среднее арифметическое отклонение профиля (R_a), определенное на базовой длине. По размеру неровностей шероховатость подразделяется на макро-, микро- и наношероховатость [255].

Увеличение степени наношероховатости до определенного предела увеличивает стабильность имплантата [35]. Однако значительное повышение шероховатости сопровождается увеличением гидрофильности поверхности, а адгезия клеток так же, как и адгезия белковых молекул, понижается на избыточно гидрофильных и гидрофобных поверхностях. Это положение хорошо иллюстрируется исследованием адгезии макрофагов на поверхности, имеющие различную степень шероховатость. Было показано, что при увеличении шероховатости от 10 до 50 нм количество и скорость адгезировавших клеток увеличивалась, а от 100 до 200 нм снижалась, что было обусловлено нарушением строения цитоскелета клеток, кроме того контакт с поверхностью, имеющей шероховатость 200 нм приводил к увеличению экспрессии генов провоспалительных цитокинов [417]. Считается, что для хорошей адгезии клеток шероховатость поверхности должна находиться в интервале от 0,5 до 3 мкм [325, 205]. Прочность адгезии клеток, в свою очередь, определяет скорость пролиферации и дифференциации. Прочная адгезия приводит к снижению скорости пролиферации и ускорению дифференциации, масса новообразованной костной ткани оказывается небольшой. При непрочной адгезии, напротив, пролиферация выражена, а дифференциация замедлена [95].

Смачиваемость поверхности имплантата, ее заряд и свободная поверхностная энергия являются доминантными характеристиками на первоначальном этапе осаждения белкового слоя. С увеличением гидрофильности поверхности количество адсорбированных белковых

молекул повышается. Однако избыточно гидрофильные (краевой угол смачиваемости $<35^{\circ}$) и гидрофобные (краевой угол смачиваемости $>85^{\circ}$) поверхности не являются предпочтительными для их адсорбции.

В исследовании, выполненном на добровольцах, было показано, что увеличение гидрофильности поверхности дентальных имплантатов (методом титаноплазменного напыления на поверхность SLA) приводит к большому количеству контактов на границе костная ткань-имплантат, более выраженной ее минерализации на 28-е сутки после имплантации. К 42-м суткам после операции отличия между имплантатами нивелировались [380]. Возможно то, что эффект гидрофильных поверхностей проявляется только на раннем этапе остеоинтеграции, привело к получению противоречивых результатов. Так, в ранее выполненных исследованиях A.Wennerberg (1996) не было выявлено клинической эффективности имплантатов SLA (Straumann), обработанных титаноплазменным методом, по сравнению с имплантатами SLA (Straumann) [554].

Клетки имеют тенденцию лучше адгезировать на гидрофильных шероховатых поверхностях, выбирая в первую очередь места с положительным зарядом, а распластывание и формирование клеточного слоя лучше происходит на более гладких поверхностях. Из этого следует, насколько сложно учесть все аспекты клеточной реакции, чтобы оптимизировать свойства поверхности биоматериала, предназначенного для конкретного применения. Общие критерии выбора поверхности заключаются в следующем. Предпочтительными являются поверхности, имеющие микронную и субмикронную шероховатость. Микронная шероховатость способствует адгезии и распластыванию клеток, а субмикронная увеличивает выделение локальных регуляторных факторов [158].

По мнению авторов [490] пролиферация клеток также зависит во многом от энергетического состояния поверхности. На пролиферацию влияет не столько значение свободной поверхностной энергии, сколько соотношение ее полярной и дисперсионной составляющих – $(\gamma^p/(\gamma^p + \gamma^d))$. Наиболее активно пролиферация происходит, когда доля полярной компоненты составляет $\sim 0,3$. Повышение доли полярной компоненты снижает пролиферативную способность клеток [460].

1.6. Модификация поверхности титановых имплантатов алмазоподобными пленками

В конце 70-х годов 20 столетия были открыты пленочные углеродных структуры, полученные осаждением углерода в вакууме и имеющие связи между атомами углерода и свойства характерные для алмаза, благодаря чему они получили название «алмазоподобные» (DLC).

Пионерской работой в области исследования биологических свойств «алмазоподобных» пленок явилась работа Томсона и др., опубликованная в 1991 году [518]. Токсичность DLC пленок тестировали в культуре макрофагов, поскольку они участвуют в воспалительных процессах и реакциях отторжения, анализируя концентрацию лизосомных энзимов. В результате было установлено, что DLC пленки, полученные разложением углеводов, не токсичны. При культивировании на DLC фибробластов, последние сохраняли жизнеспособность, имели типичную морфологию. Позднее эти результаты были подтверждены другими исследователями [207, 388, 564, 521].

В течение последующих двадцати лет опубликовано большое количество работ, подтверждающих биологическую совместимость DLC пленок с клетками тканей организма. Однако вследствие большого разнообразия методов получения DLC пленок, их состав (a-C, a-C:H), структура (sp^3/sp^2), а значит и физико-химических свойств (твердость, смачиваемость и т.д.) получаемые результаты значительно различаются. Систематизация данных также затруднена из-за разнообразия применяемых методов исследования и различных клеточных линий, используемых в экспериментах. Зачастую исследования проводят только в краткосрочных культурах.

Исследование взаимодействия DLC пленок с клетками ткани включает изучение жизнеспособности, адгезии клеток, способности их к пролиферации и дифференцировке. Тестирование DLC пленок на цитосовместимость проводили с использованием макрофагов, фибробластов, остеобластов, нейтрофилов, клеток гладкой мускулатуры, эпителиальных клеток и т.д. Выбор клеточной линии был обусловлен потенциальной областью применения пленок. Для проверки биосовместимости материала с костной тканью чаще всего используют фибробласты и остеобласты. С другой стороны, использование клеток костного мозга дает возможность изучения ранних стадий остеогенной дифференцировки примитивных мультипотентных стволовых клеток в клетки костной ткани [478, 441, 477, 442].

Анализируя экспериментальные данные по тестированию DLC пленок на биосовместимость можно отметить, что большинство работ посвящено исследованию адгезии клеток и их морфологии после культивирования в течение одного-трех дней. Установлено, что DLC пленки, включая водородосодержащие (a-C:H) и азотсодержащие (CNx), не снижают адгезию клеток по сравнению с медицинскими пластиками (полиметилметакрилат, политетрафторэтилен, полистирол), нержавеющей сталью и титаном [441,442,534]. Для адгезии клеток на DLC свойственны закономерности характерные для адгезии клеток на другие поверхности: повышение их гидрофильности улучшает адгезию клеток. Понижение краевого угла смачиваемости DLC пленок от 62° до 51° за счет осаждения на подложки из нержавеющей стали различной шероховатости (R_a от 0,02 до 3,5 мкм) [478,477], введение в состав DLC других

элементов (Ca, P), ультрафиолетовая обработка, приводящая к повышению их гидрофильности, увеличивало количество адгезировавших клеток [478, 477, 467].

При добавлении в состав DLC пленок азота их гидрофильность и поверхностная энергия повышаются. До настоящего времени нет единого мнения о зависимости адгезии клеток от концентрации азота. Так, по данным ряда авторов, при исследовании CN_x и DLC пленок в одинаковых условиях было установлено, что на ранних сроках культивирования (до 24 ч) количество адгезировавших фибробластов на пленках значимо не отличалось. Однако при более длительном культивировании образцов с пленками (7 суток) на CN_x пленках, в отличие от DLC, наблюдалось снижение пролиферативной активности фибробластов [478, 441, 442,]. По данным другой группы исследователей [562], небольшое количество азота в CN_x пленках увеличивало адгезию фибробластов. Структура CN_x пленок и их электропроводность, определяются помимо концентрации азота условиями осаждения пленок, таким могут способ получения пленки может оказывать влияние на адгезию и пролиферацию клеток.

Гидрофильность играет важную роль на начальной стадии взаимодействия клетки с поверхностью. Пролиферация клеток ассоциирована в большей степени с топографией поверхности, а также с ее химическим и энергетическим состоянием [250].

DLC пленки, осажденные на гладкие полированные поверхности различных материалов, в зависимости от условий осаждения имеют шероховатость от наноуровня до микронного масштаба. На таких поверхностях клетки хорошо распластаются и имеют типичную морфологию [250]. Во всех работах, посвященных исследованию биосовместимости DLC пленок, отмечается, что адгезирующие на их поверхность клетки, жизнеспособны и способны к пролиферации. Исследование пролиферации остеобластов на DLC пленках при культивировании в течение 7 дней показало, что скорость роста количества остеобластов на DLC пленках выше по сравнению с титаном, нержавеющей сталью и контрольными культурами на пластике [442]. Эффект активации пролиферации остеобластов был подтвержден другими авторами [483]. Через три дня культивирования количество остеобластов на DLC пленке и полистироле практически сравнялось, хотя через одни сутки их количество на DLC пленке было значимо ниже по сравнению с контрольным полистиролом.

Для остеоинтеграции имплантатов желательно, чтобы их поверхность обладала остеокондуктивными, остеоиндуктивными свойствами, а также активировала процесс остеогенеза [195, 194]. Оригинальные исследования остеоиндуктивных свойств углеродных алмазоподобных пленок показали, что такие пленки направленно действуют на дифференцирование клеток костного мозга в остеогенном направлении и способствуют формированию внеклеточного матрикса и его минерализации [442].

1.7. Обоснование применения биокompозита «прилипающая фракция клеток костного мозга – пористая титановая матрица с алмазоподобной пленкой» для стимуляции остеогенеза

Восстановление утраченного объема костной ткани с помощью трансплантации тканеинженерных конструкций с использованием аутологичных остеогенных клеток, увеличенных в количестве культивированием, рассматривается в настоящее время в качестве альтернатива аутотрансплантации костной ткани и одним из перспективных направлений реконструктивной хирургии [62, 26, 37, 428, 533, 350, 531, 424, 203, 217, 355].

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки способные к дифференцировке при определенных условиях в направлении нескольких клеточных линий – миоцитов (поперечнополосатых, гладкомышечных клеток, кардиомиоцитов), клеток поджелудочной железы, глиальных клеток, остеоцитов, фиброцитов, хондроцитов, адипоцитов, теноцитов, эндотелиальных клеток, стромальных клеток, остеобластов/остеоцитов, а также клеток-предшественниц с ограниченным потенциалом развития, в том числе предшественниц фибробластов, остеобластов, адипоцитов и хондроцитов [183, 103, 26, 198, 186, 148, 295, 296, 462, 350, 462, 367, 475, 217, 318, 566, 228].

Мультипотентные клетки могут быть эмбриональными или постнатальными, то есть выделенными из взрослых тканей [185]. Использование постнатальных стволовых клеток оправдано не только по философским, этическим и правовым причинам, но и с учетом практических аспектов использования их для нужд клеточной терапии. Постнатальные стволовые клетки имеют меньший пролиферативный потенциал и уступают эмбриональным клеткам по набору направлений дифференциации, однако имеют целый ряд преимуществ: стабильный фенотип, легкость изоляции, транспортабельность, совместимость с различными методами доставки, сохранившийся потенциал экспансии [26, 555], а снижение пролиферативного потенциала уменьшает потенциальный риск развития опухоли [148].

Постнатальные мультипотентные клетки были изолированы и охарактеризованы во многих лабораториях, были определены минимальные критерии, необходимые для их идентификации [183, 274, 339]. Предметами исследований в данной области в настоящее время являются альтернативные источники получения ММСК, разработка протоколов выделения, изоляции, фенотипирования, очистки, культивирования, индукции дифференциации для максимальной реализации остеогенного потенциала, совершенствование способов транспортировки клеток-предшественниц в область поражения, в том числе скэффолдов [7, 26, 37, 533, 424, 203, 217, 355].

По мнению ряда исследователей, ММСК ассоциированы с периваскулярной соединительной тканью и могут быть выделены из большинства тканей и органов [148, 259].

В качестве источника предшественниц остеогенных клетки можно использовать костный мозг [29, 183], периферическую кровь [382, 362], пуповинную кровь [362], плаценту [531, 287], жировую ткань [110, 569, 367], надкостницу [123, 428], пульпу зуба [456, 376], синовиальную оболочку, стенку сосудов [202]. ММСК из разных источников сходны по основным характеристикам – морфологически, иммунофенотипически, по широте потенциала и способности к дифференцировке [299; 337], отличия выявляются в экспрессии некоторых фенотипических маркеров, в способности к пролиферации и дифференциации в определенную линию клеток. Так, МСК из фетальной селезенки и печени, имеют одинаковый фенотип, при этом МСК селезенки имеют меньший потенциал к адипогенезу, а МСК из фетальной печени – к остеогенезу [37, 540, 475; 498].

Костный мозг является источником различных классов постнатальных стволовых клеток, в том числе остеогенных клеток-предшественниц при физиологической и репаративной регенерации костной ткани. Аспират костного мозга относится к легко доступным традиционным источникам для получения стволовых мезенхимальных клеток для нужд клеточной терапии, МСК костного мозга наиболее полно охарактеризованы [103, 37, 533, 428, 350, 303]. Содержание МСК в кроветворной ткани составляет по данным разных авторов от 1-й клетки на 10 000 до 1-й на 1 000 000 ядродержащих клеток костного мозга [73, 148, 408, 409]. ММСК костного мозга обладают выраженной потенцией к дифференцировке в остеогенном направлении. Среди выделенных МСК из костного мозга человека коммитированные остеогенные клетки составляют 0,5-1% [26, 43].

Применение ММСК для стимуляции репаративной регенерации костной ткани оправдано в случаях «остеогенной недостаточности», обусловленных истощением камбиального резерва остеогенных клеток (замедленная консолидация переломов костей, образование ложных суставов, протяженные дефекты, дефекты после остеомиелита), необходимость в системной модуляции остеогенеза появляется при несовершенном остеогенезе и др. [103, 64].

Преимущества аутологичных ММСК, изолированных из тканей пациента, по сравнению с аллогенными клетками заключаются в отсутствии иммуногенности, снижении риска возможного инфицирования реципиента [148], недостаточной изученностью механизмов взаимодействия аллогенных клеток на организм, в том числе на остеогенную ткань [62].

Условия изоляции и культивирования, используемые для экспансии ММСК, зависят от их способности прилипать к поверхности пластика, хотя выраженность способности к адгезии может значительно варьировать [559, 555]. В настоящее время большинства существующий протоколов изоляции ММСК включает в качестве первого этапа – отбор клеток по адгезии к пластику. Полученные колонии имеют значительную гетерогенность по морфологии,

цитохимическим свойствам, потенциям клеток к дифференцировке, что отражает различную степень зрелости клеток [148, 446]. Существует несколько подходов для устранения контаминации кроветворными клетками мезенхимальных клеток: центрифугирование в градиенте плотности, сортировка по размеру, по экспрессии специфических молекул (Stro-1, CD105, стадийспецифического эмбрионального антигена-1). Однако применение данных методик не приводит к полному устранению гетерогенности ММСК.

Многие исследователи считают, что нефракционированные мононуклеары костного мозга являются наиболее приемлемым клеточным трансплантатом [566] по ряду причин: красный костный мозг, является наиболее доступным источником получения прогениторных клеток. Трансплантация клеток, подвергнутых минимальным манипуляциям, приводит к сохранению их жизнеспособности и функции. Кроме того, в состав фракции мононуклеаров входят гемопоэтические и мезенхимальные клетки различной степени зрелости, таким образом, при трансплантации осуществляется комплексное влияние клеток красного костного мозга на репарацию тканей [12].

В исследовании Wani (2013) была продемонстрирована эффективность, простота и отсутствие осложнений при инъекционном использовании нефракционированного костного мозга. Представлены клинические данные о лечении 50 пациентов с замедленной консолидацией и несращениями костей различной локализации (в 54% – это была большеберцовая кость), у которых были произведены 1-2 инъекции аспирата костного мозга (10-15 мл) непосредственно над местом перелома. Положительный результат был достигнут в 92% случаев [543]. По данным [309] использование аналогичного протокола лечения при лечении пациентов с несращениями костей голени привело к положительному результату в 75%.

Обеспечение выживаемости, пролиферации и дифференциации клеток-предшественниц достигается их иммобилизацией на трехмерной матрице [217]. Идеальная матрица должна иметь трехмерную структуру, имитирующая микроиши [186] и свойства экстрацеллюлярного матрикса, быть нетоксичной, биосовместимой и биорезорбируемой со скоростью образования костной ткани [28, 32, 4, 424, 203].

Было доказано, что ММСК проявляют способность дифференцироваться в остеогенные клетки адгезировав на 3-х мерных матрицах, где образуют трехмерные структуры. Данное свойство остеогенных клеток связывают с генетически детерминированной зависимостью основных биологических функций остеогенных клеток (пролиферация, дифференциация, синтез белков экстрацеллюлярного матрикса) от механических сигналов. В качестве носителя для ММСК используют различные материалы, что свидетельствует о наличии недостатков у каждого из носителей – деминерализованный аллогенный или ксеногенный костный матрикс,

матрицы из органических кислот (полимолочной, полигликолевой) кислот, криогели из коллагена, гидроксиапатит, биоситалы, пористые керамики, металлы и др. [63, 62, 64].

К настоящему времени накоплен обширный экспериментальный материал, свидетельствующий об эффективности трансплантаций ММСК, отработаны методические подходы для накопления достаточного количества клеточного материала. ММСК продемонстрировали большой потенциал для замещения поврежденных тканей – костной, хряща, сухожилий и связок. Было показано, что трансплантированные клетки могут выживать и участвовать в регенерации, интегрируясь в состав костного регенерата. Клетки располагаются преимущественно в периваскулярных тканях, дифференцируются в направлении хондро-, фибро- и остеогенеза, участвуют в реваскуляризации зоны поражения. Трансплантация клеток-предшественниц позволяет стимулировать репаративные процессы собственных поврежденной тканей, улучшает механические характеристики регенерата [103, 64, 68, 12, 303, 566, 279].

Первая трансплантация клеток мезенхимальной линии на губчатой матрице с целью активации остеогенеза в области дефектов костной ткани была выполнена в СССР в 1987 году [7, 138]. Однако использование ММСК в клинике до сих пор не является распространенной процедурой, при этом сообщения о положительном эффекте ММСК на остеогенез появляются в литературе. Так, после пересадки костного мозга трем детям, страдающим несовершенным остеогенезом, развившимся в результате химиотерапии, у 2-х детей было отмечено полное приживание донорских клеток, а в культуре остеобластов из подвздошной кости было выявлено 1,5-2% остеобластов донора. У 3-го ребенка культуру остеобластов не смогли получить. Клинически у всех детей было отмечено значительное улучшение – увеличилась длина длинных трубчатых костей, уменьшилось количество переломов, увеличилась минеральная плотность костной ткани [303]. В работе Е.М.Норwitz (2002) сообщается о лечении 6-и детей с тяжелыми проявлениями несовершенного остеогенеза трансплантацией костного мозга, которая была дополнена двумя инфузиями аллогенных ММСК. У пяти из шести пациентов произошло приживание мезенхимальных клеток донора («химеризация»), в том числе костей, кожи, стромы, и ускорение роста в течение первых 6 месяцев после инфузии ММСК длинных трубчатых костей, увеличение роста [340].

В «УНИИТО им. В.Д. Чаклина» в рамках совместного с Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (Genoa, Italy) и Istituti Ortopedici Rizzoli (Bologna, Italy) исследования были применены ткане-инженерные конструкции – макропористые гидроксиапатитовые матрицы, с помещенными на них аутогенными, предварительно увеличенными в количестве, предшественницами остеогенных клеток, для лечения пациентов с большими сегментарными дефектами (4-7 см) длинных трубчатых костей. В течение 5-7-и месяцев было выявлено образование костной мозоли вдоль имплантатов, достигнута интеграция имплантатов с

костными отломками, аппараты внешней фиксации были удалены через 6-13-и месяцев. Хорошая интеграция имплантатов сохранялась в течение всего периода наблюдения – 6-7-и лет [399].

В исследованиях представлены положительные результаты лечения ложных суставов (уменьшение сроков сращения) при использовании деминерализованного костного аллотрансплантата, заселенного аутогенными ММСК (в количестве $7-10 \times 10^6$ на 1 см^3 аллокости) [198], формировании дистракционного регенерата у детей с врожденными укорочениями конечностей и врожденными ложными суставами (ускорение консолидации после резекции ложного сустава и формирование регенерата с повышенной рентгенологической плотностью) [124].

Таким образом, многочисленные экспериментальные данные и единичные клинические исследования демонстрируют перспективность использования клеток мезенхимальной линии для оптимизации течения репаративного остеогенеза в качестве дополнительного метода лечения.

1.8. Обоснование сочетанного применения костного морфогенетического белка-2 и пористых титановых имплантатов с алмазоподобной пленкой для замещения дефектов костной ткани

Семейство костных морфогенетических белков, которое относится к TGF- β , является важнейшим регулятором развития костной ткани. К настоящему времени идентифицировано ~ 20 костных морфогенетических белков [381]. Из них костные морфогенетические белки КМБ - 2,-4,-5,-6,-7,-9 имеют непосредственное отношение к процессам хемотаксиса ММСК к дефекту костной ткани, пролиферации, дифференцировки, апоптозу, межклеточным взаимодействиям клеток остеобластического дифферона, синтезу белков экстрацеллюлярного матрикса, его минерализации, то есть – морфогенезу костной ткани [525, 304, 251, 504]. Однако только КМБ-2 и -7 обладают остеоиндуктивными свойствами [304], их роль представляется значительной. КМБ-3, -3b – осуществляют негативную регуляцию остеогенеза [229, 304].

КМБ секретируют остеобласты как составляющую внеклеточного экстрацеллюлярного матрикса не коллагеновой природы [510]. Вначале молекулы КМБ находятся в неактивном состоянии, после расщепления субтилинподобной протеазой образуются мономеры (100-140 аминокислот), из которых формируются активные димеры [116]. Высокая активность КМБ в ЭЦМ поддерживается аутокринно и паракринно [510, 201, 558].

Действие КМБ (-2,-3,-4,-7) опосредовано гетеродимерным рецепторным комплексом, состоящим из субъединиц – КМБ-рецептора-IA и -IB и КМБ-рецептора II, состоящих в свою очередь из субъединиц. Взаимодействие КМБ с рецепторным комплексом индуцирует

фосфорилирование специализированных белков Smad-1, -5, -8, расположенных в цитоплазме, после чего они перемещаются в ядро, где активируют транскрипцию целевых генов - Dlx5, Runx2, Osx. Возможен второй путь сигнализации, обусловленный КМБ – через каскад киназ, активирующих р38-митогенактивирующую протеинкиназу. После КМБ-индукции, Smad и р38 MAPK пути сходятся в точке активации генов, контролирующих дифференциацию мезенхимальных клеток-предшественниц в остеогенном направлении [71, 381, 519, 251].

Известно, что КМБ-2 и -4 действуют как синергисты. Регулируя образование и функцию остеобластов, они создают предпосылку для развития остеокластов, таким образом, поддерживая физиологическое соотношение количества остеобластов и остеокластов. Высказывалось мнение, что КМБ-2, -4, взаимодействуя с ноггином и другими антагонистами, осуществляют базовое управление скоростью костного ремоделирования и репарации кости, другие регуляторные сигналы (например, ростовые факторы, такие как фактор роста фибробластов-2, гормональные, биомеханические сигналы) более тонко регулируют остеогенез [201], в том числе изменяя экспрессию гена КМБ-2 в клетках остеобластического дифферона [344].

На различных экспериментальных животных (крысы, кролики, собаки, овцы) на модели перелома было доказано, что КМБ-2 индуцирует ортотопическое образование костной ткани и ускоряет репаративную регенерацию [485, 556, 374]. В последующих исследованиях было показано, что совместное применение факторов роста, например, КМБ-2 и фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) создает предпосылки для ускорения регенерации кости и ее васкуляризации. Поскольку КМБ-2 и VEGF вовлечены в регуляцию репарации кости через различные пути, ответ приобретает синергичный характер [374]. Эффект КМБ-2 потенцируется при его совместном использовании с фибронектином или активных фрагментов фибронектина [402]. Механизм заключается в расположении определенным образом доменов фибронектина, связывающих интегрин, и доменов фибронектина, связывающих КМБ, что облегчает взаимодействие КМБ с клеткой-мишенью [428]. КМБ-2 отводится центральная роль в остеоиндукции. Так, остеоиндуктивный эффект декальцинированного костного матрикса преимущественно определяется содержанием в нем КМБ-2 [402]. У мышей-мутантов, лишенных способности к продукции КМБ-2, при сохранившейся способности синтезировать другие регулирующие остеогенез молекулы, происходит нарушение остеогенеза, спонтанные переломы костей, то есть другие КМБ не могут компенсировать отсутствие КМБ-2 [510, 524].

КМБ-2 является многоцелевым фактором, помимо регуляторного воздействия на остеогенез, он способствует развитию кровеносных сосудов, непосредственно стимулируя эндотелиальные клетки [381], увеличивает экспрессию VEGF в остеобластах [270]. КМБ-2

увеличивает в культурах остеобластов уровень иРНК и концентрацию IGF-1 и -2 [247], стимулирующих метаболизм в костной ткани.

Полученные рекомбинантные формы КМБ-2 [347] были идентичны естественному КМБ-2 по структуре и продемонстрировали выраженную остеоиндуктивную активность. Хотя некоторые исследования показали, ускорение заживления перелома у животных с рчКМБ -2, введенным инъекционно в буфере [461], оптимальное формирование костной ткани происходит при введении рекомбинантного человеческого КМБ-2 (рчКМБ-2) на носителе [304]. Его роль – локализация после имплантации остеоиндуктора на участке биологического действия в течение клинически обоснованного времени, поскольку длительный выход малых или начальный выброс значительных количеств КМБ-2 отрицательно влияет на регенераторные процессы [492]. Материалы, используемые в качестве носителей для КМБ, можно разделить на несколько основных групп – деминерализованный костный матрикс [522, 433] отдельно или в сочетании, например, с альгинатным гелем [189], гиалуроновой кислотой [60]; коллагеновые губки и пасты [484, 511, 311, 214]; рассасывающиеся синтетические полимеры, такие как полимолочная и полигликолевая кислоты [565, 532, 536]; кальций-фосфатные соединения, включая кораллы, гидроксиапатит, трикальцийфосфат, сульфат кальция и их композиты [338, 433, 528, 341, 536, 542]; прочие, например, композиты: желатиновые губки – гидроксиапатит, желатиновые губки – полимеры (поли-лактид-со-гликолида), хитозан – наночастицы хондроитин сульфата [368, 480, 542], биоактивные стекла, фибрин [519].

Было показано, что при внесении в зону дефекта кости рчКМБ-2 ускоряет образование костной ткани, по морфологическим признакам не отличающейся от ткани соответствующей анатомической области, увеличивает минерализацию костной мозоли (на 20-60%) и прилежащего сегмента костной ткани и прочность регенератов (на 80%) [122, 449, 236, 237, 271].

Результаты, подтверждающие ускорение репарации при переломах и дефектах костной ткани, были получены многими исследовательскими группами на различных моделях и разных видах животных – крысы, кролики, собаки, приматы [382, 519, 547].

Полученные результаты послужили основанием для применения рчКМБ-2 в клинике с целью повышения эффективности репаративного остеогенеза. В 2002 году было проведено масштабное проспективное рандомизированное контролируемое, одиночное слепое исследование для оценки безопасности и эффективности использования рчКМБ-2 при заживлении открытых переломов костей голени. Были оценены результаты лечения 450 пациентов, разделенных на 3 группы: в первой группе производили фиксацию костных отломков интрамедуллярным стержнем и послойное ушивание мягких тканей. Во второй группе – выполняли интрамедуллярную фиксацию костных отломков, наложение на зону

перелома коллагеновой губки, содержащей 0,75 мг/мл (6 мг) рЧКМБ-2, ушивание мягких тканей. В третьей группе отличие заключалось в дозе рЧКМБ-2 – 1,5 мг/мл (12 мг). В результате было доказано, что при введении в зону дефекта рЧКМБ-2 уменьшаются сроки консолидации открытых переломов большеберцовой кости (на 33%), ускоряется заживление мягких тканей, уменьшается количество инфекционных осложнений, в результате значительно снижается потребность во вторичных инвазивных вмешательствах [311].

С 2002 г. по решению FDA (Управления по контролю за продуктами и лекарствами, USA) препарат «Infuse» (Medtronic, Memphis, USA), содержащий коллаген и рЧКМБ-2, был разрешен к применению в качестве лекарственного средства, для стимуляции остеогенеза при выполнении межтелового спондилодеза поясничного отдела позвоночника из переднего доступа с использованием LT-кейджа (Medtronic), выполняемого по поводу остеохондроза, спондилолистеза или ретролистеза на уровне L2-S1 позвоночника и лечения открытых переломов большеберцовой кости в качестве замены аутооттрансплантатов.

Однако по мере накопления клинического материала и долгосрочных наблюдений за пациентами, в литературе развернулась бурная дискуссия по поводу побочных эффектов, выявляемых при использовании «Infuse». В ходе разбирательства выявили, что в ~ 85% случаев [286] препарат использовали вопреки рекомендациям, нарушения касались области применения и используемых доз. Наиболее освещены в литературе осложнения, возникшие при использовании «Infuse» у пациентов с межтеловым спондилодезом шейного отдела позвоночника [280] и межтеловым спондилодезом поясничного отдела позвоночника (posterior и transforaminal lumbar interbody fusions – PLIFs, TLIFs). В многочисленных ретроспективных исследованиях осложнения, связанные с применением КМБ-2, в послеоперационном периоде были отмечены в 5,8-23,2% случаев (обструкция дыхательных путей, одышка, дыхательная недостаточность, дисфагия, выраженное воспаление мягких тканей на 2-7-е сутки после операции, охриплость голоса [420, 561, 280]). Заключение – применение «Infuse», при выполнении переднего межтелового спондилодеза шейного отдела позвоночника, создает неприемлемый риск со стороны дыхательной системы [561].

Мнения о безопасности использования «Infuse» при операциях на поясничном отделе позвоночника расходятся, ряд авторов указывают на развитие остеолита, образование субхондральных кист при высокой концентрации КМБ-2, неврологических нарушений, обусловленных значительной гетеротопической оссификацией, в том числе, в пределах позвоночного канала, раневую инфекцию. Авторы данного исследования считают, что применение «Infuse» при миниинвазивных вмешательствах приводило к значительному ускорению формирования артродеза, но, даже при "очень низкой дозе" КМБ-2, были выявлены несколько осложнений [556, 398, 280]. В другом ретроспективном исследовании, осложнения

были оценены у 1037-и пациентов, перенесших заднебоковой спондилодез с использованием «Infuse». Осложнения отмечены у 190 из 1037 пациентов (18,3%), из них непосредственно соотнесены с применением «Infuse» 0,6% (осложнения у 6-и пациентов). Соответственно авторы пришли к выводу, что препарат на основе КМБ-2 относительно безопасен и эффективен и может быть использован при формировании заднебокового артродеза в поясничном отделе позвоночника [308].

Приведенные примеры демонстрируют необходимость дальнейшего изучения влияния рекомбинантных факторов роста на ткани организма как *in vitro*, так и *in vivo* с разработкой жестких протоколов применения, где особое внимание должно быть уделено допустимым дозам, используемых препаратов. Одним из подходов к снижению отрицательного влияния КМБ-2 является применение носителей, способных удерживать его в области дефекта, не позволяя проникать в прилежащие ткани. Так, недавно исследователи представили новый композитный носитель, сформированный послойно, и состоящий из титановой подложки, покрытой слоем TiO_2 нанотрубочек и далее многослойным покрытием из желатина и хитозана, содержащим КМБ-2 и обеспечивающим контролируемый его выход в прилежащие ткани [343].

1.9. Обоснование применения наночастиц гидроксиапатита, внедренных в поры титанового имплантата с алмазоподобной пленкой, для замещения дефекта костной ткани

Гидроксиапатит (ГА), является химическим эквивалентом минеральной составляющей костной ткани. В костной ткани кристаллы частиц ГА имеют пластинчатую (длина – 15-200 нм, ширина – 10-80 нм, толщина – 2-7 нм [293]) или шаровидную форму, располагаются между плотно упакованными коллагеновыми фибриллами и обеспечивают механическую прочность костной ткани [65].

ГА обладает широким диапазоном возможных свойств (по прочности, степени пористости, скорости резорбции, происхождению и т.д.), биосовместимостью, способен замещать утраченный объем костной ткани, не обладает иммуногенностью, поэтому его используют в качестве кондуктивного остезамещающего материала. Однако применение имплантатов из ГА в травматологии и ортопедии ограничено, особенно с размерами пор более 100 мкм (обеспечивающих колонизацию пор остеогенными клетками и васкуляризацию кости) из-за хрупкости и низкого сопротивления усталостному разрушению, чаще фосфаты кальция используют в качестве наполнителей или в виде покрытий [24, 158].

Структурные особенности покрытий или наполнителей, такие как фазовый состав, размер зерна, кристалличность, оказывают существенное влияние на их биологические свойства [158, 361]. Были высказаны предположения, что уменьшение размерности кристаллов ГА до величины, естественной для костной ткани приведет к улучшению процессов остеointеграции [219].

В настоящее время получены наночастицы ГА и наноструктурированные покрытия на основе ГА. Они обладают уникальными свойствами: частицы отличаются большой площадью поверхности, изменяется поверхностная энергия; при наноструктурировании поверхностей, изменяется шероховатость и поверхностная энергия, что оказывает значительное влияние при контакте с ГА на выраженность, направленность ответа макрофагов и клеток остеобластического дифферона.

Характер взаимодействия клеток организма с наночастицами ГА активно изучают. Представленные в литературе данные не однозначны. Установлено что, адгезия остеобластов зависит не только от типа частиц (кристаллический ГА или аморфный фосфат кальция), но и их размера. По данным ряда авторов уменьшение частиц до наноразмера и снижение их кристалличности способствует улучшению адгезии, активирует пролиферацию остеобластов и подавляет апоптоз [500, 494, 495]. Имеются указания, что нанофазные покрытия на основе фосфатов кальция улучшают остеointеграцию пористых имплантатов [13].

При изучении взаимодействия остеобластов и частиц ГА было выявлено, что остеобласты активнее адгезируют, а в последующем активнее пролиферируют на поверхности наночастиц ГА размером 20 нм, по сравнению с частицами 56 нм и частицами микронного масштаба; уменьшение размера частиц ГА до наноразмеров приводит к уменьшению апоптоза остеобластоподобных клеток (MG63), по сравнению с частицами микронного масштаба [223, 500, 549, 411, 494, 495, 219]. Предполагаемый механизм действия наночастиц на остеобласты заключается в ориентации белков адгезии остеобластов, таких как витронектин, на границы зерна, что в свою очередь увеличивает адгезию остеобластов и изменяет их форму, а это в свою очередь влияет на пролиферативную активность клеток [549, 474].

Снижение кристалличности частиц также увеличивает адгезию остеобластов на них [157]. Отдельные работы посвящены изучению влияния формы кристаллов ГА на свойства контактирующих с ними остеобластов. Было показано, что клетки лучше адгезируют на сферические наночастицы, чем на кристаллы вытянутой формы [294].

В соответствии с другой гипотезой легко попадая в клетки эндоцитозом или пиноцитозом наночастицы ГА в лизосомах подвергаются деградации с высвобождением ионов, в том числе Ca^{2+} , увеличение Ca^{2+} в клетке приводит к инициации ее пролиферации и дифференцировки [294, 427, 219].

В результате изучения остеоинтеграции титановых имплантатов с наноструктурированным ГА покрытием, было выявлено увеличение площади контакта костной ткани с имплантатом, увеличение прочности интерфейса костное ложе-имплантат при внедрении кроликам титановых имплантатов с наноструктурированным ГА покрытием [432].

Однако некоторые авторы отмечают, что наночастицы ГА образуют в биологической среде агломераты, которые активно поглощают человеческие макрофаги с образованием поверхностно-связанных компартментов (surface-connected compartment) [419] и вызывают дозо-зависимый цитотоксический эффект [422]; при размере частиц ГА 30-80 нм (концентрация 20-200 мкг/мл) было выявлено дозо-зависимое ингибирование пролиферативной активности клеток моноцитарно/макрофагальной линии, апоптоз, увеличение уровня p53. Предполагаемый механизм развития апоптоза – инициация фосфорилирования p53 [509].

В исследовании Z.Shi (2009), было показано, что при контакте клеток остеогенной саркомы с наноГА происходила потеря межклеточных контактов, клетки уменьшались в размерах, митохондрии набухали, форма ядер изменялась, хроматин уплотнялся. Наночастицы ГА 80 нм были более цитотоксичны, чем частицы 20 нм. Во внутриклеточном пути передачи сигнала показано участие каспазы-9 [494]. В исследованиях X.Zhu (2006), K.Wei (2011) показано, что наноГА в виде покрытия на титановых образцах и частиц, введенных в трехмерную матрицу, снижали адгезию остеобластов и индуцировали хорошо развитые длинные и широкие филоподии и ламеллоподии, тем самым увеличивая подвижность клеток [567, 551].

Итак, представленные в литературе данные о взаимодействии наночастиц ГА, макрофагов и остеобластов не позволяют сделать заключение об эффектах наночастиц ГА, тем более при внедрении их *in vivo* в составе композитного имплантата.

1.10. Заключение

Титан является одним из наиболее коррозиестойчивых, электрохимически инертных, биотолерантных металлов, что определяет его широкое применение в травматологии и ортопедии для изготовления имплантатов. Однако любые металлические имплантаты не являются индифферентными по отношению к тканям организма. За счет биомеханического несоответствия металлов и кости при внедрении металлических имплантатов развивается стрессорное ремоделирование костной ткани, а в результате образования частиц износа имплантатов и коррозии металлов – местная хроническая воспалительная реакция с разной степенью участия иммунных механизмов, что в свою очередь инициирует нестабильность имплантатов.

Для оптимизации интеграции имплантатов, увеличения сроков их функционирования используют пористые металлы или пористые покрытия, модификацию поверхности имплантатов биоинертными или биоактивными покрытиями, стимуляцию остеогенеза.

Исходя из вышесказанного применение пористых титановых имплантатов для замещения дефектов костной ткани оправдано, однако сведений об остеоинтеграции пористых титановых имплантатов, полученных методом компактирования пористых титановых гранул, как и об оптимальном соотношении пористости и прочности таких имплантатов в доступной нам литературе не обнаружено. Учитывая отсутствие цитотоксичности алмазоподобных пленок, их способности изолировать металлические поверхности от тканей организма, покрытие ими пористых титановых матриц является перспективным техническим решением для улучшения свойств костных имплантатов.

Однако при оценке биосовместимости алмазоподобных пленок абсолютное большинство исследований было выполнено *in vitro*, и ограничивались культивированием клеток в течение 1-14 суток. Сведений о хроническом эксперименте *in vivo*, в котором бы оценивалось влияние алмазоподобных пленок, нанесенных на пористый титан, прежде всего на костную ткань, а так же другие ткани организма в доступной литературе мы не обнаружили. Сведения о механизмах влияния алмазоподобных пленок на клетки мезенхимальных линий немногочисленны, получены при культуральных исследованиях и требуют подтверждения в хроническом эксперименте *in vivo*. Кроме того свойства композита могут значительно отличаться от свойств исходных материалов, методы получения титановой матрицы и нанесения алмазоподобной пленки в значительной мере определяют конечные свойства композита.

В литературе отсутствуют сведения о свойствах композитов «пористая матрица-новообразованная костная ткань» при использовании пористых титановых матриц с алмазоподобными покрытиями для замещения дефектов костной ткани.

Перспективным представляется применения пористых титановых матриц с алмазоподобным покрытием в качестве скэффолдов для аутологических миеелокариоцитов, КМБ-2 в качестве стимуляторов остеогенеза, наночастиц ГА.

ГЛАВА 2

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Для решения поставленных в работе задач был использован экспериментальный метод.

Все исследования проводили с соблюдением принципа гуманной методологии медико-биологических экспериментов на животных, учитывая требования ГОСТ Р ИСО 10993.2-99 от 01.07.2010, главы 25, ст. 245 УК РФ, Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях N123, от 18.03.1986 и протокола к ней от 22.06.1998 [55, 178, 283], а также в соответствии с «Международными рекомендациями по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» Международного совета медицинских научных организаций (CIOMS), 1985 года [46, 188].

План проведения эксперимента, его новизна, допустимость и приемлемость были утверждены на заседании Ученого Совета ФГБУ «УНИИТО им. В.Д. Чаклина» Минздрава РФ от 25.01.2011 (протокол Ученого Совета № 10) и на заседании комитета по этике ФГБУ УНИИТО им. В.Д. Чаклина Минздрава России от 17 июня 2015 (протокол № 31).

Кроликов содержали в стандартных условиях экспериментального отделения¹ ГБОУ ВПО Уральской государственной медицинской академии Минздрава России. Овцы для эксперимента поступали из частного фермерского хозяйства, через 3-4 недели после операции их переводили обратно на ферму.

2.1. Дизайн исследования

Существует несколько методологических подходов исследования биосовместимости материалов, используемых для имплантации. В качестве скрининга обычно используют методы *in vitro*, следующий этап – исследование *in vivo*. Оба подхода имеют свои преимущества и недостатки. Исследования *in vitro* не позволяют оценить множественность факторов, воздействующих в организме на имплантат, и реакцию тканей организма на имплантацию. Однако они требуют меньше материальных затрат и времени, легче воспроизводимы. Исследования *in vivo* длительные, дорогостоящие и при этом обычно не полностью воспроизводят определенную патологию человека, а полученные результаты часто имеют

¹ заведующий канд. мед наук А.И. Исайкин

значительный (функциональный) разброс. В данном исследовании использовали культуральные методы и эксперименты на животных.

Распределение животных по сериям:

- 1 серия – исследование адгезии, пролиферации прилипающей фракции миелокариоцитов, активности оксидоредуктаз при культивировании на образцах полированного титана (ПолTi), полированного титана с алмазоподобной пленкой (ПолTi(a-C)), полированного титана с композитной пленкой (ПолTi(CN_{0,25})), пористые титановые пластины (ПлTi₄₀), ПлTi₄₀(a-C), ПлTi₄₀(CN_{0,25}). Количество животных – 7 кроликов, 5 мышей. Сроки наблюдения от 4 часов до 32-х суток культивирования.
- 2 серия – исследование особенностей морфологии и морфометрии новообразованной костной ткани. Каждому кролику внедряли по 2 имплантата в обе тазовые конечности. Сроки наблюдения – 4, 16, 32, 52 недели после операции.
Заполнение дефектов ПTi₄₀МК – 1 группа, внедрено 44 имплантата.
Заполнение дефектов ПTi₄₀(a-C)МК – 2 группа, внедрено 44 имплантата.
Заполнение дефектов ПTi₄₀(CN_{0,25})МК – 3 группа, внедрено 16 имплантатов.
- 3 серия – исследование прочности (на разрыв) новообразованной костной ткани. Каждому кролику внедряли по 2 имплантата в правую тазовую конечность, левая, не оперированная конечность, являлась контрольной. Сроки наблюдения – 4, 16, 52 недели после операции.
Заполнение дефектов ПTi₄₀МК – 1 группа, внедрено 20 имплантатов.
Заполнение дефектов ПTi₄₀(a-C)МК – 2 группа, внедрено 12 имплантатов.
Заполнение дефектов ПTi₄₀(CN_{0,25})МК – 3 группа, внедрено 10 имплантатов.
- 4 серия – исследование влияния титановых имплантатов на метаболизм костной, мышечной тканей, кроветворение, регионарные лимфатические узлы, селезенку, периферическую кровь, морфологию костной ткани. Каждому кролику внедряли по 2 имплантата в правую тазовую конечность, в левой конечности моделировали незаполненные дефекты большеберцовых и бедренных костей. Сроки наблюдения – 4, 16, 52 недели после операции.
Заполнение дефектов ПTi₄₀МК – 1 группа, внедрено 36 имплантатов.
Заполнение дефектов ПTi₄₀(a-C)МК – 2 группа, внедрено 34 имплантатов.
Заполнение дефектов ПTi₄₀(CN_{0,25})МК – 3 группа, внедрено 36 имплантатов.
- 5 серия – исследование влияния на свойства новообразованной костной ткани сочетанного использования ПTi₄₀(a-C) и прилипающей фракции миелокариоцитов, увеличенных в количестве культивированием в течение 14 суток. Каждому кролику внедряли по 2

имплантата в обе тазовые конечности, всего внедрено 12 имплантатов. Сроки наблюдения – 2, 4 недели.

Заполнение дефектов $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ – 1 группа.

Заполнение дефектов $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ – 2 группа (контроль).

6 серия – исследование особенностей остеоинтеграции $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$. Каждому кролику внедряли по 4 имплантата, внедрено 24 имплантата. Сроки наблюдения – 4, 16, 52 недели после операции.

7 серия – исследование особенностей остеоинтеграции при сочетанном использовании $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ и КМБ-2. Сроки наблюдения – 4, 16 недель после операции.

Изучение новообразованной костной ткани в искусственных дефектах костной ткани, не заполненных имплантатами (отрицательный контроль) – 1 группа. У кроликов смоделировано 6 искусственных дефектов костной ткани;

Заполнение дефектов $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ДКМ}$ – 2 группа. Кроликам внедрено 6 имплантатов (контроль остаточной остеогенной активности ДКМ);

Заполнение дефектов $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ДКМ-рЧКМБ-2(I)}$ – 3 группа. Кроликам внедрено 10 имплантатов. Доза рЧКМБ-2 – составляла 0,0194-0,036 мг/имплантат;

Заполнение дефектов $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ДКМ-рЧКМБ-2(II)}$ – 4 группа. Кроликам внедрено 12 имплантатов. Доза рЧКМБ-2 – составляла 0,063-0,068 мг/имплантат;

Заполнение дефектов $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ДКМ-рЧКМБ-2(III)}$ – 5 группа. Кроликам внедрено 11 имплантатов. Доза рЧКМБ-2 – составляла 0,132-0,193 мг/имплантат.

Заполнение дефектов $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ – 6 группа. Кроликам внедрено 7 имплантатов (положительный контроль).

8 серия – 6 интактных кроликов

9 серия – определение оптимальной объемной доли пор в $\text{PTi}(\text{a-C})\text{МК}$ и прочностных свойств (на сжатие) блока « $\text{PTi}(\text{a-C})\square\text{МК}$ – новообразованная в порах костная ткань». Экспериментальные животные – овцы. Сроки наблюдения 4, 24, 52 недели. Внедрено 36 имплантатов.

Заполнение дефектов $\text{PTi}_{30}(\text{a-C})\square\text{МК}$, объемная доля пор титановой матрицы 30%;

Заполнение дефектов $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\square\text{МК}$, объемная доля пор титановой матрицы 40%;

Заполнение дефектов $\text{PTi}_{50}(\text{a-C})\square\text{МК}$, объемная доля пор титановой матрицы 50%.

Для каждого срока наблюдения в каждой серии эксперимента кроликов тщательно подбирали. Это были половозрелые кролики породы Белый и Черный Великан стадного разведения из одного помета или братья и сестры от одного отца в возрасте 6-12 месяцев, исходного веса 3-4 кг. Эксперимент выполнен на 146-и кроликах, 133 кроликам проведены оперативные вмешательства.

Прооперировано двенадцать 6-9 месячных овец романовской породы имевших исходный вес 24-31 кг. Из них одна овца погибла через месяц после операции, явных причин смерти обнаружено не было. У двух баранов на 1-е, 2-е сутки после операции было выявлено нарушение опороспособности задних конечностей, вызвавшее адинамию. По результатам клинического и рентгенологического исследований диагностированы у первого – спиральный перелом бедренной кости в верхней трети (выше места введения имплантата), у второго – перелом бедренной кости в месте введения имплантата с левой стороны, справа – перелом костей голени также в зоне оперативного вмешательства, в связи, с чем они были выведены из эксперимента внепланово.

Таким образом, в данной работе проанализированы результаты исследований по внедрению 334 имплантатов 133 кроликам, 6 интактных кроликов; введения 36 имплантатов 9-и овцам. Интактные 5 двух месячных мышей самцов (лаборатория экспериментального медицинского моделирования НИИ фармакологии СО РАН чистой линии СВА/CaLac, массой 18-20 г., данный фрагмент эксперимента был выполнен на базе ГУ НИИ фармакологии Томского НЦ СО РАН в лаборатории патофизиологии) и 7 кроликов использованы как доноры костного мозга при выполнении культуральных исследований.

Выведение животных из эксперимента осуществляли по плану, введением летальной дозы золетила.

2.2. Характеристика и способы получения имплантатов

В эксперименте *iv vitro* использовали образцы 5-и типов:

1. ПолTi – диски полированного титана (диаметр 5 мм, толщина 2 мм);
2. ПлTi₄₀ – пористые титановые пластины ((8x8)x2 мм) с пористостью (θ) = 40 %;
3. ПлTi₄₀(a-C) – пористые титановые пластины ((8x8)x2 мм), θ =40 %, с алмазоподобной пленкой;
4. ПлTi₄₀(CN_{0,25}) – пористые титановые пластины ((8x8)x2 мм), θ = 40%, с композитной азотсодержащей алмазоподобной пленкой, содержание азота в пленке 25 ат.%;
5. ПлTi₄₀(CN_{0,5}) – пористые титановые пластины ((8x8)x2 мм), с θ = 40%, с композитной азотсодержащей алмазоподобной пленкой, содержание азота в пленке 33 ат. %.

В эксперименте *iv vivo* использовали имплантаты 6-и типов, имеющих цилиндрическую форму (диаметром 4,5 мм, длиной 5 мм) (эксперименты на кроликах) и трапецевидные в сечении имплантаты (четыре плоскости имплантата представляли собой равнобедренные

трапеции высотой 10 мм, две – прямоугольники размером (15 x 10) и (14 x 9) мм)) (эксперименты на овцах):

1. PTi_{40} – цилиндрические имплантаты из пористого титана, $\theta = 40\%$;
2. $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ – цилиндрические имплантаты из пористого титана, $\theta = 40\%$, с алмазоподобной пленкой;
3. $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})$ – цилиндрические имплантаты из пористого титана, $\theta = 40\%$, с композитной азотсодержащей алмазоподобной пленкой, содержание азота в пленке 25 ат.%;
4. $\text{PTi}_{30}(\text{a-C})\square$ – трапециевидные в сечении имплантаты из пористого титана, $\theta = 30\%$, с алмазоподобной пленкой;
5. $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\square$ – трапециевидные в сечении имплантаты из пористого титана, $\theta = 40\%$, с алмазоподобной пленкой;
6. $\text{PTi}_{50}(\text{a-C})\square$ – трапециевидные в сечении имплантаты из пористого титана, с $\theta = 50\%$, с алмазоподобной пленкой (рисунок 2.2.1).



Рисунок 2.2.1 – Образцы титана пористого, полированного титана и пористые титановые имплантаты для испытаний *in vitro* и *in vivo*

Образцы полированного титана для исследований были изготовлены² из технически чистого титана (BT1-0). Его состав: Ti 98,1-99,7%, примесей замещения не более Fe-0,18, Si-0,1 вес.%; примесей внедрения не более C-0,07, O-0,12, N-0,04 вес.%. Поверхность заготовок дисков обрабатывали наждачной бумагой, промывали спиртом в ультразвуковой ванне, осуществляли электрополировку при 15°C в смеси хлорной кислоты (HClO_4) и уксусного ангидрида ($(\text{CH}_3\text{CO})_2\text{O}$). Методом сканирующей туннельной микроскопии на микроскопе СММ-2000Т (ООО «КПД», Зеленоград, Россия) осуществляли контроль шероховатости поверхности образцов титана: в пяти точках поверхности сканировали области по пяти сканам размером 40x40 мкм, где определяли среднюю шероховатость образца (R_a), размах высот по 10 наиболее выступающим точкам поверхности образца (R_z). У полированных образцов титана $R_a = 30$ нм, $R_z = 200$ нм [175, 158].

² Экспериментальные образцы титана и имплантатов были изготовлены сотрудниками Ордена Трудового Красного Знамени института физики металлов Уральского отделения РАН канд. техн. наук В.И. Новоженовым, С.Ю.Орловым.

Пористые имплантаты получали из отсева гранул губчатого титана ТГ-120М (ГОСТ 17746, фракция -12 ± 2) производства ВСМПО АВИСМА (Россия). Данный титан имеет следующие характеристики в вес. %: не менее 99,49% титана, не более 0,24 вес. % Fe, 0,064 вес. % Mg, 0,025 вес. % Ni, 0,041 вес. % Cl, 0,007 вес. % C, а также газовые примеси в количестве 0,089 вес. % Cl, 0,007 вес. % N, 0,041 вес. % O. После компактирования и спекания образцы имели следующий состав: 98,68% титана, 0,555 вес. % Fe, 0,022 вес. % Mg, 0,032 вес. % Ni, 0,028 вес. % Cr, а также газовые примеси в количестве 0,24 вес. % Cl, 0,005 вес. % N, 0,388 вес. % O, 0,048 вес. % C, титана 98,68%.

Гранулы (пористость 46%) промывали в дистиллированной воде в ультразвуковой ванне, высушивали на воздухе, отжигали в вакууме ($P=10^{-3}$ Па), компактировали в цилиндрических или квадратного сечения пресс-формах при нагрузках от 1,5 до 5 тонн (удельное давление 3-5 кг/см²) [175, 158]. Сформированный компакт очищали химическим травлением в 8% растворе плавиковой кислоты (HF), отмывали от кислоты кипячением 3 раза по 1 часу в дистиллированной воде со сменой воды, отжигали в вакууме при 1100⁰С – 2 часа.

Из приведенных результатов исследования механических свойств полученного компакта (таблица 2.2.1) [175, 158] видно, что при увеличении пористости более 50% резко снижается прочность при изгибе и ударная вязкость компакта, а модуль Юнга уменьшается уже при пористости более 40%.

Таблица 2.2.1– Механические свойства отожженного пористого титанового компакта

Объемная доля пор θ , %	Прочность на изгиб $\sigma_{изг}$, МПа	Ударная вязкость K_c кН/м	Условный предел текучести $\sigma_{0,2}$, МПа	Модуль Юнга E , ГПа
20	155,0	42	-	-
40	42,7	16	64	3,4
50	25,5	14	31	0,5
60	8,8	5	-	-

Системы пор титана, полученного данным методом, содержит макроканалы сечением 100-500 мкм, распределенные случайным образом (рисунок 2.2.2а), и поры микронного масштаба (рисунок 2.2.2б). Макроканалы определяют основные свойства системы пор в конечном продукте [53, 175].

Доля пор, сообщающихся с поверхностью при пористости от 35 до 55%, составляет 75±8%. За 30 минут все сообщающиеся с поверхностью поры в образцах имплантатов полностью заполняются жидкостью (дистиллированная вода или среда 199, содержащая 20% эмбриональной телячьей сыворотки).

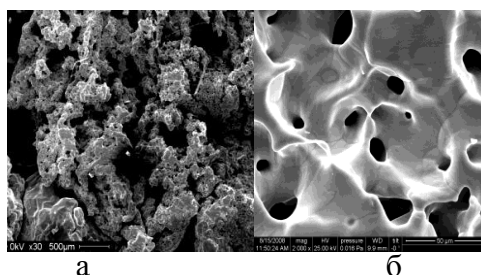


Рисунок 2.2.2 – Пористые титановые имплантаты для испытаний *in vitro* и *in vivo*. Сканирующая электронная микроскопия. а – макроканалы сечением 100-500 мкм, являющиеся промежутками между спрессованными и спекшимися при отжиге гранулами, б – микроканалы, сохранившиеся от пористости в исходных гранулах после прессования

На часть готовых титановых имплантатов наносили углеродсодержащие пленки методом импульсного дугового распыления графитовой мишени³. Перед нанесением пленок осуществляли ионное травление поверхности титана ионами Ar^+ ($E=4$ кэВ) в вакууме ($P=6 \times 10^{-2}$ Па) в течение 30 минут. В результате удался слой толщиной $\approx 0,1$ мм.

Пленки осаждали на установке нанесения упрочняющих покрытий УВНИИПА-1-001 (Инв. № 60739) в условиях вакуума ($P=5 \times 10^{-3}$ Па) или в атмосфере азота ($P=1-5$ Па) при частоте импульсов 1 Гц⁴. В вакууме образуется алмазоподобная пленка (а-С) в атмосфере азота – композитная (CN_x) [146] (рисунок 2.2.3).

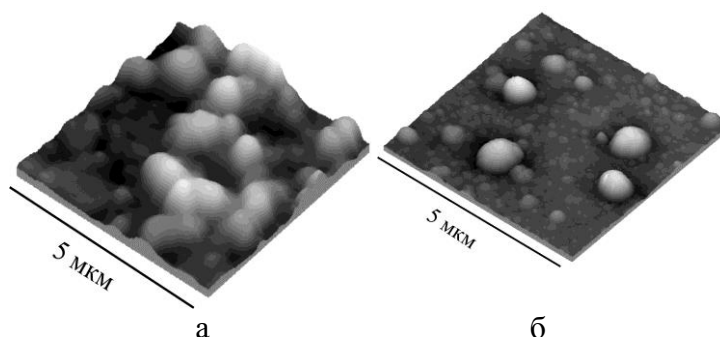


Рисунок 2.2.3 – Морфология углеродсодержащих нерезорбируемых пленок а – алмазоподобной пленки, б – композитной пленки $\text{CN}_{0,25}$.

Атомно-силовая микроскопия

Толщина пленок составляла от 30 до 50 нм. Содержание азота в пленке (от 0 до 33 ат.%) было обусловлено давлением газа в камере. Концентрацию азота в пленке контролировали методом ядерного микроанализа на пучке дейтронов с энергией 900 кэВ по ядерной реакции $^{14}\text{N} (d, \alpha)^{12}\text{C}$. В качестве свидетеля-эталоны использовали пленку нитрида титана с известной

³ Алмазоподобные пленки на экспериментальные образцы наносил сотрудник Ордена Трудового Красного Знамени института физики металлов Уральского отделения РАН ведущий технолог В.А.Югов.

⁴ Морфологию и свойства пленок исследовали сотрудники Ордена Трудового Красного Знамени института физики металлов Уральского отделения РАН канд. физ.-мат. наук А.П.Рубштейн и канд. физ.-мат. наук И.Ш.Трахтенберг.

концентрацией азота. Контроль качества адгезии пленки оценивали методом термоциклирования: проводили 100 циклов термоциклирования путем нагрева образцов до 373K и охлаждения до 77,2 K.

Для равномерного нанесения пленки на всю поверхность образца ионно-плазменной установки камера оснащена держателем карусельного типа.

Свойства а-С пленки, полученной в вакууме импульсно-дуговым распылением графитовой мишени: количество sp^3 -связей в пленках по данным Рамановской спектроскопии составляет 70-80%, они являются изоляторами [42]. К особенностям топографии поверхности пленок относится доменная структура с декорированным вдоль границ рельефом. Средняя шероховатость поверхности пленки толщиной ~ 100 нм внутри доменов $R_a \sim 30 \pm 4$ нм. Границы доменов представляют собой цепочки пиков пирамидальной формы высотой $\sim 150-200$ нм (рисунок 2.2.4). Эти пики представляют фрагменты пучков нанотрубок, которые в своей сердцевине сохраняют трубчатую структуру [69], а по периферии – переходные структуры в направлении от трубчатой формы к аморфной алмазоподобной. Плотность таких пиков на поверхности пленки $\sim 10^7$ см $^{-2}$, т.е. среднее расстояние между ними составляет ~ 3 мкм. На поверхности имеются также отдельные наросты высотой более 300 нм. Среднее расстояние между ними составляет ~ 30 мкм [156].

При образовании пленки в атмосфере азота образуется композитная пленка, состоящая из доменов а-С и C_2N . При увеличении концентрации азота происходит снижение количества sp^3 -связей и, соответственно, увеличивается количество sp^2 -связей. Граница между этими домена обладает свойством электропроводимости, в наибольшей степени проводимость выражена в пленках с равным количеством доменов, т.е. при $x=0,25$ [45]. Особенностью топографии этого типа пленки является наличие глобулярных структур имеющих размеры от 20 до 800 нм.

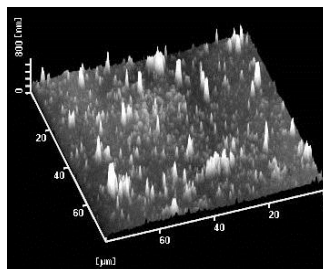


Рисунок 2.2.4 – Отдельные пики и их цепочки, имеющие в составе нанотрубки.
Атомно-силовая микроскопия

С увеличением концентрации азота и толщины пленки происходит увеличение шероховатости поверхности пленки. При толщине пленки $CN_{0,25} \approx 100$ нм, средняя шероховатость $R_a = 21 \pm 8$ нм [156]. Увеличение концентрации азота в пленке приводит к возрастанию гидрофильности

поверхности образцов. Готовые образцы и имплантаты стерилизовали автоклавированием при 132°C 20 минут.

2.3. Методы исследования *in vitro*

При работе с миелокариоцитами использовали четыре варианта полной культуральной среды и транспортную среду. Их состав приведен ниже.

Среда I (транспортная) – среда RPMI-1640 или 199 (ФГУ ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор»), содержащая 5% эмбриональной сыворотки телят (ПанЭКО), L-глутамин (ПанЭКО) в количестве 30 мг/100 мл среды, гентамицин 100 мкг/1 мл среды (Marichem AG), гепарин 50 ЕД/1 мл среды.

Среда II – среда 199 или RPMI-1640 (ФГУ ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор»), содержащая 20% эмбриональной сыворотки телят (Thermo Fisher Scientific, ПанЭКО), L-глутамин («ПанЭКО») 30 мг/100 мл среды, гентамицин 50 мкг/1 мл среды (Marichem AG), гепарин 50 ЕД/1 мл среды.

Среда III (полувязкая) – среда RPMI-1640 (ФГУ ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор»), содержащая 20% эмбриональной сыворотки телят (Thermo Fisher Scientific, ПанЭКО), L-глутамин (ПанЭКО) 30 мг/100 мл среды, гентамицин 50 мкг/1 мл среды (Marichem AG), 5 000ЕД/1 мл среды, метилцеллюлоза (Sigma) – конечная концентрация в среде 3%.

Среда IV – среда McCoy's 5A (BioWhittaker^RLonza), содержащая 30% эмбриональной сыворотки телят (HyClone, Thermo Fisher Scientific), L-глутамин (Sigma, ПанЭКО) 30 мг/100 мл среды, гентамицин (Marichem AG), 5 мг/100мл, гепарин-натрий (Braun) 50 ЕД/1 мл среды.

Среда V – полужидкая синтетическая готовая среда MethoCultTM P4535 (содержащая эритропоэтин, рекомбинантные человеческие факторы – фактор стволовых клеток, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ИЛ-3, IL-6, G-CSF).

В качестве отсеоиндуктора использовали 0,01М β-глицерофосфат кальция [51].

Исследования *in vitro* выполнены на клетках костного мозга кроликов и мышей. У кроликов под общим наркозом (золетил – 6 мг/кг) костный мозг забирали в условиях асептики и антисептики методом пункции костного мозга из крыла подвздошной кости в среду I. У мышей после забоя – из костномозгового канала большеберцовых и бедренных костей методом аспирации так же в транспортную среду.

Дальнейшие манипуляции с миелокариоцитами осуществляли в силиконированных пробирках. Миелокариоциты отмывали от жирового костного мозга избытком полной культуральной среды II. Для этого суспензию клеток костного мозга центрифугировали при 1000 оборотов/минуту 20 минут, удаляли жировой костный мозг и надосадок, а клетки ресуспендировали в свежей среде II. Жизнеспособность миелокариоцитов оценивали после

окрашивания 0,4% трипановым синим на изотоническом растворе NaCl в камере Горяева. Окрашивание клеток оценивали как признак необратимого повреждения цитоплазматической мембраны. Доводили клеточность суспензии до $(5-6) \times 10^6$ живых клеток/мл среды.

Для культивирования миелокариоцитов использовали апиrogenные стерильные полистероловые 24-луночные планшеты (SPL Lifesciences, Castor). В лунки вносили по 1 мл суспензии миелокариоцитов и по одному тестируемому стерильному образцу. Образцы инкубировали в течение 2-х часов, за это время миелокариоциты с культуральной средой проникали в поры имплантата, где адгезировали на внутреннюю поверхность пор. После чего образцы переносили в новую лунку, содержащую полную культуральную среду. Культивирование осуществляли в CO₂-инкубаторе CELL 48 (стандартная линия) в стандартных условиях при 37°C, во влажной атмосфере, при 4% CO₂. Смену 60% среды осуществляли 2 раза в неделю. Культивирование клеток проводили в течение 3-32 суток. Особенности культуральной среды (она не содержала индукторов гемопоэза, таких как эритропоэтин) приводило к тому, что гемопоэтические клетки, выявляемые в начале культивирования, не пролиферировали и не дифференцировались, а это приводило к тому, что гемопоэтические клетки постепенно удалялись со сменой среды.

Цитотоксичность образцов оценивали, используя простые легко стандартизируемые тесты. Для этого унифицированным биохимическим методом (описание используемых биохимических методов приведено в разделе 2.3.3.2) изучали концентрацию ЛДГ в супернатанте клеток как характеристику целостности цитоплазматических мембран клеток после их инкубации с исследуемыми образцами в течение 4 часов. В качестве оценки функциональной активности клеток, по способности клеточной суспензии восстанавливать 0,4% нитросиний тетразолий (Германия) в течение 2 часов с автоматическим учетом результатов на СФ-26 при длине волны 620 нм [90, 70].

Адгезию миелокариоцитов исследовали с использованием полированных дисков титана с пленками и без пленок одинаковой шероховатости, для исключения влияния макрорельефа поверхности образца на данный показатель. Для этого исследуемые образцы инкубировали с миелокариоцитами в течение 4 часов. Затем их однократно отмывали от не адгезировавших клеток средой I. После чего диски с адгезировавшими на них клетками переносили в лунки, содержащие 0,5 мл 0,25% трипсин-ЕДТА (Sigma) на 15 минут. Клетки осторожно ресуспендировали и переносили в силиконированные пробирки, где реанимировали в одинаковом объеме среды 199 и эмбриональной сыворотки телят (1:1). Количество клеток подсчитывали в камере Горяева и выражали в количестве $\times 10^6$ /мл среды.

Для оценки влияния образцов титана с пленками и без покрытия на колониеобразующую способность костномозговых прекурсоров миелокариоциты культивировали в присутствии исследуемых образцов в лунке или непосредственно на поверхности образцов.

Культивирование в лунке с образцом или без него (контроль) использовали в пилотном исследовании на мышах, выполненном на базе ГУ НИИ фармакологии Томского НЦ СО РАН в лаборатории патофизиологии, где клонировали прилипающую и неприлипающую фракции миелокариоцитов в среде III (плотность посева в этой серии составляла 5×10^5 живых миелокариоцитов/мл).

Колонии (колониеобразующие единицы, содержащие более 50 нуклеаров) и кластеры (колониеобразующие единицы, содержащие не менее 5 нуклеаров) в лунке подсчитывали визуально с помощью инвертированного микроскопа (ув. x40, x100, x200, 400). Расчет индекса созревания КОЕ (соотношение количества кластеров к колониям) позволил оценить интенсивность дифференцировки клеток-предшественниц [51].

Культивирование прилипающей фракции миелокариоцитов кролика в присутствии образцов пористого титана с пленками или без пленок осуществляли в среде IV в стандартных условиях. Морфологию клеток, культивируемых в лунках без образцов (контроль) и в лунках с образцами, изучали после покраски азур-эозином II в световом микроскопе Leica DM1000 (сертификат соответствия DE.ИМ25.H01024). Площадь, занятую фибробластоподобными клетками оценивали с помощью аппаратно-программного комплекса видео «Тест-морфология 4,0». Для этого использовали функцию выделения и определения площади, занимаемую культурой фибробластоподобных клеток на фотографиях. Количество клеток, образованных в поверхностных порах имплантатов, оценивали «снимая» их с поверхности имплантатов 0,25% трипсин-ЕДТА и подсчитывая их количество в камере Горяева.

Культивирование миелокариоцитов на пористых титановых пластинах осуществляли в среде IV в стандартных условиях. Организацию клеточного слоя в поверхностных порах имплантатов изучали методом СЭМ⁵ после фиксации клеток 2,5% глутаральдегидом на фосфатном буфере (рН 7,4 – 20 минут) [159]. В дальнейшем препараты готовили по стандартной методике подготовки биологических объектов для электронной микроскопии: дегидратация в этаноле восходящей концентрации (30, 50, 70, 100%), 15 мин в смеси этанола с ацетоном, нанесение титана методом распыления в вакууме [8].

В среде V осуществляли культивирование гемопозитических предшественниц. Распознавание и подсчет кроветворных колоний осуществляли с помощью инвертированного

⁵ Сканирующую электронную микроскопию выполняли в Центре электронной микроскопии ИФМ УрО РАН Н.В.Николаева и канд. физ.-мат. наук А.П.Рубштейн

микроскопа по общепринятым морфологическим признакам без предварительной окраски препаратов [72].

2.4. Методы исследования *in vivo*

2.4.1. Насыщение пористых имплантатов миелокариоцитами, костным морфогенетическим белком, гидроксиапатитом

Наращивание клеточного материала проводили по одному протоколу для всех типов имплантатов. После 2-х часовой экспозиции имплантатов с суспензией миелокариоцитов в среде II, для того чтобы клетки с током жидкой культуральной среды могли проникнуть в поры имплантата и адгезировать на его поверхность, имплантаты однократно осторожно промывали от не прикрепившихся клеток той же средой. Затем имплантат с прикрепившимися клетками переносили в новую стерильную лунку, содержащую среду IV и культивировали в стандартных условиях 14 суток.

После окончания культивирования каждый раз контролировали наличие жизнеспособных клеток, способных к пролиферации и миграции, по появлению колоний клеток на пластике под имплантатом и вокруг него.

Лиофилизированный 300 мг ДКМ с размером частиц менее 0,125 мм, с различным содержанием рЧКМБ-2 в стерильном боксе гомогенизировали в 200 мкл стерильного физиологического раствора. Стерильные титановые имплантаты взвешивали в условиях бокса, равномерно заполняли приготовленной пастой все поверхностные поры имплантатов, взвешивали их повторно для контроля массы нанесенной пасты. Масса пасты в имплантатах не различалась более, чем на 20%. Затем с ДКМ (рЧКМБ-2) имплантаты высушивали в стерильных условиях в течение 16 часов при +4°C и упаковывали.

Исходным материалом для получения наночастиц ГА служил порошок синтетического гидроксиапатита кальция (ЗАО НПП «БИОМЕД»). По данным рентгеновского фазового анализа он представлял собой смесь двух фаз: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – ГА и CaHPO_4 – монетит в соотношении 60:40 ат.%. Для измельчения ГА использовали высокоэнергетическую шаровую мельницу AGO2, помол производили при ускорении 40-60 g с периодическими остановками через 30 с, при этом температура не превышала 45°C. Загрязнение ГА железом (по данным спектрального анализа) не превышало 10⁻² вес. %. В ходе механической обработки в результате химической реакции происходило образование ГА из монетита [157]. Изменялась и форма кристаллов – исходный препарат состоял преимущественно из вытянутых частиц шириной 10-40 нм и на порядок большей длины (рисунок 2.2.6), объединенных в агломераты (~500 нм). При помол в течение 10 минут были обнаружены округлые частицы (10-130 нм, доля частиц размером менее 50 нм возрастала с 25% до 98%), агломераты от 300 нм и более (рисунок 2.2.6).

Для насыщения пористой структуры имплантата наночастицами ГА имплантаты погружались в суспензию, содержащую наночастицы ГА в этиловом спирте, и подвергали ультразвуковой обработке в течение 30 мин. После обработки ультразвуком образцы высушивались на воздухе 2 часа при 80⁰С и 4 часа при 150⁰С.

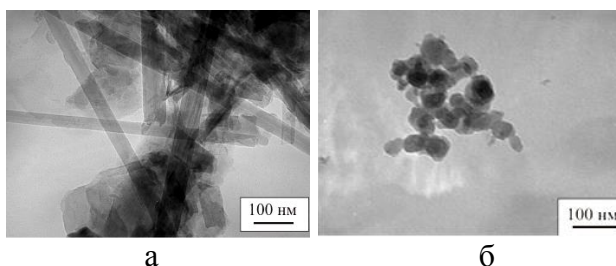


Рисунок 2.2.6 – Гидроксиапатит
а – исходные кристаллы гидроксиапатита;
б – наночастицы гидроксиапатита

2.4.2. Методика оперативного вмешательства

Кроликам в области операционного поля выстригали шерсть, кожу обрабатывали 70% спиртом. Оперативное вмешательство выполняли под общей анестезией⁶ – внутримышечно рометар 2% – 8 мг/кг (Rometar 2%, СПОФА, Чехия) и золетил – 6 мг/кг (Zoletil-100, «Virbac Sante Animale»). Для местного обезболивания использовали 0,25% новокаина, которым выполняли также гидравлическую препаровку тканей. Из продольного разреза 1,5-2 см по внутренней поверхности в области дистального метафиза бедренной кости выделяли поверхность кости, рассекали надкостницу и отслаивали её от кости на площади около 1 см². Сверлом 4 мм формировали искусственный цилиндрический дефект кости с проникновением в костномозговой канал. Сверлом 4,5 мм вход раззенковывали. В дефект устанавливали имплантат таким образом, чтобы его торец не выступал за пределы кости. Фиксацию имплантата осуществляли прямой импакцией. На рану накладывали послойные швы, рану обрабатывали тетрациклином (Terramicyn Aerosol Spray, содержит окситетрациклина гидрохлорида 3,92%). Аналогичные операции выполняли в области проксимального метафиза большеберцовой кости и на контралатеральной конечности. У части животных в соответствии с задачами на левой конечности формировали краевые дефекты костной ткани, но не заполняли их имплантатами. Объем интраоперационной кровопотери при моделировании двух дефектов на каждой тазовой конечности и внедрении ПТi₄₀МК был 6,0 мл (2,8; 6,9) что составляло 3,7 % (1,65; 4,4) от

⁶ Операции выполнены канд. мед. наук Э.Б.Макаровой., млад. науч. сотр. Д.Г.Близнецом

объема циркулирующей крови, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ – 5,3 мл (4,1; 5,7) – 2,9% (2,5; 3,9), $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ – 6,2 мл (5,7; 6,9) – 3,1% (3,0; 4,6). Кроликов помещали в отдельные клетки, где они через 5-6 часов свободно передвигались с опорой на оперированные конечности. В течение нескольких суток отмечался незначительный отек в зоне операции, не требовавший дополнительных лечебных мероприятий. Заживление происходило первичным натяжением.

Оперативное вмешательство у овец выполняли под общей анестезией. Перед операцией шерсть у овец обстригали машинкой. Премедикация: вечером и утром Espumisan 40-10 мл per os. Утром перед операцией выполняли катетеризацию плюсневой передненаружной вены. Премедикация – Atropine sulfate solution for injections 0,05% внутривенно медленно 0,01 мг/кг в 20 мл изотонического раствора хлорида натрия, Dimedrolum 1% p-p 1 мл внутримышечно, Ceftriaxone (ООО Деко) – 1,0 г в 5 мл 0,25% новокаина внутримышечно, кетонал (Ketonal, LEK d.d.) внутримышечно 2 мл – 50 мг Ketoprofen, Ксилавет (XylaVet, Interchemie Werken, Нидерланды) 20 мг ксилазина в 1 мл – 0,3 мг/кг. Общий анестетик – Zoletil-100 «Virbac Sante Animale» 10 мг/кг.

Непосредственно перед выполнением оперативного вмешательства проводили тщательный туалет кожных покровов.

Операционное поле обрабатывали 70% спиртом, в дополнение к общему наркозу выполняли местную анестезию раствором новокаина 0,25% – 5,0 мл. Из продольного линейного разреза длиной 3 см по внутренней поверхности дистального метафиза бедра послойно выделяли поверхность кости, рассекали и отсепаровывали надкостницу на площади 2,5-3 см². С помощью специально изготовленного коробчатого долота в дистальном метафизе бедренной кости формировали дефект в виде прямоугольного паза размерами 1.5 x 1.0 см, глубиной 1.0 см. В дефект устанавливали имплантат из пористого титана (четыре плоскости имплантата представляли собой равнобедренные трапеции высотой 10 мм, две – прямоугольники размером (15 x 10) и (14 x 9) мм). Внедрение и фиксацию имплантата осуществляли путём прямой импакции таким образом, чтобы торец имплантата не выстоял за пределы кости, при этом во всех случаях была достигнута стабильная фиксация имплантата. Рану послойно ушивали одиночными швами, после чего его обрабатывали тетрациклином (Terramicyn Aerosol Spray, содержит окситетрациклина гидрохлорида 3,92%). Аналогичные операции выполняли в области проксимального метафиза большеберцовой кости и на контралатеральной задней конечности.

Учитывая, что линейные размеры формируемых дефектов были менее одного диаметра большеберцовой или бедренной кости, угловые размеры этих дефектов – менее ¼ окружности кости на уровне сформированного дефекта, расчетные коэффициенты увеличения напряжения на оперированные сегменты составляют менее 1,4, остаточная прочность прооперированных

сегментов превышала 75%. В соответствии с рекомендациями [23, 196] дополнительные средства внешней фиксации в этом случае не требуются.

После операции – Dimedrolum 1% раствор 1 мл внутримышечно, Ceftriaxone 1,0 г в 5 мл 0,25 % новокаина внутримышечно, кетонал (Ketonal) внутримышечно 2 мл – 50 мг (Ketoprofen).

В течение 3-х суток внутримышечно – Dimedrolum 1% раствор 1 мл, кетонал (Ketonal) внутримышечно 2 мл – 50 мг (Ketoprofen), 7 суток – Ceftriaxone, 1,0 г в 5 мл 0,25 % новокаина внутримышечно.

После операции овцы через 3-4 часа возвращались к значительной двигательной активности, с нагрузкой на оперированные конечности. С целью профилактики послеоперационного травматизма их помещали в специально изготовленные отдельные маленькие стойла для ограничения двигательной активности на 2-е недели. Отек в области операционных швов проходил через 5-14 суток после операции. В течение этого времени животных ежедневно осматривали, обрабатывали швы, при необходимости – корректировали назначения, при наличии признаков воспалительного процесса назначали второй антибиотик – энроксил 5% раствор для инъекций (Solutio Enroxil 5 % KRKA, Словения), стероидные гормоны (Dexamethason, раствор для инъекций 4 мг/мл, Shreya Life Sciences) – 1 раз в сутки внутримышечно по 8 мг до 3-х суток.

На 14-е сутки снимали швы. Через 4-е недели после операции животных перевозили на ферму, где их содержали в течение месяца в отдельном стойле, а затем переводили в стадо на свободный выгул.

В соответствии с планом животных выводили из эксперимента. У экспериментальных животных исследовали периферическую кровь, костную и мышечную ткани, регионарные лимфатические узлы, селезенку, костный мозг.

2.4.3 Лабораторные и инструментальные методы исследования

2.4.3.1 Лучевые методы исследования

Рентгенографию оперированных конечностей выполняли после операции и после забоя животных в 2-х проекциях⁷ на рентгеновском диагностическом комплексе Philips Medical Systems Nederland B.V. (регистрационное удостоверение ФСЗ 2010/07369).

⁷ Рентгенологическое исследование и компьютерная томография были выполнены в отделении лучевой диагностики ФГБУ «УНИИТО им. В.Д. Чаклина» канд. мед. наук И.А. Зельским

Части животным из 7 серии после выведения из эксперимента дополнительно была выполнена компьютерная томография оперированных конечностей на компьютерном томографе Toshiba Medical Systems Corporation (регистрационное удостоверение ФСЗ 2007/00893).

2.4.3.2 Лабораторные методы исследования

Исследования периферической крови и костного мозга

Периферическую венозную кровь для гематологического исследования у кроликов забирали утром из краевой вены уха в вакуумные пробирки Improvacuter (2,0 мл, содержащие 1,6 мг/мл EDTA-K₂), для биохимического анализа – Improvacuter с активатором свертывания SiO.

Гематологические исследования выполнены на автоматических анализаторах KX-21N (Sysmex, Япония; регистрационное удостоверение ФСЗ № 2003/989) с использованием оригинальных реагентов Sysmex и контрольных материалов ParaCheck (Streck, USA).

Мазки окрашивали по Романовскому-Гимза [106]. Подсчитывали процентное содержание лейкоцитов (на 200 клеток) в периферической крови. Ретикулоциты подсчитывали в мазках после витальной окраски бриллиантовым крезиловым синим на 1000 эритроцитов с последующим расчетом абсолютного количества ретикулоцитов в литре.

Костный мозг получали методом пункции головки бедренной кости у наркотизированных животных. Клеточность костного мозга подсчитывали в камере Горяева, морфологическое исследование форменных элементов с подсчетом процентного содержания миелокариоцитов осуществляли в окрашенных (по Нохту) мазках (на 500 клеток). На основании полученных результатов рассчитывали следующие индексы:

Лейкоэритробластическое соотношение – миелоидные элементы/ядерные элементы эритроидного ряда;

Индекс созревания нейтрофилов – (промиелоциты+миелоциты+метамиелоциты) / (палочкоядерные нейтрофилы+сегментоядерные нейтрофилы);

Индекс созревания эритрокариоцитов – (полихроматофильные нормобласты+оксифильные нормобласты)/(эритробласты+пронормоциты+нормобласты) [111].

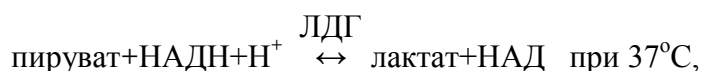
В сыворотке периферической крови определяли активность ЩФ_{общ}, ЩФ_{терм}, КФ_{общ}, КФ_{тарт}, общий кальций, ионизированный кальций, магний, неорганический фосфат.

Биохимические исследования были выполнены на биохимических анализаторах Express Plus (Bayer HealthCare LLC, регистрационное удостоверение ФСЗ № 2006/682), Sapphire-400

(Hirose electronic System Co., Ltd, Япония; регистрационное удостоверение ФСЗ № 2004/1346), унифицированными методами с использованием фирменных наборов (DiaSia, Analyticon) и контрольных материалов (Bio Rad, Trulab, Siemens) и калибраторов (Мультикалибратор 1,2 Bayer, Trulab DiaSys).

Концентрацию общего кальция определяли по реакции с комплексом арсеназо III, влияние Mg устраняли добавлением 8-гидрохиолин-5-сульфоновой кислоты (длина волны λ – 650 нм/дифференциальный фильтр – 600 нм), магния – по реакции с ксилидиновым синим, ионы Ca по реакции с гликольэфирдиамин-тетрауксусной кислотой (длина волны λ – 520 нм/дифференциальный фильтр – 570 нм), неорганического фосфата – по реакции с молибдатом аммония в присутствии серной кислоты (длина волны λ – 340 нм/дифференциальный фильтр – 405 нм). Активность ЛДГ и МДГ по оптическому оптимизированному в соответствии с рекомендациями Германского Общества клинической химии (DGKC) ультрафиолетовому тесту Варбурга (длина волны λ – 340 нм/дифференциальный фильтр – 380 нм), ЩФ по реакции с п-нитрофенилфосфатом (длина волны λ – 420 нм/дифференциальный фильтр – 600 нм), КФ_{общ} – по реакции с 1-нафтилфосфатом (длина волны λ – 405 нм/дифференциальный фильтр – 600 нм), КФ_{тарт} с α -нафтилфосфатом в присутствии L-тартрата-Na по реакции с п-нитрофенилфосфатом (длина волны λ – 405 нм/дифференциальный фильтр – 600 нм).

Активность СДГ определяли методом, основанным на восстановлении сукцинатом феррицианида калия желтого цвета до бесцветного ферроцианида калия в присутствии СДГ. Показания снимали на спектрофотометре (СФ 26, ЛОМО) при длине волны λ – 420 нм. Концентрацию пирувата – по Цоку и Лампхету по реакции восстановления



показания снимали на спектрофотометре (СФ 26, ЛОМО) (длина волны λ – 340 нм) [121].

Концентрацию ИЛ-8, -10, СРБ, КМБ-2, MMP-1, TIMP-1, IGF-I – определяли в сыворотке периферической крови методом иммуноферментного анализа с использованием наборов Cloud-Clone Corp. Enzyme-linked Immunosorbent Assay Kit. Organism Species: Oryctolagus cuniculus (Rabbit), по прилагаемым к наборам протоколам с использованием контролей.

Для выполнения анализа применяли комплекс, включающий планшетный иммуноферментный анализатор Stat Fax 3200 (Awareness Technology, Inc., USA; регистрационное удостоверение ФСЗ № 2004/1258), вошер Stat Fax 2600 (Medica, USA; регистрационное удостоверение ФСЗ № 2004/1258), шейкер Elmi (Elmi Ltd. Латвия, регистрационное удостоверение ФСЗ № 2006/1424).

Исследование костной ткани

Для проведения морфологического и морфометрического исследований новообразованной костной ткани титановую матрицу удаляли методом глубокого травления по Миргазизову [185]. Для этого костные блоки (рисунок 2.3.3.2.1) с имплантатами ($\approx 1 \times 1,5$ см) помещали в раствор плавиковой кислоты, полиэтиленгликоля (1:4) и металлического цинка.

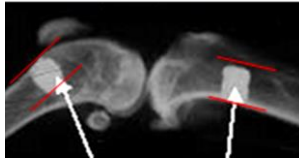


Рисунок 2.3.3.2.1 – Схема «вырезки» костных блоков большеберцовых и бедренных костей кроликов.

Рентгенограмма – фото.

Стрелки – имплантаты, схема вырезки – красные линии

После растворения металлической матрицы проводили декальцинацию тканей в растворе BiodecR (BioOptica), после чего выполняли стандартную процедуру приготовления тонких гистологических срезов: обезвоживание в спиртах восходящей концентрации, заливка парафином, приготовление срезов на микротоме, окрашивание гематоксилином и эозином и по ван Гизону. Морфологические исследования проводили на микроскопах Micros MS300 (регистрационное удостоверение МЗ РФ № 2004/180), Olympus CX41 (регистрационное удостоверение ФСЗ №2008/01701), Leica DM1000 (регистрационного удостоверения ФСЗ №2005/314).

Гистохимическое исследование было выполнено на костных субхондральных фрагментах суставных поверхностей бедренных костей. Подготовку препаратов осуществляли по методу L.K. Barthel и P.A. Raymond в модификации Ю.В. Маркитановой и М.А. Корч [226, 400, 97]. Исследуемые фрагменты костной ткани фиксировали в забуференном растворе нейтрального формалина (24 часа, 4°C). Затем промывали 0,1М раствором фосфатного буфера (рН-7,4) по 2 часа 3 раза, 18 часов – 1 раз; помещали в раствор сахарозы возрастающей концентрации в фосфатном буфере (5%, 5%, 5%, 10%, 10%, 10%, 20%, 20%,) по 60 минут и 18 часов в 20% растворе сахарозы в фосфатном буфере. Препарат стабилизировали в «Tissue-Tek OCT Compound» для защиты клеток и ядер от разрыва при последующем замораживании -35°C.

Криомикротомирование материала выполняли с использованием санного микротомы, охлажденного до -30°C и криоприставки. Исследование активности ЩФ выполняли с использованием наборов реагентов для проведения гистоэнзиматических реакций (Bio Optica, Italia) в соответствии с прилагаемыми инструкциями. Принцип метода основан на ферментативном гидролизе альфа – нафтил фосфата. В каждом наблюдении для анализировали не менее 8 полей зрения, суммарная площадь которых составляла 19 101-27 657 мкм².

Оцифровку гистологического материала выполняли с объективом х 40 с использованием микроскопа Olympus CX41RF (Япония) (регистрационное удостоверение ФСЗ №2008/01701) и видео-насадки VidiCam (Санкт-Петербург) (сертификат соответствия № РОСС RU.АЮ40.Н23249). В препаратах, подсчитывали количество остеогенных клеток (преостеоцитов/остеоцитов), преостеоцитов, экспрессирующих ЩФ [292], площадь профилей преостеоцитов, экспрессирующих ЩФ, рассчитывали среднее количество остеогенных клеток на площади гистологического препарата 100 мкм^2 , количество преостеоцитов, экспрессирующих ЩФ на 100 мкм^2 , среднюю площадь преостеоцитов, экспрессирующих ЩФ⁸.

Для биохимического исследования гомогенатов костной ткани из бедренных костей экспериментальных животных вырезали костные блоки 15-20 мм высотой, удаляли мышцы, сухожилия, периост. Проводили грубое измельчение костей в охлажденной фарфоровой ступке, просушивали образцы фильтровальной бумагой, после чего сразу помещали в жидкий азот для остановки метаболических процессов в тканях.

Манипуляции по выделению цитоплазматической и митохондриальной фракций проводили на льду, с охлажденными растворами и инструментами. Тканевые гомогенаты получали в механическом микроразмельчителе. Гомогенизировали образцы в сахарозной или в солевой среде в зависимости от изучаемого показателя. Конечное разведение гомогената составляло 1:9 (на 1 г ткани – 9 мл среды выделения). Для выделения цитоплазматической и митохондриальной фракций осуществляли дифференциальное центрифугирование при $0/+4^\circ\text{C}$ на рефрижераторной высокоскоростной центрифуге Sorval Biofugen Stfatos. Цитоплазматическую фракцию получали центрифугированием гомогената в режиме $1000 \text{ g} - 10 \text{ мин.}$ При центрифугировании в режиме $14000 \text{ g} - 15 \text{ мин.}$ – получали осадок митохондрий, его промывали средой выделения и затем разрушали 0,1 % раствором тритона X-100 [121, 176].

В гомогенатах костной ткани определяли активность ЩФобщ, ЩФтерм (3.1.3.1), КФобщ, КФтарт (3.1.3.2.), общую активность ЛДГ (1.1.1.27), общую активность МДГ(1.1.1.37), активность СДГ (КФ 1.3.99.1), концентрацию лактата, пирувата.

Минеральный состав новообразованной костной ткани определяли методом рентгеноспектрального элементного анализа⁹ на микроскопе QUANTA 200 (FEI Company, Нидерланды. Свидетельство об аттестации № 223.17.151/2009) с приставкой EGAX E-Sign, с применением пакета программ Spectrum, позволяющего идентифицировать пики и проводить

⁸ Оценка гистохимических препаратов выполнена совместно с научным сотрудником лаборатории морфологии ФГБУ УНИИТО им. В.Д. Чаклина Минздрава РФ канд. биол. наук Г.Д.Сафоновой.

⁹ Спектральный анализ выполняли – главный специалист Н.В.Николаева (ИФМ УрО РАН), старш. науч. сотр., канд. физ.-мат. наук А.П.Рубштейн (ИФМ УрО РАН).

количественный элементный анализ. Торцевую поверхность имплантата полировали алмазной пастой (50 мкм) и наносили на очищенную поверхность тонкий слой алюминия в вакууме.

Прочность новообразованной костной ткани на границе «костное ложе – имплантат» на разрыв определяли по оригинальной методике: положение имплантата контролировали рентгенологически в 2-х проекциях. Это позволяло ориентировать костный блок в держателе, чтобы прикладываемая сила имела направление перпендикулярно плоскости соединения кость-имплантат. Выпиливали одинаковые костные блоки высотой 35-40 мм с имплантатом из прооперированной и контрольные из не оперированной конечностей. Кость аккуратно очищали от мышц и сухожилий. Концы костных блоков фиксировали в стальных формах с помощью эпоксидной смолы. До полного затвердевания эпоксидной смолы блок с формами помещали в специальный держатель, сохраняющий соосность всей системы. После затвердевания смолы производили надрезы кости до имплантата с двух боковых сторон и с противоположного от имплантата торца [144]¹⁰.

Испытания проводили в течение 24 часов с момента забоя животного на испытательной машине FP-100/1 (свидетельство о поверке № 360179) с автоматической записью диаграммы. Нагрузку увеличивали со скоростью 0,66 мм/минуту до разрыва образца. Предел прочности рассчитывали по формуле:

$$\sigma = P/S,$$

где σ – предел прочности,

P – сила при которой происходит разрыв,

S – площадь разрыва (определяли по увеличенному снимку зоны разрыва).

Относительный предел прочности рассчитывали по формуле:

$$\sigma_{\text{отн}} = \sigma_o / \sigma_k,$$

где $\sigma_{\text{отн}}$ – относительный предел прочности,

σ_o – предел прочности конечности с имплантатом в интерфейсе «костное ложе-имплантат»,

σ_k – предел прочности интактной кости.

Механические испытания на сжатие пористых титановых имплантатов, а также композитов пористый титан – костная ткань, образованных в результате остеоинтеграции пористого титана, «на сжатие» проводили по ГОСТ 9550-81 на универсальной испытательной машине типа «ИНСТРОН». По диаграммам напряжение – деформация рассчитывали условный предел текучести и модуль Юнга.

¹⁰ Подготовку препаратов осуществляли канд. мед. наук Э.Б.Макарова, канд. физ.-мат. наук А.П.Рубштейн (ИФМ УрО РАН), испытания на разрывной машине проводил главный специалист Ю.И. Филлипов (ИФМ УрО РАН).

Исследование поперечнополосатых мышц

Для биохимического анализа забирали фрагменты m. tibialis anterior. Удаляли фасции, образцы мышц замораживали в жидком азоте. Подготовка гомогенатов мышц и методика выделения цитоплазматической и митохондриальных фракций была аналогичной, как и для костной ткани. В гомогенатах мышц определяли – общую активность КФК (КФ 1.7.3.2), общую активность ЛДГ (КФ 1.1.1.27), общую активность МДГ (КФ 1.1.1.37), активность СДГ (КФ 1.3.99.1), концентрацию лактата.

Элементный состав мягких тканей исследовали методом рентгеноспектрального элементного анализа. Образцы мягких тканей, непосредственно прилежащих к кости с внедренным имплантатом, а также аналогичные образцы из контралатеральной не оперированной конечности фиксировали в формалине, с помощью ручного прессы прижимали к композиту: токопроводящий скотч – алюминиевая пластина. Высушивали в вакууме ($P = 5 \times 10^{-3}$ Па), наносили алюминиевую подложку (толщиной ~ 20 нм). Определяли одинаковый набор элементов – C, N, O, K, Mg, P, Ca, S, Si, Al, Ti, что устраняло систематическую погрешность.

Исследование лимфатических узлов и селезенки

Подколенные лимфатические узлы и селезенку фиксировали 10% раствором формалина. Из парафиновых блоков готовили серийные срезы толщиной 5-7 мкм, сделанные на уровне ворот и полюсов лимфатических узлов и селезенки. Препараты окрашивали гематоксилином – эозином и по Ван-Гизону. Характеристику препаратов проводили с использованием микроскопа Olimpus CX41RF (регистрационное удостоверение ФСЗ №2008/01701)¹¹. Для изучения соотношения площадей, структурных элементов лимфатических узлов производили оцифровку гистологического материала при увеличении $\times 4$, использовали компьютерную программу ВидеоТест-Мастер-4.0. Дифференцированный подсчет клеточных элементов лимфатических узлов осуществляли в различных функциональных зонах, в каждой зоне подсчитывали 500 клеток. При подсчете численной плотности клеток площадь поля зрения составляла $0,025 \text{ мм}^2$ ¹².

¹¹ Морфологические исследования лимфатических узлов и селезенки выполнены совместно с сотрудником ГБОУ ВПО «Уральский медицинский университет» Минздрава России канд. мед. наук Н.Б.Блинковой.

¹² Дифференцированный подсчет клеток и определение численной плотности лимфоцитов выполнено совместно с младшим научным сотрудником клинко-биохимической лаборатории ФГБУ УНИИТО им. В.Д. Чаклина Минздрава РФ канд.биол.наук Н.С.Киселевой.

2.5. Статистические методы исследования

С целью подтверждения выдвинутых гипотез и обнаружения новых закономерностей был проведен статистический анализ результатов, полученных в планируемом эксперименте. При анализе данных использовали непараметрические методы однофакторного дисперсионного анализа для зависимых (тест Уилкоксона) и независимых (тесты Манна-Уитни, Краскала-Уоллиса, анализ таблиц сопряженности) групп с применением технологии множественной проверки гипотез на основе поправки Бонферрони, а также тест Шапиро-Уилка для проверки нормальности распределений [44]. При проведении статистических расчетов, использовался пакет STATISTICA 10 компании StatSoft, а для визуализации данных и построения соответствующих графиков – пакет Microsoft Excel 2007.

Для выполнения расчетов прочности бедренной кости человека, имеющей дефект, замещенный титановым имплантатом, применялся пакет ANSYS 16 компании ANSYS Inc¹³. Необработанная модель геометрии бедренной кости взята с сайта grabcad.com. Ее предварительная обработка производилась средствами ANSYS Design Modeller, а соответствующие механические расчеты осуществлялись в пакете ANSYS Mechanical, реализующем методы конечно-элементного моделирования. Тип используемого в расчетах конечного элемента – SOLID 186/187.

¹³ Моделирование выполнено совместно с сотрудником отдела математического программирования Института математики и механики им. Красовского УрО РАН канд. физ.-мат. наук К.С.Кобылкиным.

ГЛАВА 3

**ИЗУЧЕНИЕ ОСТЕОИНТЕГРАЦИИ ПОРИСТЫХ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ
И ПОРИСТЫХ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ,
МОДИФИЦИРОВАННЫХ УГЛЕРОДСОДЕЖАЮЩИМИ ПЛЕНКАМИ**

3.1. Изучение биосовместимости композита «титан-углеродсодержащие пленки» in vitro

Существование универсальных реакций на клеточном уровне в ответ на действия химических, физических и биологических факторов приводит к развитию сходных изменений в клетках – нарушению целостности мембран, синтеза и активности ферментов, ионного состава, метаболических и ряд других процессов. Для оценки данных изменений разработан комплекс стандартных биохимических исследований оценки жизнеспособности клеток и токсического воздействия на них. Он включает изучение немногих простых и хорошо поддающихся масштабированию и стандартизации биохимических показателей – оценивается степень повреждения клеточных мембран, перекисное окисление липидов, активность ряда мембрансвязанных и цитозольных дегидрогеназ. Данный подход позволяет использовать небольшое количество тестов на первом «оценочном» этапе, поскольку нарушения даже в одной, но жизненно важной системе неизбежно затрагивает жизнедеятельность клеток в целом [70]. В работе Еропкина М.Ю. было показано, что данные реакции проявляются независимо от химического строения тестируемого вещества, метода оценки цитотоксичности и мало зависят от видового происхождения клеток [70].

Общую цитотоксичность композита – титан, модифицированный DLC пленками, оценивали по активности в супернатанте культур клеток цитозольного фермента ЛДГ, который выделяется из клеток при необратимом повреждении их мембран, при инкубации миелокариоцитов кролика с образцами ПлTi_{40} , $\text{ПлTi}_{40}(\text{a-C})$, $\text{ПлTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})$ и $\text{ПлTi}_{40}(\text{CN}_{0,5})$. О функциональной активности клеток судили по способности оксидоредуктаз восстанавливать нитросиний тетразолий до диформаза.

Проведенные эксперименты показали, что жизнеспособность клеток при инкубации миелокариоцитов с образцами $\text{ПлTi}_{40}(\text{a-C})$ и $\text{ПлTi}_{40}(\text{CN}_x)$ была выше, чем с ПлTi_{40} . При использовании азотсодержащей композитной $\text{CN}_{0,25}$ пленки отличия были значимыми (таблица 3.1).

Способность клеточной суспензии восстанавливать нитросиний тетразолий имела тенденцию к увеличению в культурах миелокариоцитов, инкубированных с образцами титана, покрытыми углеродсодержащими пленками (таблица 3.1). При инкубации титана с $\text{ПлTi}_{40}(\text{CN}_{0,5})$ с содержанием азота в пленке 33 ат.% происходило значимое увеличение

активности оксидоредуктаз. Показано, что минимальные эффективные концентрации большинства химических веществ вызывают активацию оксидоредуктаз, что рассматривается как «метаболическая активация», то есть мобилизационная стадия стресса на клеточном уровне в ответ на внешнее воздействие [70].

Таблица 3.1 – Исследование цитотоксичности композитов «титан-углеродсодержащие пленки» в краткосрочных культурах миелокариоцитов кроликов (медиана, 25-, 75-процентили)

Тестируемые образцы	Активность ЛДГ в супернатанте [#] , U/L	Восстановление нитросинего тетразолия ^{##} , у.е.
ПТi ₄₀	73,4 (64,2; 74,4), n=5	1,03 (0,82; 1,36), n=6
ПТi ₄₀ (а-С)	48,45 (44,5; 52,2), n=5	0,95 (0,92; 1,16), n=6
ПТi ₄₀ (СN _{0,25})	13,05* (10,3; 22,1), n=5	0,93 (0,85; 1,08), n=6
ПТi ₄₀ (СN _{0,5})	31,6 (26,1; 51,5), n=5	0,46* (0,42; 0,48), n=4

[#] Результат представлен в виде разности активности фермента в культуральной среде после

и до инкубации с клетками.

^{##} Результат представлен в виде отношения контроль/опыт, где контролем являлась активность клеток костного мозга того же животного, инкубируемых в тех же условиях, но без образцов.

* $p \leq 0,05$ по сравнению с группой ПТi₄₀.

Таким образом, при культивировании миелокариоцитов кролика с тестируемыми образцами не было выявлено токсического влияния последних на клетки. Самая выраженная реакция была отмечена на ПТi(CN_{0,5}), однако и она носила адаптационный характер.

Однако при культивировании образцов, покрытых пленкой содержащей 33 ат.% азота, с клетками в 2-х случаях из 5-и было отмечено частичное отслоение пленки. На основе полученных результатов все дальнейшие исследования были выполнены на образцах с а-С и CN_{0,25} пленками.

Исследования адгезии клеток на поверхности различных материалов и покрытий относится к базовым методам определения биосовместимости материалов, которые будут находиться в контакте с тканями организма [41]. Это связано с тем, что адгезия клеток является одним из начальных этапов формирования костной ткани на поверхности имплантата и характеризует непосредственный контакт биосистемы с тестируемым материалом (рисунок 3.1.1).

Количество адгезировавших на поверхность клеток при использовании в качестве подложки для адгезии клеток ПолТi(а-С) значимо не изменялось 79,5% (77,1;187,3) по сравнению с адгезией на ПолТi. Предпочтительными для адгезии миелокариоцитов оказались образцы ПолТi(CN_{0,25}) – количество адгезировавших клеток на них было значимо выше 174,1% (127,5;179,0) ($p \leq 0,032$) по сравнению с ПолТi.

При изучении колониеобразующей способности костномозговых прекурсоров мышей линии СВА/СаLас через 7 суток культивирования неприлипающих и прилипающих костномозговых клеток в присутствии испытуемых образцов было выявлено значимое увеличение количества КОЕ фибробластоподобных клеток, развившихся из прилипающей фракции клеток при использовании $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ по сравнению с PTi_{40} ($p \leq 0,049$) (таблица 3.2). При контакте с алмазоподобными пленками пополнение популяции, имеющих морфологическую характеристику фибробластоподобных клеток, происходило за счет более примитивных клеток-предшественниц, на что указывала тенденция к уменьшению соотношения количества кластеров/колоний в лунках при культивировании с образцами $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})$.

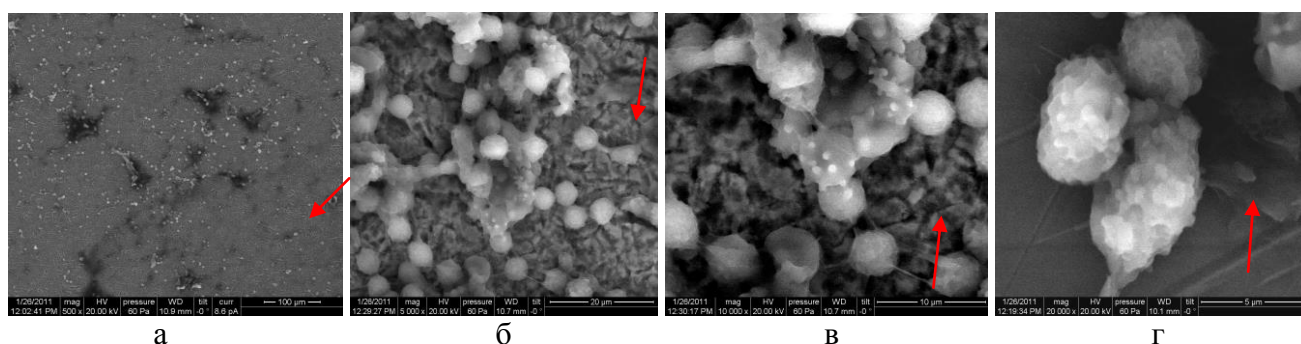


Рис. 3.1.1 – Адгезия миелокариоцитов кроликов на поверхность полированного титана с алмазоподобной пленкой. СЭМ-микрофото.

а - Ув.х500, б - Ув.х5000, в - Ув.х10000, г - Ув.х 20000.

Стрелки: красные - мультислойные комплексы молекул, адсорбированные на поверхность из культуральной среды, адгезирующие на них клетки

Таблица 3.2 – Культивирование миелокариоцитов костного мозга мышей линии СВА/СаLас в полужидкой среде в присутствии образцов пористого титана (медиана, 25-, 75-процентили)

Не прилипающая фракция миелокариоцитов		
	КОЕ	Количество кластеров/ количество колоний, в лунке
PTi_{40}	140 (67; 190)	16,5 (5,7; 22,8)
$\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$	190 (102; 194)	19,4 (15,1; 26,1)
$\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})$	128 (119; 259)	20,6 (20,3; 28,8)
Прилипающая фракция миелокариоцитов		
	КОЕф	Количество кластеров/ количество колоний, в лунке
PTi_{40}	14 (10;16)	6 (1,7; 6,2)
$\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$	19 (18; 22) *	2,2 (1,3; 2,6)
$\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})$	6 (6; 11)	2,7 (2,0; 5)

Посадка 1×10^5 мононуклеаров костного мозга/лунку, * $p \leq 0,05$ по сравнению с PTi_{40}

Морфологически культуры прилипающей фракции миелокариоцитов кроликов, выросшие в лунках без образцов (контроль) и в присутствии PTi_{40} , $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})$ не

различались. К 7-м суткам во всех лунках основная масса клеток имела типичную фибробластоподобную морфологию (рисунок 3.1.2) с отростками различной длины и формы, округлыми ядрами, иногда содержащие в цитоплазме включения. Образование монослоя не было завершено.

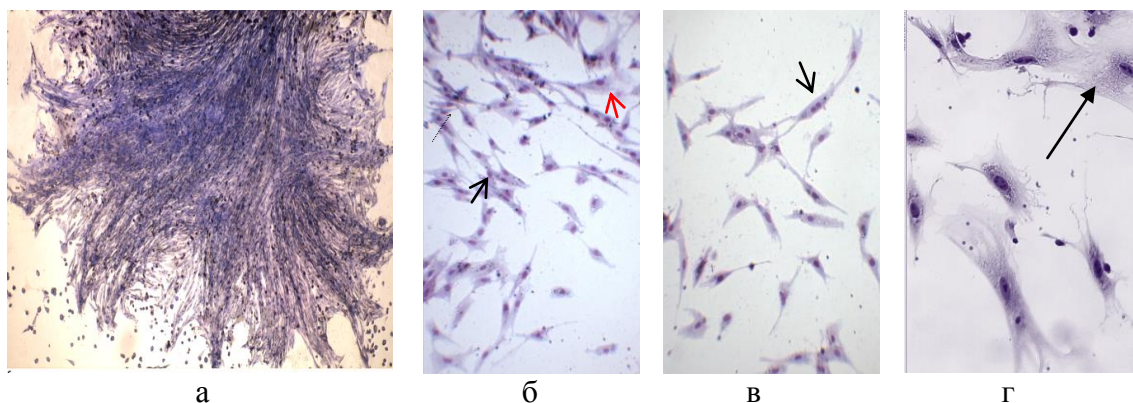


Рис. 3.1.2 – Прилипающая фракция костного мозга кролика.

7 суток культивирования в присутствии образцов ПТi₄₀. Окрашивание по Романовскому-Гимза. СМ-микрофото. а – Ув.х40, б, в, г – Ув.х400.

а – колония компактного типа, сформирована типичными веретенообразными клетками, расположенными упорядоченно;

б – культура фибробластоподобных клеток. Стрелки: черная – веретеновидные клетки; красная – клетки полигональной формы с большим количеством отростков.

в – веретеновидная диплоидная клетка (черная стрелка);

г – клетки полигональной формы с многочисленными ветвящимися отростками, вакуолизированной цитоплазмой.

Стрелки: черная – «гигантские» распластанные клетки с вакуолизированной цитоплазмой

При увеличении срока культивирования миелокариоцитов до 14-и суток в присутствии всех типов образцов происходило снижение гетерогенности культур, преобладали плотно упакованные клетки веретеновидной формы, расположенные параллельно друг другу (рисунок 3.1.3), при этом культуры не останавливали рост при достижении стадии конфлюэнтного монослоя, образуя многослойные тяжистые структуры напоминающие «узелки». Образующиеся в культурах клетки условно можно было разделить на три группы. Большая часть из них относилась к первой группе. Они были веретеновидной (или каплевидной) формы с 1-3 длинными отростками, более скудной цитоплазмой, по сравнению с полигональными клетками, с небольшим округлым или палочковидным ядром, расположенным эксцентрично или в центре. Структура хроматина плотная, гиперхромная, ядрышки нерегулярные единичные. По данным литературы такую морфологию имеют молодые, активно мигрирующие клетки, имеющие большой пролиферативный потенциал, они образуют колонии компактного типа [108].

Вторую группу представили клетки в состоянии репликативного старения (Hayflick, 1965), они были большего размера, неправильной иногда причудливой формы за счет

множественных коротких псевдоподий. Ядро – округлое, крупное, расположено эксцентрично с нежной структурой хроматина. Культуры, образованные такими клетками, находятся в стабильном состоянии, их пролиферативный потенциал значительно снижен, однако является ли данное состояние признаком старения клеток в культуре, до сих пор обсуждается в литературе [37].

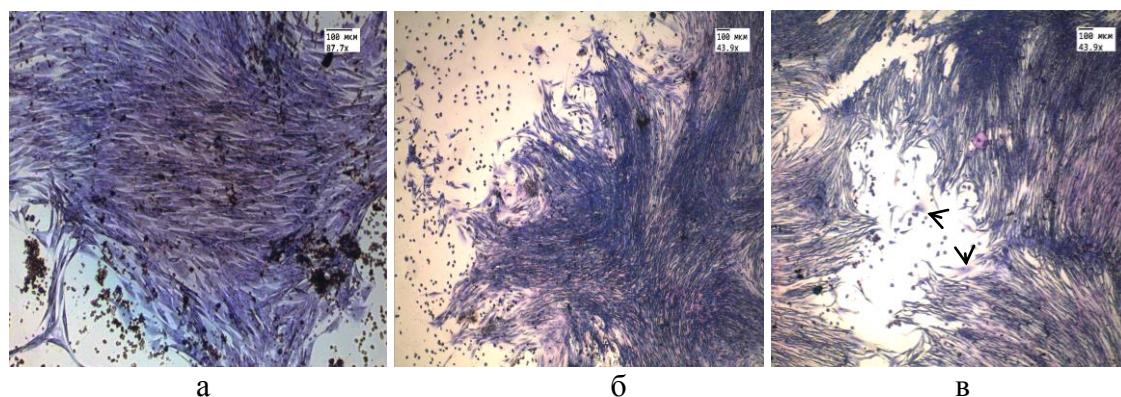


Рис. 3.1.3 – Прилипающая фракция костного мозга кролика, 14 суток культивирования в присутствии образцов ПТi₄₀. Окрашивание по Романовскому-Гимза. СМ-микрофото. Ув.х40.
а, б, в – колонии фибробластоподобных клеток плотно упакованных, образующих многослойные структуры.

Стрелки: единичные сильно распластаные полигональные крупные клетки

Третья группа – клетки, имеющие гипертрофный тип – «гигантские» сильно распластаные по поверхности клетки, что по данным литературы связано с активацией киназного пути (TORC1/S6-киназа/белок S6 рибосом), регулирующего биогенез рибосом и аутофагию, с непропорциональным увеличением объема цитоплазмы, которая часто обильно вакуолизирована (рисунки 3.1.2 г, 3.1.3 в). Такие клетки практически не способны к пролиферации [37]. Часто такую морфологию ассоциируют со старением клеток [453].

При культивировании прилипающей фракции миелокариоцитов кроликов на образцах пористого титана без покрытия и с DLC на 3 сутки инкубации преимущественно в порах титановых матриц были выявлены кроветворные клетки (гранулоцитарные, эритроидные, макрофагальные) и стромальные элементы (фибробластоподобные, веретеновидные клетки) (рисунок 3.1.4).

Часть фибробластоподобных клеток располагалась морфологически однородными группами. В 91-96% – это группы по 5-50 клеток, в 4-9% – скопления содержали 50 и более клеток, их колониеподобное расположение позволяет предполагать формирование клеток следствием дифференциации КОЕэ и КОЕгм. Клетки, заполняющие ниши в титановой матрице, нередко образовывали отростки и контактировали между собой. Для объективизации оценки заселения имплантатов клетками было подсчитано количество КОЕ, образованных при культивировании прилипающей фракции костного мозга на различных образцах. На 3-и сутки

при использовании $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})$ выявлены значимо большее количество КОЕ, содержащих от 5 до 50 клеток, по сравнению с PTi_{40} (таблица 3.3), и тенденция к увеличению площади, занятой клетками на поверхности $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})$, по сравнению с площадью на PTi_{40} .

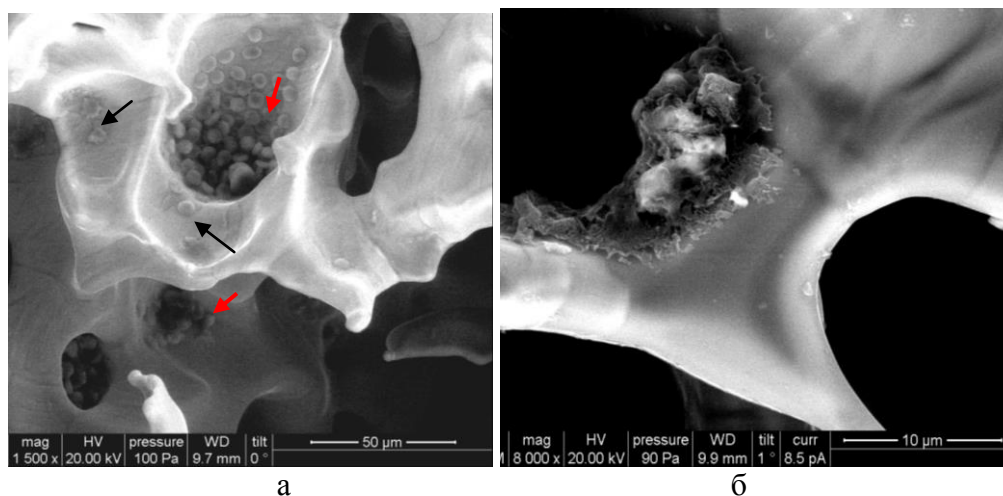


Рисунок 3.1.4 – Прилипающая фракция миелокариоцитов кролика в PTi_{40} .

Культивирование 4-е суток. СЭМ – микрофото.

а – клетки в поверхностных нишах. Стрелки: красные – колониеподобное расположение кроветворных клеток; черные – распластанные на поверхности с бороздками клетки.

б – вероятно, стромальная клетка

Таблица 3.3. – Среднее количество КОЕ на 3-и сутки культивирования прилипающей фракции миелокариоцитов кроликов в поверхностных порах титановых матриц (подсчет по 50 электронно-микроскопическим снимкам, площадь поля зрения снимка 200 мкм^2)

	PTi_{40}			$\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})$		
	КОЕ, содержащие от 5 до 50 клеток	количество КОЕ, содержащие более 50 клеток	Площадь занятая клетками, %	КОЕ, содержащие от 5 до 50 клеток	количество КОЕ, содержащие более 50 клеток	Площадь занятая клетками, %
$M \pm \sigma$	$1,51 \pm 2,03$	$0,08 \pm 0,28$	$2,16 \pm 1,87$	$2,19 \pm 2,57^*$	$0,22 \pm 0,47$	$2,63 \pm 2,42$

* $p \leq 0,05$ по сравнению с группой PTi_{40} .

Заселение клетками поверхностных пор имплантатов было прослежено до 32-х суток культивирования. На 3-10 сутки культивирования в нишах пористой титановой матрицы видно образующееся внеклеточное вещество (рисунок 3.1.5 б, д); на 17- 21 сутки культивирования часть пор полностью заполнена компонентами внеклеточного матрикса (рисунок 3.1.5.е, рисунок 3.1.6).

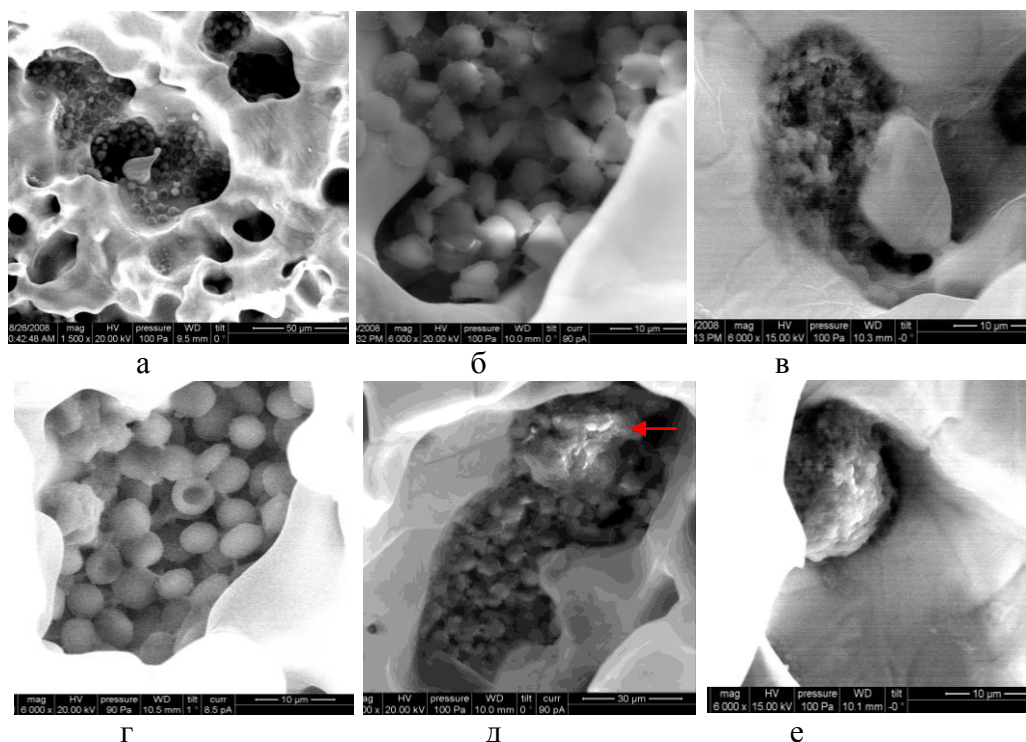


Рисунок 3.1.5 – Прилипающая фракция миелокариоцитов кроликов. СЭМ – микрофото.
а, б, в – PtTi_{40} . а – 4 суток культивирования; б – 7 суток культивирования;
в – 17 суток культивирования. Новообразованное межклеточное вещество и клетки практически
полностью заполняет просвет поры.
г, д, е – $\text{PtTi}_{40}(\text{a-C})$. г – 4 суток культивирования. д – 10 суток культивирования. Стрелка –
компоненты внеклеточного матрикса. е – 17 суток культивирования. Поверхностная пора
 $\text{PtTi}_{40}(\text{a-C})$ заполнена компонентами внеклеточного вещества

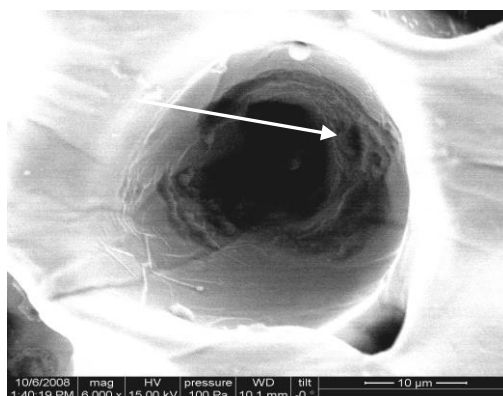


Рисунок 3.1.6 – Прилипающая фракция миелокариоцитов кроликов
в поверхностных порах $\text{PtTi}_{40}(\text{a-C})$, культивирование в течение 17-и суток. СЭМ – микрофото.
Вся внутренняя поверхность пор покрыта компонентами внеклеточного матрикса,
фибробластоподобными клетками, кроветворными предшественниками

На 32-е сутки культивирования количество клеток, расположенных в
поверхностных порах, при культивировании миелокариоцитов на $\text{PtTi}_{40}(\text{a-C})$ и
 $\text{PtTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})$ значительно превышает количество клеток на PtTi_{40} и достигает, соответственно,
166% (80; 200) и 233% (120; 310).

3.2. Исследования *in vivo*

Клиническое наблюдение за экспериментальными животными показало: через сутки после операции состояние кроликов (температура тела, частота дыхания и сердцебиения, положение тела, подвижность, аппетит) во всех сериях (2, 3, 4) было удовлетворительным. Они активно передвигались по клетке, опираясь на оперированные конечности. Локальные проявления воспалительной реакции (гиперемия, небольшая отечность, при пальпации области операционного шва – болевая реакция) были отмечены в течение 5-10 суток после операции.

Регенерация краевых дефектов метафизов большеберцовых и бедренных костей, не заполненных имплантатами

У кроликов формировали краевые дефекты метафизов проксимальных отделов большеберцовых и дистальных отделов бедренных костей. В левой (контрольной) конечности дефекты оставались незаполненными (КД), в правую (опытную) были внедрены в 1-й группе пористые титановые имплантаты, насыщенные аутомиелокариоцитами, увеличенными в количестве культивированием (ПТi₄₀МК), во 2-й группе ПТi₄₀(а-С)МК, в 3-й группе ПТi₄₀(CN_{0,25})МК.

Морфологических различий при репаративной регенерации КД между тремя группами выявлено не было. Через 4 недели после формирования КД в области кортикальной пластинки, прилежащей к дефекту, были выявлены периостальные наложения, ее реактивные изменения (отсутствие отчетливой границы между глубоким и волокнистым слоями периоста, локальное утолщение остеогенного слоя) (рисунок 3.2.1.1), очаговые некротические процессы (запустевание лакун, деструкция межклеточного вещества), некоторое расширение гаверсовых каналов. В области прилежащей губчатой костной ткани – расширение межтрабекулярных пространств за счет уменьшения ширины трабекул, что является характерной особенностью rarefакции костной ткани.

Со стороны кортикальных пластинок в КД формировались пластинчатая костная ткань с небольшими участками ретикулофиброзной и фиброзной тканей. Со стороны губчатой кости, вставая между краями кортикальных пластинок, определялись хрящевая ткань, ретикулофиброзная костная ткань и элементы красного костного мозга. Таким образом, образовывалась основа для пролиферации и дифференциации мигрирующих из периоста, эндоста и костного мозга в зону дефекта остеогенных клеток.

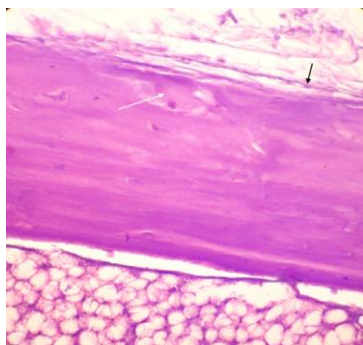


Рисунок 3.2.1.1 – Кролик. Прилежащая к искусственному краевому дефекту костной ткани кортикальная пластинка. 4 недели после операции.

Гистологический срез. Окраска гематоксилин-эозин. СМ-микрофото. Ув. х 200. Реактивные изменения прилежащей кортикальной пластинки: отсутствие отчетливой границы между глубоким и волокнистым слоями периоста, расслоение надкостницы (черная стрелка), зона некроза (белая стрелка)

Процесс костеобразования протекал преимущественно по энхондральному типу. То есть в прилежащих к краям КД метафизов большеберцовых и бедренных костей через 4-е недели после операции выявлены как признаки дистрофии, остеонекроза, rareфикации костной ткани, по краю костных фрагментов изъеденность и единичные остеокласты в узлах резорбции, снижение плотности костной ткани, так и признаки активации остеогенеза.

Остеобласты, морфологически представляющие единую группу, проявляют существенные отличия по уровням экспрессии остеобласт-ассоциированных маркеров. Наиболее специфичными маркерами остеобластов считают – сиалогликопротеин и остеокальцин [137]. ЩФ и рецептор к ПТГ менее специфичны, однако обладают преимуществом – экспрессируются остеобластами, различной степени дифференцированности, происхождения, в условиях разных механизмов ossification – энхондральном и интрамембранозном [248]. Учитывая это, исследование ЩФ является широко используемым маркером при фенотипировании остеобластов [506]. Для оценки интенсивности процессов ремоделирования в кости используют сочетанное определение концентрации маркеров резорбции и костеобразования [176, 21].

Через 4 недели после операции у животных всех групп в гомогенатах костной ткани сегментов, прилежащих к КД, отмечалось увеличение активности ЩФобщ по сравнению с интактными животными. У животных 1 и 2 групп, соответственно, до 183,9% ($p \leq 0,021$) и 131,0% ($p \leq 0,007$) (таблица А.1).

Активность ЩФтерм в сегментах костной ткани с КД через 4 недели значимо увеличивалась у животных всех групп: в 1 группе – до 312,5% ($p \leq 0,039$), во 2-й группе – до 226,9% ($p \leq 0,043$), в 3-й группе – до 307,7% ($p \leq 0,007$), по сравнению с интактной костной тканью. Между группами значимых различий выявлено не было. Сообразно возрастала объемная доля площади клеток, экспрессирующих ЩФ в 1-й группе до 104,7%; во 2-й группе –

127,1%; в 3-й группе – 114,1% (таблица А.2) и средняя площадь, экспрессирующих ЩФ клеток (соответственно до 112,1%; 129,6%; 116,0%), т.е. количество «крупных остеоцитов» (другие названия – остеойд-остеоцитов или преостеоцитов II-III типов, или образующих остеоцитов). Эти клетки имеют больший размер, менее сплюсненную форму и менее длинные отростки, чем зрелые остеоциты, у них хорошо развит комплекс Гольджи [292]. Количество остеогенных клеток и клеток, экспрессирующих ЩФ, не было увеличено.

КФтарт не является специфичным маркером активности остеокластов [436], поскольку его активность высока в моноцитарно/макрофагальных клетках. Однако доступность теста, причастность КФтарт к процессу резорбции кости, доказанное увеличение активности при ряде заболеваний, ассоциируемых с деструкцией костной ткани (болезнь Педжета, остеопороз постовариэктомический) привлекают к нему внимание [33]. Значимость КФтарт возрастает при совместно использовании с другими тестами и определении непосредственно в костной ткани. В гомогенатах кости, прилежащей к КД, значимых изменений в активности КФ нами не выявлено (таблица А.1).

Относительная прочность на разрыв костного блока с искусственно сформированным дефектом (у животных всех групп) через 4 недели достигала 20,98% (13,47; 28,49) по сравнению с интактной костью.

Через 16 недель, у животных всех групп площади дефектов значительно уменьшились, у 25% кроликов края КД не сомкнулись, дефект кортикальной пластинки оставался видимым микроскопически. Во всех группах новообразованная костная ткань имела отличия от характерного для данной анатомической области строения: неупорядоченность строения, метакромазия окраски немногочисленные остеоны неправильной формы с неровной границей, костно-мозговой канал сформирован не полностью. У большинства кроликов присутствовали участки хрящевой, ретикулофиброзной костной, волокнистой соединительной ткани с небольшими скоплениями клеток красного костного мозга (рисунок 3.2.1.2).

Активность остеогенеза в сегменте кости с КД оставалась высокой во всех группах: были значимо увеличены объемные доли площади клеток, экспрессирующих ЩФ, а в 1-й группе и количество остеогенных клеток (до 113,3%, $p \leq 0,034$) (таблица А.2).

Относительная прочность новообразованной костной ткани на границе «костное ложе-имплантат» на разрыв через 16 недель достигала 40% (38; 43) от прочности нативной кости у животных всех групп. Через 52 недели кортикальная пластинка была восстановлена, однако ее толщина оставалась меньшей, чем у интактных животных (~ 1/2 от первоначальной высоты). Область КД была заполнена атрофичными костными трабекулами (рисунок 3.2.1.3), между которыми располагался преимущественно жировой костный мозг. Границу бывшего дефекта кости удавалось выявить только в области кортикальной пластинки. В одном случае место

дефекта полностью заполнила плотная пластинчатая костная ткань (рисунок 3.2.1.3 б). Активность остеогенеза падала.

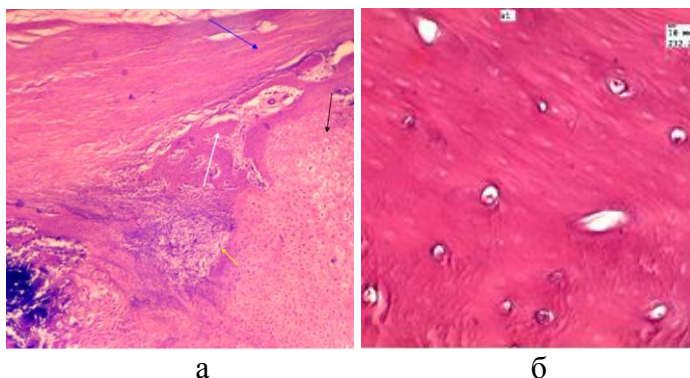


Рисунок 3.2.1.2 – Кролики. Краевой дефект костной ткани. 16 недель после операции. Гистологические срезы. Окраска гематоксилин-эозин. СМ-микрофото.

а - Ув. х 100, б - Ув. х 200

а – область дефекта. Стрелки: черная – участки хрящевой ткани, белая – новообразованная трабекула, синяя – кортикальная пластинка, по высоте не достигающая до операционного уровня, желтая – область формирующейся ретикулофиброзной костной ткани.
б – кортикальная пластинка с расширенными гаверсовыми каналами

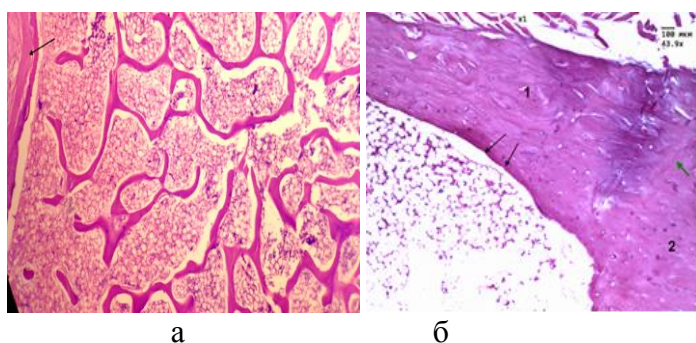


Рисунок 3.2.1.3 – Кролики. Искусственные дефекты костной ткани. 52 недели после операции. Гистологический срез. Окраска гематоксилин-эозин. СМ-микрофото. Ув. х 100.

а – сеть атрофичных трабекул выполняет краевой дефект, между ними жировой и миелоидный костный мозг. Стрелки: черная – кортикальная пластинка, меньшая по высоте, чем в интактной кости. б – случай полного замещения дефекта компактной (остеонной) костной тканью (2).

Стрелки: зеленая – граница дефекта, черные – узуры края кортикальной пластинки (1), примыкающей к зоне дефекта (2)

Прочность прооперированного сегмента значимо не отличалась от прочности интактной костной ткани.

Таким образом, к концу срока наблюдения происходило частичное органотипическое восстановление кости в области КД, что согласуются с описанными в литературе закономерностями посттравматического репаративного остеогенеза краевого дефекта длинных трубчатых костей (и соответствует поздним типовым фазам – регенерации и функциональной адаптации) [48, 63, 47, 86].

3.2.2. Закономерности репаративного остеогенеза при внедрении пористых имплантатов

При замещении краевых дефектов метафизов большеберцовых и бедренных костей $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ в условиях описанной модели было выявлено: при внедрении имплантатов с многоуровневой разветвленной системой пор, насыщенных прилипающей фракцией миелокариоцитов, уже через 4-е недели после операции, врастающие в периферические поры из костного ложа костные трабекулы и более молодая костная ткань, мозаичная по строению (трабекулы ретикулофиброзной, пластинчатая костная ткань) в центральных отделах имплантата смыкались между собой. В результате большая часть сообщающихся с поверхностью пор всех тестируемых имплантатов была заполнена новообразованной костной тканью, что было продемонстрировано при изучении шлифов «имплантат - новообразованная в порах ткань» (рисунок 3.2.2.1).

Количественный расчет площади, занимаемой новообразованной тканью по сечениям блоков, после вытравливания титановой матрицы, подтвердил, что ~30% площади области внедрения имплантатов (т.е. площадь открытых пор) занято костной тканью.

Остеогенез обеспечивался в большей степени клеточными элементами эндоста, а также за счет остеогенных клеток–предшественниц костного мозга, в меньшей степени – за счет остеогенных прогениторных клеток периоста и осуществлялся двумя путями, протекающими параллельно – контактно и дистантно; преимущественно по десмальному типу. Пористый имплантат служит матрицей для аппозиционного роста кости в периферических отделах имплантата и врастающих из костного ложа сосудов, а также для новообразования незрелой костной ткани в центральных отделах имплантата из мигрировавших туда остеогенных клеток-предшественниц.

Заполнение дефекта $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ способствовало активации (увеличению количества остеогенных клеток и их функциональной активности) и большей протяженности по времени репаративного остеогенеза. Как следствие – образованию *de novo* функционально более зрелой кости.

Наряду со стереотипной картиной репаративного остеогенеза, которая отражает стабильность условий, обуславливающих течение остеогенеза при внедрении пористых титановых имплантатов, при использовании DLC были выявлены некоторые морфологические особенности.

Результатом репаративного остеогенеза краевых дефектов при внедрении $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ было полное восстановление органотипической архитектоники кости в периферических отделах области внедрения имплантатов и частичное - в центральных отделах.

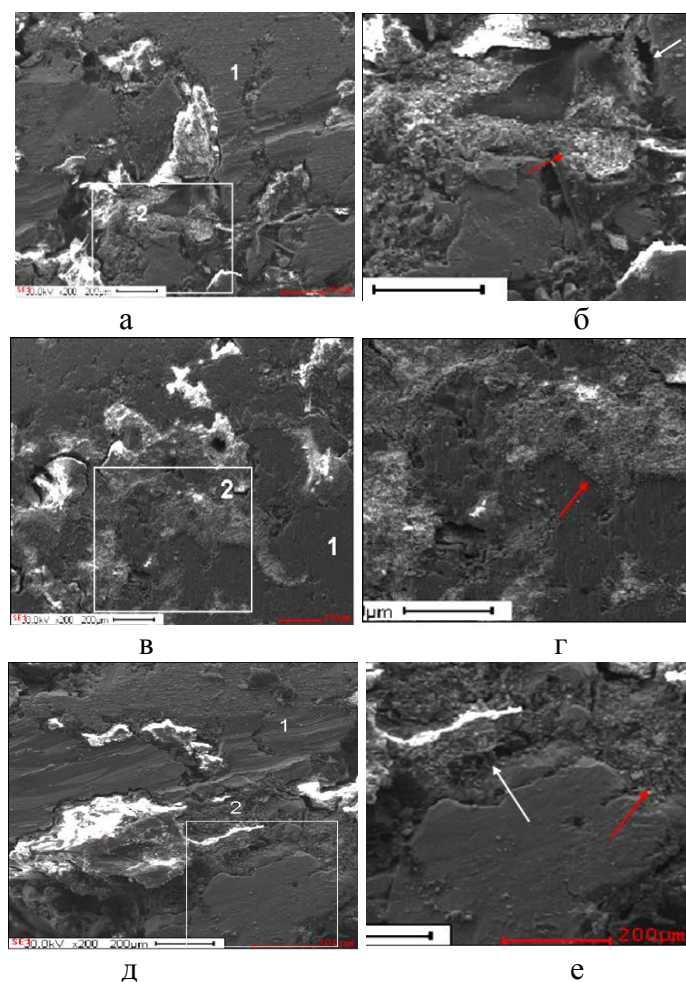


Рисунок 3.2.2.1 – Кролики.

Поверхность шлифов костных блоков «имплантат-новообразованная кость».

СЭМ – микрофото. Ув. х 200. 4 недели после операции.

Центральные отделы области внедрения.

1 – титановая матрица; 2 – новообразованная в порах костная ткань.

Большая часть порового пространства заполнена костной тканью. Стрелки: красные - костная ткань плотно прилежит к титановой матрице;

белые - неплотное прилегание костной ткани к титановой матрице.

а, б – внедрен $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, (б – увеличенный фрагмент того же препарата);

в, г - $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, (г – увеличенный фрагмент того же препарата);

д, е - $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ (е – увеличенный фрагмент того же препарата)

Через 16 недель после операции при использовании имплантатов всех типов отмечалось восстановление кости как органа: восстановление 40-72% прочности; васкуляризация зоны дефекта, восстановление микроциркуляции во всем оперированном сегменте, о чем свидетельствовало уменьшение проявлений дистрофических изменений в костном ложе к 16-и неделям; образование костного мозга между трабекулами новообразованной костной ткани.

При использовании данной экспериментальной модели у кроликов процесс ремоделирования, вероятно, осуществлялся как путем остеокласт-остеобластного ремоделирования, значимость которого у кроликов обсуждалась и в итоге была охарактеризована количественно [329], так и реструктуризацией перилакунарного матрикса

остеоцитами (рисунок 3.2.2.2). Существование остеоцитарного остеолита и его физиологическая роль у ряда млекопитающих, включая кроликов, доказана [292]. В настоящее время ряд авторов считают, что остеоцитарное ремоделирование является более быстрым и большим по объему перестраиваемой костной ткани механизмом локальной перестройки костной ткани, по сравнению с остеокласт-остеобластным ремоделированием. За счет наличия на остеоцитах механорецепторов происходит регуляция активности остеобластов, остеокластов, метаболизм кальция и фосфора в организме [135, 3, 2, 365, 242, 315; 218, 392, 285].

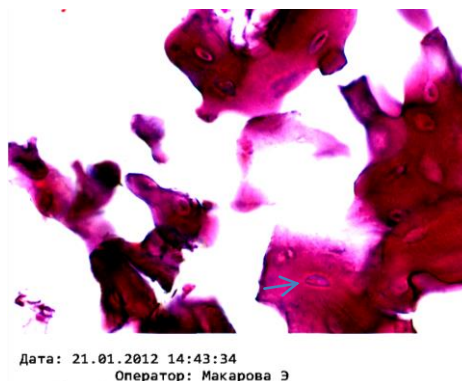


Рисунок 3.2.2.2 – Кролик. 16-ть недель после внедрения $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. Титановая матрица вытравлена. Гистологический срез. Окраска гематоксилином-эозином.

СМ-микрофото. Ув. X 200.

Стрелки: синяя – область метакромазии и просветления периостеоцитарной зоны

Реакция костной ткани на внедрение имплантатов носила системный характер, что подтверждалось направленностью и выраженностью изменений изучаемых показателей в контралатеральных конечностях с КД, которые помимо прочего были обусловлены типом внедренного имплантата в опытной конечности. Внедрение $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ стимулировало регенерацию дефекта и в контралатеральной конечности, по сравнению с $\text{PTi}_{40}\text{МК}$.

3.2.3. Особенности репаративного остеогенеза при остеоинтеграции пористых титановых имплантатов

Через 4 недели после операции в области внедрения $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ и на прилежащих к имплантату участках кортикальной пластинки были выявлены небольшие периостальные наложения. Восстановление кортикальной пластинки происходило как за счет образования и компактизации костных трабекул на месте периостальных костных наложений, так и за счет аппозиционного роста костной ткани и комплексов хрящевых клеток от краев губчатой части ложа с последующей перестройкой и образованием компактной костной ткани. Было отмечено

узурирование (образование небольших краевых дефектов) края кортикальной пластинки в месте внедрения имплантатов, ее истончение в этой области (до 1/2 от исходной высоты), что, по нашему мнению, являлось исходом местной воспалительной реакции, развившейся в ответ на травму.

В прилежащих к имплантату участках костного ложа были выявлены посттравматические изменения: небольшие зоны rarefакции костной ткани (глубиной ~0,3 см преимущественно со стороны метафиза). На этих участках костные балочки истончены, межбалочные пространства расширены, в диафизе вытянуты параллельно компактному слою, содержат преимущественно жировой малоклеточный костный мозг, межучточное костное вещество слабо базофильное, но вокруг сосудов окрашивается более интенсивно. В отделах, прилежащих к имплантатам, были выявлены признаки выраженных дистрофических изменений костной ткани (базофилия, неравномерность окрашивания, у единичных остеонов – прерывистость и неровность толщины линий склеивания, неравные расстояния между линиями склеивания, у трабекул – неровность края). Костное вещество на краевых участках костного ложа имело ограниченные небольшие области некроза (рисунок 3.2.3.1) (на глубине ~ до 1/2 высоты кортикальной пластинки), которые характеризовались запустеванием некоторого количества лакун вследствие гибели остеоцитов, метакромазией межучточного вещества, что свидетельствовало о дезинтеграции коллагеновых волокон. Было отмечено расширение, отек некоторых гаверсовых каналов, заполнение части из них рыхлой соединительной тканью.

На краях костных фрагментов кортикальной пластинки, ограничивающих дефект, были выявлены участки костной ткани, подвергающиеся резорбции и единичные остеобласты в резорбционных лакунах то есть, степень поврежденности прилежащих к дефекту участков кости уменьшалась.

В области смоделированного дефекта костной ткани выявлена выраженная активность процессов остеогенеза. Между внедренным имплантатом и костным ложем располагалась сеть анастомозирующих ветвящихся молодых костных трабекул, с находящимися на их поверхности в большом количестве остеобластами. Наблюдались процессы перестройки новообразованных молодых трабекул с образованием зрелой пластинчатой кости. Межтрабекулярные пространства характеризовались значительным количеством клеточных элементов, наличием новообразованных сосудов. В межбалочном пространстве были обнаружены элементы костного мозга смешанного характера – жирового и миелоидного.

В периферических отделах области внедрения имплантата остеогенез шел за счет вырастающих из костного ложа молодых костных трабекул, по краям трабекул располагались остеобласты. В центре области внедрения имплантата основной объем пор заполняла преимущественно ретикулофиброзная костная ткань и элементы грубоволокнистой

соединительной ткани, на ограниченных участках выявлены участки более зрелой костной ткани.

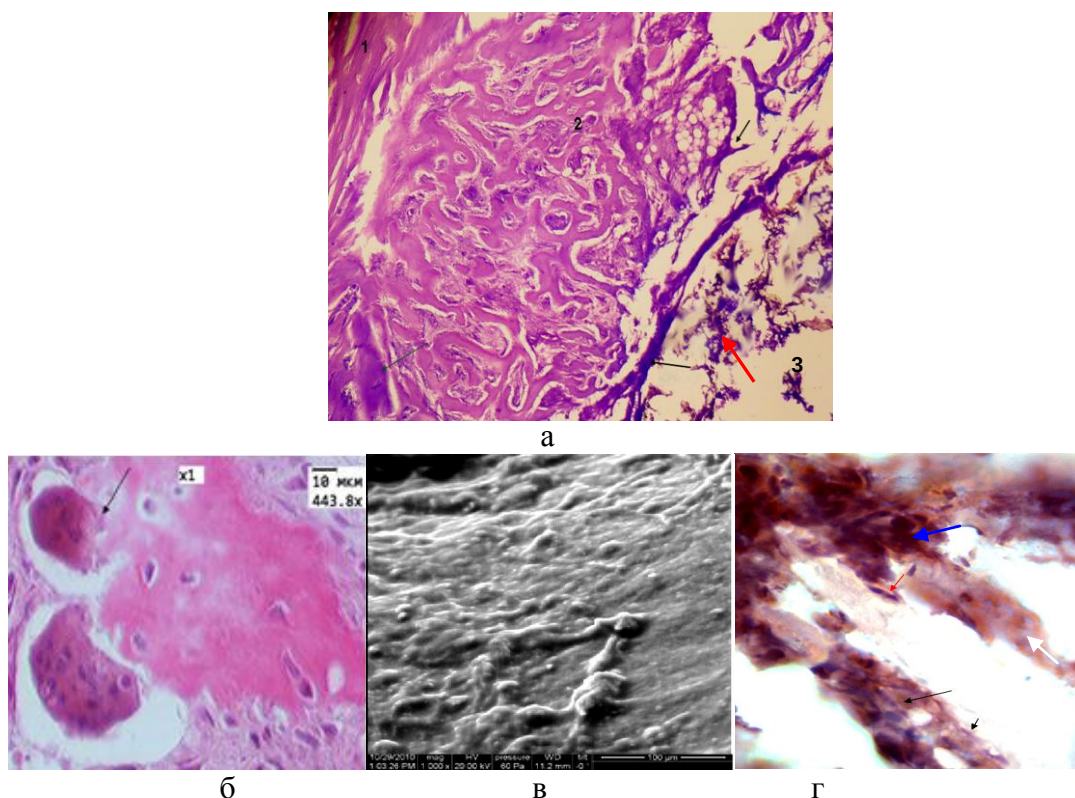


Рисунок 3.2.3.1 – Кролик. Имплантат – ПТi₄₀МК. 4-е недели после операции.

Титановая матрица вытравлена. а, б, г – гистологические срезы.

Окраска гематоксилином-эозином. СМ-микрофото.

а – Ув. х 40, б – Ув. х 1000., г - Ув. х 400. в – СЭМ – микрофото. Ув. х 1000.

а – костное ложе – кортикальная пластинка (1) с признаками дистрофии (метахромазия); область дефекта между костным ложем и имплантатом (2) – молодые костные трабекулы, ретикулофиброзная костная и соединительная ткани, на трабекулах располагаются многочисленные остеобласты; зона внедрения имплантата (3).

Стрелки: зеленая – краевой очаг некроза кортикальной пластинки в костном ложе, черные – из зоны дефекта костные трабекулы вырастают в периферические поры; красная – новообразованное в периферических порах костное вещество.

б – прилежащий к имплантату участок костного ложа. Лакуна с остеокластами, вероятно, локализуется на месте предсуществовавшего небольшого участка остеонекроза.

Вокруг трабекулы – ретикулофиброзная костная и соединительная ткани.

Стрелки: черная – остеокласт в активном состоянии – уплощенное основание контактирует с резорбируемой трабекулой.

в, г – центральные области внедрения имплантата.

в – веретеновидные и полигональные клетки на поверхности новообразованного костного вещества.

г – незрелая костная ткань. Стрелки: черная - скопление остеогенных клеток с базофильной цитоплазмой, красная – диплоидный фибробласт, белая – костная балочка ретикулофиброзной костной ткани, синяя – участок более зрелой костной ткани.

Активно протекало образование межучасточного вещества, представленного диффузно располагающимися гранулами, в состав которых, по данным литературы, входят коллаген и

протеогликаны, и их скоплениями (вторичными гранулами) с постепенным накоплением волокнистых структур – коллагеновых фибрилл [137] (рисунок 3.2.3.2).

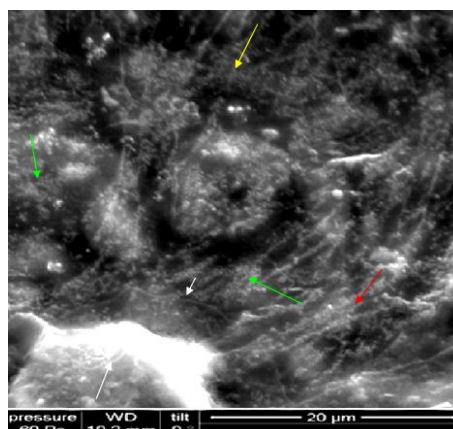


Рисунок 3.2.3.2 – Кролик. Имплантат - ПТi₄₀. 4-е недели после операции. Титановая матрица вытравлена. СЭМ – микрофото. Ув.х 6000. Центральные отделы области внедрения. Поверхность новообразованного костного вещества. Стрелки: зеленые – гранулярный материал; красные – коллагеновые волокна расположены преимущественно параллельно друг другу; желтая – волокна расположены без преобладающей ориентации; белые – новообразованные капилляры

Таким образом, костная ткань была представлена большим количеством остеогенных клеток и базофильно неравномерно окрашенным матриксом. Площадь зрелой костной ткани в поровом пространстве достигала 51,1% (45,4; 68,0).

Взаимосвязано и координировано с заполнением порового пространства костной тканью из костного ложа в поры имплантата прорастали сосуды, что важно для дифференциации остеогенных клеток-предшественниц в остеогенном направлении [6]. Поскольку одним из решающих факторов, обуславливающих образование остеобластов, имеет парциальное давление кислорода, а, следовательно, скорость роста капилляров является одним из факторов лимитирующих путь дифференциации клеток предшественниц в остеогенные клетки.

В 30,8% на отдельных участках между костным ложем и имплантатами были обнаружены ограниченные по протяженности (~ 20% от диаметра имплантата) участки тонкой клеточно-волокнистой прослойки, представленные параллельно ориентированными коллагеновыми волокнами (рисунок 3.2.3.3), фиброцитами и фибробластами. Однако признаков отторжения инородного тела – гигантских многоядерных клеток – не обнаружено. При полуколичественной оценке местной реакции на внедрение имплантатов учитывали выраженность воспалительной реакции (присутствие, количество, наличие скоплений нейтрофилов, лимфоцитов, макрофагов, плазматических клеток, гигантских клеток), васкуляризацию, фиброз, жировую инфильтрацию, наличие травматического некроза, инородных веществ.

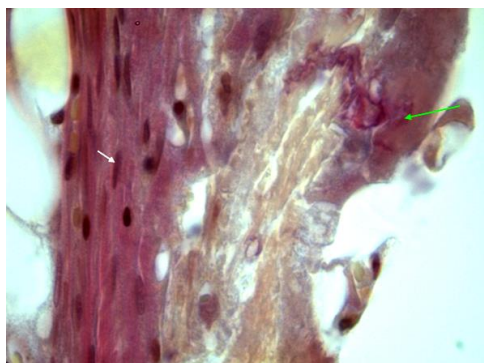


Рисунок 3.2.3.3 – Кролик. Имплантат – ПТі₄₀. 4 недели после операции. Титановая матрица вытравлена. Гистологический срез. Окраска гематоксилином-эозином. СМ-микрофото.

Ув. х 400. Клеточно-волоконистая прослойка на границе имплантата и костного ложа.

Стрелки: белые – фибробласты, расположенные между соединительно-тканными волокнами; зеленая – новообразованная в периферических порах костная ткань

Оценку местной реакции выражали в баллах, среднее количество баллов при внедрении ПТі₄₀МК составило – 1,0 (1,0; 2,0) (таблица 3.2.3.1). Наиболее часто выявляли – ограниченные некротические участки костной ткани (в 7-и случаях из 17-и) и ограниченную по протяженности фиброзную прослойку между костным ложем и имплантатом (у 7-х из 17-и кроликов). По условиям данного эксперимента через 4 недели после имплантации у 2-х кроликов из 17 выявлено легкое раздражающее действие на ПТі₄₀МК [54].

Введение ПТі₄₀МК приводит к значимому по сравнению с интактной костной тканью увеличению объемной доли площади клеток, экспрессирующих щелочную фосфатазу ($p \leq 0,049$) (Таблица А.3, рисунок 3.2.3.4), что является признаком функциональной активности остеобластов и сопровождается активацией остеогенеза [292] в прооперированном сегменте кости.

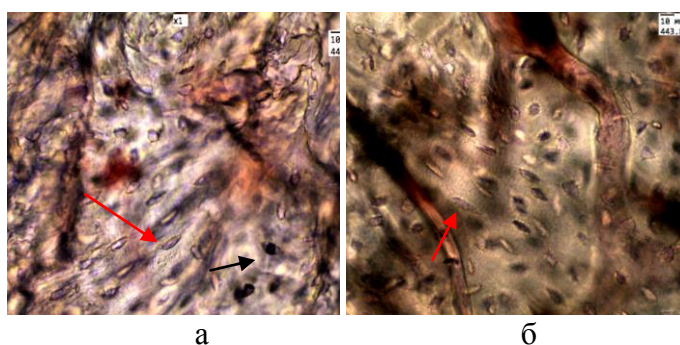


Рисунок 3.2.3.4 – Кролики. а – интактное животное; б – сегмент костной ткани, прилежащий к ПТі₄₀МК. 4 недели после операции. Не декальцинированные препараты.

Гистологические срезы. Окраска на щелочную фосфатазу. СМ-микрофото. Ув. х 400.

Стрелки: красные – остеогенные клетки, не экспрессирующие ЩФ;
черные – экспрессирующие ЩФ

Менее показательны оказались результаты биохимического исследования ЩФ в гомогенатах костной ткани, прилежащей к внедренным имплантатам, хотя общие

закономерности, выявленные при гистохимическом и биохимическом исследованиях, сходны. Так, активность ЩФобщ в костной ткани сегментов, с внедренными ПТi₄₀МК, значимо не отличалась от активности ЩФобщ в интактной костной ткани. Активность термолabile ЩФ (ЩФтерм) в цитоплазматической фракции гомогенатов костной ткани через 4 недели после операции возрастала (таблица А.4) по сравнению с интактной костной тканью (до 232,6%, $p \leq 0,039$). Значимых различий при внедрении ПТi₄₀МК и формировании КД выявлено не было (таблицы А.4).

Активность тартратрезистентной кислой фосфатазы (КФтарт) в гомогенатах костной ткани при внедрении ПТi₄₀МК по сравнению с интактными животными имела тенденцию к увеличению (до 177,8% ($p \leq 0,1$)). Различий между контралатеральными конечностями с ПТi₄₀МК и КД выявлено не было (таблица А.1, А.4).

Таблица 3.2.3.1 – Полуколичественная оценка местной реакции на внедрение имплантатов (медиана, 25-, 75-квартили, количество исследований)

Срок обследования	4 недели после операции	16 недель после операции	52 недели после операции
Тип имплантатов			
ПТi ₄₀ МК	1,0 (1,0; 2,0), n=17	1,0 (0; 1,0), n=11	0 (0; 0,5), n=11
ПТi ₄₀ (а-С)МК	0,5 (0; 1,0), n=12	0 (0; 0), n=11	0 (0; 0), n=14
ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК	0 (0; 1,0), n=9	0 (0; 1,0), n=9	0 (0; 0), n=6

Заключения о степени раздражающего действия делали на основе шкалы: не раздражающее действие количество баллов – 0,0-2,9; легкое раздражающее действие – 3,0-8,9; умеренное раздражающее действие – 9,0-15,0; тяжелый раздражитель >15 баллов.

Изменения активности ЩФтерм в периферической крови в целом соответствовали изменениям данного признака в гомогенатах костной ткани этих же кроликов и результатам, полученным при исследовании количества остеогенных клеток, экспрессирующих щелочную фосфатазу. Максимальные увеличение активности ЩФтерм в периферической крови отмечаются в течение 4-16 недель после операции: соответственно до 230% ($p \leq 0,033$) – через 4 недели после операции, до 415,4% – через 8 ($p \leq 0,028$), через 12 недель – до 357,7% ($p \leq 0,020$), через 16 недель – до 342,3% ($p \leq 0,015$) (таблица А.5, рисунок 3.2.3.5).

Доля ЩФтерм от ЩФобщ значимо возрастает, начиная с 1-й недели после операции, и значительно превышает дооперационный уровень до 24-й недели после операции включительно.

Изменение активности КФтарт в сыворотке периферической (таблица А.5) и после моделирования КД в обеих конечностях и внедрения ПТi₄₀МК в правую конечность носило характер тенденций на ранних сроках наблюдения и снижалось в период с 16-й по 24-ю недели после операции.

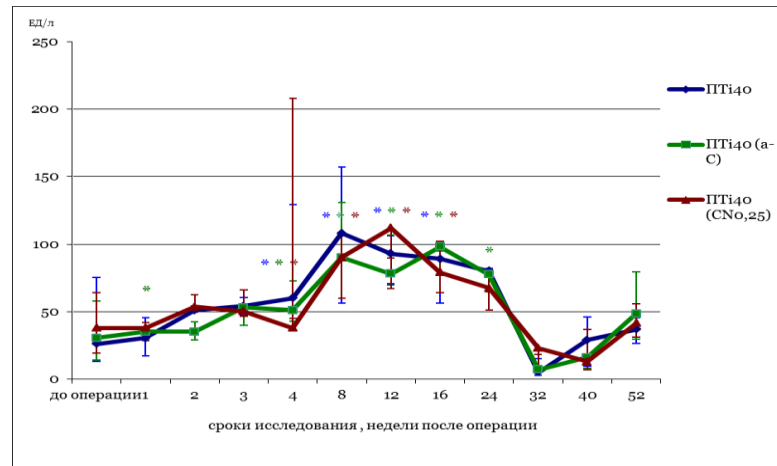


Рисунок 3.2.3.5 – Активность термолabileй фракции щелочной фосфатазы в сыворотке периферической крови кроликов после внедрения пористых титановых имплантатов и моделирования незаполненных дефектов костной ткани в контралатеральной конечности (медиана, 25-, 75- квартили),
* $p \leq 0,05$ – по сравнению с дооперационным уровнем соответствующей группы

Таким образом, в течение 1-16 недель после операции активность анаболических процессов в костной ткани нарастала, на что указывало повышение активности ЩФтерм на фоне отсутствия изменения активности КФтарт. Принципиальным является сам факт отсутствия увеличения активности КФтарт в течение всего времени наблюдения, как в костной ткани, так и сыворотке крови, особенно на поздних сроках наблюдения, что подтверждает отсутствие реакции отторжения на внедренные имплантаты.

Перспективными маркерами деструкции соединительной ткани считаются ММР-1 и тканевой ингибитор металлопротеиназы 1 (TIMP-1) [177]. ММР-1 или интерстициальная коллагеназа относится к семейству секреторных цинковых металлопротеиназ, подсемейству коллагеназ, участвует в специфическом гидролизе нативного коллагена I, II, III VII, X типов, при физиологических значениях pH, инактивирует ИЛ-1 β [151]. Регуляция синтеза и секреции ММР осуществляется преимущественно провоспалительными цитокинами, интегринами, простагландином E. Активируют большинство ММР протеазы типа плазмينا и активатора плазминогена урокиназного типа. Основными продуцентами ММР-1 считаются фибробласты, эндотелиальные клетки, так же синтезируют его моноциты/макрофаги, остеобласты [21]. Концентрация ММР-1 – фермента, осуществляющего гидролиз коллагенов внеклеточного матрикса [356], значительно увеличивалась через 4 недели после операции (до 190,9%), однако в силу недостаточного объема выборки статистической значимости выявлено не было. Аналогична динамика TIMP-1, способного непосредственно взаимодействовать с активным центром ММР-1 и ограничивать деструктивные процессы – обнаружено увеличение его уровня через 4 недели и нормализация к 16 неделям (таблица 3.2.3.5) после имплантации.

Таким образом, резорбция некротизированных участков костного вещества, вероятно, происходит с участием механизма «гладкой», или «химической резорбции» с последующим замещением дефектов ретикулофиброзной костной тканью.

Минерализацию новообразованной в порах имплантатов костной ткани мы оценивали по соотношению Ca/P, на периферии зоны внедрения имплантата этот показатель достигал 66,4%, а в центре зоны внедрения – 54,4% по сравнению с интактной костной тканью.

Таблица 3.2.3.5 – Концентрация регуляторных молекул и ферментов в периферической крови кроликов при формировании краевых дефектов большеберцовых и бедренных костей в обеих конечностях и внедрения в правую конечность пористых титановых имплантатов, насыщенных миелокариоцитами (медиана, 25-, 75-квартили, количество исследований)

Срок обследования	Тип имплантатов	Концентрация IGF-1, нг/мл	Концентрация КМБ-2, пг/мл	Концентрация MMP-1, нг/мл	Концентрация TIMP-1, пг/мл
До операции	PTi ₄₀ МК	2,1 (1,7; 4,0) n=5	87,4 (67,5; 44,7) n=4	4,4 (4,3; 4,5) n=6	106,3 (98,0;18,9) n=5
	PTi ₄₀ (а-С) МК	2,5 (2,2; 6,0) n=6	110,4(81,1;139,6) n=4	4,7 (4,3; 5,0) n=6	87,3 (83,9; 104,6) n=6
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК	3,2 (2,9; 3,5) n=6	121,7(86,2;202,1) n=4	4,5 (4,4; 4,9) n=5	90,2 (85,4; 94,3) n=6
После операции					
4-е недели	PTi ₄₀ МК	3,3 (2,7; 3,8) n=6	169,6* (156,8;178,0) n=3	8,4 (5,2; 8,9) n=6	123,8 (99,0; 150,8) n=6
	PTi ₄₀ (а-С) МК	8,1* (3,8; 9,2) n=6	352,6 * ** (323,8; 615,2) n=4	5,4 (4,5; 7,6) n=6	105,8 (84,4;124,0) n=6
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК	3,4 (2,26; 3,9) n=5	228,3 (175,5; 446,6) n=4	4,3 (4,2; 4,5) n=6	102,4 (90,2; 118,5) n=6
16-ть недель	PTi ₄₀ МК	7,04 (4,5; 9,4) n=6	101,8 (46,6; 195,2) n=6	4,15 (3,99; 4,31) n=6	93,1 (90,2; 110,7) n=6
	PTi ₄₀ (а-С) МК	6,7 (4,2; 8,7) n=6	235,5 (199,1;402,1) n=5	4,2 (4,1; 4,4) n=5	99,0 (91,4; 109,0) n=6
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК	8,9* (6,8; 10,3) n=5	222,8 * (200,4; 269,7) n=6	4,5 (4,3; 8,3) n=6	129,7 (87,8;137,4) n=5
52-е недели	PTi ₄₀ МК	1,9 (1,3; 4,5) n=6	90,5 (75,4; 120,7) n=4	4,0 (4,1; 4,6) n=6	110,3 (92,0;125,9) n=5
	PTi ₄₀ (а-С) МК	3,0 (2,0; 7,3) n=6	112,9 (101,1;129,5) n=5	4,8 (4,1; 5,2) n=6	95,0 (85,9; 114,2) n=6
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК	3,3 (2,2; 3,8) n=5	125,7 (86,2;150,4) n=4	4,7 (4,1; 4,8) n=5	93,2 (86,2; 96,3) n=6

*p≤0,05 по сравнению с дооперационным уровнем в соответствующей группе,

** p≤0,05 по сравнению с группой PTi₄₀МК

Исследование прочности на разрыв блока «костное ложе – новообразованная в порах костная ткань» продемонстрировало, что прочность костного блока, с PTi₄₀МК, превышала

прочность костного блока с КД в 1,95 раза. По сравнению с интактной костной тканью прочность новообразованной костной ткани составляла 41% (38; 41) (таблица 3.2.3.6).

Через 16-ть недель после операции ткань костного ложа имела более компактное строение. Дистрофические изменения, узурация, rareфикация были менее выражены, однако появились признаки склерозирования. Прилежащая к дефекту кортикальная пластинка в области, примыкающей к внедренному имплантату, была, по-прежнему, истончена (~ 3/4 от первоначальной высоты), а в месте внедрения – восстановлена частично.

Таблица 3.2.3.6 – Значения относительного предела прочности на растяжение новообразованной костной ткани на границе «костное ложе – имплантат» (в % от интактной кости)

Тип имплантата	Срок исследования, недели после операции		
	4	16	52
PTi ₄₀ МК	41; 41; 40; 35	44; 47; 48	100; 89; 90; 97 [■]
PTi ₄₀ (a-C) МК	69; 43; 58 *	71; 68; 72 *	88; 98; 114; 96
PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК	50; 54; 51*	49; 62; 61 *	97; 83; 102 [■]

■ - разрыв произошел по уровню интактной костной ткани,

* $p \leq 0,05$ по сравнению с PTi₄₀ МК в соответствующий срок после операции

В зоне сформированного искусственного дефекта сеть костных трабекул становилась более плотной, расположенной упорядоченно по сравнению с предыдущим сроком. Количество остеогенных клеток в костной ткани снижалось, они приобретали характерную для остеоцитов уплощенную полигональную форму и располагались в плоских лакунах в образуемом ими матриксе, внутри новых слоев или между слоями. Матрикс был окрашен более слабо, но более равномерно, хотя новообразованные пластинки различались по тону вероятно за счет различного направления волокон в соседних слоях. Между трабекулами были выявлены включения кроветворной ткани и жирового костного мозга. В 36,4% случаев на границе костного ложа были обнаружены ограниченные по протяженности соединительно-тканые элементы.

При полуколичественной оценке местной реакции на внедрение PTi₄₀МК имплантатов среднее количество баллов в группе через 16 недель после имплантации составило – 1 (0; 1) (таблица 3.2.3.1). Наиболее часто выявляли – ограниченные некротические участки костной ткани (в 6 случаях из 11) и ограниченную по протяженности фиброзную прослойку между костным ложем и имплантатом (у 4 из 11 кроликов). По условиям данного эксперимента через 16 недель после имплантации реакции раздражения на образцы PTi₄₀МК не выявлено [54].

По периферии области внедрения имплантата часть новообразованных костных структур имела плотное сращение с костным ложем хорошо сформированными костными трабекулами (рисунок 3.2.3.6) врастающими из костного ложа. При исследовании шлифов блоков «костное ложе – имплантат – новообразованная костная ткань», полученных на 16-ю неделю после

операции, было выявлено, что большая часть костной ткани прилегает непосредственно к поверхности титановой матрицы, что является одним из признаков остеоинтеграции имплантата. В центральной части имплантата преимущественно были расположены первичные костные балочки. На ограниченных участках выявлены признаки склерозирования новообразованного костного вещества. Площадь зрелой костной ткани в порах имплантата увеличивалась и достигала 59,5% (40,2; 64,2).

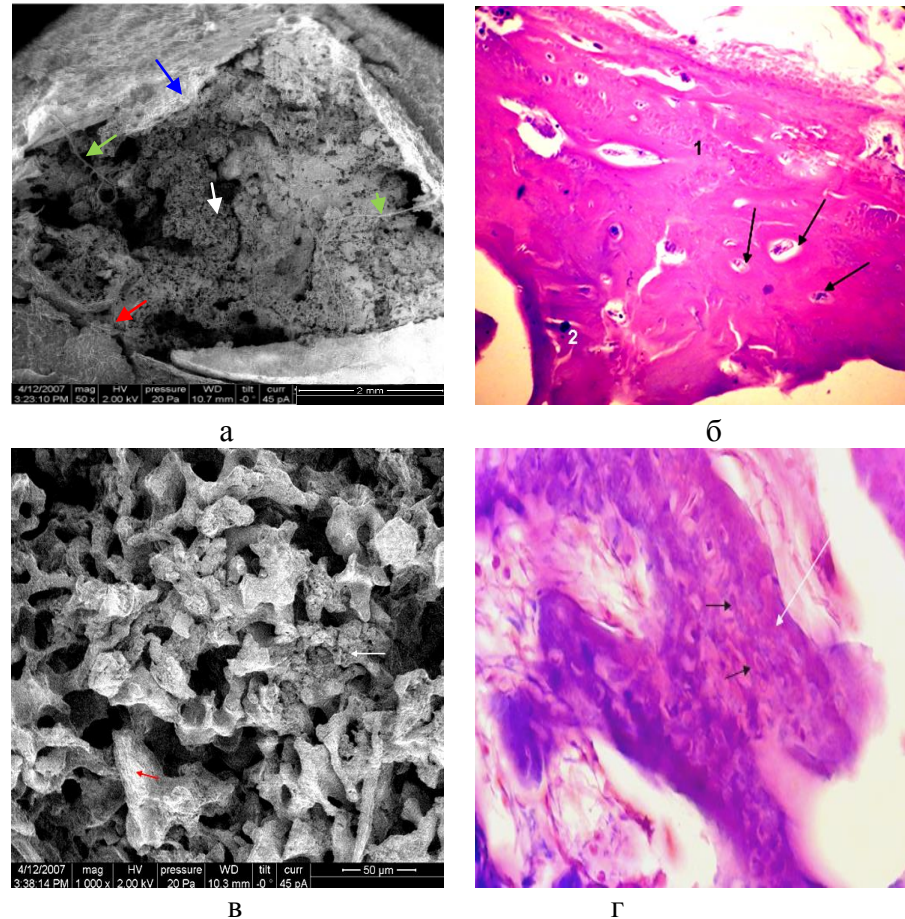


Рисунок 3.2.3.6 – Кролики. Имплантат - ПТi₄₀МК. 16-ть недели после операции. Титановая матрица вытравлена. а, в – СЭМ – микрофото. б, г – гистологический срез. Окраска гематоксилином-эозином. СМ-микрофото. б - Ув. х 100, в – Ув. х 200.

а – поровое пространство заполнено костной тканью различной степенью зрелости. Стрелки: красная – врастающая из костного ложа в поверхностные поры пластинчатая костная ткань; зеленые – сосуды; белая – ретикулофиброзная костная ткань в центральных областях; синяя – элементы соединительно-тканной капсулы. Костное ложе (1) и врастающие из него в периферические поры костные трабекулы (2).

б – костное ложе с признаками дистрофии – метахромазией, расширенными отечными гаверсовыми каналами (черные стрелки).

в, г – центральные отделы области внедрения имплантата, в – стрелки: белая – ретикулофиброзная, красная – пластинчатая костная ткань.

г – неравномерно окрашенное межклеточное вещество с большим количеством остеогенных клеток. Стрелки: белая – костная трабекула; черная – остециты

Активность остеогенеза в костной ткани оперированного сегмента с внедренным имплантатом $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ оставалась высокой – происходило увеличение (до 109%) среднего количества клеток, экспрессирующих ЩФ на 100 мкм^2 площади препарата, ($p \leq 0,034$) (таблица А.3), по сравнению с интактной костной тканью. Соответственно, увеличивалась объемная доля площади профилей клеток, экспрессирующих ЩФ (до 112%), данный показатель также превышал его значение в интактной костной ткани ($p \leq 0,034$). Доля клеток, экспрессирующих ЩФ, превышала этот показатель при формировании КД.

При детальном исследовании гистологических срезов новообразованной в порах костной ткани кроликов в периостеоцитарных зонах была обнаружена метакромазия костного вещества, расширение некоторых остеоцитарных лакун, по сравнению с интактными животными, просветление периостеоцитарной зоны. Данные факты, укладываются в картину, соответствующую остеоцитарному ремоделированию кости, которое характеризуется изменением формы и размеров лакунарно-канальцевого пространств.

Причем последний механизм при использовании данной модели замещения костного дефекта у кроликов, очевидно, имеет значительную роль в репарации костной ткани, на что косвенно указывает динамика активности КФтарт в периферической крови. В период активно протекающего ремоделирования костной ткани через 16-ть недель после операции она снижалась по сравнению с активностью в интактной кости, и к 24-м неделям после операции составляла 51,9% ($p \leq 0,014$) по сравнению с дооперационным уровнем в данной группе.

Концентрации ММР-1 и ТИМР-1 через 16-ть недель после операции соответствовали уровню до операции.

Активность ЩФтерм в периферической крови, напротив, была увеличена с 4-й до 24-й недели после операции (соответственно до 230,8% через 4 недели после операции ($p \leq 0,033$), 415,4% – 8-я неделя ($p \leq 0,028$), 357,4% – 12-я ($p \leq 0,020$), 342,3% – 16-я ($p \leq 0,015$), 307,7% – 24-я неделя после операции).

После 16-и недель активность остеогенеза начинала снижаться, что отчетливо выявлялось при анализе динамики показателей метаболизма костной ткани в периферической крови – ЩФтерм (таблица А.5).

Относительный предел прочности костной ткани на разрыв на границе «костное ложе – новообразованная в порах $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ костная ткань» к 16-и неделям после операции достигал 47% от интактной костной ткани (таблица 3.2.3.6).

Через 36 недель после имплантации $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ было выявлено: кортикальная пластинка была неравномерной толщины, костное ложе состояло из губчатой костной ткани с умеренно выраженными дистрофическими изменениями трабекул. Костный мозг в периимплантатном пространстве – миелоидный и жировой. Костные трабекулы, образовавшиеся в порах

имплантата, распределены равномерно, отмечается частичное склерозирование новообразованной костной ткани. В центре области внедрения имплантатов сохраняется незрелая костная ткань.

В сыворотке периферической крови исследуемые маркеры метаболизма костной ткани не отличались от значений у интактных животных.

Через 52 недели целостность кортикальной пластинки была восстановлена, однако ее высота по-прежнему оставалась меньшей, чем у интактных животных на 10-15%. В непосредственно прилежащих к имплантату участках кортикальной пластинки и костной ткани костного ложа обнаружены распространенные дистрофические и очаговые склеротические изменения. Вероятно, в связи с этим активность ЩФ в костной ткани прилежащего к внедренному имплантату сегмента, была значимо ниже (64,9%, $p \leq 0,0015$), чем в интактной кости, а активность ЩФтерм имела тенденцию к снижению (50%, $p \leq 0,075$) по сравнению с интактной костной тканью.

При этом количество остеогенных клеток, количество клеток, экспрессирующих ЩФ, доля клеток экспрессирующих ЩФ, объемная доля площади клеток, экспрессирующих ЩФ, значимо не отличались от показателей в интактной костной ткани (таблицы А.3). Данные различия, возможно, обусловлены техническими особенностями – для биохимических исследований забирали костную ткань, непосредственно прилежащую к имплантату, а для гистохимических исследований – со стороны суставной поверхности коленного сустава.

В периферических отделах области внедрения имплантата располагалась разветвленная сеть костных структур, с четко выраженным остеоцитарным строением и органотипической архитектоникой костных трабекул, прочно связывающих костное ложе с костной тканью в порах имплантата (рисунок 3.2.3.7). Площадь, занятая зрелой костной тканью составляла 56% (33,9; 59,9) (рисунок 3.2.3.8).

Однако во внутреннем поровом пространстве имплантата были выявлены противоположные тенденции: процесс ее ремоделирования продолжался, на что указывало наличие сопряженных по времени и в пространстве на площади, не превышающей 250x250 мкм активных остеокластов, осуществляющих деструкцию костного матрикса и остеогенных клеток, образующих вторичную пластинчатую кость [66] (рисунок 3.2.3.9).

Несмотря на это после 16-и недель наблюдение увеличение площади зрелой костной ткани в порах титановых имплантатов не обнаружено (рисунок 3.2.3.8), а активность остеогенеза в сегменте прилежащей костной ткани снижалась до уровня интактной кости.

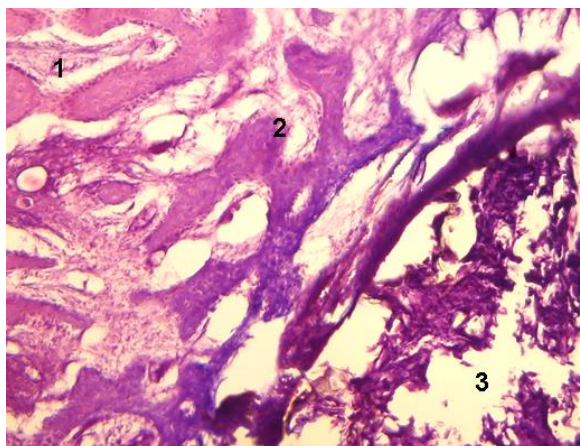


Рисунок 3.2.3.7 – Кролик. Имплантат - ПТi₄₀МК. 52-е недели после операции.

Титановая матрица вытравлена. Гистологический срез.

Окраска гематоксилином-эозином.

СМ-микрофото. Ув. х 40.

Костное ложе (1), область сформированного костного дефекта (2) – граница между ними слабо различима, область внедрения имплантата (3).

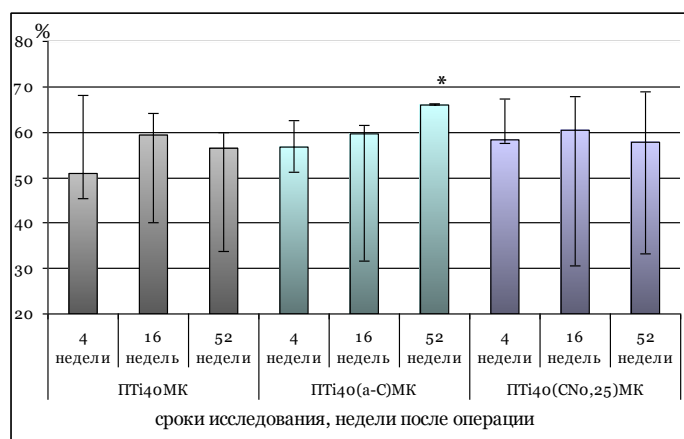


Рисунок 3.2.3.8 – Площадь зрелой костной ткани в порах имплантатов (медиана, 25-, 75-квартили).

* $p \leq 0,05$ по сравнению с ПТi₄₀МК в соответствующий срок после операции

Вероятно, данный факт обусловлен биомеханическими причинами. В центральных отделах внедрения имплантата создаются особые условия для новообразованной костной ткани: деформация матрикса костной ткани минимальна в силу жесткости пористой титановой матрицы, соответственно, не инициируется конвекционный механизм течения жидкости в канальцах к остецитам и от них. В исследованиях, выполненных на животных, было установлено, что в ответ на исчезновение механического раздражения кости в условиях невесомости значительно снижается скорость

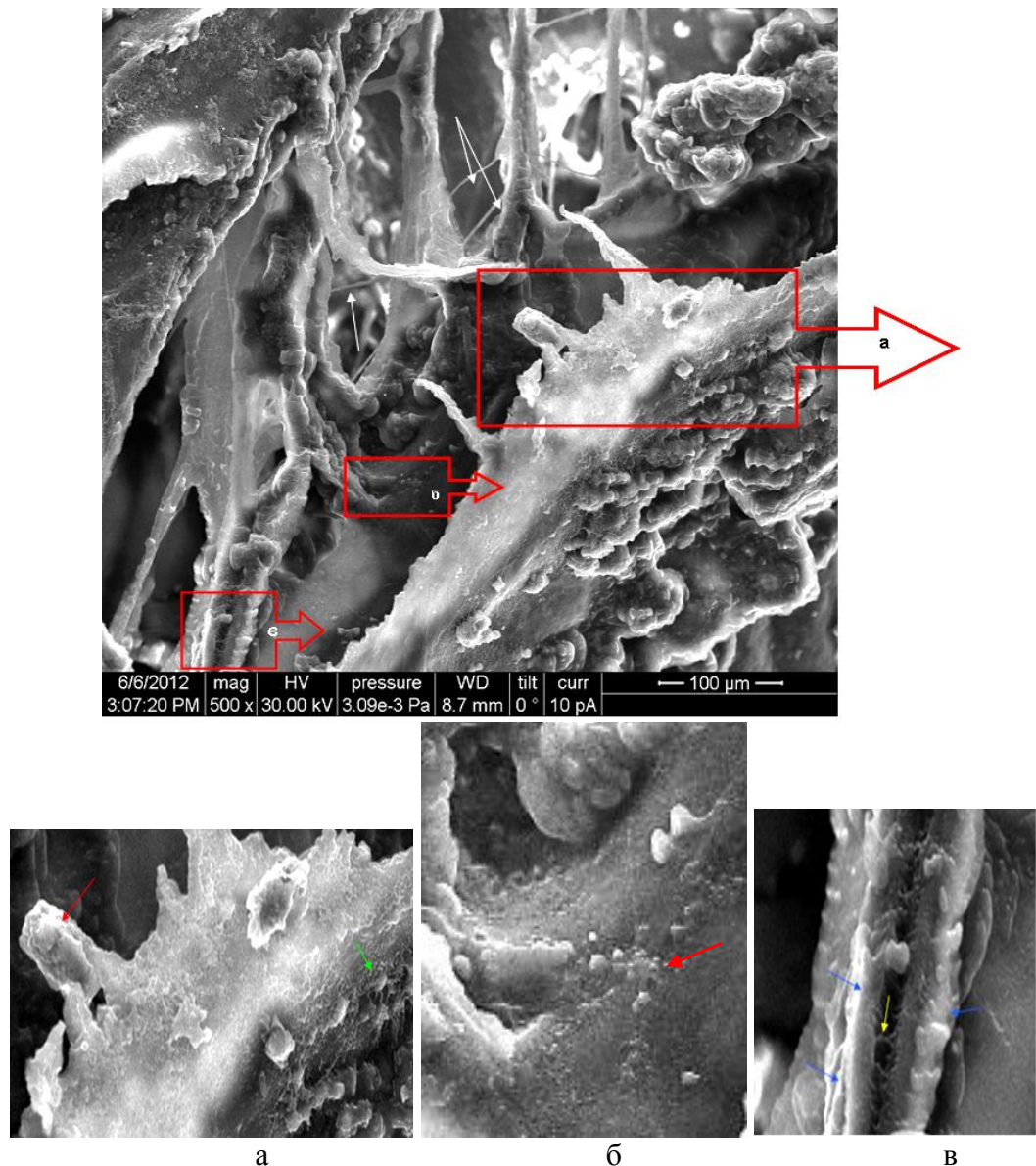


Рисунок 3.2.3.9 – Кролик. Имплантат – ПТi₄₀МК. 52 недели после операции.

Титановая матрица вытравлена. СЭМ – микрофото. Ув. х 500.

Центральная часть области внедрения имплантата. Костная ткань различной степени зрелости, повторяющая форму пор. Стрелки: белые – многочисленные сосуды. а, б, в – увеличенные участки того же фото. а – участок, на котором активно протекает процесс перестройки костной ткани. Стрелки: красные – функционально активный остеокласт в эрозивной лакуне с неровными краями, зеленая – остеогенные клетки полигональной формы; б – скопление, вероятно, кроветворных клеток. в – костные пластинки - синие стрелки; желтая – система связочных волокон, расположенных поперечно ориентации костных пластинок.

перемещения жидкости в эндостальных канальцах и остеоцитарных лакунах кортикальной пластинки бедра [273], происходит активация остеоцитарной резорбции кости и угнетение остеобластического гистогенеза на стадии дифференциации стволовых мультипотентных стромальных клеток в преостеобласты [135, 479]. В настоящее время считается, что снижения механического стресса, приводит к снижению волново- и ионотоков в лакунарно-канальцевой системе остеоцитов, образующих остеоцитарную сеть и регулирующих

направленную подвижность и функциональную активность остеокластов, что инициирует остеокласт-остеобластную резорбцию и запускает процессы ремоделирования в соответствии с механическими потребностями кости [135].

На поверхности костных трабекул были обнаружены кроветворные клетки (рисунок 3.2.3.10). Расположение этих клеток скоплениями вокруг более крупных округлых клеток позволяет предположить, что это гемопоэтические островки, с находящимися в центре макрофагами или ретикулярными клетками, создающих гемопоэтическое микроокружение для кроветворных-прекурсоров гранулоцитарной и эритроцитарной линий [72, 71].

Образованные костные трабекулы умеренно плотные, васкуляризованы. Однако количества этих сосудов явно не достаточно, поскольку на ограниченных, имеющих нечеткие границы небольших участках костной ткани, расположенных преимущественно в центральных отделах области внедрения имплантата, обнаружены признаки остеосклероза (в кортикальной пластинке – сужение гаверсовых каналов, мозаичность строения, а в губчатой костной ткани – уменьшение клеточности, ее уплотнение). Между трабекулами располагаются включения красного и жирового костного мозга с преобладанием последнего. Выявленные изменения мы рассматриваем, как реактивные изменения, являющиеся исходом дистрофического процесса (рисунок 3.2.3.11).

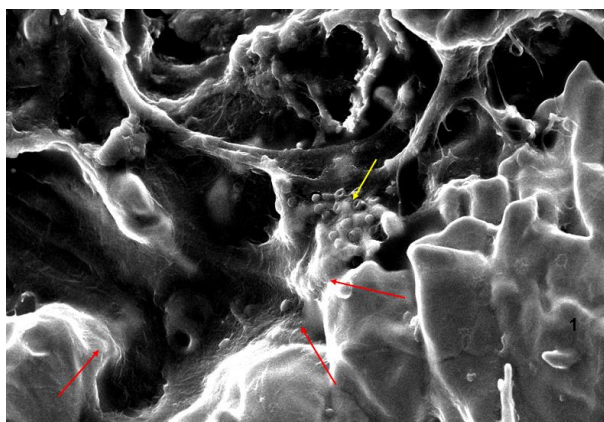


Рисунок 3.2.3.10 – Кролик. Имплантат - ПТi₄₀МК. 16 недель после операции. Блок «костное ложе – имплантат с образованной в порах костной тканью» надпилен и расколот. СЭМ – микрофото. Ув. х 800. Стрелки: красные – области прямого контакта костных структур с поверхностью металла (1); желтая – эритробластический островок

В периферической крови показатели метаболической активности костной ткани – активность ЩФ, КФ и их костных фракций, соответствовали значениям данных показателей у интактных животных.

Таким образом, при использовании ПТi₄₀МК новообразованная в области между костным ложем и имплантатом, а также на периферии области внедрения имплантата костная ткань имеет типичное для данной анатомической области строение. За счет этого относительная прочность блока – «костное ложе – костная ткань в порах имплантата» – к 52-м неделям после

операции в условиях одноосного растяжения – объективного критерия оценки морфофункционального состояния костей [65], сопоставима с прочностью нативной костной ткани – 94%, (89%, 98%). При разрыве одного из костных блоков с ПТi₄₀МК разрыв произошел не по границе сформированного искусственного дефекта.

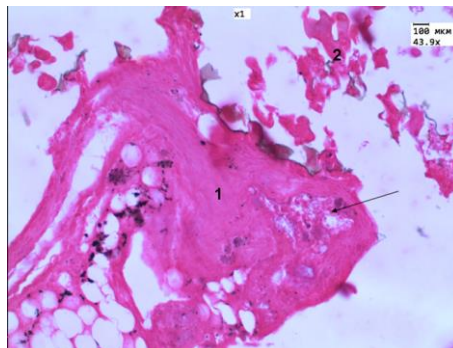


Рисунок 3.2.3.11 – Кролик. Имплантат - ПТi₄₀МК. 52 недели после операции.

Титановая матрица вытравлена. Центральные отделы области внедрения имплантата.

Гистологический срез. Окраска гематоксилином-эозином. СМ-микрофото. Ув. х 200.

Умеренная плотность костных трабекул (1), костные структуры (2). Стрелки: черная – участки дистрофии и ограниченные участки некроза костной ткани. Черная зернистость, вероятно, обусловлена импрегнацией тканей солями титана при вытравливании титановой матрицы

Полученные результаты согласуются с многочисленными данными литературы и клиническим опытом о положительном эффекте на репаративный остеогенез заполнения некритических дефектов костной ткани остеокондуктивным материалом, что создает трехмерное пространство с лучшими условиями для проявления морфогенетических потенций остеогенными прекурсорами [76, 225]. Кроме того, пористый титан обладает свойством остеопротекторности – способностью воссоздавать утраченный анатомический объем и частично прочность кости, а также противостоит заполнению дефекта кости соединительной и мышечной тканям.

Механизмы регуляции репаративной регенерации костной ткани опосредуются системными (гормональными, нейроэндокринными факторами, витаминами) и локальными (ростовые факторы, цитокины, костные морфогенетические белки) факторами. Из системных факторов мы исследовали динамику одного из значимых пептидных гормонов – IGF-1, который оказывает влияние в составе «оси»: гипофизарный гормон роста, IGF-1, IGF-2, два рецептора (IGFR1, IGFR2), рецептор инсулина, 6-ть связывающих белков (IGFBP). Под влиянием гормона роста его секретируют гепатоциты (в этом случае он действует как гормон), меньшее его количество экспрессируется остеобластами, в этом случае он является аутокринным или паракринным локальным фактором. Концентрация IGF-1 в периферической крови кроликов с ПТi₄₀МК имеет тенденцию к увеличению в течение 16 недель после операции (таблица 3.2.3.5).

К локальным факторам относится КМБ-2. Его концентрация в периферической крови кроликов с ПТi₄₀МК увеличивалась через 4 недели до 194,1% ($p \leq 0,043$) и нормализовалась к 16-и неделям после операции.

3.2.4. Особенности репаративного остеогенеза при остеоинтеграции пористых титановых имплантатов с углеродсодержащими пленками

При внедрении ПТi₄₀(а-С)МК и ПТi₄₀(CN_{0,25})МК принципиальных отличий в течение репаративного процесса по сравнению с ПТi₄₀МК выявлено не было, обнаруженные изменения касались выраженности тех или иных описанных выше признаков.

Отличительные особенности заключались в следующем: на начальных этапах (4 недели после операции) исследования признаки дистрофических изменений, rareфикации в костном ложе были менее значительными и имели следующую степень выраженности ПТi₄₀МК > ПТi₄₀(CN_{0,25})МК $\approx$ ПТi₄₀(а-С)МК. Отсутствовали или были минимально выражены признаки очаговых некротических процессов в костном ложе, что, вероятно, связано с большей скоростью заполнения дефекта новообразованными тканями, и, что особенно важно, прорастающими из костного ложа сосудами. Вследствие этого происходило более быстрое и полное восстановление кровоснабжения и микроциркуляции в костной ткани как в новообразованной, так и в костном ложе.

Через 4 недели после внедрения ПТi₄₀(а-С)МК в области сформированного дефекта периостальные наложения были минимальны, что указывало на значительную роль эндоста и костного мозга в качестве источников остеогенных клеток-предшественниц. Дефект был выполнен молодыми и зрелыми костными трабекулами, образующими мелкопетлистую губчатую костную ткань, в ее межтрабекулярных пространствах располагался миелоидный и жировой костный мозг.

При полуколичественной оценке степени местного раздражающего действия (таблица 3.2.3.1) среднее количество баллов в группе ПТi₄₀(а-С)МК составляло – 0,5 (0; 1). Наиболее часто выявляемые признаки отличались при внедрении ПТi₄₀МК и ПТi₄₀(а-С)МК. При имплантации ПТi₄₀(а-С)МК это были минимальные проявления реакции сосудистого звена в виде 1-3 очагов неоваскуляризации (в 5 случаях из 12), что, возможно, является проявлением активной васкуляризации новообразованной костной ткани; редкие скопления от 2 до 5 плазматических клеток (у 3 из 12 кроликов). Соединительнотканые элементы между костным ложем и имплантатами выявлены в 8,3% (для сравнения при внедрении ПТi₄₀МК – 30,8%), что было расценено нами как морфологический признак лучшей остеоинтеграции ПТi₄₀(а-С)МК. На

внедрение $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ у 1 из 12-и кроликов выявлено местное легкое раздражающее действие [54].

Костеобразование в порах $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ происходило активнее, что морфологически проявлялось большей клеточностью сформированных по ходу пор молодых костных трабекул и меньшей метахромазией матрикса на периферии области внедрения имплантата в ранние сроки наблюдения (рисунок 3.2.4.1), чем при имплантации $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, значимым увеличением в прилежащих сегментах кости количества остеогенных клеток на 100 мкм^2 гистологического препарата, среднего количества клеток, экспрессирующих ЩФ, доли клеток, экспрессирующих ЩФ, и объемной доли их площади не только по сравнению с интактной костной тканью, но и по сравнению группой $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ (рисунок 3.2.4.2) и с КД. Увеличением активность ЩФобщ (до 352,1%, $p \leq 0,014$) и ЩФтерм (151,9 %, $p \leq 0,043$) в гомогенатах костной ткани по сравнению с интактной костной тканью (таблица А.4).

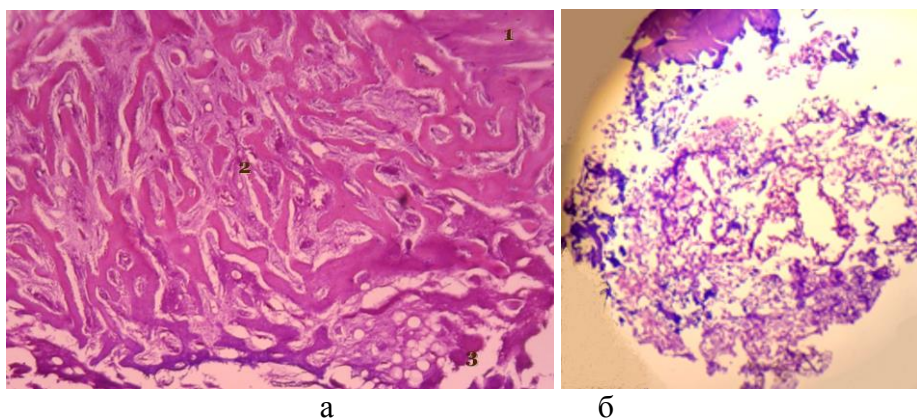


Рисунок 3.2.4.1 – Кролик. Область внедрения имплантата – $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. 4-е недели после операции. Титановая матрица вытравлена. Гистологический срез. СМ-микрофото.

Окраска гематоксилином-эозином. а – Ув. $\times 40$, б – Ув. $\times 100$.

а – костное ложе (1), область дефекта (2), периферическая область внедрения имплантата (3);
б – заполняющая поры новообразованная костная ткань, кортикальная пластинка частично восстановлена

Средняя площадь клеток, экспрессирующих ЩФ, у животных с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ была ниже (85,1%, $p \leq 0,049$), чем в контралатеральных конечностях с КД, что мы связываем с ускорением дифференцировки остеогенных клеток при внедрении в искусственный дефект $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$.

Механизм активации остеогенеза в сегменте костной ткани, прилежащем к $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, вероятно, обусловлен увеличением пролиферации остеогенных клеток-предшественниц, а также ускорением их дифференциации по сравнению с интактной костной тканью, сегментом кости с КД и костью, с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$.

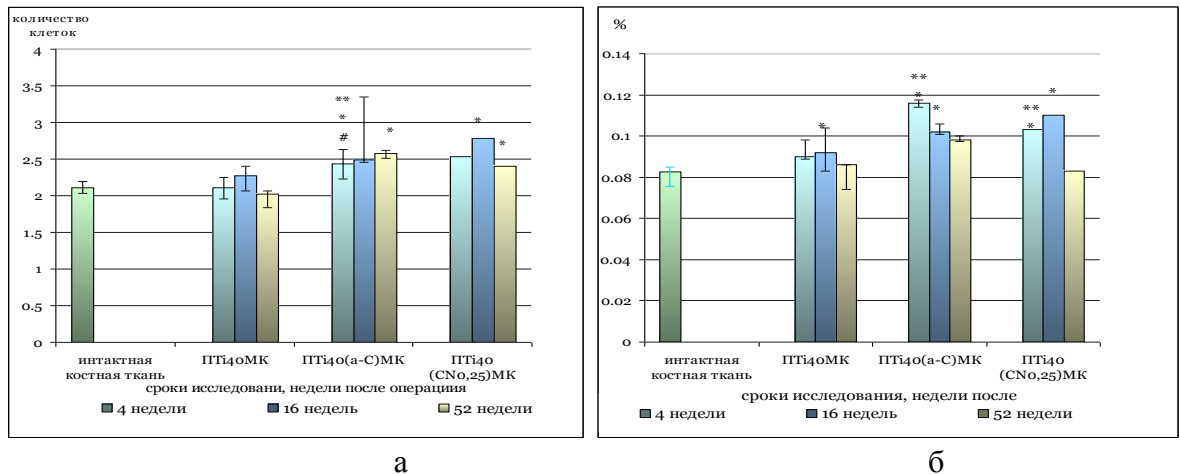


Рисунок 3.2.4.2 – Кролики. Гистохимическое исследование сегментов костной ткани, прилежащих к внедренным имплантатам. Медиана, 25-, 75-квартили.

а – количество остеогенных клеток на 100 мкм²; б – объемная доля площади клеток, экспрессирующих щелочную фосфатазу.

Где * $p \leq 0,05$ по сравнению с интактной костью,

$p \leq 0,05$ по сравнению с КД в соответствующий срок после операции,

** $p \leq 0,05$ по сравнению с PTi₄₀MK в соответствующий срок после операции

В сыворотке периферической крови динамика и выраженность изменений изучаемых маркеров метаболизма костной ткани не отличается у животных с внедренными PTi₄₀MK, PTi₄₀(a-C)MK, PTi₄₀(CN_{0,25})MK в течение всего периода наблюдения.

Также через 4 недели после операции не отличалась площадь, занятая зрелой костной тканью во внутреннем поровом пространстве имплантатов. Зрелая костная ткань в области внедрения PTi₄₀(a-C)MK составляла 56,8% (51,3; 62,7), PTi₄₀MK - 51,0% (45,4; 68,0). Зрелая костная ткань располагалась преимущественно в периферической области внедрения имплантатов.

Минерализация новообразованной костной ткани у животных с внедренными PTi₄₀MK, PTi₄₀(a-C)MK через 4 недели после операции значимо не различались, однако отмечается тенденция в увеличении соотношения Ca/P при использовании имплантатов с алмазоподобными пленками. При внедрении PTi₄₀(a-C)MK соотношение Ca/P достигало 72% на периферии области внедрения имплантата и 60% в центре имплантата по сравнению с данным показателем в интактной костной ткани.

Прочность костной ткани при внедрении PTi₄₀(a-C)MK на границе «костное ложе – имплантат» на разрыв значимо превышала прочность костного блока при внедрении PTi₄₀MK и достигала 58% от прочности интактной кости.

Активация остеогенеза отмечалась в течение более длительного времени, что подтверждала динамика изучаемых показателей. Так, через 16 недель после внедрения PTi₄₀(a-C)MK активность ЩФтерм в цитоплазматической фракции гомогенатов костной ткани превышала данный показатель в интактной костной ткани ($p \leq 0,043$) и соотносилась с

увеличенным количеством клеток, экспрессирующих ЩФ по сравнению с интактной костной тканью ($p \leq 0,034$). В группе $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ к 16 неделям после операции появлялись признаки снижения активности остеогенеза (снижение активности ЩФтерм, количества клеток экспрессирующих ЩФ).

Более высокая активность остеогенеза имела следствие – более быстрое восстановление кортикальных пластинок, хотя их высота оставалась меньшей (на $\sim 10\%$), чем исходная (рисунок 3.2.4.3).

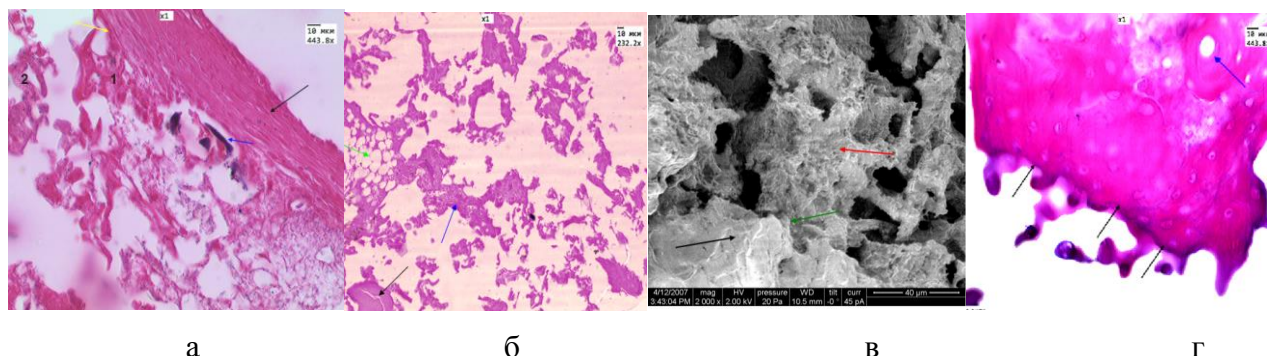


Рисунок 3.2.4.3 – Кролик. Область внедрения $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. 16-ть недель после операции. Титановая матрица вытравлена. а, б, г – Гистологические срезы. СМ-микрофото.

Окраска гематоксилином-эозином.

а – Ув. $\times 100$, б - Ув. $\times 200$, г – Ув. $\times 400$. в – СЭМ – микрофото, Ув. $\times 2000$.

а – периферическая область внедрения имплантата. Стрелки: черная – восстановленная кортикальная пластинка, не достигающая исходной высоты; желтая – срастающиеся с кортикальной пластинкой трабекулы (1), ретикулофиброзная костная ткань (2); синяя – остатки титановой матрицы.

б, в, г – центральные области внедрения имплантата.

б – Стрелки: черные – зрелые трабекулы в периферических отделах имплантата; синяя – ретикулофиброзная костная ткань, зеленая – жировой костный мозг.

в – Стрелки: красная – первичные трабекулы ретикулофиброзной костной ткани; черные – более зрелые трабекулы; зеленая – место интеграции молодой и более зрелой ткани.

г – Стрелки: синяя – сформированный в поровом пространстве остеон; черные – места интеграции молодой, образующейся во внутреннем поровом пространстве и более зрелой костной ткани, прорастающей в периферические поры из костного ложа.

Восстановление кортикальной пластинки происходило преимущественно за счет аппозиционного роста трабекул от края дефекта. Определенный вклад в регенерацию кортикальной пластинки вносили костные трабекулы, врастающие со стороны костного ложа, образованного губчатой костной тканью с последующей перестройкой новообразованной костной ткани.

Поскольку прочность кости определяется в большей степени прочностью кортикальной пластинки, прочность на разрыв блока «костное ложе – новообразованная в порах костная ткань» к 16-и неделям после внедрения $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ значительно превышает прочность костного блока с $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ и достигает 71% от интактной кости. Это, в свою очередь, позволяет

прогнозировать более раннюю функциональную активность пациентов при использовании $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ имплантатов.

При полуколичественной оценке местной реакции на внедрение имплантатов (таблица 3.2.3.1) среднее количество баллов в группе составило – 0 (0; 0). У 1 кролика из 11 (9,1%) выявляли ограниченную по протяженности фиброзную прослойку между костным ложем и имплантатом. По условиям данного эксперимента через 16 недель после имплантации реакции раздражения на образцы $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ не выявлено [54].

Признаки активации дифферона остеобластных клеток (увеличение количества остеогенных клеток, доли клеток, экспрессирующих ЩФ, объемной доли площади клеток, экспрессирующих ЩФ) у животных с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ сохраняются до конца срока наблюдения (52 недели после операции). В результате только в области внедрения имплантатов с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ площадь трабекул с остеоцитарным строением, присущим зрелой структуре костной ткани, увеличивается (рисунок 3.2.4.4) в течение всего срока наблюдения (рисунок 3.2.3.8), соответственно через 4 недели – 56,8% (51,3; 62,7), через 16 недель – 59,6% (31,7; 61,5), к 52 неделям после операции – 66,0% (65,9; 66,2), что отличает данные имплантаты от $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$.

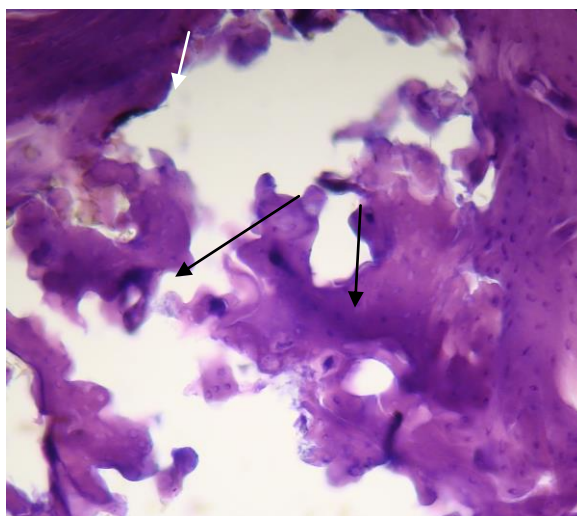


Рисунок 3.2.4.4 – Кролик. Область внедрения имплантата - $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. 52 недели после операции. Титановая матрица вытравлена. Гистологический срез. Окраска гематоксилином-эозином. СМ-микрофото. Ув. x200.

Центральные отделы области внедрения имплантата.
Зрелые трабекулы (белая стрелка) и костное вещество (черные стрелки).

К 52 неделям после операции различия между площадью, занятой зрелой костной тканью в поровом пространстве $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, становятся статистически значимыми. Данный результат, вероятно, обусловлен способностью алмазоподобных пленок и нанотрубок индуцировать дифференциацию стволовых мезенхимальных клеток в остеогенном

направлении за счет активации их механорецепторов, а также способствовать формированию остеогенными клетками органического матрикса и его минерализацию [441, 439, 437, 442, 438].

Прочность блока «костное ложе – новообразованная костная ткань» через 52 недели после операции достигает 97% от исходной. Вероятно, лучшие условия трофики тканей приводят к менее выраженным склеротическим изменениям новообразованной костной ткани на поздних сроках наблюдения (16-52 недели после операции). Степень выраженности этих изменений уменьшается в ряду $PTi_{40} > PTi_{40}(CN_{0,25}) \approx PTi_{40}(a-C)$ от средне выраженных до незначительных.

В регуляции репаративной регенерации при внедрении $PTi_{40}(a-C)$ МК задействованы, как локальные ростовые факторы, так и системные гормональные, что отличает данную группу от животных с внедренными PTi_{40} МК. Концентрация IGF-1 в периферической крови кроликов с $PTi_{40}(a-C)$ МК увеличилась в течение 16 недель после операции (таблица 3.2.3.5) с максимумом изменений через 4 недели – 405% ($p \leq 0,017$), по сравнению с уровнем до операции. Аналогична динамика концентрации КМБ-2. Через 4 недели после операции она возрастает до 319,4% ($p \leq 0,017$) по сравнению с уровнем до операции и значимо превышает аналогичный показатель в группе с PTi_{40} МК более чем в 2 раза. Участие системных регуляторов остеогенеза, более выраженное увеличение концентрации локальных факторов, индуцирующих остеогенез, косвенно подтверждает большую напряженность процессов репаративного остеогенеза и большую их протяженность по времени.

Через 4 недели после имплантации $PTi_{40}(CN_{0,25})$ МК в области внедрения имплантата выявлены минимальные периостальные наложения, прилежащая к дефекту кортикальная пластинка истончена. Костное ложе соединено с тканевым комплексом на месте имплантата посредством несколько атрофичных трабекул.

Новообразованная зрелая костная ткань располагалась преимущественно на периферии области внедрения имплантата. Ее площадь значимо не отличалась от площади зрелой костной ткани у животных с PTi_{40} МК и составляла 58,2% (57,7; 67,2) от площади новообразованной костной ткани. Соотношение Ca/P достигало 68% на периферии области внедрения имплантата и 56,4% в центре имплантата по сравнению с интактной костной тканью.

После имплантации $PTi_{40}(CN_{0,25})$ МК активность остеогенеза в прилежащих к внедренным имплантатам сегментах кости была несколько ниже, чем у животных при имплантации $PTi_{40}(a-C)$ МК. Однако по сравнению с интактной костной тканью и с группой PTi_{40} МК было увеличено количество клеток, экспрессирующих ЩФ, доля клеток, экспрессирующих ЩФ, и объемная доля площади клеток, экспрессирующих ЩФ (таблица А.3).

Полученные при гистохимических и морфометрических исследованиях результаты согласуются с результатами биохимического исследования костной ткани. Так при внедрении

PTi₄₀(CN_{0,25})МК в сегментах костной ткани, прилежащих к имплантатам, нами была выявлена бóльшая активность ЩФтерм (359%, $p \leq 0,007$) по сравнению с интактной костной тканью, а также по сравнению с группой PTi₄₀МК ($p \leq 0,043$) (таблица А.4).

Прочность костной ткани на разрыв у животных с PTi₄₀(CN_{0,25})МК через 4 недели после операции достигала 51% от прочности нативной кости и значимо превышала данный показатель у животных PTi₄₀МК.

Через 16 недель при использовании PTi₄₀(CN_{0,25})МК активность остеогенеза оставалась высокой. Происходило восстановление целостности кортикальной пластинки, хотя ее высота оставалась меньшей, чем исходная на 10-20%. Ложе было представлено костными трабекулами с дистрофическими изменениями, хотя их выраженность была меньшей, чем у животных с PTi₄₀МК. В периферических отделах области внедрения имплантата располагались более зрелые трабекулы, чем в центральной зоне. В зоне внедрения имплантата зрелая костная ткань составляла 60,5% (30,5; 67,8). Прочность костной ткани на границе с имплантатом составляла – 61% от прочности интактной костной ткани.

Количество остеогенных клеток, количество клеток, экспрессирующих щелочную фосфатазу, объемная доля площади клеток, экспрессирующих щелочную фосфатазу превышали соответствующие показатели в интактной костной ткани (131,1%, ($p \leq 0,039$) 129,5%, ($p \leq 0,039$); 129,4%, ($p \leq 0,049$)). Количество клеток, экспрессирующих щелочную фосфатазу, значимо превышало данный показатель у животных с PTi₄₀МК. Отличий между животными с внедренными PTi₄₀(а-С)МК и PTi₄₀(CN_{0,25})МК не выявлено.

Через 52 недели у животных с PTi₄₀(CN_{0,25})МК активность остеогенеза затухала. Количество остеогенных клеток и их функциональная активность соответствовали значениям интактной костной ткани. Гистологических особенностей не было выявлено. В кортикальной пластинке сохранялись дистрофические изменения. В костной ткани ложа и трабекулах на месте имплантата были выявлены очаги склерозирования. Костный мозг в области внедрения имплантата и ложе в основном – жировой. Зрелая костная ткань в области внедрения имплантата составляла 57,7% (33,3; 68,9). Прочность костной блока с имплантатом на разрыв составляет 97% от интактной костной ткани (таблица 3.2.3.6).

В регуляции репаративной регенерации при внедрении PTi₄₀(CN_{0,25})МК принимали участие локальные и системные факторы. Значительное увеличение концентрации КМБ-2 в периферической крови было отмечено через 4, 16 недель после операции (до 187,6%, 183,1% по сравнению с уровнем до операции). Вовлеченность системного регуляторного фактора – IGF-I несколько отсрочена, и лишь через 16 недель после операции отмечается его увеличение до 278,1% (таблица 3.2.3.5). Значимых отличий в концентрации регуляторных молекул у животных, с внедренными PTi₄₀МК и PTi₄₀(CN_{0,25})МК, не выявлено. Полученные результаты

косвенно свидетельствуют о большей активности процессов репаративной регенерации при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ по сравнению с $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, но меньшей по сравнению с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$.

Важно отметить, что выявленные особенности репаративного остеогенеза при использовании определенного типа имплантата обнаруживаются и в контралатеральных конечностях с КД. Однако выраженность этих изменений меньшая. Так в конечностях с КД у животных из группы $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ объемная доля площади клеток, экспрессирующих щелочную фосфатазу, превышает данный показатель у животных из группы $\text{PTi}_{40}\text{МК}$.

3.3. Обсуждение полученных результатов

В ходе эксперимента было выявлено, что миелокариоциты лучше адгезировали на $\text{ПолTi}(\text{CN}_{0,25})$, количество адгезировавших клеток на $\text{ПолTi}(\text{a-C})$ не отличалось от количества клеток на ПолTi .

Адгезия клеток на испытуемые образцы, ассоциирована со скоростью адсорбции и составом адсорбированных на поверхность белков. После контакта материала с жидкостями организма или «полными культуральными средами», содержащими сыворотку (эмбриональную телячью, крови донора и т.д.), на поверхности образца формируется слой белковых молекул, состав, структура, конформационные изменения которых во многом определяют физико-химические свойства поверхности. Считается, что в начале (~ 10 минут) адгезируют преимущественно альбумины [17, 18], которые в последующем частично замещаются такими молекулами как фибронектин, вбронектин (Vroman-эффект). Наличие даже небольшого количества этих белков значительно увеличивает адгезию клеток, что обусловлено присутствием у них специфической аминокислотной последовательности (Arg-Gly-Asp).

Большинство авторов сходится во мнении, что адгезия белков активнее происходит на гидрофильные поверхности (при условии, что угол смачиваемости находится в границах 35-85°). Введение азота в состав пленки приводит к увеличению гидрофильности поверхности - краевой угол смачивания (θ_w) исследуемых нами пленок колеблется в зависимости от условий получения пленки, но в целом прослеживается следующая закономерность: a-C (θ_w - 64,0-88,0) > $\text{CN}_{0,25}$ (θ_w - 31,6-75,0) $\approx$ Ti (θ_w - 54,0). Нами показано, что скорость увеличения шероховатости в течение первых 10 минут инкубации образцов с культуральными средами, обусловленная образованием мультислойного молекулярного комплекса, который постепенно распределялся по всей поверхности образца, выше на образцах $\text{ПолTi}(\text{CN}_{0,25})$ [158]. Однако по данным [261] адсорбция альбумина и фибриногена была выше на поверхности a-C , чем на CN_x , что не соотносится с увеличением краевого угла смачивания и уменьшением поверхностной энергии

(особенно ее полярной компоненты) у а-С пленок по сравнению с CN_x . Позже группа других авторов подтвердила, что поверхностное натяжение и поверхностная энергия, не коррелируют напрямую с концентрацией адсорбированного на полированный титан или титана с а-С фибриногена [499], как и количество адгезирующих клеток не коррелирует с количеством фибриногена на поверхности, а ассоциируется с соотношением концентраций альбумина/фибриногена: чем выше данное соотношение, тем ниже количество адгезирующих клеток и тромбоцитов. По данным литературы соотношение альбумина/фибриногена, адгезирующих на а-С составляет 1,01-1,24, для CN_x пленок – 0,49, для полиметилметакрилата (ПМК) - 0,39, при этом количество адгезировавших гранулоцитов на а-С была меньше, чем на подложку из ПМК [261].

При оценке колониеобразования фибробластоподобными и кроветворными прекурсорами *in vitro* мы выявили, что при культивировании миелокариоцитов в течение от 3 до 32 суток количество колониеобразующих единиц (КОЕ) и количество клеток на поверхности PTi_{40} с DLC пленками было больше, чем на поверхности PTi_{40} . Результаты, полученные *in vitro*, согласуются с результатами, полученными *in vivo*. При остеоинтеграции имплантатов с DLC пленками, было выявлено увеличение количества остеогенных клеток в костной ткани оперированного сегмента. Изменения были более выражены и проявлялись в течение всего периода наблюдения (52 недели после операции) при использовании $PTi_{40}(a-C)$. В результате при имплантации $PTi_{40}(a-C)$ в области дефекта образовалась более зрелая и прочная на разрыв костная ткань.

К настоящему времени накоплены экспериментальные данные, убедительно демонстрирующие, что к основным факторам поверхности, определяющим пролиферацию и дифференциацию контактирующих с ней клеток, относят ее химический состав, топографию, энергетическое состояние [252, 327].

Мы считаем, что одним из механизмов, инициирующих пролиферацию и дифференциацию остеогенных клеток-предшественниц на PTi_{40} с DLC пленками, осуществляется путем «контактной регуляции» клеток остеогенной линии за счет топографии DLC пленок. Для них характерны - цепочки пиков усеченной пирамидальной формы, образованных фрагментами пучков многослойных нанотрубок, высотой ~ 150-200 нм, с диаметром основания достигающего 200 нм на а-С и полусферы высотой более 100 нм на CN_x пленках [156].

Было показано, что микро- и нанотопография подложек оказывает выраженное влияние на базисные функции клеток и их сообществ [401, 264, 451]. Регуляторному воздействию со стороны нанотопографии подвержены – структура цитоскелета, форма клеток, связанная с ними полярность клеток, подвижность, адгезия, экспрессия генов, пролиферация,

дифференциация, [539], фенотипические особенности [464], функциональная активность [389, 443] и апоптоз [264]. Данные зависимости были выявлены для большего числа линий клеток включая фибробласты, эндотелиоциты, эпителиоциты, нейроны, макрофаги, остеобласты [264, 443, 263, 438].

Культивирование клеток мезенхимальной линии на наноструктурированных подложках приводит к значительным изменениям их морфологии. На гладких поверхностях клетки распластаны, а их высота минимальна. На структурированных поверхностях, как правило, клетки мезенхимальной линии располагаются между выступами, имеют большую длину и высоту, они образуют большее количество филоподий по краю ламеллоподии, их длинные отростки направлены в сторону выступов или других клеток [264, 403, 464, 363, 406, 364]. Увеличение клеточных контактов усиливает их полярность, ориентированность и скорость миграции. Стресс-фибриллы в клетках располагаются более регулярно, а винкулин-положительные контакты клетки с подложкой выражены и сконцентрированы по периферии [363]. Возникновение филоподий рассматривают в качестве возможного механизма физического и химического зондирования клетками остеобластической линии микроокружения. Именно адгезивные структуры сопрягают микроокружение с цитоскелетом [40, 510].

Предполагают, что деформация мембраны клеток, чувствительных к механическим сигналам (в том числе при контакте с шероховатостью подложки), или изменение характера движения периосцитарной жидкости приводят к изменению конформации трансмембранных, связанных с цитоскелетом, рецепторов, таких как интегриновые [254], в частности и интегрина- $\alpha 2\beta 1$. Роль семейства интегринов изучена в большей степени, однако известно, что механические сигналы так же поступают в клетку через коннексоны и α -рецепторы эстрогенов [137], рецепторы к гиалуроновой кислоте [26].

Механические сигналы, поступающие в клетку через α -рецепторы к эстрогену, активируют сигнальный путь Wnt/ β -catenin и его компоненты – Sfrp2 и Wisp2, что приводит к ингибции рецепторов, активируемых пролифераторами пероксисом $\gamma 2$ (PPAR $\gamma 2$), SOX-9 и C/EBP α (факторов транскрипции адипогенеза, хрящевой ткани и доминантных негативных регуляторов остеогенеза в ММСК). Сохраняющийся β -catenin из цитоплазмы транслоцируется в ядро, где регулирует экспрессию генов, необходимых для пролиферации клетки, в том числе активирует синтез циклина-D1, обеспечивающего фазу G1 и переход клетки из G1 в S-фазу, активирует гены Runx2, Osteris и синтез их продуктов, факторов транскрипции, запускающих остеогенную дифференцировку [73].

При активации клеток механическими сигналами, в том числе и при деформации клеток, культивируемых на поверхностях с бугорками, приводит к активации сигнального пути –

МАРК/ERK, так же характерно вовлечение в трансдукцию сигнальных каскадов с участием Р38МАРК, стрессактивируемых протеинкиназ (JNK) и сигнального каскада с участием цитоскелета клеток, последнее отличает данный механизм от индуцированной дексаметазоном дифференциации остеогенных клеток-предшественниц. В преosteобластах, подвергнутых механической деформации или ежедневной низкодозовой механической стимуляции, МАР-киназы (ERK1/2МАРК и р38МАРК) регулируют фосфорилирование Runx2, что приводит к его активации *in vitro* и *in vivo* [26].

МАРК-зависимые киназы фосфорилируют транскрипционные факторы семейства Ets, индуцирующих гены *fos*, *jun*, *myc* и др.. Происходит обязательное ингибирование экспрессии семейства транскрипционных факторов TWIST (-1 и -2), которые взаимодействуя с доменом ДНК Runx2, угнетают его активацию в ранних предшественниках остеобластов [231]. Продукты генов *c-fos* и *c-jun*, образуют активационные белковые комплексы (AP-1), блокирующие апоптоз остеоцитов, регулирующие деление клетки (переход из G1 в S-фазу и G2 в M), увеличивающие экспрессию генов *Dlx5*, *Runx2*, *Osterix/Sp7*, *Shh*, *Vax*, поддерживающих остеогенную дифференцировку, и активирующих экспрессию генов, ростовых факторов – КМБ-2, -4, -7, IGF-1, GM-CSF; матричных белков – остеопонтина, остеокальцина, костного сиалопротеина, коллаген-1,-5,-11,-12 типов; ферментов – ЩФ, MMP-1; рецепторов к TGF- β , FGF, кальцитонину. Мы наблюдали значимое увеличение концентрации КМБ-2, IGF-1, ИЛ-8 в периферической крови у животных с ПТi₄₀DLC, по сравнению с ПТi₄₀. Наши собственные результаты и данные литературы обобщены в схеме (рисунок 3.3.1).

При культивировании клеток на бугорках отмечено увеличение экспрессии генов, кодирующих белки такие как – BAIAP2 (белок фокальных адгезий), PAK (регулятор активности белков цитоскелета), WAVE1 (активатор белкового комплекса – Arp2/3, полимеризующего актин в ламеллоподии), BAI1 (белок, связывающий ингибитор ангиогенеза), белки цитоскелета и др. [443, 263, 438]. Значительную роль в анаболическом эффекте механических сигналов играют экспрессия индуцибельной простагландин-синтазы и синтез простагландинов E₂, I₂, F₂ α регулирующих пролиферации остеогенных клеток [26, 458, 487]. При культивировании клеток-предшественниц остеобластов на поверхностях, структурированных нанотрубками, ускорение темпов роста количества остеобластов достигало 300-400%, колонии были более плотными и значимо превышали по величине колонии на гладкой поверхности [437], происходила инициация их дифференцирования в остеобластоподобные клетки, экспрессирующие гены и синтезирующие соответствующие белки – остеопонтин, остеокальцин и ЩФ [438].

Нами было выявлено увеличение количества остеогенных клеток, экспрессирующих ЩФ в костной ткани оперированного сегмента, и их площадь, занятая этими клетками.

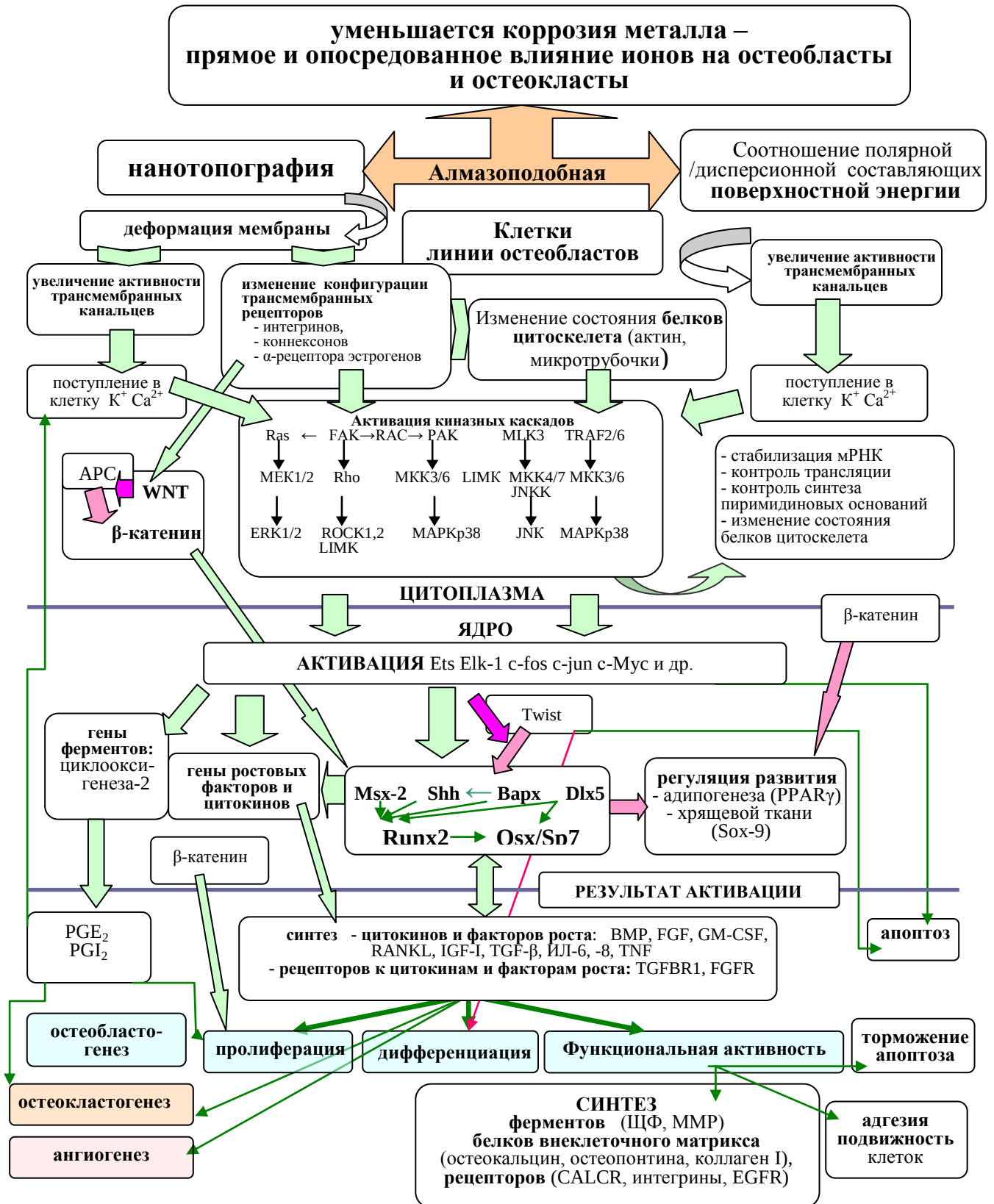


Рисунок 3.3.1 Механизмы влияния алмазоподобной пленки на основные сигнальные пути регуляции остеогенеза,

где → торможение, → активация;

Ets, Elk-1, c-fos, c-jun, c-Myc – гены транскрипционных факторов;

Msx-2, Shh, Barx, Dlx5 – гены транскрипционных факторов, активирующих Runx-2

В интерфейсе «костное ложе – имплантат» образуется более прочная костная ткань, что косвенно свидетельствует о ее большей минерализации на ранних сроках наблюдения. По данным литературы механические сигналы оказывают влияние на функцию остеогенных клеток: на структурированной титановой подложке активность ЩФ в клетках была выше, раньше выявлялись костный сиалопротеин и остеопонтин, минерализация культур была выше, чем на необработанных титановых подложках [443, 221]. Аналогичные результаты были достигнуты при культивировании МСК на поверхностях с нанесенными углеродными нанотрубками или TiO_2 нанотрубками [443, 451, 563]. В условиях гипергравитации происходило усиление синтеза коллагена I типа, а в условиях микрогравитации его экспрессия снижалась. При этом регуляция осуществлялась через сигнальный путь с участием протеинкиназ семейства MAPK (ERK 1/2) [364]. Ноно- и микроструктурированные поверхности увеличивают подвижность культивируемых (эпителиальных, нейтрофилов, фибробластов). В литературе даже появился термин «топотаксис» (topotaxis) – миграция к конкретной топографической области, а при культивировании на рифленной поверхности – вдоль бороздок [263, 327, 364]. В нашем случае это важно для миграции остеогенных клеток-предшественниц во внутреннее поровое пространство.

Одной из особенностей течения репаративного остеогенеза в условиях замещения дефекта $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$, выявленной нами, было лучшее состояние материнского костного ложа. Морфологически это проявлялось меньшей выраженностью дистрофических, некротических процессов и rareфикации прилежащей костной ткани в сроки 4-16 недель после операции и менее выраженными склеротическими изменениями новообразованной костной ткани в сроки 16-52 недели после операции. Мы ассоциируем выявленные признаки репаративного остеогенеза с более быстрым заполнением дефекта тканью при использовании углеродсодержащих пленок, и, что особенно важно, вероятно, с лучшей васкуляризацией зоны имплантации, в результате происходило более быстрое и более полное восстановление кровоснабжения во всем оперированном сегменте. Механизмы активация ангиогенеза, вероятно, связаны с увеличением экспрессии генов, кодирующих белки в клетках мезенхимальной линии при контакте с наноструктурированной поверхностью имплантатов, которые прямо или опосредовано регулируют ангиогенез (FGF, PDGF и др.). Помимо регуляции пролиферации, дифференциации, выживания остеогенных клеток роль данных факторов роста значительна в регуляции ангиогенеза. Они поддерживают дифференциацию эндотелиальных клеток-предшественниц в эндотелиоциты [263, 364].

Таким образом, механические сигналы, вызванные деформацией клеток на шероховатой поверхности определенной формы и размера, могут инициировать специфичный ответ – пролиферацию и дифференцировку в остеогенном направлении ММСК даже в отсутствии

химических индукторов. Однако при значительном увеличении размера шероховатости, «грубости» поверхности подложек многочисленные линии клеток человека пролиферируют менее активно [263, 364]. Полученные результаты подтверждают заманчивое предположение о том, что рельеф поверхности является важным компонентом для развития тканей, способных воспринимать и трансформировать механические сигналы, т.е. индуцировать развитие костной ткани.

Еще одним фактором, оказывающим значительное влияние на пролиферативную активность остеогенных клеток по данным литературы, является соотношение свободной и дисперсионных составляющих поверхностной энергии. Внедрение в структуру алмазоподобной пленки более электроотрицательного азота приводит к поляризации поверхности CNx пленок и увеличивает долю полярной компоненты ($\gamma^p/(\gamma^p+\gamma^d) \sim 0,56-0,75$) [158]. Доля полярной компоненты а-С пленок ($\gamma^p/(\gamma^p+\gamma^d) \sim 0,24-0,43$) [460], вызывающему увеличение пролиферативной активности остеогенных клеток.

И, наконец, в результате нанесения DLC пленок уменьшается коррозия титана в организме, что было нами продемонстрировано. В результате снижаются прямые эффекты его ионов на жизнеспособность остеобластов, остеокластов, эпителиальных клеток [443], экспрессию Runx2, Osterix в остеобластах, экспрессию RANKL и OPG в остеобластах и эпителиальных клетках, доказанные *in vitro* при концентрации 20 ppm [553, 412]. Данная концентрация клинически значима, поскольку в мягких тканях, прилежащих к зоне имплантации, титан был обнаружен в концентрациях 50-300 ppm [553, 412]. Следовательно, *in vivo* ионы Ti могут проявлять прямые и опосредованные, через активацию макрофагов [289], отрицательные эффекты на жизнеспособность, пролиферацию и функцию остеобластов, в результате биосовместимость и долговременная стабильность имплантатов уменьшается.

Таким образом, при использовании пористого титана с алмазоподобными пленками, вероятно, происходит оптимизация процессов репарации – за счет ускорения пролиферации предшественниц остеобластов, их дифференциации и функциональной активности.

3.4 Заключение

В ходе исследования *in vitro* было выявлено отсутствие токсического воздействия титана и композитов «титан - а-С» и «титан - CN_{0,25}» на миелокариоциты кроликов. Отмечена активация адгезии миелокариоцитов на композитную пленку. Было выявлено увеличение количества фибробластоподобных и кроветворных КОЕ при культивировании клеток костного мозга в присутствии образцов титана или на титановой матрице с углеродсодержащими

нерезорбируемыми пленками состава углерод (а-С) и углерод-азот (CN_{0,25}) по сравнению с титаном (контроль).

Клетки-предшественницы костного мозга, проникая в поры имплантатов, были способны к развитию как в стромальные клетки, так и в кроветворные. В силу особенностей культуральной среды (она не содержала индукторы кроветворных клеток-предшественниц) развитие внесенных клеток шло преимущественно по пути дифференциации клеток-предшественниц в клетки стромы. Образующиеся клетки, в том числе фибробластоподобные, распространялись по поверхности ПТi₄₀, ПТi₄₀(а-С), ПТi₄₀(CN_{0,25}), стремясь колонизировать всю поверхность пор, а так же заполняли внутреннее поровое пространство компонентами экстрацеллюлярного матрикса. Примененная техника позволяла сформировать единую структуру, состоящую из клеток и компонентов внеклеточного матрикса, полностью покрывающую внутреннюю поверхность пор.

В эксперименте *in vivo* было обнаружено, что заполнение дефекта костной ткани ПТi₄₀МК, приводит к более выраженной и длительной по времени активации процессов остеогенеза в оперированном сегменте, образованию органотипической и более прочной (на ранних сроках наблюдения - 4-16-ть недель после операции), т.е. функционально более зрелой костной ткани по сравнению с незаполненными дефектами.

При использовании в качестве скэффолдов для аутологичных миеелокариоцитов пористых титановых имплантатов с углеродсодержащими нерезорбируемыми пленками обоих типов интенсивность процессов остеогенеза была более выражена и долговременна по сравнению с ПТi₄₀МК. Это проявлялось увеличением количества остеогенных клеток в костной ткани, прилежащего к дефекту сегмента, увеличением количества клеток экспрессирующих ЩФ. В результате в искусственно сформированном дефекте происходило более быстрое образование более прочной на разрыв костной ткани на границе «костное ложе – новообразованная в порах костная ткань». При использовании ПТi₄₀(а-С)МК интенсивность остеогенеза была выше в течение всего периода наблюдения, к 52-м неделям после операции во внутреннем поровом пространстве зрелая костная ткань занимала большую площадь, чем в ПТi₄₀МК.

При использовании пористых имплантатов, *in vitro* насыщенных миеелокариоцитами, увеличенными в количестве, новообразование костной ткани в зоне дефекта происходит как по контактному механизму, вероятно, за счет остеогенных клеток введенных в поры предварительно, а так же мигровавших в поры после внедрения имплантата, так и по дистантному механизму, за счет прорастания костных трабекул в поверхностные поры из материнского ложа.

При использовании пористых имплантатов с углеродсодержащими пленками было отмечено лучшее состояние материнского костного ложа. В сроки 4-16-ть недель после операции морфологически это проявлялось меньшей выраженностью дистрофических, некротических процессов. Кроме того, были менее выражены склеротические изменения новообразованной костной ткани в сроки 16-52-е недели после операции. Мы связываем выявленные особенности репаративного остеогенеза с более быстрым заполнением дефекта тканью при использовании углеродсодержащих пленок, в результате – более быстрым и более полным восстановлением кровоснабжения и микроциркуляции во всем оперированном сегменте.

Введение имплантатов в искусственные дефекты кости приводило к системным изменениям активности остеогенеза. Изменения в контралатеральных конечностях имели ту же направленность, но меньшую выраженность, что и в конечности с имплантатами. Наиболее вероятная причина данного феномена – доказанное увеличение концентрации в периферической крови регуляторных молекул остеогенеза, таких как КМБ-2, IGF-I, при репаративной регенерации дефектов костной ткани в условиях данного эксперимента.

Таким образом, структурно-функциональная организация новообразованной костной ткани указывает, что при внедрении имплантатов с обоими типами алмазоподобных пленок остеоинтеграция имплантатов наступала более быстро, чем при использовании пористого титана без покрытия. Помимо остеокондуктивности – способности материала играть роль пассивного матрикса для новой кости [529], и остеопротекторности – способности в течении репаративного этапа создавать условия для «возвращения» кости утраченного анатомического объема и противостоять при этом формированию соединительной ткани, стремящейся быстро заполнить пространство дефекта кости, пористый титан с углеродсодержащими пленками, особенно с алмазоподобной, обладает способностью вызывать активацию пролиферации остеогенных клеток предшественниц и инициировать дифференцировку их в остеогенном направлении.

ГЛАВА 4

**РЕАКЦИЯ ТКАНЕЙ ОРГАНИЗМА НА ФОРМИРОВАНИЕ КРАЕВЫХ ДЕФЕКТОВ
БОЛЬШЕБЕРЦОВЫХ И БЕДРЕННЫХ КОСТЕЙ
И ВНЕДРЕНИЕ В НИХ ПОРИСТЫХ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ,
НАСЫЩЕННЫХ АУТОЛОГИЧНЫМИ МИЕЛОКАРИОЦИТАМИ**

Основной задачей фрагмента, представленного в 4-й главе, было раскрытие локальных реакций регионарных лимфатических узлов, костной и мышечной тканей, костного мозга на формирование краевых дефектов костей и внедрение в краевые дефекты пористых титановых имплантатов, насыщенных миелокариоцитами. Для этого у кроликов моделировали дефекты метафизов дистальных отделов бедренных и проксимальных отделов большеберцовых костей обеих конечностей, в правую конечность внедряли $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ или $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$, в левой конечности дефекты оставались незаполненными.

Анализируя показатели периферической крови и морфологическое строение селезенки, мы рассматривали выявленные изменения как реакцию на внедрение имплантатов и обращали внимание на различия, обнаруженные между группами животных, которые отличались между собой только типами внедренных в правую конечность имплантатов. КД в левой конечности были одинаковы у всех животных.

**4.1. Состав периферической крови кроликов после формирования краевых дефектов
обеих тазовых конечностей и внедрения пористых титановых имплантатов,
насыщенных аутологичными миелокариоцитами, в кости правой конечности**

Система крови быстро реагирует на изменения окружающей или внутренней среды и играет значительную роль в процессе развития краткосрочной и долговременной адаптации к стрессорному воздействию. В организме развивается стереотипная (неспецифическая) реакция на повреждение тканей, характеризующаяся последовательными стадиями развития и являющаяся частью общего адаптационного синдрома. В ответ на специфические раздражители формируются специфические для каждой кроветворной линии реакции периферической крови и центрального звена кроветворения – костного мозга, что в целом и обуславливает устойчивость организма к травме, инфекции, гипоксии и т.д. [45, 67, 115]. И специфические, и неспецифические реакции системы крови являются цитокин-опосредованными. Ответ костной ткани на ее повреждения имеет тесную взаимосвязь с ответом системы крови [139].

После моделирования у кроликов дефектов костной ткани в большеберцовых и бедренных костях обеих конечностей и внедрения в правую конечность $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ или $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ показатели периферической крови животных характеризовались 4-я периодами изменений состава периферической крови, отражающими основные функционально-морфологические периоды остеоинтеграции пористых титановых имплантатов и заживления КД. Динамика показателей периферической крови у животных с разными типами имплантатов не различалась. Были выявлены лишь некоторые отличия в выраженности обнаруженных изменений.

В первый период (1-2-я недели после операции) изменения были обусловлены преимущественно операционной травмой. У животных, с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, в периферической крови были выявлены следующие изменения по сравнению с уровнем до операции: лейкоцитоз (максимальные изменения лейкоцитов были выявлены через неделю после операции – 159,7%, $p \leq 0,002$ (рисунок 4.1.1)), тенденция к росту абсолютного количества нейтрофилов до 180,0% ($p \leq 0,1$); тенденция к увеличению скорости оседания эритроцитов, тромбоцитоз. Тенденции к пропорциональному снижению количества эритроцитов и концентрации гемоглобина (рисунок 4.1.2), увеличение относительного и абсолютного количества ретикулоцитов (соответственно до 525%, $p \leq 0,010$; 405,3%, $p \leq 0,010$). МСН и RDW не претерпевало значимых изменений. МСНС имела тенденцию к увеличению. Моноцитоз через 2-е недели после операции (166,7%, $p \leq 0,008$).

У животных, с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, динамика вышеперечисленных показателей была сходной, отличия заключались в следующем: по сравнению с уровнем до операции – статистически значимо увеличивалось количество тромбоцитов (до 133,2%, $p \leq 0,018$), MCV был снижен ($p \leq 0,010$), количество моноцитов значимо не изменялось.

У кроликов, с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$, динамика вышеперечисленных показателей была сходной с изменениями, выявленными у животных с $\text{PTi}_{40}\text{МК}$. Отличия заключались в отсутствии значимого изменения количества моноцитов.

Второй период ограничивался 3-4-й неделями после операции и характеризовался активно протекающими процессами репарации костной и скелетной мышечной тканей. К концу периода происходило заполнение большей части сообщающихся с поверхностью пор имплантатов новообразованной костью.

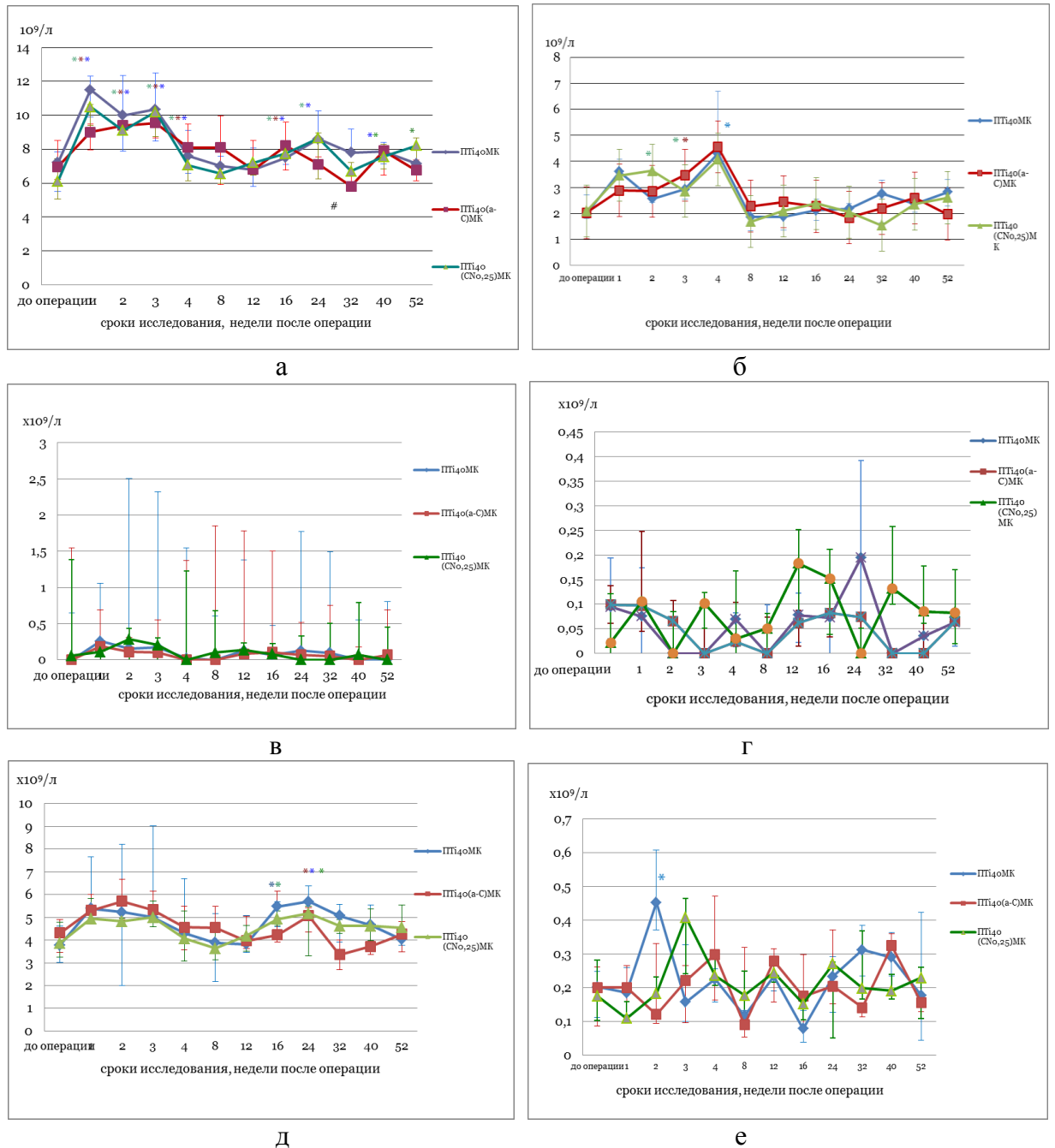


Рисунок 4.1.1 – Исследование периферической крови кроликов при формировании краевых дефектов большеберцовых и бедренных костей в обеих конечностях и внедрении в правую конечность пористых титановых имплантатов, насыщенных миелокариocyтами (медиана, 25-, 75- процентиля).

* $p \leq 0,05$ по сравнению с дооперационным уровнем в соответствующей группе

$p \leq 0,05$ по сравнению с группой PTi₄₀MK.

а – количество лейкоцитов; б – количество сегментоядерных нейтрофилов;

в – количество эозинофилов; г – количество базофилов;

д – количество лимфоцитов; е – количество моноцитов

КД (в контралатеральных конечностях) через 4-е недели после операции были заполнены костной, хрящевой и соединительной тканями.

У животных, с внедренными ПТi₄₀МК, количество эритроцитов и концентрация гемоглобина к концу 2-го периода не отличались от уровня до операции; признаки активности воспалительного процесса сохранялись до конца периода – лейкоцитоз (105,5%, $p \leq 0,016$), увеличенное абсолютное количество нейтрофилов – 204,8% ($p \leq 0,0082$), соотношение лейкоцитов и СОЭ – 253,8%, $p \leq 0,028$ (таблица Б.1). Концентрация ИЛ-8 имела тенденцию к повышению, концентрация ИЛ-10 – не отличалась от уровня до операции (таблица 4.1.2).

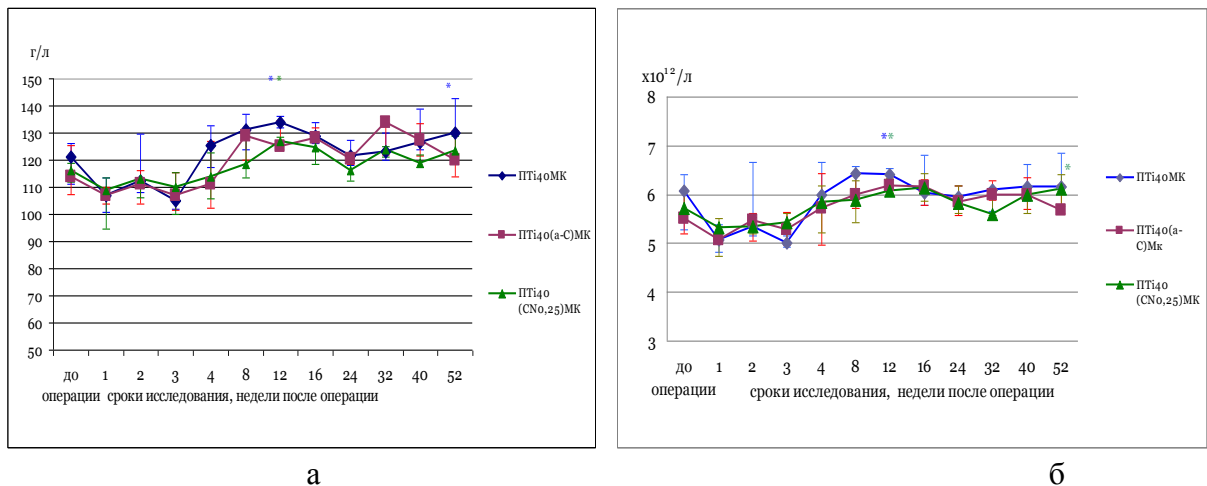


Рисунок 4.1.2 – Исследование периферической крови кроликов при формировании краевых дефектов большеберцовых и бедренных костей в обеих конечностях и внедрении в правую конечность пористых титановых имплантатов, насыщенных миелокариоцитами (медиана, 25-, 75- процентиля).
* $p \leq 0,05$ по сравнению с дооперационным уровнем в соответствующей группе
а – концентрация гемоглобина; б – количество эритроцитов

У животных с внедренными ПТi₄₀(а-С)МК динамика вышеперечисленных показателей была сходной. Отличия заключались в следующем: средний объем эритроцитов (MCV) оставался ниже дооперационного уровня ($p \leq 0,001$), концентрация ИЛ-8 увеличена до 257,2% (по сравнению с уровнем до операции $p \leq 0,028$).

У кроликов с внедренными ПТi₄₀(СN_{0,25})МК динамика вышеперечисленных показателей была сходна изменениям в группе ПТi₄₀МК. Отличие – MCV оставался ниже дооперационного уровня ($p \leq 0,007$).

Третий период изменений в периферической крови приходился на 8-ю – 32-ю недели после операции и отражал процессы ремоделирования новообразованной костной ткани, что морфологически проявлялось увеличением площади зрелой костной ткани во внутреннем поровом пространстве внедренных имплантатов (глава 3), а при заживлении незаполненных дефектов происходило замещение хрящевой и соединительной тканей трабекулами костной ткани.

Данные морфологического исследования в области операционной раны, динамика количества лейкоцитов, нейтрофилов периферической крови, лейкоцитарного индекса

интоксикации по Кальф-Калифу указывают на снижение через 3-8-мь недель выраженности воспалительной реакции у экспериментальных животных. Однако концентрация провоспалительного цитокина ИЛ-8 в периферической крови имеет тенденцию к увеличению в этот период. Для ИЛ-8 характерно быстрое увеличение концентрации под действием неспецифических факторов – травмы, некроза тканей, гипоксии, липополисахаридов, других цитокинов – ИЛ-1 β , ФНО- α и др. [167, 16, 88, 31, 317]. Основные его функции – изменение экспрессии молекул межклеточной адгезии, рекрутирование Т-лимфоцитов, моноцитов, нейтрофилов, эозинофилов в зону поражения и воспаления, активация ангиогенеза. Таким образом через 3-8 недель после операции выявлены неспецифические признаки воспалительной реакции в периферической крови, которая не связана непосредственно с операционной травмой. Повышение концентрации провоспалительных цитокинов инициирует продукцию клетками печени острофазовых белков, и к 16-й неделе после операции у животных с ПТi₄₀МК было выявлено небольшое, но статистически значимое увеличение концентрации С-реактивного белка (СРБ), лейкоцитоз, лимфоцитоз. Так, через 16-ть недель после операции увеличивалось количество лейкоцитов (до 104,2%, $p \leq 0,007$), абсолютное количество лимфоцитов (до 144,7%, $p \leq 0,028$) по сравнению с дооперационным уровнем. Через 24-е недели изменения нарастали – лейкоцитоз увеличивался до 119,4% ($p \leq 0,03$), абсолютный лимфоцитоз до 150,0% ($p \leq 0,043$). Концентрация ИЛ-10 не претерпевала значимых изменений.

Количество эритроцитов, концентрация гемоглобина, абсолютное количество ретикулоцитов превышали референсные величины (соответственно через 12-ть недель после операции эритроциты и гемоглобин - 105,6%, $p \leq 0,028$, 110,7%, $p \leq 0,028$, абсолютное количество ретикулоцитов через 16-ть недель - 716,9%, $p \leq 0,011$). Данные изменения сохранялись до 24-й недели включительно.

У животных с внедренными ПТi₄₀(а-С)МК лейкоцитоз был менее выражен. На 32-ю неделю после операции количество лейкоцитов было значимо ниже, чем у животных с внедренными ПТi₄₀МК, ($p \leq 0,001$).

При внедрении ПТi₄₀(СN_{0,25})МК динамика вышеперечисленных показателей была сходна, особенность заключалась в следующем – наряду с увеличением абсолютного количество лимфоцитов был выявлен «левый сдвиг» нейтрофилов, что проявлялось увеличением относительного количества палочкоядерных нейтрофилов через 12-ть недель после операции до 200% ($p \leq 0,018$), ядерного индекса до 228,0% ($p \leq 0,011$). Через 24-е недели после операции за счет увеличения количества лейкоцитов происходило увеличение индекса соотношения лейкоцитов и СОЭ до 180,0% ($p \leq 0,028$).

Таблица 4.1.2 – Концентрация цитокинов и СРБ в периферической крови кроликов при формировании краевых дефектов большеберцовых и бедренных костей в обеих конечностях и внедрения в правую конечность пористых титановых имплантатов, насыщенных миелокариоцитами

Срок обследования	Тип внедренных имплантатов	Концентрация ИЛ-8, пг/мл (медиана, 25-, 75-квартили), количество исследований	Концентрация ИЛ-10 пг/мл (медиана, 25-, 75-квартили, количество исследований	Концентрация СРБ нг/мл (медиана, 25-, 75-квартили), количество исследований
До операции	PTi ₄₀ МК	57,93 (44,30; 95,87) n=4	43,59 (43,02;44,13), n=5	1,98 (1,47; 2,33) n=5
	PTi ₄₀ (а-С) МК	61,23 (32,38; 68,20) n=6	44,04 (43,58;44,58) n=6	1,75 (1,67; 1,82) n=6
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК	59,61 (56,0; 104,61) n=6	43,59 (43,04;44,38) n=5	2,80 (2,75; 3,24) n=6
4 недели	PTi ₄₀ МК	110,04 (88,59;114,31) n=6	46,31 (45,51;46,54) n=5	2,53 (2,28; 2,73) n=6
	PTi ₄₀ (а-С) МК	157,48*(138,97;217,38) n=5	47,04 (44,95;49,51) n=5	2,57 (1,81; 3,25) n=6
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК	152,0 (78,74; 292,78) n=5	45,00 (43,42;48,03) n=6	2,47 (2,12; 3,21) n=6
16 недель	PTi ₄₀ МК	49,56 (31,92; 92,59) n=6	44,43 (43,71;45,48) n=6	3,26*(2,51; 3,21) n=6
	PTi ₄₀ (а-С) МК	112,95 (98,95; 163,59) n=6	44,38 (44,95;45,51) n=6	2,83*(2,55; 3,31) n=6
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК	50,58 (40,95; 116,63) n=5	43,7 (43,47;43,81) n=5	3,26 * (2,72; 3,53) n=5
52 недели	PTi ₄₀ МК	61,33 (50,30; 97,99) n=6	44,64 (43,01;45,32), n=6	1,68 (1,57; 2,07) n=5
	PTi ₄₀ (а-С) МК	65,54 (34,65; 78,21) n=6	44,64 (43,54;44,93) n=5	1,87 (1,48; 1,92) n=6
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК	54,34 (45,60; 107,85) n=6	44,47 (43,02; 46,55) n=6	3,52 (1,89; 3,73) n=6

* $p \leq 0,05$ по сравнению с дооперационным уровнем в соответствующей группе

Четвертый период изменений в периферической крови соответствовал 40-й – 52-й неделям после операции. У животных с внедренными PTi₄₀МК со стороны системы крови 4-й период характеризовался лейкоцитозом, выявленным на 40-й неделе после операции (109,7%, $p \leq 0,030$). Соответственно возрастало соотношение лейкоцитов и СОЭ к 40-й неделе после операции до 369,6%, $p \leq 0,028$. Необходимо отметить не только отсутствие признаков анемии на поздних сроках наблюдения, но и увеличение концентрации гемоглобина по сравнению с уровнем до операции (107,4%, $p \leq 0,028$).

У животных с PTi₄₀(а-С)МК выявлено увеличение относительного количества молодых форм нейтрофилов (до 175,0%, $p \leq 0,028$) по сравнению с уровнем до операции и соответственно возрастание ядерного индекса до 205,7% ($p \leq 0,028$).

При внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ динамика показателей была сходна – лейкоцитоз в течение 40-52-й недель после операции, «левый сдвиг» нейтрофилов, увеличение ядерного индекса. Увеличение количества эритроцитов, содержания гемоглобина в эритроците.

Таким образом, при репаративной регенерации краевых дефектов костной ткани в периферической крови были выявлены легкая степень нормохромной нормо- или микроцитарной анемии и тромбоцитоз в послеоперационном периоде. Было выявлено два периода увеличения количества лейкоцитов периферической крови у животных всех групп. В послеоперационном периоде развивался нейтрофильный лейкоцитоз, через 16-ть недель после операции был выявлен лимфоцитарный лейкоцитоз. При внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ в периферической крови были обнаружены более выраженные признаки воспалительной реакции в отдаленном периоде. Через 40-52-е недели после имплантации был выявлен лейкоцитоз со «сдвигом влево». Изменения количества лейкоцитов и их клеточного состава взаимосвязаны с периодами репаративного процесса костной и кроветворной тканей.

4.2. Морфофункциональное состояние костного мозга

Задача данного фрагмента – охарактеризовать локальные эффекты внедренных имплантатов на состояние костного мозга в прилежащем к имплантату сегменте кости. Для этого вначале необходимо было оценить изменения костного мозга в сегменте кости, прилежащем к сформированному, но не заполненному дефектам метафизов дистальных отделов бедренных и проксимальных отделов большеберцовых костей.

4.2.1. Морфофункциональное состояние костного мозга кроликов после формирования краевых дефектов метафизов большеберцовых и бедренных костей

Пролиферативную активность костного мозга у экспериментальных животных косвенно оценивали по количеству ядросодержащих клеток костного мозга в бедренной кости с КД (в контралатеральной конечности – $\text{PTi}_{40}\text{МК}$). Через 4-е, 16-ть, 52-е недели после операции данный показатель значимо не отличался от количества ядросодержащих клеток костного мозга в бедренной кости интактных кроликов (таблица 4.2.1.1). Динамика пролиферативной активности миелокариоцитов у кроликов в конечностях с КД (в контралатеральные конечности внедрены $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ или $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$) была сходной.

Таблица 4.2.1.1 – Количество миелокариоцитов костного мозга кроликов после формирования дефектов метафизов большеберцовых и бедренных костей

Срок обследования	Тип внедренных имплантатов	Количество миелокариоцитов в конечности с незаполненными дефектами костной ткани, $\times 10^9/\text{л}$ (медиана, интерквартильный интервал)	Количество миелокариоцитов в конечности с внедренными имплантатами, $\times 10^9/\text{л}$ (медиана, интерквартильный интервал)
До операции	PTi ₄₀	102,5 (72,2; 105,0) n=5	
	PTi ₄₀ (a-C)	169,7 (97,5; 184,6) n=6	
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})	146,0 (132,9; 203,0) n=6	
После операции			
4-я неделя	PTi ₄₀	128,5 (121,0; 139,0), n=6	130,0 (126,5; 133,0) n=5
	PTi ₄₀ (a-C)	101,5 (100,0; 142,5) n=5	161,3 (137,6; 183,5) n=4
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})	187,8 (133,9; 254,1) n=4	189,3 (161,3; 198,0) n=4
16-я неделя	PTi ₄₀	145,6 (41,6; 297,1) n=6	176,2 (48,9; 253,8) n=6
	PTi ₄₀ (a-C)	99,5 (90,5; 109,6) n=6	103,0 (100,8; 112,9) n=6
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})	185,5 (134,5; 210,0) n=5	166,5 (152,5; 207,8) n=5
52-я неделя	PTi ₄₀	135,9 (89,3; 144,2) n=5	156,5 (96,5; 157,9) n=5
	PTi ₄₀ (a-C)	154,6 (112,3; 153,7) n=6	157,4 (99,8; 169,3) n=6
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})	192,8 (141,8; 234,1) n=5	190,3 (147,9; 251,0) n=5

Оценку дифференцировки миелокариоцитов осуществляли, анализируя дифференцированный подсчет ядросодержащих клеток пунктата костного мозга, отражающий количественный состав кроветворной ткани.

Анализ миелограмм пунктатов костного мозга, полученных из сегментов бедренных костей, сопредельных с КД (в контралатеральных – PTi₄₀МК) через 4-е недели после операции выявил: тип эритропоэза нормобластический, относительное количество эритроидных клеток костного мозга по сравнению с интактными животными увеличено (до 106,5%, $p \leq 0,028$), что характерно для стадии костно-мозговой компенсации анемии. Изменения затрагивали как молодые элементы эритроидного ростка (количество эритробластов увеличивалось до 259,4%, $p \leq 0,002$), так и зрелые (нормоциты оксифильные - 104%, $p \leq 0,012$). Через 16-ть недель после операции количество эритроидных клеток костного мозга нормализовалось. Однако до 52-й недели после моделирования КД сохранялись изменения соотношения между молодыми и зрелыми эритрокариоцитами, в пользу последних – относительное количество оксифильных нормоцитов через 52-е недели было увеличено до 106,7% ($p \leq 0,011$) по сравнению с интактными животными (таблица Б.2).

У животных в конечностях с КД (в контралатеральных конечностях – ПТ_{i40}(а-С)МК), динамика вышеперечисленных показателей была сходной. Отличия заключались в более выраженной активации эритроидного ростка – через 4-е недели после операции возрастало относительное количество эритробластов – 146,9%, $p \leq 0,033$, нормоцитов базофильных – 127,0%, $p \leq 0,014$, оксифильных – 126,7, $p \leq 0,008$, уменьшалось лейко-эритробластическое отношение до 78,6%, $p \leq 0,008$). Через 52-е недели изменений в красном ростке костного мозга по сравнению с интактными животными не выявлено (таблицы Б.2, Б.3).

К особенностям, выявленным при исследовании костного мозга, полученного из сопредельных с КД сегментов (в контралатеральных конечностях – ПТ_{i40}(CN_{0,25})МК), относится увеличение индекса созревания эритрокариоцитов, что позволяет предположить ускорение созревания клеток эритроидного ряда [45] через 52 недели после операции.

Исследование клеточного состава гранулоцитарного ростка костного мозга бедренной кости с КД (в контралатеральные конечности внедрены ПТ_{i40}МК) выявило, что через 4-е недели после операции относительное количество гранулоцитов значимо не отличалось от данного показателя у интактных животных. Однако было увеличено относительное количество молодых форм гранулоцитов – миелобластов (до 202,9%, $p \leq 0,014$) и промиелоцитов (до 131,1%, $p \leq 0,0011$). Через 16-ть недель после операции происходила нормализация показателей гранулоцитарного ростка костного мозга. Через 52-е недели относительное количество гранулоцитов уменьшалось по сравнению с интактными кроликами, а индекс созревания нейтрофилов увеличивался (до 112,7%, $p \leq 0,008$). Учитывая обнаруженный в поздние сроки наблюдения (40-я неделя после операции) лейкоцитоз со «сдвигом влево», можно предположить ускорение дифференцировки нейтрофилов с последующей миграцией их в периферическую кровь.

В костном мозге, полученном из бедренных костей с КД (в контралатеральных конечностях внедрены ПТ_{i40}(а-С)МК), через 4-е недели после операции относительное количество гранулоцитов снижалось до 84,3% ($p \leq 0,008$), причем данные изменения затрагивали как более молодые формы (промиелоциты – 32,5%, $p \leq 0,008$ миелоциты – 73,4%, $p \leq 0,008$), так и более зрелые (палочкоядерные нейтрофилы – 82,58%, $p \leq 0,008$). К 16-ти неделям после операции и до конца срока наблюдения (52-е недели после операции) значимых изменений в гранулоцитарном ростке не выявлено.

В костном мозге, полученном из бедренных костей с КД (в контралатеральных конечностях – ПТ_{i40}(CN_{0,25})МК), через 4-е недели после операции было отмечено расширение гранулоцитарного ростка – происходило увеличение как относительного, так и абсолютного количества миелоидных клеток костного мозга, причем в наибольшей степени изменения

затрагивали зрелые клеточные элементы – относительное количество метамиелоцитов увеличивались до 117,9% ($p \leq 0,0007$), палочкоядерных нейтрофилов – до 118,0% ($p \leq 0,035$) по сравнению с интактными кроликами. Через 16-ть недель после операции относительное количество гранулоцитов костного мозга находилось в референсном диапазоне. Однако соотношение более молодых и зрелых элементов отличалось от такого же соотношения у интактных кроликов, лейко-эритробластическое соотношение увеличивалось (до 122,9%, $p \leq 0,018$). Через 52-е недели было отмечено увеличение относительного (до 106,5%, $p \leq 0,01$) и абсолютного количества гранулоцитарных элементов костного мозга за счет более зрелых форм – метамиелоцитов и сегментоядерных нейтрофилов (соответственно, 114,1%, $p \leq 0,008$; 121,9%, $p \leq 0,008$), смещение лейко-эритроцитарного соотношения с 1,92 у интактных животных до 2,50 ($p \leq 0,008$), что указывает на расширение гранулоцитарного ростка костного мозга, данные изменения сопровождались лейкоцитозом выявленным у животных данной группы через 52 недели после операции (таблица Б.3).

Количество мононуклеаров костного мозга у животных с КД (в контралатеральной конечности внедрены $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ или $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$) не претерпевали значимых изменений в сроки наблюдения 4-е, 16-ть, 52-е недели после операции.

Отличием животных с КД (в контралатеральной конечности – $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$) было увеличение относительного количества лимфоцитов через 16-ть недель после операции (до 119,9%, $p \leq 0,018$) с последующим снижением их количества (до 87,1%, $p \leq 0,018$) через 52 недели после операции по сравнению с интактными животными.

Таким образом, при репаративной регенерации КД в прилежащем сегменте бедренной кости были обнаружены следующие изменения костного мозга: через 4-е недели после операции были выявлены изменения характерные для стадии костномозговой компенсации анемии: увеличение количества эритроидных клеток костного мозга, изменение их соотношения. Наиболее выражены данные изменения были в группе животных с внедренными в контралатеральные конечности $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. Восстановление показателей эритроидного ростка кроветворения у кроликов в конечности с КД наиболее полно произошло в группе животных с внедренными в контралатеральную конечность $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. Через 52-е недели после операции отличий в показателях эритроидного ростка у животных данной группы от интактных кроликов выявлено не было.

При внедрении $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, через 52-е недели после операции относительное количество клеток гранулоцитарного ростка кроветворения уменьшалось по сравнению с интактными кроликами, при этом возрастало относительное количество более зрелых элементов –

метамиелоцитов, сегментоядерных нейтрофилов и увеличивался индекс созревания нейтрофилов.

В группе животных, с внедренными в контралатеральную конечность $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$, было выявлено расширение гранулоцитарного ростка кроветворения костного мозга через 4-е недели после операции преимущественно за счет его более зрелых клеточных элементов. Через 52-е недели изменения затрагивали как эритроцитарный, так и гранулоцитарный ростки кроветворения: снижение относительного количества молодых, способных к делению элементов – эритробластов, пронормоцитов, базофильных нормоцитов, уменьшение относительного количества всех эритроидных клеток; гранулоцитарный росток – увеличение количества метамиелоцитов и сегментоядерных нейтрофилов; а также уменьшение относительного количества лимфоцитов.

4.2.2. Состав кроветворного костного мозга кроликов после внедрения в дефекты

метафизов большеберцовых и бедренных костей пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами

У животных с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ или $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ (в контралатеральной конечности – КД) количество миелокариоцитов через 4-е, 16-ть, 52-е недели недель после операции значимо не отличалась от данного показателя у интактных кроликов (таблица 4.2.1.1).

При исследовании клеточного состава костного мозга у животных с внедренными в краевые дефекты костей $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ (в контралатеральной конечности – КД) было выявлено, что через 4-е недели после операции сохраняется нормобластический тип эритропоэза. Количество клеток эритроидного ряда значимо не увеличено, это отличает конечность с внедренными имплантатами от конечности с КД. Изменения затрагивают более зрелые эритроидные элементы (снижено содержание полихроматофильных нормоцитов, но увеличено количество оксифильных). В морфофункциональном состоянии эритроидного ростка через 16-ть недель после операции было отмечено уменьшение количества молодых эритроидных клеток, способных к делению – пронормоцитов (их количество снижалось до 48,0%, $p \leq 0,019$). Через 52 недели выявленные ранее изменения прогрессировали – было снижено количество эритробластов (до 57,3%, $p \leq 0,004$), пронормоцитов (до 27,9%, $p \leq 0,004$) (таблица Б.4), но увеличилось относительное количество гемоглобинизированных форм эритрокариоцитов – полихроматофильных нормоцитов (до 153,3%, $p \leq 0,023$) и индекс созревания эритрокариоцитов (до 109,1%, $p \leq 0,023$).

У животных с внедренными в краевые дефекты костей $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ (в контралатеральной конечности – КД) было выявлено уменьшение относительного количества молодых эритроидных клеток. Через 4-е недели после операции количество пронормоцитов снижалось до 31,4% ($p \leq 0,01$), через 16-ть – 41,7% ($p \leq 0,008$), через 52 недели количество эритробластов составляло 58,3% ($p \leq 0,004$) от их количества у интактных кроликов.

У животных с внедренными в краевые дефекты костей $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ (в контралатеральной конечности – КД) динамика выявленных изменений была сходна. Через 4-е недели абсолютное количество ядросодержащих эритроидных клеток имело тенденцию к увеличению, в то время как относительное уменьшалось (пронормоциты до 53,9%, $p \leq 0,004$, нормоциты полихроматофильные – 86,7%, $p \leq 0,003$). Через 16-ть недель дисбаланс в соотношении элементов эритроидного ряда сохранялся. Через 52-е недели после операции было отмечено тотальное снижение относительного количества клеток эритроидного ряда, причем не только по сравнению с интактными животными (в целом до 73,8%, $p \leq 0,008$), но и по сравнению с животными с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ ($p \leq 0,03$). Таким образом, направленность изменения клеточного состава эритроидного ростка у кроликов в конечности с внедренными имплантатами $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ совпадала с его изменениями в контралатеральной конечности (с незаполненным дефектом кости). Однако за счет тенденции к увеличению количества миелокариоцитов в аспирате костного мозга абсолютное количество клеток эритроидного ряда даже увеличивается. Необходимо подчеркнуть отсутствие морфологических признаков усиленного апоптоза клеток костного мозга (уменьшение объемов клеток, кариорексиса, кариопикноза, наличия апоптотических телец, фагоцитируемых макрофагами) и анемии в периферической крови, что свидетельствовало бы в пользу угнетения эритропоэза в обеих конечностях у животных данной группы.

У кроликов с внедренными в краевые дефекты костей $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ (в контралатеральной конечности – КД) через 4-е недели после операции не выявлены изменения общего количества клеток гранулоцитарного ростка в костном мозге прооперированного сегмента кости, а увеличивается только количество промиелоцитов – 126,2% ($p \leq 0,0007$). Через 16-ть недель после операции относительное количество клеток гранулоцитарного ряда снижается (до 89,8%, $p \leq 0,019$) преимущественно за счет зрелых форм (палочкоядерных и сегментоядерных нейтрофилов). Однако их абсолютное количество увеличивается до 154,5% по сравнению с количеством до операции. Через 52-е недели после операции были выявлены небольшие изменения в соотношении различных форм гранулоцитов: содержание промиелоцитов уменьшается (до 62,3%, $p \leq 0,004$), а метамиелоцитов увеличивается (116,5%, $p \leq 0,016$). Однако изменения индекса созревания нейтрофилов не выявлено.

У животных с внедренными в краевые дефекты костей $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ (в контралатеральной конечности – КД) через 4-е недели после операции значимых изменений в пуле миелоидных клеток не выявлено. Через 16-ть недель изменения затрагивают пролиферирующие гранулоцитарные клетки. Относительное количество миелобластов и миелоцитов уменьшается (соответственно до 84,6%, $p \leq 0,01$; 89,5%, $p \leq 0,01$). Через 52 недели после операции значимых изменений в миелограмме, по сравнению с показателями до операции, не выявлено.

У животных с внедренными в краевые дефекты костей $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ (в контралатеральной конечности – КД) через 4-е недели после операции было выявлено расширение (гиперплазия) гранулоцитарного ростка (увеличивалось как относительное, так и абсолютное количество миелоидных клеток), количество созревающих клеток метамиелоцитов возрастало значимо до 126,5%, ($p \leq 0,0002$); через 16-ть недель до 111,2% ($p \leq 0,017$). Через 52-е недели изменения нарастали – гранулоцитарный росток был расширен (количество клеток нейтрофильного ряда увеличено до 110,0%, $p \leq 0,008$ по сравнению с уровнем до операции) за счет зрелых форм нейтрофилов – палочкоядерных (117,1%, $p \leq 0,021$) и сегментоядерных нейтрофилов (122,5%, $p \leq 0,008$). Соответственно, было увеличено лейко-эритробластическое соотношение до 153,1% ($p \leq 0,008$), а индекс созревания нейтрофилов уменьшался как по сравнению с интактными животными, так и по сравнению с кроликами с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ (таблица Б.5).

У кроликов с внедренными в краевые дефекты костей $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ (в контралатеральной конечности – КД) количество мононуклеаров костного мозга в обозначенные периоды исследования не изменялось.

У животных с внедренными в костную ткань $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ относительное количество лимфоцитов возрастало (до 118,4%, $p \leq 0,014$) через 16-ть недель после операции. У животных с внедренными в костную ткань $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ количество лимфоцитов увеличивалось до (до 117,0%, $p \leq 0,009$) к 52-м неделям после операции.

Таким образом, при внедрении пористых титановых имплантатов в костную ткань в костном мозге прилежащего сегмента были выявлены изменения отличные при внедрении разных типов имплантатов, в большей степени это относится к поздним срокам наблюдения, что позволяет предположить обусловленность данных различий используемыми углеродсодержащими алмазоподобными пленками. Были выявлены следующие особенности: через 4-е недели после операции у животных с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ изменения костного мозга, характерные для стадии костномозговой компенсации анемии, были выражены в меньшей степени, чем в контралатеральных конечностях с КД. Через 52-е недели после имплантации в костном мозге, сопредельных к

внедренным имплантатам сегментах, снижалось относительное количество молодых эритроидных клеток, способных к делению. Выраженность изменений увеличивалась в ряду $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК} < \text{PTi}_{40}\text{МК} < \text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$.

При внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ происходило значимое увеличение количества лимфоцитов костного мозга (соответственно через 16-ть и 52-е недели после операции).

Через 52-е недели после внедрения $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ в костном мозге прилежащего сегмента было выявлено расширение гранулоцитарного ростка кроветворения, сопровождающееся развитием лейкоцитоза со «сдвигом влево» в периферической крови (на 40-ю, 52-ю недели наблюдения).

4.2.3. Колониеобразующая способность костного мозга кроликов после формирования краевых дефектов метафизов большеберцовых и бедренных костей

Исследование колониеобразующей активности кроветворного костного мозга и предшественниц фибробластоподобных клеток после длительного контакта тканей конечности с внедренными костными имплантатами (52-е недели) позволяет оценить интегративный результат влияния имплантатов *in vivo* на сохранность гемопоэтических потенций костного мозга и колониеобразующую способность фибробластоподобных клеток – предшественниц.

В конечности с КД (в контралатеральной внедрены $\text{PTi}_{40}\text{МК}$) через 4-е недели после операции количество коммитированных клеток-предшественниц эритроидного ростка гемопоэза было увеличенным (до 548,9%, $p \leq 0,014$) (рисунки 4.2.3.1, 4.2.3.2)

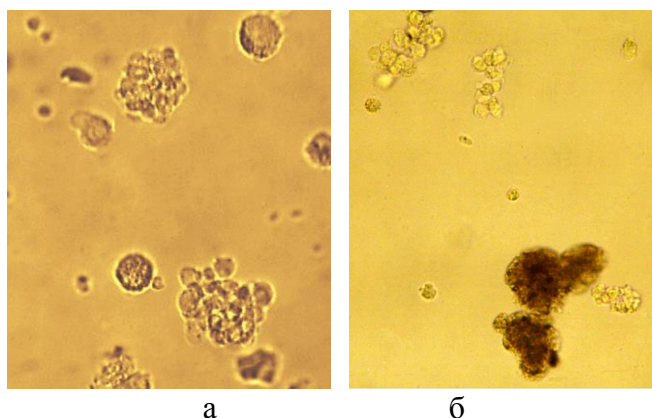


Рисунок 4.2.3.1 – 4-е недели после операции. 10 суток инкубации, мононуклеаров костного мозга 1×10^4 /лунку. СМ-микрофото.

а – две колонии, сформировавшиеся после дифференциации КОЕ-Э. Ув x200;

б – в нижней части снимка БОЕ-Э Ув x 100

преимущественно за счет более зрелых КОЕ-э, количество которых увеличилось в 20,2 раза. Через 52-е недели после операции количество клеток предшественниц эритроидного ростка

значимо не отличалось от уровня до операции. У животных в конечностях с КД (в контралатеральные внедрены $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ или $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$) выявлены сходные изменения.

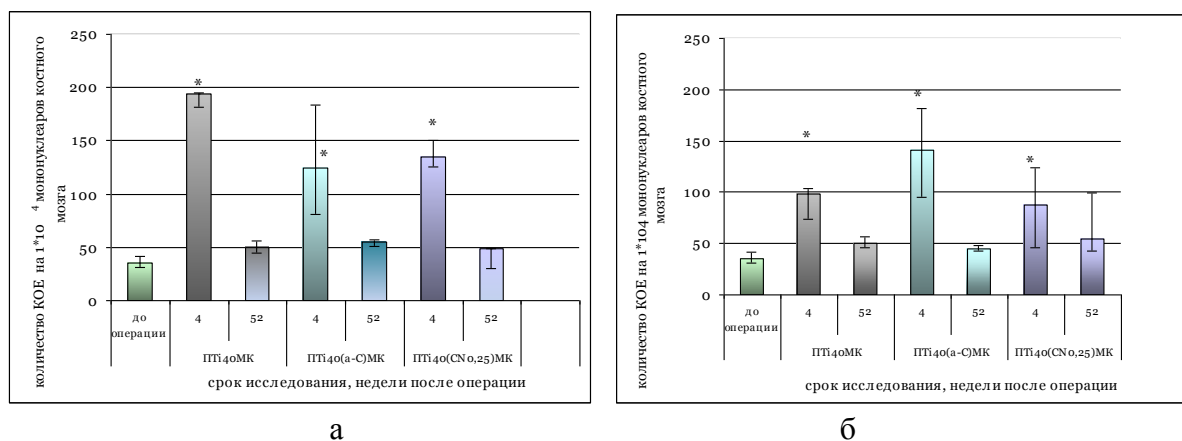


Рисунок 4.2.3.2 – Количество эритроидных предшественниц костного мозга (КОЕ-Э и БОЕ-Э) кролика. 10 суток инкубации мононуклеаров костного мозга 1×10^4 /лунку (медиана, 25-, 75- процентиля). а – конечность с краевыми дефектами костной ткани; б – конечность с внедренными в краевые дефекты пористыми титановыми имплантатами, насыщенными аутологичными миелокариоцитами

У животных всех групп с КД через 4-е после операции количество гранулоцитарно-макрофагальные КОЕ (КОЕ-ГМ) (рисунок 4.2.3.3) имеет тенденцию к увеличению, а через 52-е недели после операции изменение становится значимыми (153,8%, $p \leq 0,007$ по сравнению с количеством до операции).

У животных всех групп в конечностях с незаполненными дефектами костной ткани через 4-е недели после операции количество фибробластоподобных КОЕ (КОЕф) имеет тенденцию к увеличению (рисунок 4.2.3.4), а через 52 недели после операции значимо не отличается от уровня до операции.

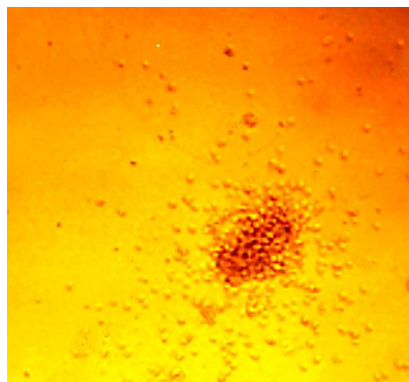


Рисунок 4.2.3.3 – 4-е недели после операции. 10 суток инкубации, мононуклеаров костного мозга 1×10^4 /лунку. СМ-микрофото. В центре снимка – одна колония, сформировавшаяся КОЕ-ГМ. Ув x 100

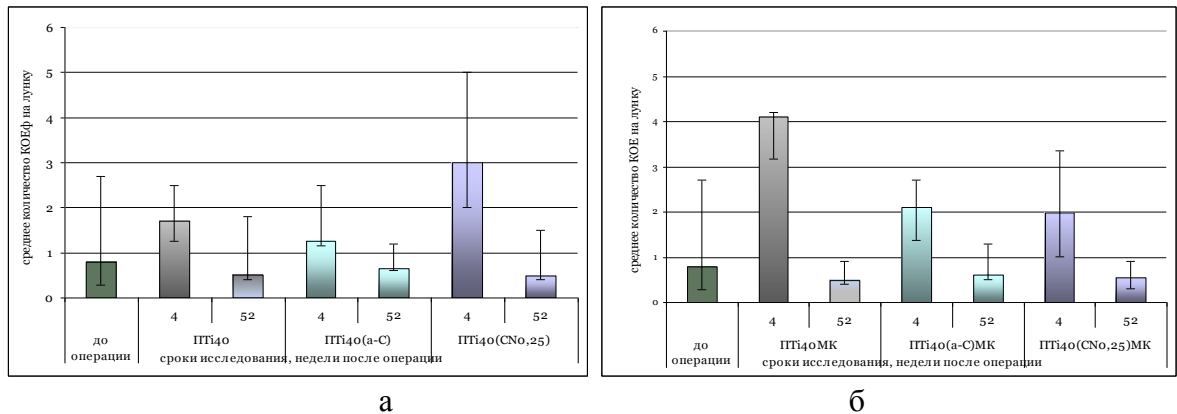


Рисунок 4.2.3.4 – Количество фибробластоподобных КОЕ костного мозга кролика. 10 суток инкубации, прилипающей фракции 1×10^6 миелокариоцитов (медиана, 25-, 75-процентиля).

а – конечность с краевыми дефектами костной ткани;
 б – конечность с внедренными пористыми титановыми имплантатами, насыщенными аутологичными миелокариоцитами

4.2.4. Колониеобразующая способность костного мозга кроликов после внедрения в дефекты метафизов большеберцовых и бедренных костей пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами

В конечности с внедренными PTTi₄₀МК (в контралатеральных конечностях КД) через 4-е недели после операции количество коммитированных клеток-предшественниц эритроидного роста было увеличенным (до 291,6%, $p \leq 0,019$) преимущественно за счет более зрелых КОЕ-э (рисунок 4.2.3.2), количество которых увеличилось в 5,9 раза. Различий между конечностью с незаполненными дефектами и конечностью с внедренными имплантатами не выявлено. Через 52-е недели после операции количество клеток предшественниц красного роста значимо не отличалось от уровня до операции. У животных с внедренными PTTi₄₀(a-C)МК или PTTi₄₀(CN_{0,25})МК (в контралатеральных конечностях КД) выявлены схожие изменения.

У животных в конечностях с внедренными PTTi₄₀МК, PTTi₄₀(a-C)МК и PTTi₄₀(CN_{0,25})МК через 52 недели увеличивалось количество КОЕ-ГМ костного мозга (до 156,5%, $p \leq 0,013$; 164,7%, $p \leq 0,008$; 149,9%, $p \leq 0,02$ соответственно) по сравнению с уровнем до операции.

Изменения количества КОЕф носили характер тенденций. Различий между конечностью с незаполненными дефектами и конечностью с внедренными имплантатами не выявлено.

Таким образом, исследование колониеобразующей способности кроветворного костного мозга и предшественниц фибробластоподобных клеток в динамике после длительного контакта костной ткани и костного мозга с имплантатами не выявило значимого снижения способности костномозговых прекурсоров формировать колонии в культуре ткани.

4.3. Динамика фагоцитарной активности нейтрофилов периферической крови кроликов после формирования краевых дефектов костей обеих тазовых конечностей у кроликов и внедрения пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миеелокариоцитами, в кости правой конечности

При тестировании имплантируемых в организм материалов представляется важным оценить не только количественные характеристики клеток крови, но и их функциональную активность.

Изменение поглотительной активности (фагоцитарный индекс и фагоцитарное число) нейтрофилов за период наблюдения носили характер тенденций у животных всех групп (рисунок 4.3.1) и находились в пределах референтных величин.

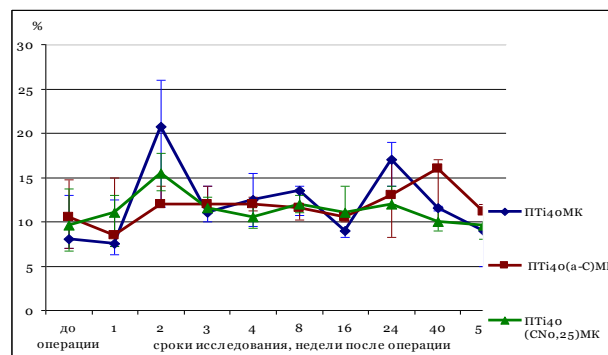


Рисунок 4.3.1 – Динамика фагоцитарного индекса нейтрофилов периферической крови кроликов после формирования краевых дефектов костной ткани в обеих конечностях и внедрения пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миеелокариоцитами, в одну из конечностей (медиана, 25-, 75- процентиля)

4.4. Динамика показателей минерального обмена в периферической крови кроликов после формирования краевых дефектов костей обеих тазовых конечностей и внедрения пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миеелокариоцитами, в кости правой конечности

У животных с внедренными в правые тазовые конечности ПТi40МК и сформированными КД в контралатеральных конечностях в течение 3-х недель после операции была выявлена тенденция к снижению концентрации общего кальция в периферической крови по сравнению с дооперационным уровнем (таблица Б.6). С 16-й по 40-ю недели после операции было выявлено небольшое, но статистически значимое снижение концентрации общего кальция в периферической крови (соответственно до 96,4%, $p \leq 0,012$; 92,8%, $p \leq 0,027$), что подтверждает данные полученные при обследовании пациентов с закрытыми переломами большеберцовой кости [173]. У животных с внедренными ПТi40(а-С) или ПТi40(СN0,25) в течение 3-х недель после операции динамика кальциемии была схожей. Отличием являлось отсутствие

уменьшения концентрации общего кальция в периферической крови на поздних сроках наблюдения. Изменения концентрации ионизированного кальция носили характер тенденций у животных всех групп в течение всего периода наблюдения, что так же не противоречит результатам, полученным в клинике [165] (рисунок 4.4.1).

Концентрации неорганического фосфата в периферической крови животных с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ в правые тазовые конечности и КД контралатеральных конечностях имеет два периода уменьшения – через 12-16-ть недель до 82,1%, $p \leq 0,017$ и через 52-е недели до 77,8%, $p \leq 0,02$. В группах с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{а-С})\text{МК}$ или $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ динамика фосфатемии была схожей.

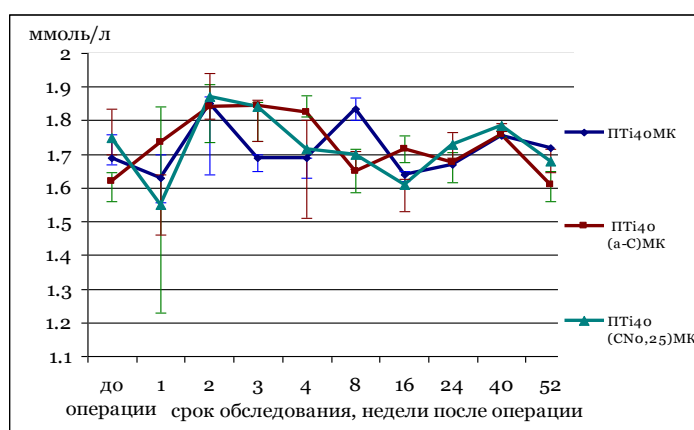


Рисунок 4.4.1 – Динамика концентрации ионизированного кальция в периферической крови кроликов после формирования краевых дефектов костной ткани в обеих конечностях и внедрения пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами в одну из конечностей (медиана, 25-, 75- процентиля)

Известно, что в условиях физиологической нормы соотношение концентраций кальция и неорганического фосфата периферической крови находятся в реципрокных отношениях. Следовательно, для выявления изменений в системной регуляции кальциево-фосфатного обмена важно было проанализировать соотношение данных макроэлементов. У животных с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ была выявлена тенденции увеличения кальций-фосфатного индекса через 2-е недели после операции (до 131,3%, ($p \leq 0,067$)).

У животных с $\text{PTi}_{40}(\text{а-С})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ динамика кальций-фосфатного индекса была сходна.

Концентрации магния в периферической крови животных с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ имела два периода уменьшения – через 8-мь недель до 89,4%, ($p \leq 0,028$) и через 40-к недель до 83,5%, ($p \leq 0,028$). При внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ динамика концентрации магния в периферической крови сходна.

Таким образом, после моделирования дефектов костной ткани в обеих конечностях и внедрения пористых титановых имплантатов ($\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{а-С})\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$) в одну

из конечностей обнаружена тенденция к снижению концентрации общего кальция, неорганического фосфата в течение 3-х недель после операции. При этом значимые изменения концентрации ионизированного кальция не выявлены. Особенностью животных, с внедренными в правую конечность $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, являлось значимое снижение концентрации общего кальция в периферической крови на поздних сроках наблюдения (16-я – 52-я недели после операции).

У животных всех групп выявлено два периода уменьшения концентрации магния и неорганического фосфата в периферической крови в отдаленные сроки после операции (через 8-12 и 40-52-е недели после операции).

4.5. Некоторые особенности метаболизма костной и мышечной тканей кроликов после формирования краевых дефектов костей обеих тазовых конечностей и внедрения пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами, в кости правой конечности

Чистый титан и его сплавы относятся к группе наиболее биосовместимых, нетоксичных металлов с отличными коррозионными качествами [78]. Однако при внедрении титановых пластин, винтов, полированных винтовых титановых имплантатов было обнаружено накопление титана в прилежащих тканях, сыворотке крови, макрофагах, а также в отдаленных от внедренных металлических имплантатов органах [472, 345]. Повышение концентрации металла связано с его коррозией или с образованием частиц износа, подавляющее большинство которых, имеет субмикроскопическую и нано- размерность, по данным Case et al. (1994) – 10-70 нм [249], Doorn (1998) – 6 нм [249], а, следовательно, могут быть обнаружены только при использовании специальных методов, таких как электронная микроскопия. При этом частицы наноразмера имеют большую относительную площадь поверхности, чем микрочастицы и химически более активны.

При биодegradации многих металлов (Zn, Co, V, Cd, Ni) было обнаружено изменение активности ферментов, таких как – глутатион-3-трансфераза, глутатионредуктаза, лактатдегидрогеназа, щелочная фосфатаза [82, 77]. Исходя из вышесказанного, было целесообразно исследовать активность ферментов гликолиза (протекающего в физиологических условиях в костной ткани с большой интенсивностью) и аэробных окислительно-восстановительных реакций, активирующихся в период регенерации кости после продолжительного контакта тканей организма с пористыми титановыми имплантатами [174, 118, 112, 176].

4.5.1. Метаболизм костной ткани после формирования краевых дефектов метафизов большеберцовых и бедренных костей

Специфичную для анаэробного гликолиза прямую и обратную реакции восстановления пирувата цитозольным восстановленной НАДН, в которой пируват является акцептором водорода, катализирует лактатдегидрогеназа (ЛДГ) (КФ 1.1.1.27 L-лактат: НАД-оксидоредуктаза).

После формирования КД (в контралатеральных конечностях внедрены $\text{PTi}_{40}\text{МК}$) активность общей цитоплазматической ЛДГ (ЛДГц) в гомогенатах прилежащих сегментов кости была снижена по сравнению с интактными животными через 16-ть недель после имплантации ($p \leq 0,028$) (таблица Б.7). К концу срока наблюдения активность ЛДГц у животных данной группы не отличалась от интактных животных. Динамика активности ЛДГц в сегментах костей сопредельных с КД (в контралатеральных конечностях – $\text{PTi}_{40}(\text{а-С})\text{МК}$ или $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$) была сходной, но изменялась на уровне тенденций.

В сегментах костей, сопредельных с КД, у животных всех групп была выявлена тенденция к накоплению пирувата в костной ткани, обнаруженная во все сроки наблюдения (рисунок 4.5.1.1). Особенностью животных с $\text{PTi}_{40}(\text{а-С})\text{МК}$ в контралатеральных конечностях являлось статистически значимое увеличение концентрации пирувата через 16-ть и 52-е недели после операции моделирования КД.

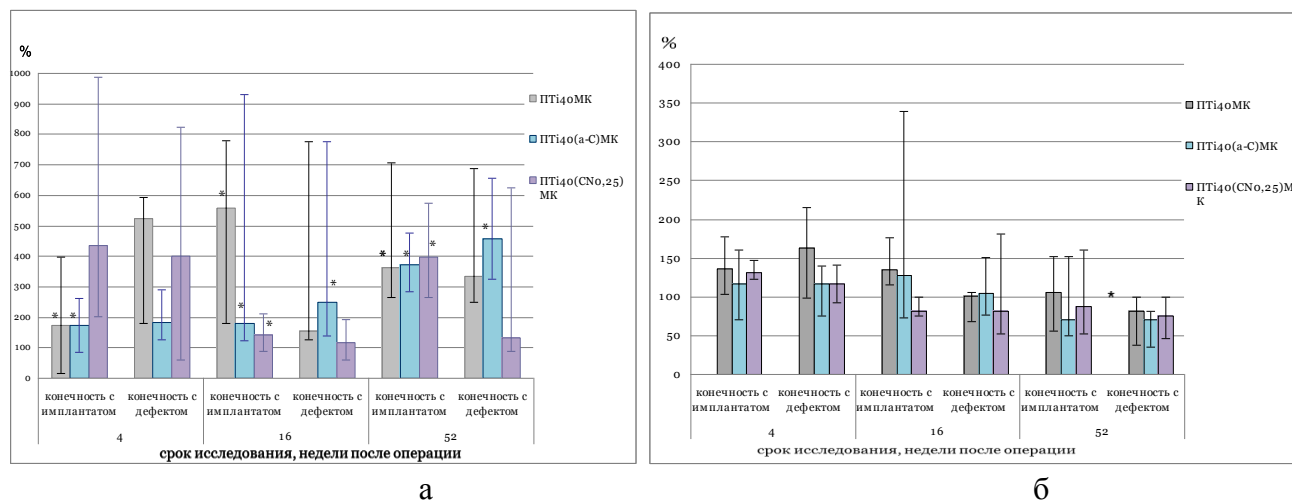


Рисунок 4.5.1.1 Динамика концентрации пирувата (а) и лактата (б) в гомогенатах костной ткани кроликов при моделировании дефектов большеберцовых и бедренных костей в обеих конечностях и внедрения в правую конечность пористых титановых имплантатов, насыщенных миелокариоцитами по сравнению с интактными животными (медиана, 25-, 75- процентиля).

* $p \leq 0,05$ по сравнению с интактными животными

Концентрация лактата в гомогенатах костей, сопредельных с КД, (в контралатеральных конечностях – $\text{PTi}_{40}\text{МК}$) имела тенденцию к росту через 4-е недели после формирования КД и

снижалась через 52-е недели после операции. У животных, с внедренными в контралатеральные конечности $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ или $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})$, динамика изменений была сходна.

Цитоплазматическая никотиамиддинуклеотид зависима малатдегидрогеназа (КФ 1.1.1.37; НАД-МДГ) состоит из 4-х субъединиц и участвует в переносе метаболитов между клеточными компартментами, а также в анаболических процессах клетки [125, 162]. Изменения активности цитоплазматической НАД-МДГ (НАД-МДГц) в гомогенатах костей, сопредельных с КД, (в контралатеральных конечностях внедрены $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ или $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ или $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$) носили характер тенденций.

Активность митохондриальной НАД-МДГ (НАД-МДГм) димерной изоформы, катализирующей в цикле трикарбоновых кислот обратимое превращение малата в оксалоацетат и функционирующей как малат-аспартатный шунт [162], в гомогенатах костей, сопредельных с КД (в контралатеральных конечностях внедрены $\text{PTi}_{40}\text{МК}$), снижалась в течение 4-х недель после операции до 20,6% ($p \leq 0,006$) и нормализовалась к 52-м неделям наблюдения. В гомогенатах костей, сопредельных с КД (в контралатеральных конечностях внедрены $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ или $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$), динамика была сходной, но изменения носили характер тенденций.

Активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в сегментах костей, сопредельных с КД (в контралатеральных конечностях внедрены $\text{PTi}_{40}\text{МК}$), незначительно снижалась в течение 16-и недель после формирования краевых дефектов и значимо увеличивалась к 52-м неделям наблюдения до 401,8% ($p \leq 0,006$). Динамика активности СДГ в сегментах костей, сопредельных с КД (в контралатеральных конечностях внедрены $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$), была сходной, но носила характер тенденций.

4.5.2. Метаболизм костной ткани после внедрения в дефекты метафизов

большеберцовых и бедренных костей пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами

В сегментах костей, сопредельных с $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ или $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$, динамика изменения активности общей ЛДГц в гомогенатах костной ткани была сходной с динамикой общей ЛДГц в контралатеральных конечностях с КД (таблица Б.8).

В гомогенатах костной ткани конечностей с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ было выявлено накопление ПВК во все сроки наблюдения – 4-е, 16-ть, 52-е недели после операции, соответственно до 172,8% ($p \leq 0,028$), 558,8% ($p \leq 0,012$), 362,7% ($p \leq 0,005$) по сравнению с костной тканью интактных кроликов; у животных с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ – изменения были сходны (рисунок 4.5.1).

Динамика концентрации лактата в гомогенатах костной ткани сегментов, прилежащих к $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{а-С})\text{МК}$ или $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$, была сходна с динамикой этого показателя в контралатеральной конечности (с КД).

На активность НАД-МДГц приходилось от 90 до 98 % активности фермента в гомогенатах костной ткани. При внедрении в костную ткань $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ на ранних сроках наблюдения – 4-е, 16-ть недель после операции, – значимо увеличивается соотношение активности цитоплазматической и митохондриальной фракций НАД-МДГ костной ткани (соответственно в 2,0; 4,7 раза). При внедрении в костную ткань $\text{PTi}_{40}(\text{а-С})\text{МК}$ изменения носили характер тенденций. При внедрении в костную ткань $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ доля НАД-МДГц увеличивается в 2,1 раза ($p \leq 0,036$) по сравнению с интактными кроликами.

Изменения активности НАД-МДГц в гомогенатах костной ткани в конечностях с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{а-С})\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ носили характер тенденций.

Активность НАД-МДГм в конечностях с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ значимо снижалась в течение 16-и недель после операции и нормализовалась к 52-м неделям наблюдения. Динамика активности НАД-МДГм в конечностях, с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{а-С})\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ была аналогичной, однако изменения носили характер тенденций.

Есть мнение, что снижение активности МДГм, обнаруживаемое при нарушении целостности кости в условиях ишемии тканей, обусловлено не только изменениями морфологии и функции митохондрий, а необходимо для уменьшения образования активных форм кислорода в условиях неполного восстановления кислорода в дыхательной цепи и ограничения процессов свободно радикального окисления в клетке. При этом выраженность данной реакции пропорциональна длительности и выраженности ишемии ткани [163, 91, 125].

Изменения активности СДГ в гомогенатах костной ткани конечностей, с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{а-С})\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$, были аналогичны ее изменениям в контралатеральных конечностях (с незаполненными дефектами) – ее активность незначительно снижалась в течение 16-и недель и повышалась к 52-м неделям наблюдения.

Таким образом, в гомогенатах костной ткани были выявлены изменения активности некоторых ферментов, осуществляющих аэробное и анаэробное расщепление метаболитов, преимущественно в течение 4-16-и недель после формирования краевых дефектов кости или внедрения пористых титановых имплантатов. К 52-й неделе после операции активность ЛДГц, НАД-МДГц НАД-МДГм, СДГ соответствовали активности данных ферментов у интактных животных. Через 52 недели наблюдения не выявлено значимых отличий между активностью ферментов в контралатеральных конечностях (с незаполненными дефектами и с внедренными пористыми титановыми имплантатами), а также различий между животными с внедренными титановыми имплантатами без покрытий и с алмазоподобными покрытиями. Полученные

результаты мы расцениваем как свидетельство отсутствия значимого изменения активности исследуемых ферментов при длительном контакте костной ткани с пористыми титановыми имплантатами, как без покрытий, так и с алмазоподобными пленками (PTi₄₀МК, PTi₄₀(а-С)МК и PTi₄₀(CN_{0,25})МК). Однако выявленное накопление пирувата в костной ткани и активация СДГ (через 52-е недели наблюдения) указывают на изменение характера метаболизма в сегментах костей, прилежащих к сформированным дефектам, причем в большей степени при внедрении в дефекты пористых титановых имплантатов.

4.5.3. Метаболизм скелетной мышечной ткани при формировании краевых дефектов большеберцовых и бедренных костей обеих конечностей и внедрения пористых титановых имплантатов в кости правой конечности

Методом рентгеноспектрального анализа через 16-ть недель после внедрения в метафизы большеберцовых и бедренных костей PTi₄₀МК, предварительно насыщенных аутологичными миелокариоцитами, было выявлено значимое увеличение концентрации титана в *m. tibialis anterior* и *m. adductor magnus* до 150,0% (116,7; 166,0; n=11) по сравнению с интактными животными. При внедрении пористых титановых имплантатов с алмазоподобными пленками (PTi₄₀(а-С)МК и PTi₄₀(CN_{0,25})МК), так же насыщенных миелокариоцитами, такого увеличения концентрации титана в названных мышцах не выявлено (соответственно 93,5% (73,6; 101,3; n=7) и 108,4% (83,3; 129,2; n=8)) по сравнению с контрольными образцами.

Известно, что многие металлы при взаимодействии с белками *in vitro* или, кумулируясь в организме, проявляют биохимическую активность по отношению к значимым для катализа сульфгидрильным, тиоловым, карбоксильным и другим активным группам. Так, при экспозиции *in vitro* ферментов с нанопорошком цинка или меди активность ЛДГ, ЩФ падала, что, по мнению авторов, указывало на прямое токсическое влияние наночастиц на данные ферменты [77, 160].

Исходя из этого, интерес представляло исследование активности некоторых ферментов, важных для функционирования мышечной ткани. В скелетных мышцах активно протекают реакции гликолиза. Однако считается, что основным поставщиком энергии в клетке является креатинфосфокиназная реакция. Исходя из этого, мы исследовали активности общей ЛДГ_ц, общей НАД-МДГ_ц и НАД-МДГ_м, креатинфосфокиназы (КФК), СДГ в *m. tibialis anterior*.

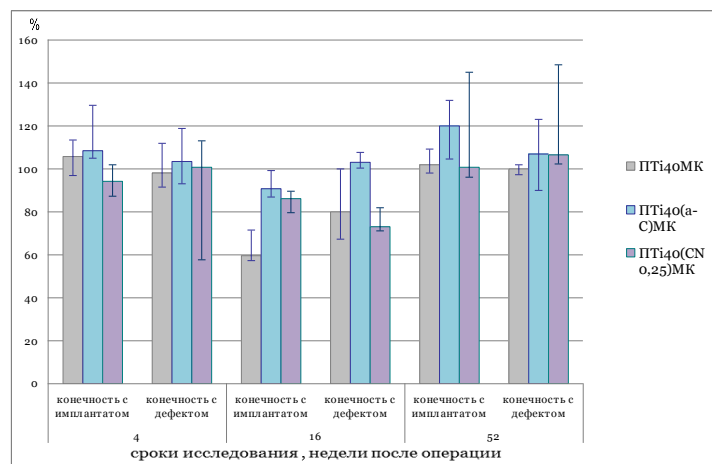
Скелетная мышца тазовой конечности кроликов *m. tibialis anterior* содержит преимущественно быстро сокращающиеся волокна (12% - Па и 82% - Id) [204]. Выбор *m. tibialis anterior* был обусловлен тем, что во время операции при выделении метафиза

большеберцовой кости мы, не рассекая *m. tibialis anterior*, отводили ее в сторону. В результате она была травмирована незначительно.

После формирования КД большеберцовых и бедренных костей у животных всех групп (в контралатеральных конечностях внедрены $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$) через 4-е, 16-ть, 52-е недели после операции активность ЛДГц, НАД-МДГц, НАД-МДГм, СДГ, КФК в *m. tibialis anterior* значимо не изменялась по сравнению с интактными животными (таблицы Б.9). При этом были отмечены тенденции к снижению активности ЛДГц, НАД-МДГц, КФК в течение 4-16-и недель после операции и, напротив, увеличение активности НАД-МДГм.

В конечностях, с внедренными в большеберцовые и бедренные кости $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$, динамика активности исследуемых ферментов была аналогичной. Особенностью являлось значимое снижение активности КФК в *m. tibialis anterior* через 4-е недели после имплантации в большеберцовые и бедренные кости $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ (таблица Б.10), что, вероятно, связано с уменьшением двигательной активности животных.

Концентрация лактата в *m. tibialis anterior* у животных всех групп в конечностях с незаполненными дефектами и в конечностях с внедренными имплантатами (независимо от типа имплантата) не претерпевала значимых изменений (рисунок 4.5.3.1.).



а

Рисунок 4.5.3.1 – Динамика концентрации лактата в *m. tibialis anterior* кроликов при моделировании дефектов большеберцовых и бедренных костей в обеих конечностях и внедрения в правую конечность пористых титановых имплантатов, насыщенных миелокариоцитами по сравнению с интактными животными (медиана, 25-, 75- процентиля).

* $p \leq 0,05$ по сравнению с интактными животными

Таким образом, различий в активности исследуемых ферментов в *m. tibialis anterior*, прилежащей к прооперированному сегменту большеберцовой кости у животных, с внедренными в костную ткань $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$, через 52-е недели после операции выявлено не было. Также не выявлено различий в активности исследуемых

ферментов в m. tibialis anterior между контралатеральными конечностями с КД и с костными дефектами, заполненными имплантатами.

4.6. Состояние регионарных лимфатических узлов после формирования краевых дефектов костей

Согласно представлениям [22], дренируемый орган и лимфатический регион – интерстициальное пространство, сосудистое звено и регионарные лимфатические узлы, являются целостной функциональной единицей. Лимфатические узлы выполняют кроветворную, иммунопoэтическую, барьерно-фильтрационную, резервуарную, детоксикационную, метаболическую функции. При действии дестабилизирующих факторов иммунная система в качестве одной из интегративных систем организма и ее периферические органы – лимфатические узлы в том числе, неизбежно вовлекаются в ответную реакцию. Анализ структурно-функциональных изменений ее компонентов способен выявить объективную информацию о процессах адаптации, дезадаптации органов и систем в регионе лимфосбора [161]. Необходимо отметить, что иммунная система кролика отличается значительной пластичностью и способна отвечать даже на незначительные воздействия выраженными морфологическими сдвигами, кроме того структура лимфатических узлов кроликов близка по морфологии лимфатическим узлам человека [101].

Mohr в 1957 установил, что макрофаги переносят частицы титана в лимфатические узлы. Полученные результаты позже подтвердили Hilmann и Donath (1991). Учитывая вышесказанное, задачей данного фрагмента являлась комплексная оценка динамики морфологических, морфометрических параметров структур регионарных лимфатических узлов 1-го этапа для тазовых конечностей [22] и цитоархитектоники их структурно-функциональных зон в ответ на формирование дефектов костей тазовых конечностей; оценка состояния лимфатических узлов при заполнении дефектов пористыми титановыми имплантатами, насыщенными миелокариоцитами.

4.6.1. Состояние регионарных лимфатических узлов после формирования краевых дефектов костей

У интактных кроликов, а также у кроликов после моделирования КД метафизов большеберцовых и бедренных костей во все сроки наблюдения после операции подколенные лимфатические узлы чаще имели овальную или округлую форму, реже были бобовидной формы.

Общая площадь среза подколенных лимфатических узлов кроликов в конечности с КД метафизов большеберцовых и бедренных костей (в контралатеральной конечности – ПТi₄₀МК) через 4-е недели имела тенденцию к увеличению до 226,9% ($p \leq 0,1$), (таблица Б.11). К концу срока наблюдения (52-е недели после операции) площадь подколенных лимфатических узлов в конечности с КД не отличалась от значений данного показателя у интактных животных.

Динамика изменения площади среза у животных, с внедренными в контралатеральные конечности ПТi₄₀(а-С)МК и ПТi₄₀(CN_{0,25})МК, была аналогичной.

Гистологическая структура подколенных лимфатических узлов при формировании КД костей тазовой конечности была сохранена у всех животных во все сроки наблюдения.

Через 4-е недели после операции у кроликов с КД (в контралатеральных конечностях внедрены ПТi₄₀МК) – площадь капсулы и краевых синусов подколенных лимфатических узлов по сравнению с интактными животными была значимо увеличена ($p \leq 0,019$) (таблицы Б.12) в основном за счет расширения последних. Количество клеточных элементов в подкапсульных синусах – чаще умеренное.

Корковое вещество было несколько расширено за счет размеров некоторых фолликулов и расширения коркового плато. Строение лимфоидных фолликулов характеризовалось полиморфизм у 3-х из 4-х кроликов. Часть из них была увеличена, расширена, в них определялись светлые центры, что указывало на активную пролиферации лимфоцитов. Данное положение подтверждалось снижением относительного количества зрелых лимфоидных элементов в корковом плато до 95,8% ($p \leq 0,003$) по сравнению с интактными животными. Однако абсолютное их количество имело тенденцию к увеличению (таблицы Б.13, Б.14). Обращало на себя внимание значительное увеличение количества эозинофилов в корковом плато (относительное до 400% по сравнению с интактными животными, $p \leq 0,004$; абсолютное до 733,4%, $p \leq 0,004$). Мантийные и краевые зоны фолликулов были расширены, границы между краевыми и мантийными зонами четкие у 2-х животных из 4-х.

Паракортикальная зона была расширена сегментарно. Абсолютное количество молодых лимфоидных элементов увеличено по сравнению с интактными животными (лимфобластов до 267,9%, $p \leq 0,03$; пролимфоцитов до 178,6%, $p \leq 0,017$), межузелковые синусы с умеренным количеством клеточных элементов.

Несмотря на то, что мозговое вещество не расширено, количество молодых лимфоидных элементов в этой зоне было увеличено (лимфобластов относительное до 244,4%, $p \leq 0,003$; абсолютное до 227,0%, $p \leq 0,004$; абсолютное количество пролимфоцитов увеличено до 237,8% $p \leq 0,004$). Абсолютное количество эозинофилов (подсчитанное вне областей их скопления) увеличено до 300,0% по сравнению с интактными животными. У 1-го кролика из 4-

х при качественной морфологической оценке препаратов лимфатического узла была выявлена реакция, квалифицированная как эозинофильная клеточная инфильтрация.

Через 16-ть недель после операции отмечалось снижение выраженности морфологических проявлений реакции лимфатических узлов на нанесенную травму, по сравнению с предыдущим сроком наблюдения - фолликулы становились более мономорфны, были в меньшей степени увеличены в размерах, мантийные и краевые зоны расширены у меньшего количества животных. В корковом плато количество макрофагов было повышенным. Количество клеточных элементов в подкапсульных, межузелковых и мозговых синусах – малое или умеренное, что указывало на снижение антигенной нагрузки.

Через 52-е недели после формирования КД (в контралатеральных конечностях внедрены ПТi₄₀МК) морфологическая картина подколенных лимфатических узлов незначительно отличалась от морфологической картины интактных животных (рисунок 4.6.1.1).

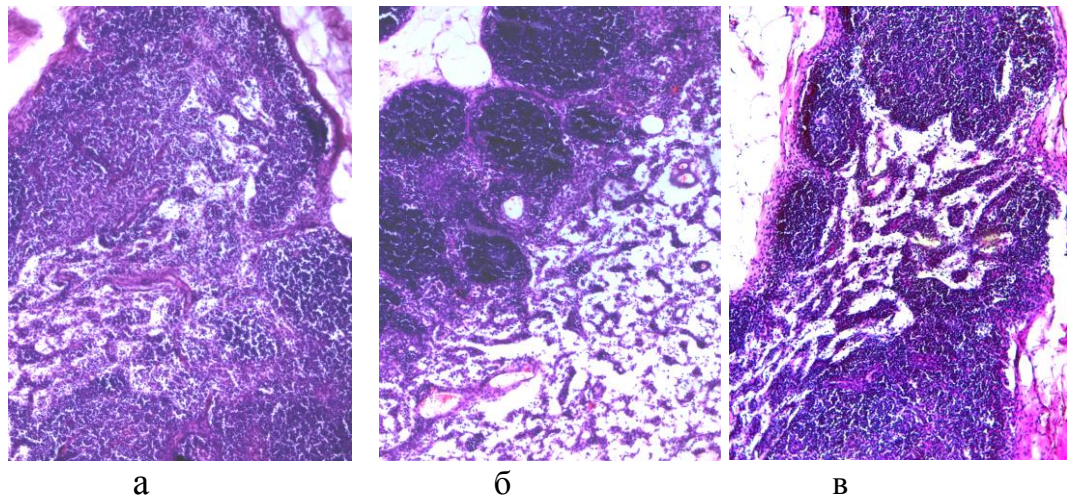


Рисунок 4.6.1.1 а – интактный кролик. Подколенный лимфатический узел. Фолликулы коркового слоя мономорфны, паракортикальная зона не расширена, в синусах умеренное количество клеточных элементов. б – кролик, 52-е недели после операции, конечность с краевыми дефектами костной ткани (в контралатеральной конечности – ПТi₄₀МК). Подколенный лимфатический узел. Фолликулы коркового слоя мономорфны, без расширения светлых центров, краевая и мантийная зоны без расширения, в синусах малое количество клеточных элементов. в – кролик. 52-е недели после операции, конечность с краевыми дефектами костной ткани (в контралатеральной конечности – ПТi₄₀(а-С)МК). Подколенный лимфатический узел. Фолликулы коркового слоя мономорфны, светлые центры определяются в единичных фолликулах. Паракортикальная зона не расширена. В синусах малое количество клеточных элементов. СМ-микрофото. Окраска гематоксилином-эозином. Ув.х100.

Особенностью являлась бедность клеточными элементами подкапсульных, межузелковых и мозговых синусов. При этом в корковом плато, паракортикальной зоне и мозговом веществе сохранялось увеличенное количество молодых лимфоидных элементов (в корковом плато абсолютное количество лимфобластов – 189,1% $p \leq 0,015$ по сравнению с интактными животными; в паракортикальной зоне относительное количество лимфобластов –

257,4% ($p \leq 0,015$); в мозговом веществе пролимфоцитов – 166,7% ($p \leq 0,002$)) и, соответственно, было снижено количество лимфоцитов. В корковом плато было увеличено относительное количество макрофагов до 180,0% ($p \leq 0,025$) (таблица Б.14).

Особенностью регионарных лимфатических узлов конечности с незаполненными КД (в контралатеральных конечностях внедрены $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$) через 4-е недели после операции являлось – отсутствие расширения коркового вещества, большая мономорфность фолликулов по структуре и размеру. Значимое увеличение относительного и абсолютного количества макрофагов (до 180,0%, $p \leq 0,003$; 171,4% $p \leq 0,002$), что как правило рассматривают в качестве свидетельства усиления процессов разрушения клеток в зоне лимфосбора [177]. Изменения в паракортикальной зоне были аналогичны изменениям, описанным у животных, с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$.

Мозговое вещество было отечно, абсолютное количество макрофагов в данной зоне увеличено до 145,5%, $p \leq 0,02$. Через 16-ть недель после операции у кроликов данной группы было повышено количество молодых лимфоидных элементов в кортикальном плато, паракортикальной зоне, мозговом веществе по сравнению с интактными животными; количество животных с отеком мозгового вещества и его выраженность уменьшались.

Через 52-е недели морфологическая картина подколенных лимфатических узлов незначительно отличалась от морфологической картины интактных животных, однако в паракортикальной зоне и мозговом веществе сохранялось повышенное и абсолютное количество лимфобластов.

Особенностью регионарных лимфатических узлов конечности с незаполненными КД (в контралатеральных конечностях внедрены $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})$) через 4-е недели было снижение количества клеточных элементов в подкапсульных синусах по сравнению с интактными животными. Корковое вещество было не расширено или расширено незначительно.

Обращает на себя внимание увеличение в корковом веществе относительного количества макрофагов до 200,0% ($p \leq 0,009$), абсолютного до 206,1% ($p \leq 0,009$) и наиболее выраженное по сравнению с другими группами увеличение количества эозинофилов – относительного до 700% ($p \leq 0,009$), а в абсолютных цифрах до 1200% ($p \leq 0,009$). Лимфоидные фолликулы были более мономорфны, лишь в некоторых фолликулах расширены светлые центры. У всех животных данной группы мантийные и краевые зоны фолликулов не расширены, границы между зонами нечеткие. Межузелковые синусы с малым количеством клеточных элементов. Особенности выявленными у животных данной группы были: в паракортикальной зоне увеличение количества эозинофилов (относительное до 350%, ($p \leq 0,03$), абсолютное до 322,2% ($p \leq 0,009$)) и относительного количества макрофагов до 120,0% ($p \leq 0,009$); увеличение абсолютного количества сегментоядерных нейтрофилов в мозговой зоне.

У 2-х из 4-х животных при морфологическом описании лимфатических узлов выраженность данных изменений позволила оценить их как лейкоцитарную инфильтрацию лимфатических узлов, у одного кролика – как синусовую гистиоцитарную реакцию, у другого – эозинофильную клеточную реакцию. В динамике через 16-ть недель после операции у животных в конечностях с незаполненными краевыми дефектами (в контралатеральные конечности внедрены $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$) отмечалась положительная динамика. Через 52-е недели характеристики большинства структур подколенных лимфатических узлов так же приближались к характеристикам интактных кроликов, однако были выявлены изменения, затрагивающие паракортикальную зону, которая была сегментарно расширена у всех животных, а у 3-х кроликов из 4-х была выявлена инфильтрация эозинофилами преимущественно синусов лимфатических узлов (рисунок 4.6.1.2).

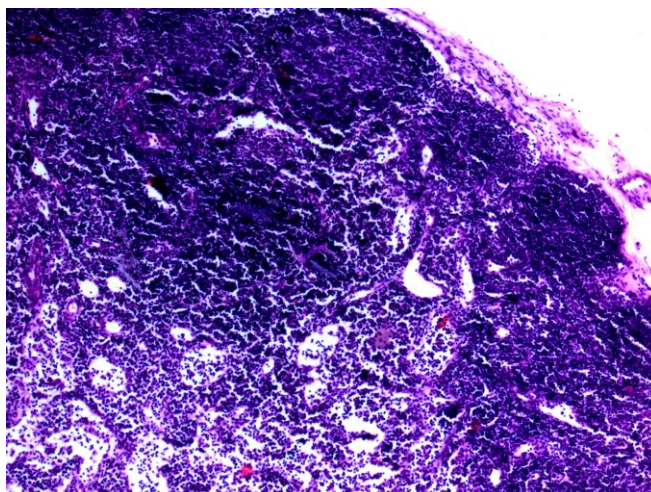


Рисунок 4.6.1.2 – Кролик. 52-е недели после операции, конечность с краевыми дефектами костной ткани (в контралатеральной конечности - $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$). СМ-микрофото. Подколенный лимфатический узел. Расширена паракортикальная зона, эозинофильная инфильтрация. Окраска гематоксилином-эозином. Ув.х100.

В этой же зоне количество плазматических клеток увеличивалось со временем, а к 52-м неделям после операции достигало 196,4% ($p \leq 0,017$) по сравнению с интактными животными, а так же значимо превышало данный показатель у животных, с внедренными в контралатеральную конечность $\text{PTi}_{40}\text{МК}$.

Таким образом, у животных всех гоупп при формировании КД во все сроки наблюдения гистологическая структура регионарных лимфатических узлов была сохранена. Выявлены однотипные изменения микроархитектоники и клеточного состава регионарных лимфатических узлов (преимущественно кортикальной, паракортикальной зон и мозгового вещества).

Изменения клеточного состава затрагивали преимущественно корковое плато, паракортикальную и мозговую зоны – отмечено увеличение количества лимфобластов и пролимфоцитов и соразмерное снижение зрелых элементов – лимфоцитов; увеличение

количества эозинофилов и макрофагов на ранних сроках наблюдения (4-е недели после внедрения имплантатов). У животных в конечности с КД (в контралатеральную конечность внедрены ПТi₄₀ МК) количество макрофагов в корковом плато лимфатического узла было увеличено до конца наблюдения (52-е недели после операции). У животных в конечности с КД (в контралатеральную конечность внедрены ПТi₄₀(CN_{0,25})МК) до конца срока наблюдения увеличено количество эозинофилов. Обращает на себя внимание минимальное изменение клеточного состава герминативных зон регионарных лимфатических узлов у животных с КД. Выявленные изменения указывают на умеренную реактивность Т- и В-зависимых зон, стимуляцию системы моноцитов/макрофагов, эозинофилов, обусловленные воспалительной реакцией, вероятно, сопровождающейся аутоиммунным компонентом, проявления которой снижаются в течение года у животных всех групп.

4.6.2. Состояние регионарных лимфатических узлов после замещения краевых дефектов костей пористыми титановыми имплантатами

Общая площадь срезов подколенных лимфатических узлов кроликов через 4-е недели после замещения дефектов метафизов большеберцовых и бедренных костей ПТi₄₀МК имела тенденцию к увеличению до 245,5 % ($p \leq 0,053$), через 52-е недели данный показатель не отличался от показателя у интактных животных. У животных, с внедренными ПТi₄₀(а-С) МК или ПТi₄₀(CN_{0,25})МК, динамика изменения площади подколенных лимфатических узлов была аналогична (таблица Б.11).

Гистологическая картина подколенных лимфатических узлов при внедрении имплантатов всех тестируемых типов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами, была сохранена, клеточная атипия отсутствовала, при этом выраженность изменения структурно-функциональных зон и их клеточного состава была существеннее по сравнению с изменениями в лимфатических узлах контралатеральной конечности с КД.

Через 4-е недели после операции у животных, в конечности с внедренными ПТi₄₀МК, в подколенных лимфатических узлах была выявлена тенденция к увеличению площади капсулы с подкапсульными синусами по сравнению с интактными животными. В подкапсульных синусах – значительное количество клеточных элементов (таблицы Б.15).

Корковое вещество было расширено за счет фолликулярной гиперплазии, увеличения площади коркового плато. Морфологическая картина лимфатических фолликулов была неоднородна – они различались по структуре и размеру, в них четко определялись светлые центры, так же отличающиеся по размерам, краевые и мантийные зоны. В светлой зоне реактивных центров фолликулов, где происходит созревание клеток В-лимфоцитарного ряда,

было увеличено относительное и абсолютное количество зрелых лимфоидных элементов (до 119,1%, $p \leq 0,009$; 121,1%, $p \leq 0,038$) (таблицы Б.17), являющихся морфологическим субстратом формирования гуморального иммунного ответа. Площадь коркового плато, где одновременно присутствуют как Т-лимфоциты, так и В-лимфоциты, через 4-е недели после операции имела тенденцию к увеличению (до 159%, $p \leq 0,059$), при этом отмечалось снижение относительного количества зрелых лимфоидных элементов (до 97,3%, $p \leq 0,019$), что указывало на активацию пролиферации бласттрансформированных лимфоцитов. Существенно возрастало как относительное, так и абсолютное количество макрофагов (до 170%, $p \leq 0,019$; 159,2, $p \leq 0,038$).

В паракортикальной зоне, содержащей преимущественно Т-лимфоциты, в том числе рециркулирующий пул клеток крови, было выявлено сегментарное или диффузное ее расширение, при этом численная плотность клеток значимо не изменялась. Уменьшалось относительное количество зрелых лимфоидных элементов (соответственно до 97,8%, $p \leq 0,009$), но не абсолютное их количество, данная инверсия может быть обусловлена активацией пролиферации бласттрансформированных лимфоцитов и последующим ускорением миграции зрелых лимфоидных элементов через стенки посткапиллярных венул в кровеносное русло; увеличивалось абсолютное количество эозинофилов (до 288,8%, $p \leq 0,019$).

Мозговое вещество лимфатического узла было расширено за счёт отека (выявленного у всех кроликов в группе), венозного полнокровия (у 1-го кролика из 4-х) и увеличения количества лимфоидных элементов в синусах и мозговых тяжах (у 2-х кроликов из 4-х), а так же за счет отека мозговых синусов. При этом увеличивалось как относительное количество молодых лимфоидных элементов – лимфобластов (до 211,1%, $p \leq 0,009$) и пролимфоцитов (до 200,0%, $p \leq 0,009$), так и их абсолютное количество (227,0%, $p \leq 0,009$; 237,8%, $p \leq 0,009$). Обращает на себя внимание значимое увеличение относительного количества эозинофилов (до 300,0%, $p \leq 0,009$) в мозговых тяжах у животных после внедрения ПТ_{i40}МК (таблицы Б.17).

Через 16-ть недель после операции была отмечена положительная динамика – подкапсульные и межузелковые синусы становились умеренно клеточными, корковое вещество и паракортикальные зоны подколенных лимфатических узлов были расширены в меньшей степени, по сравнению с предыдущим сроком наблюдения, количество молодых лимфоидных элементов уменьшалось, фолликулы становились более мономорфны, меньшего размера.

Динамика изменений в подколенных лимфатических узлах после внедрения в большеберцовые и бедренные кости ПТ_{i40}МК, носила нелинейный характер. Через 52-е недели после имплантации в подколенных лимфатических узлах были выявлены изменения, более выраженные, по сравнению с предыдущим сроком наблюдения (16-ть недель после операции). При этом если на ранних сроках после имплантации (4-е недели) была более выражена реактивность В-зависимых зон, то через 52-е недели после операции нарастала реактивность в

Т-зависимых зонах регионарных лимфатических узлов. В подкапсульных и межузелковых синусах было выявлено значительное количество клеточных элементов, корковое вещество - расширено, за счет увеличения размеров фолликулов и паракортикальной зоны (расширенной сегментарно в 3-х случаях из 4-х, а у одного животного - диффузно). В части фолликулов расширены светлые центры. При этом границы между мантийными и краевыми зонами оставались нечеткими. В мозговом веществе морфологически было выявлено увеличение количества клеточных элементов в синусах и тяжах по сравнению с интактными животными. У 3-х животных из 4-х выявлен синусовый гистиоцитоз (рисунок 4.6.2.1).

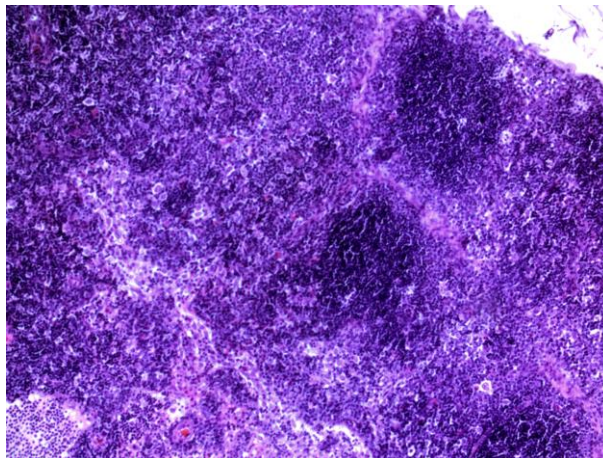


Рис. 4.6.2.1 – Кролик, с внедренными в большеберцовые и бедренные кости $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, подколенный лимфатический узел. 52-е недели после операции. СМ-микрофото.

Расширение коркового слоя, увеличение размеров фолликулов за счет расширения светлых центров, краевой и мантийной зон.

Гистиоцитарная реакция. Окраска гематоксилином-эозином. Ув.х100

В клеточном составе лимфоидной ткани значимые изменения по сравнению с интактными животными были выявлены в паракортикальной зоне – увеличение плотности клеточных элементов (до 110,2%, $p \leq 0,014$) (таблица Б.16), относительного и абсолютного количества лимфобластов (до 200,0%, $p \leq 0,022$; 232,1%, $p \leq 0,022$), абсолютного пролимфоцитов (до 167,9%, $p \leq 0,005$). В других функциональных зонах неоднородность морфологической и цитологической картины у животных приводила к большому разбросу данных в вариационных рядах и отсутствию статистически значимых изменений.

Таким образом, следует констатировать, что через 52-е недели после внедрения $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ в костную ткань в регионарных лимфатических узлах были выявлены изменения морфологической картины, затрагивающие как В-, так и Т-зависимые зоны, последние в большей степени, а так же активацию макрофагов.

Выявленные изменения в архитектонике и клеточном составе подколенных лимфатических узлов при внедрении костных $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ по сравнению с подколенными лимфатическими узлами конечностей, с незаполненными дефектами костной ткани, имели

одинаковую направленность, но большую выраженность и затрагивали все функциональные зоны лимфатического узла. Полагаем, что данные изменения, помимо операционной травмы, последующего нарушения кровообращения в прооперированной конечности и репаративной регенерации костной и прилежащих мягких тканей обусловлены реакцией лимфоидной ткани на внедренные имплантаты.

К особенностям, выявленным при морфологическом исследовании подколенных лимфатических узлов у животных, с внедренными в кости $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, через 4-е недели после операции относятся – отсутствие увеличения площади капсулы с подкапсульными синусами, клеточности подкапсульных синусов, расширения коркового вещества, больший мономорфизм лимфоидных фолликулов (по строению и размерам). Цитологическая картина в корковом плато и паракортикальной зоне отличалась от цитограмм интактных животных и животных, с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$. В корковом плато отмечалось увеличение относительного и абсолютного количества лимфобластов (до 181,8%, $p \leq 0,005$; 217,4%, $p \leq 0,008$) и, соответственно, снижение относительного числа зрелых лимфоидных элементов (до 96,0%, $p \leq 0,001$). Значительно увеличивалось как относительное, так и абсолютное количество макрофагов (до 190%, $p \leq 0,003$; 173,5%, $p \leq 0,003$) и эозинофилов (600,0%, $p \leq 0,005$; 1000,0%, $p \leq 0,003$).

Морфологическая картина в паракортикальной зоне характеризовалась выраженным диффузным расширением зоны у 3-х кроликов из 4-х, значимым по сравнению с интактными животными увеличением относительного и абсолютного количества лимфобластных клеток (соответственно до 285,7%, $p \leq 0,003$, 310,7%, $p \leq 0,005$), а так же по сравнению с кроликами, с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$; относительного и абсолютного количества пролимфоцитов (соответственно до 166,7%, $p \leq 0,005$; 194,4%, $p \leq 0,003$) по сравнению с интактными кроликами; относительного и абсолютного количества эозинофилов (соответственно до 400,0%, $p \leq 0,005$; 400,0%, $p \leq 0,008$) по сравнению с интактными кроликами.

Мозговое вещество было расширено, отчетно у всех кроликов в данной группы, у одного из кроликов выявлено венозное полнокровие мозговых тяжей. Относительное и абсолютное количество молодых лимфоидных элементов было увеличено (лимфобластов до 200,0%, $p \leq 0,0007$; 213,5%, $p \leq 0,0007$; пролимфоцитов – 175,0%, $p \leq 0,0007$; 220,0%, $p \leq 0,005$). Увеличено абсолютное количество эозинофилов в мозговых тяжях по сравнению с интактными животными.

Через 16-ть недель после операции у животных, с внедренными в $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, была отмечена положительная динамика – корковое вещество и паракортикальные зоны подколенных лимфатических узлов расширены в меньшей степени, по сравнению с предыдущим сроком наблюдения. Количество молодых лимфоидных элементов уменьшилось. Фолликулы

становились более мономорфны и в меньшей степени увеличены в размерах. Отек мозгового вещества выявлялся, однако полнокровия сосудов, эозинофильных клеточных реакций не выявлено, уменьшалось количество клеточных элементов в мозговых тяжах и синусах. У 1-го кролика из 4-х, с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, был выявлен синусовый гистиоцитоз.

У животных с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ через 52-е недели после операции морфологические характеристики большинства структур подколенных лимфатических узлов приближались к характеристикам лимфатических узлов у интактных кроликов (рисунок 4.6.2.2 а). Исключение составляла паракортикальная зона, которой оставалась расширенной у 3-х кроликов из 5-и, относительное количество зрелых лимфоидных элементов в ней было снижено (до 98%, $p \leq 0,009$), а количество макрофагов – увеличено (до 133,3%, $p \leq 0,017$).

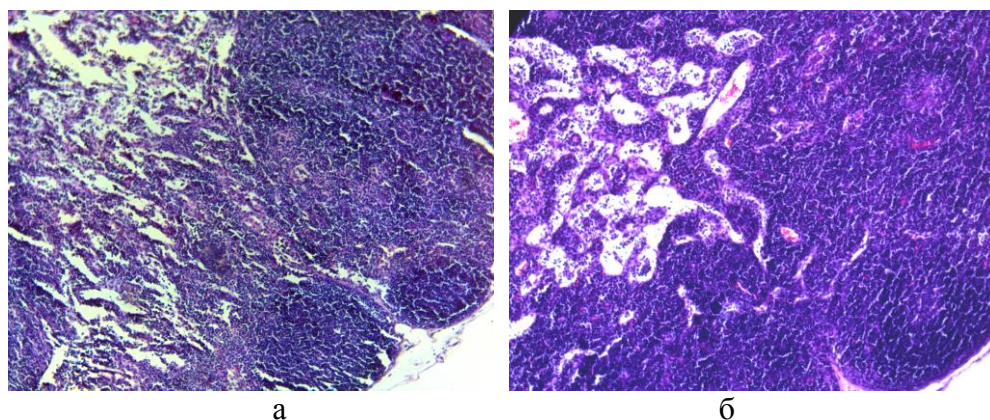


Рис. 4.6.2.2 – Подколенные лимфатически узлы. 52-е недели после операции.

а – Кролик, с внедренными в большеберцовые и бедренные кости $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$.

Фолликулы коркового слоя мономорфны, светлые центры определяются в единичных фолликулах, мантийная и краевая зона без расширения. Сегментарное расширение паракортикальной зоны. В синусах умеренное количество клеточных элементов.

б – Кролик, с внедренными в большеберцовые и бедренные кости $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$.

Фолликулы коркового слоя мономорфны, светлые центры определяются в единичных фолликулах. Диффузное расширение паракортикальной зоны с выраженной эозинофильной клеточной реакцией.

СМ-микрофото. Окраска гематоксилином-эозином. Ув.х100

Через 4-е недели после операции у животных с внедренными в опытную конечность $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ капсула с подкапсульными синусами не была увеличена, клеточность подкапсульных синусов умеренная. Кортиковое вещество расширено незначительно или не расширено. Лимфоидные фолликулы у 3-х из 4-х кроликов мономорфны не увеличены, в некоторых фолликулах расширены светлые центры. У 2-х из 4-х животных данной группы мантийные и краевые зоны фолликулов не расширены, границы между зонами нечеткие. Межузелковые синусы с малым количеством клеточных элементов. К особенностям, выявленным в данной группе, относятся значимое увеличение численной плотности клеток (до 111,3%, $p \leq 0,019$), увеличение абсолютного количества лимфобластов (до 230,4%, $p \leq 0,038$) по

сравнению с интактными животными. У 1-го из 4-х животных была выявлена эозинофильная клеточная реакция. Паракортикальная зона менее расширена, чем у кроликов с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. Мозговое вещество расширено и отечно у всех кроликов в данной группы. При этом увеличена и численная плотность клеток (до 113,7%, $p \leq 0,009$).

Через 16-ть недель после операции у животных в конечностях, с $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$, положительная динамика менее выражена. Более того, было выявлено увеличение количества клеточных элементов в подкапсульных, межузелковых и мозговых синусах, увеличение полиморфизма фолликулов по сравнению с предыдущим сроком наблюдения.

К отличительной особенности морфологической картины у животных, с внедренными в дефекты большеберцовых и бедренных костей $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$, через 52-е недели после операции, относилась эозинофильная реакция у 3-х животных из 4-х (рисунок 4.6.2.2 б). Паракортикальная зона у кроликов данной группы была диффузно (у 2-х из 4-х) или сегментарно (у 2-х из 4-х) расширена, в ней увеличивалась плотность клеточных элементов (до 111,8%, $p \leq 0,009$) с уменьшением относительного количества зрелых лимфоидных элементов. Кроме того, было выявлено, снижение относительного количества зрелых лимфоидных элементов в мозговых тяжах (97,8%, $p \leq 0,009$) и увеличения относительного и абсолютного количества плазматических клеток (до 360,0%, $p \leq 0,038$; 420,0%, $p \leq 0,038$) там же. Необходимо отметить, что уменьшение количества зрелых лимфоцитов в различные сроки наблюдения и в разных морфологически-функциональных зонах лимфатического узла в большей степени характерно для этой группы животных.

На ранних сроках наблюдения (4-е недели) после внедрения имплантатов в костную ткань изменения в регионарных лимфатических узлах, вероятно, ассоциированы с послеоперационным увеличением количества аутоантигенов в регионе лимфосбора и обнаруживаются как в Т-, так и В-зависимых зонах. Динамика изменений носит нелинейный характер. Через 16-ть недель после операции признаки антигенной стимуляции в регионарных лимфатических узлах уменьшаются при внедрении всех тестируемых имплантатов, однако через 52-е недели отмечается нарастание изменений.

Таким образом, в отдаленный период после имплантации в кости $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ в регионарных лимфатических узлах были выявлены небольшие, однако имеющие тенденцию к генерализации изменения гистоархитектоники и клеточного состава, реактивность Т-зависимых зон нарастала, активировалась система фагоцитирующих мононуклеаров. Применение $\text{PTi}(\text{a-C})\text{МК}$ минимизировало изменения в регионарных лимфатических узлах через 52-е недели после операции.

4.7. Морфология селезенки кроликов после формирования краевых дефектов костей тазовых конечностей и внедрения пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами, в кости правой конечности

Роль селезенки значительна в регуляции кровообращения, гемопоэза, обмене железа, иммуногенезе, гемостазе, а так же в регуляции функции надпочечников, щитовидной, поджелудочной, половых желез. Эта роль существенно возрастает в условиях инфекции, гипоксии, кровопотере, адаптации организма к стрессу [179, 96, 180, 87, 141, 117, 133, 191, 181, 260], однако основная ее функция – фильтрационная. Фиксированные макрофаги маргинального слоя селезенки удаляют инородные частицы из кровотока. Продукты износа и коррозии имплантатов, в том числе, металлические частицы, были идентифицированы в селезенке рядом исследователей [249, 527, 472].

Учитывая вышесказанное, исследование морфологии селезенки после моделирования в метафизах большеберцовых и бедренных костей обеих конечностей краевых дефектов и внедрения пористых титановых имплантатов в правую конечность представляло интерес.

Гистологическая картина селезенки при моделировании краевых дефектов и внедрении имплантатов всех тестируемых типов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами, была сохранена, клеточная атипия отсутствовала.

Через 4-е недели после моделирования КД обеих конечностей и внедрения ПТi₄₀МК в правую конечность, изменений в морфологической картине серозной и фиброзной оболочек селезенки не выявлено. Было обнаружено полнокровие трабекулярных вен и венозных синусов красной пульпы, гиперсидероз красной пульпы у 2-х кроликов из 4-х (рисунок 4.7.3), что указывало на нарушение кровообращения в селезенке и нарушении перехода железа, аккумулированного макрофагами селезенки, из гемосидерина и ферритина в трансферин крови [71]. В синусах красной пульпы было обнаружено небольшое количество лимфоцитов преимущественно малых и средних. У 2-х кроликов из 4-х соотношение площадей белой и красной пульпы было характерно для интактной селезенки (20:80) (рисунки 4.7.1., 4.7.2). У 2-х кроликов белая пульпа была расширена, за счет увеличения количество лимфоидных элементов (соотношение белой и красной пульпы - 30:70, 40:60). Периартериальные лимфатические муфты белой пульпы, которые рассматривают как Т-зависимыми зоны, были слабо выражены, не расширены. Вторичные фолликулы белой пульпы были умеренно выражены с расширением В-зависимых зон – светлых центров в части фолликулов. У 2-х животных их 4-х вторичные фолликулы белой пульпы с увеличенными светлыми центрами были значительно расширены. Маргинальные зоны слабо различимы. Границы между светлым центром и мантийной зоной фолликулов определялись четко, что указывало на стимуляцию иммунного ответа по гуморальному типу.

Через 16-ть недель после операции были выявлены признаки увеличения объема органа – в серозной оболочке очаговая десквамация мезотелия, фиброзная оболочка истончена.

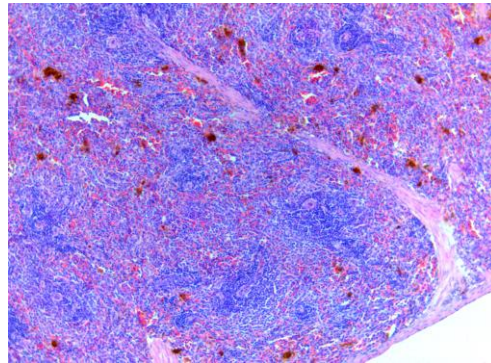


Рис 4.7.1 – Интактный кролик. Селезенка. СМ-микрофото. Соотношение красной и белой пульпы 90:10, периартериальные лимфатические муфты и вторичные фолликулы белой пульпы слабо выражены. Окраска гематоксилином-эозином. Ув.х100

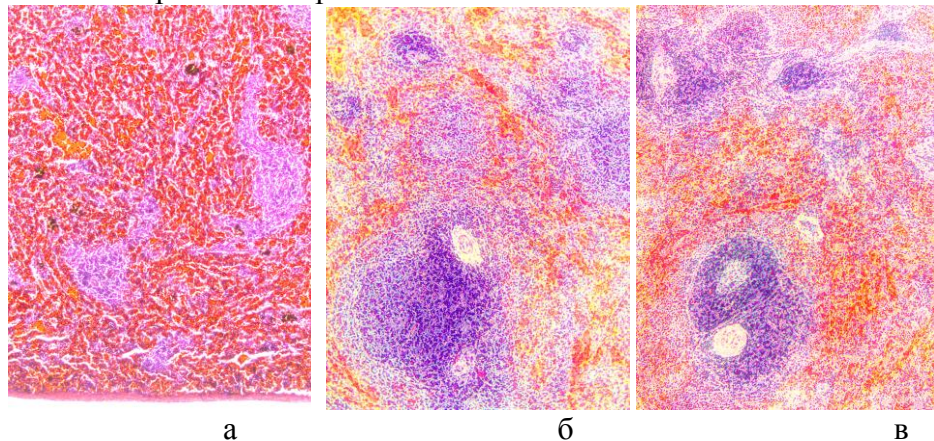


Рис 4.7.2 – Кролики, с краевыми дефектами большеберцовых и бедренных костей (в правые конечности внедрены ПТi₄₀МК, в левой конечности – КД). Селезенки. СМ-микрофото. а – 4-е недели после операции. Соотношение красной и белой пульпы 80:20, периартериальные лимфатические муфты умеренно расширены. б – 16-ть недель после операции. Соотношение красной и белой пульпы 60:40, периартериальные лимфатические муфты и вторичные фолликулы белой пульпы расширены, в синусах красной пульпы лимфоциты, гистиоциты в большом количестве. в – 52-е недели после операции. Соотношение красной и белой пульпы 70:30, периартериальные лимфатические муфты и вторичные фолликулы белой пульпы умеренно расширены, в синусах красной пульпы умеренное количество лимфоцитов. Окраска гематоксилином-эозином. Ув.х100

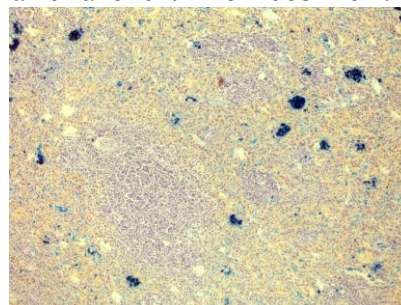


Рис 4.7.3 – Кролик, с краевыми дефектами большеберцовых и бедренных костей (в правые конечности внедрены ПТi₄₀МК, в левой конечности – КД). Селезенка. СМ-микрофото. 4-е недели после операции. В макрофагах красной пульпы селезенки умеренное количество гранул гемосидерина. Реакция Перльса. Ув. х100

Трабекулярные вены и венозные синусы с нормальным кровенаполнением, в синусах красной пульпы – значительное количество клеточных элементов (гистиоцитов, малых и средних лимфоцитов). Импрегнация красной пульпы железом не выявлена. Соотношение белой и красной пульпы: 40:60 – 30:70. У всех кроликов было выявлено расширение периаартериальных лимфатических муфт, в белой пульпе значительное расширение вторичных фолликулов, светлые центры определялись во всех фолликулах. Границы между светлыми центрами и мантийными зонами фолликулов были четкие. Маргинальные зоны хорошо различимы. У 3-х из 4-х животных выраженность Т-клеточной реакции превалировала над В-клеточной. Таким образом, были выявлены признаки значительной активации с развитием ответа по клеточному и гуморальному типу, выраженной гистиоцитарной реакции в синусах красной пульпы селезенки.

Через 52-е недели после операции в селезенке кроликов, с внедренными ПТi₄₀МК (в контралатеральной конечности – КД), серозная оболочка и фиброзная оболочка не изменены. Венозные синусы и трабекулярные вены с нормальным кровенаполнением. В синусах красной пульпы у 3-х кроликов из 4-х – небольшое количество малых и средних лимфоцитов, у 1-го – умеренное количество гистиоцитов и лимфоцитов. Соотношение белой и красной пульпы у 3-х животных не отличается от интактных кроликов, у 1-го было 40:60. Периартериальные лимфатические муфты и вторичные фолликулы белой пульпы у всех животных данной группы были умеренно выражены, в части фолликулов светлые центры несколько расширены. Границы между мантийными зонами и светлыми центрами фолликулов четкие. Маргинальные зоны слабо различимы. Выявленные изменения указывают на снижение выраженности клеточного иммунного ответа в белой пульпе селезенки и сохранения умеренной стимуляции гуморального иммунного ответа.

В морфологической картине селезенки у животных, с внедренными в дефекты большеберцовых и бедренных костей опытной конечности ПТi₄₀(а-С)МК (в контралатеральной конечности – КД), через 4-е недели после операции были выявлены следующие особенности – трабекулярные вены и венозные синусы с нормальным кровенаполнением; соотношение белой и красной пульпы у 2-х кроликов соответствует интактным животным, у 2-х составляет 30:70. Импрегнация железом отсутствует (рисунок 4.7.4). Периартериальные лимфатические муфты белой пульпы умеренно или значительно выражены, расширены. Вторичные фолликулы белой пульпы не выражены, светлые центры определяются в единичных фолликулах. Маргинальные зоны в 3-х случаях из 4-х слабо различимы. Не определяется или слабо различимы границы между мантийными зонами и светлыми центрами. Таким образом, иммунные реакции клеточного типа преобладают у 3-х кроликов из 4-х.

Через 16-ть недель после операции у животных данной группы было выявлено – истончение фиброзной оболочки, в синусах красной пульпы умеренное количество малых и средних лимфоцитов, гистиоцитов не выявлено. Соотношение белой и красной пульпы составляет 30:70 - 40:60. Периартериальные лимфатические муфты выражены и расширены умеренно.

Вторичные фолликулы белой пульпы выражены умеренно, светлые центры были выявлены в части фолликулов. Границы между светлыми центрами и мантийными зонами фолликулов нечеткие.

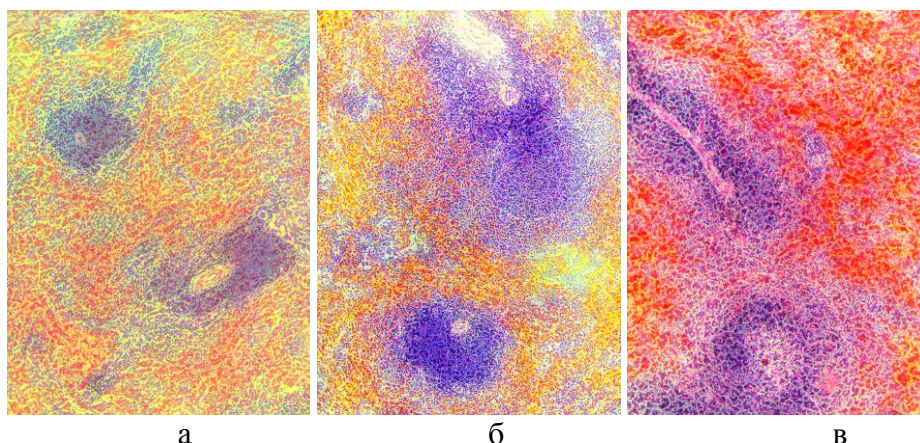


Рис 4.7.4 – Кролики, с краевыми дефектами большеберцовых и бедренных костей (в правые конечности внедрены $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, в левой конечности – КД). Селезенка. СМ-микрофото.

а – 4-е недели после операции. Соотношение красной и белой пульпы 70:30, периартериальные лимфатические муфты расширены, вторичные фолликулы белой пульпы слабо выражены. В синусах красной пульпы селезенки лимфоциты в большом количестве.

б – 16-ть недель после операции. Соотношение красной и белой пульпы 70:30, периартериальные лимфатические муфты умеренно расширены, вторичные фолликулы белой пульпы значительно выражены.

В синусах красной пульпы селезенки умеренное количество лимфоцитов.

в – 52-е недели после операции. Соотношение красной и белой пульпы 60:40, периартериальные лимфатические муфты расширены, вторичные фолликулы белой пульпы значительно выражены. В синусах красной пульпы селезенки умеренное количество лимфоцитов. Окраска гематоксилином-эозином. Ув.х100

Маргинальные зоны слабо различимы. Таким образом, реактивность Т- и В-зон у животных данной группы выражена в равной степени.

У всех кроликов, с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, через 52-е недели после операции были выявлены признаки увеличения органа, имело место истончение фиброзной оболочки. В синусах красной пульпы у 1-го из 4-х кроликов наряду со значительным количеством малых и средних лимфоцитов - единичные гистиоциты. Соотношение белой и красной пульпы составляло 30:70 - 50:50. Периартериальные лимфатические муфты и вторичные фолликулы белой пульпы выражены, расширены. Светлые центры определяются в части фолликулов. Границы между мантийными зонами и светлыми центрами фолликулов четкие у 1-го кролика

из 4-х. Выявленные изменения указывают на выраженность как клеточного, так и гуморального иммунного ответа.

Таким образом, в сроке 52 недели после операции в селезенке животных с внедренными ПТi₄₀МК и ПТi₄₀(а-С)МК сохраняются гистологические признаки стимуляции иммунных реакций клеточного и гуморального типа.

В морфологической картине селезенки у животных, с внедренными в дефекты большеберцовых и бедренных костей ПТi₄₀(СN_{0,25})МК (в контралатеральной конечности – КД) через 4-е недели после операции были выявлены следующие особенности – трабекулярные вены и венозные синусы полнокровны; соотношение белой и красной пульпы у 1-го кролика соответствует intactным животным (рисунок 4.7.5), у 3-х – 40:60 - 30:70. Периартериальные лимфатические муфты белой пульпы умеренно выражены, расширены. Вторичные фолликулы белой пульпы не выражены, редуцированы. Светлые центры вторичных фолликулов белой пульпы определяются в единичных фолликулах. Границы между светлыми центрами и мантийной зоной нечеткие, маргинальные зоны слабо различимы. Выявленные изменения указывают на умеренную активацию иммунной реакции клеточного типа.

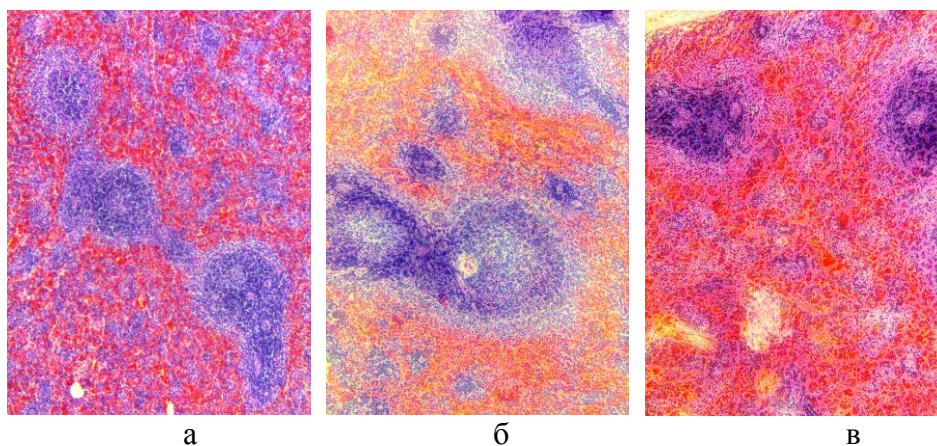


Рис 4.7.5 – Кролики, с внедренными в правые большеберцовые и бедренные кости ПТi₄₀(СN_{0,25})МК в левой конечности КД. Селезенка. СМ-микрофото.

- а – 4-е недели после операции. Соотношение красной и белой пульпы 80:20, периартериальные лимфатические муфты умеренно расширены, вторичные фолликулы белой пульпы слабо выражены.
 - б – 16-ть недель после операции. Соотношение красной и белой пульпы 70:30, периартериальные лимфатические муфты слабо выражены, вторичные фолликулы белой пульпы значительно расширены с выраженными светлыми центрами.
 - в – 52-е недели после операции. Соотношение красной и белой пульпы 80:20, периартериальные лимфатические муфты умеренно расширены, вторичные фолликулы белой пульпы слабо выражены.
- Окраска гематоксилином-эозином. Ув.х100

Морфология селезенки животных, с внедренными в опытные конечности ПТi₄₀(СN_{0,25})МК, через 16 недель после операции отличается от животных, с внедренными ПТi₄₀МК, следующим – оболочки органа не изменены; в синусах красной пульпы - умеренное

количество малых и средних лимфоцитов; соотношение белой и красной пульпы составляет 40:60 – 30:70. Импрегнация железом отсутствует. Периартериальные лимфатические муфты слабо или умеренно выражены. Вторичные фолликулы белой пульпы умеренно или значительно выражены. Светлые центры определяются в большинстве фолликулов, границы между светлыми центрами и мантийными зонами четкие. Выраженность изменений была большей в В-зависимой зоне селезенки.

Особенности морфологической картины в данной группы через 52-е недели после операции – в синусах красной пульпы у всех животных небольшое количество малых и средних лимфоцитов; соотношение белой и красной пульпы у всех животных соответствует интактным кроликам; периартериальные лимфатические муфты не выражены, редуцированы; светлые центры во вторичных фолликулах белой пульпы не определяются, соответственно не определяются границы между мантийными зонами и светлыми центрами. Маргинальные зоны слабо различимы.

4.8 Обсуждение полученных результатов

Полученные нами результаты о популяционном составе клеток периферической крови, концентрации гемоглобина, значениях эритроцитарных индексов, количестве миелокариоцитов, популяционном составе клеток костного мозга у кроликов до операции соответствовали данным, приведенным в литературе [83, 490, 489].

Динамика показателей периферической крови у животных с внедренными различными типами имплантатов костной ткани (ПТi₄₀МК, ПТi₄₀(а-С)МК и ПТi₄₀(СN_{0,25})МК) не различалась в течение всего периода наблюдения. Были обнаружены лишь некоторые отличия в выраженности выявленных изменений, условно обнаруженные изменения соответствуют 4-м периодам, взаимосвязанным с периодами репаративного процесса костной и кроветворной тканей.

В первый период (послеоперационный – 1-2-я недели после операции) были выявлены признаки воспаления - нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом влево и увеличением ядерного индекса; легкая степень нормохромной нормо- или микроцитарной анемии с сохранением регенераторной способности эритроцитарного ростка гемопоэза. На активацию костномозгового эритрона указывает возрастающее в периферической крови количество ретикулоцитов. С учетом незначительного объема интраоперационной кровопотери, которая в группе ПТi₄₀МК составила – 3,7% (1,65; 4,4), ПТi₄₀(а-С)МК – 2,9% (2,5;3,9), ПТi₄₀(СN_{0,25})МК – 3,1% (3,0; 4,6) от объема циркулирующей крови и длительности выявляемых изменений в периферической крови (до 3-х недель после операции включительно) патогенетически данная

анемия может быть отнесена к проявлениям гематологического стресс-синдрома, как ответ на сильный раздражитель, в качестве которого, вероятно, выступал болевой синдром, имевший место в послеоперационном периоде [470]. Основным пусковым механизмом анемии при развитии гематологического стресс-синдрома является активация моноцитарно-макрофагальной системы, с увеличением продукции клетками регуляторных молекул, которые инициируют каскадный синтез цитокинов лимфоцитами, эпителиальными, стромальными клетками и приводит к увеличению активности антагонистов эритропоэтина (таких как, ИЛ-1- α , - β , ФНО- α , ИЛ-6, интерферон- γ , трансформирующий фактор роста- β), подавляющих ответ эритроидных-предшественниц (БОЕ-Э, КОЕ-Э) на эритропоэтин, продукцию эритропоэтина, нарушающих метаболизм железа через увеличение синтеза гепсидина и деградацию ферропортина [50, 49, 34, 470, 407, 230]. Повторяющиеся стрессорные воздействия тормозят миграцию в костный мозг Т-лимфоцитов, продуцентов гемопоэтина ИЛ-3, что так же приводит к подавлению эритропоэза [52]. При травматическом повреждении тканей и последующем воспалении происходит высвобождение серотонина [180, 181], который тормозит образование эритропоэтина и формирование эритроидных гемопоэтических островков [49]. Наконец, еще одним фактором, определяющим развитие анемии, является повышенное разрушение эритроцитов в результате гиперфункции системы фагоцитирующих мононуклеаров, инициации стрессорным воздействием выхода в кровь индукторов эритродиереза, активации перекисного окисления липидов, повреждения мембран эритроцитов продуктами перекисного окисления [71].

Во второй период (период, активного протекающего остеогенеза – 2-4-я недели после операции) признаки воспаления сохранялись – удерживался нейтрофильный лейкоцитоз со сдвигом влево, повышалась концентрация ИЛ-8 (СХС-хемокина, хемоаттрактанта для нейтрофилов, активирующего острофазовый ответ [85, 31], функциональная активность нейтрофилов (оцениваемая по изменению поглотительной активности полиморфноядерных лейкоцитов) концентрация острофазового воспалительного белка - СРБ имели тенденцию к увеличению. Количество эритроцитов, концентрация гемоглобина к концу 2-го периода возвращались к дооперационному уровню, однако количество ретикулоцитов в периферической крови оставалось повышенным.

Третий период приходился на 4-ю – 32-ю недели после операции и морфологически характеризовался ремоделированием новообразованной костной ткани. В периферической крови был обнаружен лимфоцитарный лейкоцитоз, повышалась концентрация СРБ, при этом индекс интоксикации Кальф-Калифа снижался. Интересен выявленный через 12-16-ть недель после операции эритроцитоз, ретикулоцитоз (до 24-х недель после операции) и увеличение концентрация гемоглобина. Возможно, он был связан с выявленной нами активацией клеток-

предшественниц эритроидной линии, вызванной формированием краевых дефектов большеберцовой и бедренной костей.

Четвертый период приходится на 32 – 52-ю недели после операции, и является наиболее интересным и принципиальным, поскольку позволяет оценить эффект длительного воздействия имплантатов на ткани организма. Данный период характеризовался лейкоцитозом, увеличением количества молодых форм нейтрофилов, и индексов, отражающих активность воспалительного процесса – соотношение лейкоцитов и СОЭ и ядерного индекса Даштоянца Г.А., что свидетельствует о наличии воспалительного процесса и косвенно подтверждает реакцию костной ткани на внедренные имплантаты. Наиболее выраженными признаки воспаления были у животных, с внедренными в бедренные и большеберцовые кости $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$.

Морфологическим субстратом выявленных нами изменений, вероятно, является «стрессорное ремоделирование» костной ткани, образующей ложе имплантатов – в костном ложе были инициированы и постоянно поддерживались деструктивные, воспалительные и репаративные процессы в силу более высоких модулей упругости металлических имплантатов в момент приложения силы неизбежны микроповреждения более «мягкой» костной ткани «жестким» металлическим имплантатом. Со временем процессы резорбции и синтеза костного вещества дискоординируются и смещаются в сторону резорбции с развитием нестабильности имплантата [80, 105]. В случае внедрения пористых имплантатов «стрессорное ремоделирование» менее выражено, чем при использовании монолитных имплантатов, но полностью биомеханическое несоответствие кость-имплантат не преодолено. Нами не выявлено морфологических признаков деструкции костной ткани через 52-е недели наблюдения и значимого увеличения количества остеогенных клеток, экспрессирующих щелочную фосфатазу, в оперированном сегменте через 52-е недели после операции, что указывало бы на активацию остеогенных клеток. Данный факт может быть обусловлен чувствительностью методов, техническими трудностями исследования не декальцинированной костной ткани, сложностью изучения костной ткани в области, непосредственно прилежащей к имплантату. Однако, определенные признаки активации остеогенеза на поздних сроках наблюдения (52-е недели) были выявлены: у животных, с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ – увеличение количества остеогенных клеток в объеме костной ткани; при внедрении $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ – повышение активности термолabileй щелочной фосфатазы в гомогенатах костной ткани (глава 3).

Однако наличие «стрессорного ремоделирования» не объясняет различную степень выраженности воспалительной реакции на имплантаты разных типов, поскольку механические характеристики имплантатов не различаются. В связи с этим интересно мнение ряда

исследователей, которые считают, что одним из основных механизмов развития асептического воспаления и остеолита в области интерфейса «кость – имплантат» является индуцированный выброс цитокинов и хемокинов активированными макрофагами М1-типа [377]. Активация моноцитов/макрофагов происходит при контакте с поверхностью титана, вероятно в результате поглощения ионов титана и/или частиц износа импланта [222]. Это могло бы объяснить различия в концентрации титана, обнаруженные в сыворотке (< 7 мкг / л) и в цельной крови (50-150 мкг/л) у пациентов через 12 месяцев после спондилодеза металлоконструкциями из титанового сплава, содержащего ~ 90 % титана, 6% алюминия и 4 % ванадия [346]. Активированные М1 макрофаги секретируют провоспалительные и регуляторные цитокины (ИЛ-1 β , -6, -12, -23, -15, -33, ФНО), хемокины (IP-10, MCP-2, MIP-5 и др.), которые локально активируют иммунокомпетентные клетки; синтезируют активные формы кислорода, NO [127]; индуцируют апоптоз (например, через активацию каспаз 3-9); ускоряют костный катаболизм, активируя TRAP5b в остеокластах [377]. В периферической крови мы не выявили увеличения количества моноцитов, однако при изучении регионарных лимфатических узлов были обнаружены признаки активации системы фагоцитирующих мононуклеаров при внедрении имплантатов.

Необходимо особо отметить не только отсутствие признаков анемии на поздних сроках наблюдения у животных всех групп, но и увеличение количества эритроцитов (у кроликов с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$), концентрации гемоглобина (при внедрении $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$), среднего содержания гемоглобина в эритроцитах периферической крови.

Пролиферативная активность миелокариоцитов (косвенно оцениваемая по абсолютному количеству миелокариоцитов костного мозга) в конечностях, с КД бедренных и большеберцовых костей у кроликов всех групп через 4-е, 16-ть, 52-е недели после операции имела тенденцию к увеличению, однако значимо не отличалась от пролиферативной активности клеток костного мозга интактных кроликов. Наши результаты не противоречат данным, полученными другими авторами. Так, после частичной кортикотомии верхней трети диафиза большеберцовых костей у крыс количество миелокариоцитов максимально увеличено в течение 1-х суток после травмы, через месяц после операции их количество соответствует референсным величинам [152].

При репаративной регенерации КД в прилежащем сегменте костного мозга через 4-е недели после операции у кроликов всех групп были выявлены изменения характерные для стадии костномозговой компенсации анемии: *in vitro* усиление колониеобразующей способности костного мозга с увеличением выхода эритроидных КОЕ, преимущественно за счет более зрелых КОЕ-э; увеличение количества эритрокариоцитов, изменение их

соотношения (наиболее выражены изменения были у животных, с внедренными в контралатеральную конечность $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$).

Направленность реакций гранулоцитопоза у животных трех групп были неодинакова. У кроликов в конечности с КД (в контралатеральной конечности внедрены $\text{PTi}_{40}\text{МК}$) через 4-е недели после операции было увеличено относительное количество ранних предшественниц гранулоцитов – миелобластов и промиелоцитов. Через 52-е недели возрастало количество КОЕ-ГМ в метицеллюлозной среде, в миелограммах увеличивалось количество более зрелых элементов – метамиелоцитов, сегментоядерных нейтрофилов, индекс созревания нейтрофилов. Учитывая обнаруженный на поздних сроках наблюдения (40-я неделя) лейкоцитоз в периферической крови можно предположить ускорение дифференциации нейтрофилов с последующей миграцией их в периферическую кровь.

У животных в конечности с КД (в контралатеральной конечности – $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$) через 52-е недели *in vitro* увеличивалось количество КОЕ-ГМ, однако в миелограммах значимых изменений в гранулоцитарной линии кроветворения выявлено не было. Таким образом, восстановление костномозгового кроветворения при формировании КД у кроликов, с внедренными в контралатеральную конечность $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, было наиболее полным – через 52-е недели после операции отличий в миелограмме от интактных кроликов выявлено не было.

У животных в конечности с КД (в контралатеральной конечности – $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$), через 4-е недели после операции было выявлено расширение гранулоцитарного ростка кроветворения костного мозга, преимущественно за счет более зрелых клеточных элементов. Через 52-е недели *in vitro* увеличивалось количество КОЕ-ГМ, изменения, выявленные в миелограммах у животных данной группы, были наиболее выраженными – расширение гранулоцитарного ростка с увеличением количества зрелых форм (метамиелоцитов и сегментоядерных нейтрофилов), снижение относительного (но не абсолютного) количества лимфоцитов, эритроидных элементов.

При внедрении пористых титановых имплантатов в костную ткань в костном мозге прилежащего сегмента, были обнаружены изменения отличные при использовании различных типов имплантатов, что позволяет предположить их обусловленность внедренными пористыми титановыми имплантатами и углеродсодержащими алмазоподобными пленками.

У животных всех групп, в конечностях с внедренными имплантатами ($\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ или $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$), пролиферативная активность, оцениваемая по клеточности костного мозга, прилежащего к имплантату сегмента, через 4-е, 16-ть, 52-е недели после операции значимо не отличалась от данных показателей у интактных кроликов, хотя и имела тенденцию к увеличению.

Через 4 недели после операции у животных, с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$, *in vitro* было выявлено усиление колониеобразующей способности эритроидных коммитированных клеток-предшественниц (преимущественно более зрелых КОЕ-э). Однако в миелограммах, из сопредельных к имплантатам участков костного мозга, изменения, характерные для стадии костномозговой компенсации анемии, были незначительны. Это отличало конечности, с внедренными имплантатами, от контралатеральных конечностей с КД. Вероятно, суммарный активирующий эффект локальных гуморальных эритропоэтических факторов и прямых межклеточных контактов гемопозиндуцирующего микроокружения при внедрении имплантатов был меньшим, чем в конечности, с незаполненными КД. Через 52-е недели после операции в костном мозге, сопредельных к внедренным имплантатам сегментах кости, количество эритроидных КОЕ значимо не отличалось от уровня до операции, при этом относительное количество молодых эритроидных клеток, способных к делению снижалось. Выраженность изменений увеличивалась в ряду $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК} < \text{PTi}_{40}\text{МК} < \text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$.

Через 52-е недели у животных всех групп было выявлено увеличение количества КОЕ-ГМ *in vitro*, наибольшие изменения в миелограммах в гранулоцитарном ростке костного мозга прилежащего сегмента были выявлены с животных с $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ – расширение гранулоцитарного ростка, преимущественно за счет зрелых форм. Активация гранулоцитопоеза сопровождалась развитием лейкоцитоза (на 40-, 52-ю недели после операции) и была расценена как негативный эффект $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$.

Особенность микрорельефа композитной пленки заключается в наличии фуллереноподобных образований на ее поверхности. В литературе имеются данные об антиоксидантной активности гидратированной формы фуллерена $\text{C}_{60}(\text{OH})_{22}$, его цитопротекторным эффекте при окислительном стрессе, отсутствии генотоксической активности в SOS-chromotest (тестирование на культуре *E. coli*) и отсутствии соматических мутаций у дрозофил (SMART-тест) [282]. Однако, фуллерены (C_{60}) оказывают негативное действие на культуру *S. typhimurium*. Токсический эффект обусловлен связыванием фуллеренами катионов из раствора. В дальнейшем было показано – небольшое изменение в структуре C_{60} вызывает значительные изменения их биологических свойств. Так, агрегированные C_{60} на несколько порядков более токсичны, чем растворенные, гибель клеток обусловлена повреждением клеточных мембран супероксиданионами, образующимися в присутствии фуллеренов в воде [282]. В культуре эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVECs) водная суспензия C_{60} и гидратированная форма $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$ вызвали быстрое дозо-зависимое повышение внутриклеточного кальция и тормозили переход клеток из фазы клеточного цикла G1 в S [373, 302]. В культуре эритробластических островков $\text{C}_{60}(\text{OH})_{24}$

негативно воздействуют на процессы пролиферации, дифференциации эритроидных элементов и угнетают повторное вовлечение макрофагов в эритробластические островки [171].

Суммируя данные литературы и полученные нами результаты можно заключить – взаимодействие композитной пленки CN_{0,25} с растворами, близкими по составу жидкостям организма требует детального изучения, так же необходимы исследования биосовместимости CN_{0,25} пленки, выполненные на различных линиях клеток, и *in vivo*.

При внедрении ПTi₄₀(a-C)МК и ПTi₄₀(CN_{0,25})МК происходило значимое увеличение количества лимфоцитов костного мозга (соответственно через 16-ть и 52-е недели после операции). В настоящее время уделяют значительное внимание роли иммунокомпетентных клеток в том числе Т- и В-лимфоцитов в регуляции регенерации костной ткани. Так, регуляторные молекулы иммунной системы – цитокины, хемокины, факторы роста (такие как ИЛ-1,-4,-7,-8,-10,-12,-13,-15,-17,-18,-23, ФНО, интерфероны, CCL3 - макрофагальный воспалительный протеин-1 α , CCL9 - макрофагальный воспалительный пептид, MIF - фактор, тормозящий миграцию макрофагов, RANKL - лиганд рецептора активатора ядерного фактора к β , остеопротегерин и др.) контролируют прямо или опосредованно образование и функцию остеобластов и остеокластов [391]. В литературе накоплено большое количество данных о миграции Т-лимфоцитов в регенерирующие органы [50, 9, 200]. Результативность регенерации костной ткани уменьшалась в ряду ПTi₄₀(a-C)МК > ПTi₄₀(CN_{0,25})МК > ПTi₄₀МК, > незаполненные дефекты костной ткани, что было подтверждено морфологически, гистохимически, функционально (глава 3). Вероятно, скорость регенераторных процессов костной ткани ассоциируется с количеством, субпопуляционным составом и функцией лимфоцитов, прилежащих сегментов костного мозга.

Анализ показателей минерального обмена в периферической крови у экспериментальных животных выявил два периода снижения концентрации неорганического фосфата в сыворотке крови у животных всех групп. Гипофосфатемия (через 12-ть и 40-к недель после операции) несмотря на отсутствие изменения концентрации общего и ионизированного кальция (у кроликов, с внедренными ПTi₄₀(a-C)МК, ПTi₄₀(CN_{0,25})МК). Внедрение в кости ПTi₄₀МК приводит к более значительным изменениям – отмечено снижение концентрации общего кальция в периферической крови на поздних сроках наблюдения (16-я - 52-я недели после операции) по сравнению с уровнем до операции.

У животных всех групп выявлено два периода уменьшения концентрации магния в периферической крови в отдаленные сроки после операции (соответственно через 8-мь и 52-е недели после операции). Гипомагниемия через 8-мь недель соответствует тенденции к увеличению концентрации кальция в крови, что соответствует физиологическим пропорциям для их соотношения. Значимое снижение концентрации магния в крови, выявленное через 40-

52-е недели после операции во всех группах животных может быть обусловлено повышением концентрации глюкокортикоидов и катехоламинов на фоне хронического асептического воспаления в зоне внедрения имплантатов.

В гомогенатах костной ткани были выявлены изменения активности некоторых ферментов, осуществляющих аэробное и анаэробное расщепление метаболитов, преимущественно в течение 4-16-и недель после формирования краевых дефектов кости или внедрения пористых титановых имплантатов. К 52-й неделе после операции активность ЛДГ_ц, НАД-МДГ_ц, НАД-МДГ_м, СДГ соответствовали активности данных ферментов у интактных животных. В этот же срок не выявлено значимых отличий между активностью ферментов между контралатеральными конечностями (с КД и с внедренными пористыми титановыми имплантатами), а так же различий между животными с внедренными титановыми имплантатами без покрытий и с алмазоподобными покрытиями. Полученные результаты мы расцениваем как свидетельство отсутствия значимого изменения активности исследуемых ферментов при длительном контакте костной ткани с пористыми титановыми имплантатами, как без покрытий, так и с алмазоподобными пленками (ПТi₄₀МК, ПТi₄₀(а-С)МК и ПТi₄₀(СN_{0,25})МК). Однако обнаруженное накопление пирувата в костной ткани и активация СДГ (через 52-е недели наблюдения) указывают на изменение характера метаболизма в сегментах костей, прилежащих к сформированным дефектам, причем в большей степени при внедрении в дефекты пористых титановых имплантатов.

Методом рентгеноспектрального анализа через 16-ть недель после внедрения в метафизы большеберцовых и бедренных костей ПТi₄₀МК было выявлено значимое увеличение концентрации титана в *m. tibialis anterior* и *m. adductor magnus* до 150,0% (116,7; 166,7) по сравнению с интактными животными. Применение алмазоподобных пленок (ПТi₄₀(а-С)МК и ПТi₄₀(СN_{0,25})МК), предотвращало накопление титана в мышцах.

Исследование активности общей ЛДГ (цитоплазматической фракции), НАД-МДГ цитоплазматической и митохондриальной, СДГ, КФК в *m. tibialis anterior*, прилежащей к прооперированному сегменту большеберцовой кости, у животных, с внедренными в костную ткань ПТi₄₀МК, ПТi₄₀(а-С)МК и ПТi₄₀(СN_{0,25})МК через 52-е недели после операции не выявило значимых изменений по сравнению с интактными животными. Так же не выявлено различий в активности исследуемых ферментов в *m. tibialis anterior* между контралатеральными конечностями – с дефектами костей, заполненными имплантатами, и КД.

При формировании КД большеберцовой кости гистологическая структура регионарных лимфатических узлов во все сроки наблюдения сохранена. Были выявлены однотипные изменения микроархитектоники и клеточного состава лимфатических узлов (преимущественно кортикальной, паракортикальной зон и мозгового вещества). Полученные данные указывают на

увеличение интенсивности циркуляции лимфы через лимфатический узел, умеренное повышение реактивности Т- и В-зависимых зон. Отмечено увеличение количества лимфобластов и пролимфоцитов и соразмерное снижение количества зрелых элементов – лимфоцитов; увеличение количества эозинофилов и макрофагов на ранних сроках наблюдения (4-е недели после формирования КД), что может быть обусловлено воспалительной реакцией, сопровождающейся аутоиммунным процессом, проявления которой уменьшаются с увеличением срока наблюдения.

Обращает на себя внимание минимальные выявленные изменения клеточного состава герминативных зон лимфатических узлов у животных с КД тазовых конечностей (отмечено лишь увеличение количества лимфоцитов и только у животных с внедренными в контралатеральную конечность ПТi₄₀МК). Возможно, изменение клеточного состава различных зон регионарного лимфатического узла обусловлены преимущественно миграцией клеток периферической крови в лимфатический узел с последующей бласттрансформацией и пролиферацией, а не образованием лимфоцитов *de nova* в герминативных центрах вторичных фолликулов.

Механизмы развития воспаления, сопровождающегося аутоиммунной реакцией, в послеоперационном периоде после формирования дефекта большеберцовой кости по данным литературы заключается в изменении метаболизма и развитии эндогенной интоксикации в послеоперационном периоде. Антигенная нагрузка на регионарные лимфатические узлы при данной операции значительна настолько, что к 60-м суткам после формирования полного дефекта большеберцовой кости отмечается истощение дренажно-детоксикационных возможностей подколенных лимфатических узлов [15]. Нарушение кровоснабжения вследствие травмы или эксперимента (легирирование каудальной вены) инициирует некротические процессы в нижних конечностях и так же сопровождающиеся аутоиммунным воспалением [15, 22, 58, 128]. Усиление пролиферации и дифференцировки предшественников лимфоцитов в лимфатическом узле приводит к апоптозу значительной части вновь образованных клеток, поскольку ген антиапоптоза *bcl-2* не экспрессируется в центробластах [129]. Наконец, активация резорбции костной ткани - составляющая процесса ремоделирования новообразованной костной ткани в области дефекта, вызывает повышение в периферической крови и тканевой жидкости концентрации фрагментов коллагена I типа, продуктов деструкции неколлагеновых белков, а так же продуктов распада клеток, подвергшихся апоптозу.

Показательно в связи с этим увеличение в различных зонах лимфатических узлов количества эозинофилов, с одной стороны принимающих участие в аллаергических реакция, с другой – ограничивающих проявления аллергии и воспаления, синтезируя диаминооксидазу (гистаминазу), катализирующую гистамин, фагоцитируя гранулы базофилов, содержащие

гистамин и транспортируя их к органам выделения, связывая гистамин рецепторами, расположенными на плазмолемме, а так же вырабатывая фактор, тормозящий синтез гистамина и дегрануляцию тучных клеток и базофилов. За счет синтеза плазминогена, участвующих в фибринолизе, способных инактивировать брадикинин, что улучшает микроциркуляцию в очаге воспаления и снижает активность воспаления.

В конце срока наблюдения морфологическая картина регионарных лимфатических узлов при формировании КД незначительно отличается от морфологии лимфатических узлов интактных кроликов во всех группах животных.

При внедрении пористых титановых имплантатов в кости во все сроки наблюдения гистологическая структура регионарных лимфатических узлов сохранена, клеточной атипии не выявлено.

Обнаруженные через 4-е недели после внедрения имплантатов всех типов изменения в архитектонике и клеточном составе регионарных лимфатических узлов были более выражены, чем при формировании КД, затрагивали все функциональные зоны лимфатического узла и, были обусловлены воспалительными явлениями и антигенной (в том числе аутоантигенной) стимуляцией в зоне лимфосбора.

В применяемой экспериментальной модели в костный дефект внедряли имплантаты, насыщенные аутомиелокариоцитами, увеличенными в количестве предварительным инкубированием *in vitro*, что было еще одним отличием дефекта, замещенного имплантатами от спонтанно заживающих дефектов кости. Трансплантация миелокариоцитов могла оказывать определенное влияние на состояние регионарных лимфатических узлов. Однако по данным литературы особенностью реакции регионарных лимфатических узлов на введение в дефект костной ткани аутологичных мезенхимальных клеток является меньшее изменение объема коркового плато, паракортекса, количества иммуно- и плазмобластов, макрофагов, ретикулярных клеток и клеточных элементов, с признаками деструкции, в различных зонах регионарных лимфатических узлов, более раннее возвращение перечисленных показателей к контрольному уровню, чем при репарации КД [104]. То есть, большая степень изменений лимфатических узлов является следствием введения имплантатов, а не аутомиелокариоцитов.

Выраженность данных изменений нарастала в ряду $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК} < \text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК} < \text{PTi}_{40}\text{МК}$, что косвенно свидетельствует о более быстром и полноценном восстановлении сосудистого русла в области сформированных дефектов при использовании $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, а это в свою очередь улучшает дренаж в области прооперированных сегментов и способствует ускорению процессов репаративной регенерации тканей.

Однако в паракортикальной зоне регионарных лимфатических узлов у животных, с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, были обнаружены наиболее выраженные изменения по сравнению

с кроликами других групп. Известно, что в паракортикальной зоне происходит контакт антигенов с наивными Т-лимфоцитами, их бласттрансформация, пролиферация, дифференциация с образованием активированных Т-лимфоцитов, которые быстро покидают лимфатический узел.

Функции Т-лимфоцитов разнообразны – помимо участия в иммунных реакциях они являются регуляторами регенераторных процессов костной ткани [9, 435, 512, 513, 391]. Считается вероятным предположение, что Т-лимфоциты критически ответственны за снижение плотности костной ткани при развитии постменопаузального остеопороза, ревматоидного артрита, пародонтоза, воспалительных заболеваниях кишечника.

Принимая во внимание собственные наблюдения и данные литературы допустимо предположить, что при репаративной регенерации костной ткани в паракортикальной зоне лимфатических узлов в результате контакта с вуалевидными клетками (представляющими антигены, в том числе продукты деградации костной ткани) и комбинации цитокинов происходит активация CD3+/4+ лимфоцитов, что обуславливает изменение соотношения их популяций, прежде всего $T_H1/T_H2/T_H17$, а, следовательно, и суммарного профиля синтезируемых Т-лимфоцитами цитокинов. Так, T_H1 продуцируют IFN- γ , IL-2, TNF. IL-2 вызывает экспрессию RANKL Т-лимфоцитами, а ось RANKL/RANK/TRAFF6/NFATc1 является критической для дифференциации клеток-предшественниц остеокластов, и стимуляции функциональной активности зрелых остеокластов. IFN- γ *in vivo* оказывает разнонаправленные эффекты - ингибирует RANK сигнализацию за счет ускорения деградации TRAFF6 [513], однако не влияет на функцию зрелых остеокластов; ингибирует способность 1,25-дигидроксивитамина D3, паратиреоидного гормона, IL-1 стимулировать образование остеокластов, при этом оказывает стимулирующее воздействие на синтез RANKL и TNF лимфоцитами. TNF *in vivo* стимулирует образование новых остеокластов и резорбцию кости. IL-10, -4 и отчасти IL-13, продуцируемые T_H2 , являются, ингибиторами остеокластогенеза. Этот эффект связан с уменьшения экспрессии NFATc1 и подавления c-Fos и c-Jun, уменьшения продукции простагландинов и активности циклооксигеназы-2. IL-4 вызывает миграцию остеобластных клеток-предшественниц и увеличивает их способность секретировать остеопротегерин – антагониста RANKL [391]. И, наконец, IL-17 – продукт T_H17 , является критическим посредником при развитии многих воспалительных аутоиммунных болезней (рассеянный склероз, ревматоидный артрит) [548]. Исследования [488] показали, что IL-17 активирует остеокластогенез, увеличивая продукцию RANKL стромальными клетками. Таким образом, активность Т-лимфоцитов может являться дополнительным вектором при регуляции интенсивности регенерации костной ткани.

Динамика выявляемых изменений носит нелинейный характер. Через 16-ть недель после операции признаки антигенной стимуляции регионарных лимфатических узлов уменьшались при внедрении всех тестируемых имплантатов. Однако через 52-е недели отмечается нарастание выявляемых в лимфатических узлах изменений. У животных, с внедренными в опытную конечность $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$, обнаружены признаки реактивной гиперплазии лимфоидной ткани. При внедрении $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ – расширение коркового слоя, увеличение размеров фолликулов за счет расширения светлых центров, краевой и мантийной зон, выраженная гистиоцитарная реакция в синусах лимфоузлов; снижение количества зрелых лимфоидных элементов в корковом слое, паракортикальной зоне, мозговом веществе; увеличение количества макрофагов. При внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ было выявлено – диффузное расширение паракортикальной зоны с выраженной эозинофильной клеточной реакцией, снижением количества зрелых лимфоидных элементов, увеличением количества плазматических клеток, что вероятно, являлось следствием увеличения количества антигенов, поступающих в лимфатическую ткань. При внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{а-С})\text{МК}$ выявлены наименьшие изменения (расширение паракортикальной зоны с уменьшением количества зрелых лимфоидных элементов, увеличением количества макрофагов).

Обращает на себя внимание, что особенности характерные для лимфатических узлов при внедрении определенного типа имплантата проявляются и в лимфатических узлах контралатеральной конечности, т.е. процесс приобретает системный характер.

Таким образом, в отдаленный период после внедрения пористых титановых имплантатов с углеродсодержащими пленками или без них в лимфатических узлах были выявлены изменения гистоархитектоники и клеточного состава лимфатического узла, которые нарастали со временем, затрагивающие как В-, так и Т-зависимые зоны, последние в большей степени. Отмечалась активация системы фагоцитирующих мононуклеаров, что в целом свидетельствует о продолжающемся поступлении антигенов в лимфатические узлы. Внедрение в костную ткань $\text{PTi}_{40}(\text{а-С})\text{МК}$ с аутологичными миелокариоцитами минимизировало изменения в региональных лимфатических узлах к 52-м неделям после операции.

Встает вопрос о механизмах инициации изменений в лимфатических узлах в поздний период наблюдения. Помимо описанного выше асептического воспаления вследствие стрессорного ремоделирования костной ткани в интерфейсе кость/имплантат может происходить увеличение концентрации аутоантигенов в результате конформационных изменений белковых молекул при адгезии на металлические поверхности [17, 18]. Механическая обработка, а в большей степени химическое травление приводят к увеличению полярной компоненты (γ^p) поверхностной энергии и изменению проводниковых свойства оксидного слоя титана, что увеличивает адсорбцию белков, например фибриногена [454],

который может стать донором электронов. Это в свою очередь вызывает конформационные изменения, денатурацию и преобразование его в пептиды и фибрин-мономер, в последующем самопроизвольно собирающегося на поверхности в фибрин-агрегаты [252].

Кристаллический состав диоксида титана так же оказывает влияние на состав адгезирующих белков и на их последующие конформационные изменения. Наличие преимущественно диоксида титана на поверхности $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, в кристаллической фазе рутила, во многом уменьшает возможность диффузии ионов титана и соответственно развитие воспалительного ответа [222]. При этом некоторые белки, например, С3 компоненты комплемента напротив, обладают повышенной адгезивной способностью к рутилу и, вероятно, могут на нем трансформироваться с изменением своих антигенных свойств [405].

Считается, что увеличение площади поверхности, контактирующей с белком, так же увеличивает количество конформационно измененных белков за счет увеличения общего количества контактирующих с поверхностью белков. В нашем случае мы имеем не просто «грубую» шероховатую поверхность, а пористую трехмерную матрицу, дополнительно подвергнутую травлению в ходе технологического процесса плавиковой кислотой.

В исследованиях *in vitro* группа авторов показали, что контакт с любыми титановыми поверхностями клеток мышинных макрофагоподобных клеток линии RAW 264,7 приводила к секреции клетками хемокинов - белка хемоаттрактанта моноцитов-1 (MCP-1) и макрофагального воспалительного белка-1 α (MIP)-1 α . Механическая обработка поверхности титановых подложек (пескоструйная обработка, кислотное травление и сочетание пескоструйной обработки и кислотного травления) увеличивала *in vitro* секрецию макрофагами хемокинов и провоспалительных плейотропных интерлейкинов (ФНО- α , ИЛ-1 β , ИЛ-6), которые обладают широким спектром иммуномодулирующих эффектов [84, 16, 476]. Однако применение имплантатов, обработанных пескоструйно и кислотным травлением *in vivo*, приводило к образованию более прочного соединения костной ткани с имплантатом [466]. Существующие противоречия указывают на необходимость дальнейшего изучения процессов взаимодействия живой ткани и поверхности имплантатов.

При оценке морфологической структуры селезенки через 4-е недели после формирования дефектов большеберцовых и бедренных костей максимальные изменения в виде нарушения кровообращения, активации В-зависимых зон установлены у животных, с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, что соответствует характеристике изменений в лимфоузлах у этих же кроликов в этот же срок. У животных с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ структурные изменения селезенки были менее выражены, что также соответствует интенсивности морфо-функциональных изменений в лимфоузлах.

При оценке морфологической структуры селезенки через 16-52-е недели после операции по формированию дефектов в большеберцовых и бедренных костях обеих конечностей и внедрению пористых титановых имплантатов, насыщенных миелокариоцитами в одну из конечностей, были выявлены признаки активации с развитием ответа по клеточному и гуморальному типу – увеличение размера органа; изменение соотношения белой и красной пульпы в сторону белой пульпы; увеличение периартериальных лимфатических муфт и вторичных фолликулов белой пульпы с расширенными выраженными светлыми центрами, с четкой границей между мантийными зонами и светлыми центрами фолликулов; синусовый гистиоцитоз или эозинофильная реакция. Выявленные изменения указывают на активацию клеточного и гуморального иммунного ответа, системы фагоцитирующих мононуклеаров и эозинофилов. В большей степени данные изменения выражены в группах ПТ_{i40}МК и ПТ_{i40}(а-С)МК. Таким образом, обнаруженные изменения в лимфоузле и селезенке в отдаленных сроках однотипны и свидетельствуют о продолжении антигенной стимуляции в поздние сроки после операции.

Анализ полученных результатов и данные литературы позволяют предположить, что структурные изменения селезенки являются морфологическим субстратом ее функциональной активности, направленной на ограничение хронического асептического воспаления, развивающегося при внедрении металлических имплантатов в костную ткань, а так же ограничения интенсивности иммунного ответа на аутоантигены. Механизмы регуляторного воздействия селезенки на интенсивность иммунных воспалительных реакций, вероятно, осуществляется через синтез гуморальных факторов (низкомолекулярных пептидов; полиаминов - спермина, кадаверина, путресцина), которые осуществляют регуляцию синтеза ряда гормонов и активности биогенных аминов, а так же посредством цитокинов, синтезировать которые способны спленоциты. Известны следующие эффекты гуморальных факторов селезенки – ингибирование Тх1-лимфоцитов и активация Тх2-лимфоцитов, увеличение продукции ИЛ-4 и ИЛ-10, ингибция презентации макрофагами антигенов и синтеза макрофагами цитокинов – интерферона- γ , ИЛ-1, ИЛ-6, ФНО α ; которые помимо прочего увеличивают в остеобластах экспрессию фермента 11 β -гидроксистероиддегидрогеназы 1 и, соответственно, повышают локальную активность кортизола в костной ткани [256], уменьшение количества активированных лимфоцитов, иммуносупрессия антителообразующих клеток; элиминация циркулирующих иммунных комплексов в периферической крови. Кроме того, за счет повышения концентрации гормонов щитовидной железы и снижения повышенной активности глюкокортикоидов возможна активация костеобразования и увеличение абсорбции кальция в кишечнике и его реабсорбции в почечных канальцах и уменьшение количества и функциональной активности остеокластов [363, 364].

Локальные эффекты нормализации (снижение повышенной) активности глюкокортикоидов на остеогенные клетки следующие - увеличение апоптоза зрелых остеокластов, уменьшение длительности жизни зрелых остеокластов, снижение пролиферативной активности предшественников остеокластов в костном мозге.

При нормализации уровня глюкокортикоидов не снижается инициация апоптоза остеобластов, однако происходит смещение в сторону увеличения пула клеток предшественниц-остеобластов с уменьшением дифференцировки костномозговых предшественниц в адипоциты, через уменьшение экспрессии в пероксисомах рецепторов- γ – активаторов пролиферации, которые являются важным фактором транскрипции для адипогенеза, что приводит к усилению остеобластогенеза; ускорению созревания, увеличению активности остеобластов, увеличению синтеза коллагена I типа, снижению экспрессии RANKL и M-CSF и увеличению синтеза остеопротегерина, противодействующего процессу дифференциации и активизации остеокластов [19].

Имеется различие в сроках реакции селезенки и лимфоузла, которое может быть обусловлено некой иерархией в постнатальном лимфопоэзе. Известно, что селезенка, являясь периферическим лимфоидным органом, встроена в кровеносную систему в отличие от лимфоузла, являющегося частью лимфатической системы. Возможно скорость развития клеточных реакций в лимфоидной ткани, а также в системе фагоцитирующих макрофагов селезенки и лимфоузла различна и связана временем контакта и объемом поступающих в органы антигенов.

Группу $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ отличает увеличение численности плазматических клеток и эозинофилов в лимфоузле через 52-е недели после операции по данным гистологического исследования и лимфоцитогаммы, что может указывать на формирование иммунных реакций организма при внедрении имплантата данного типа. По данным литературы, гуморальные факторы селезенки вызывают иммуносупрессию антителообразующих клеток. В этой связи примечательно, что в селезенке животных этой группы выявлены очень слабые морфологические проявления Т-клеточного иммунного ответа и активация В-клеточных реакций в сроке 16-ть недель, а в 52-е недели наблюдается «нормализация» или даже редукция белой пульпы, несоответствующая структурным изменениям в лимфоузлах в этом сроке - диффузное расширение паракортикальной (Т-зависимой) зоны с выраженной эозинофильной клеточной реакцией. Таким образом, вероятно развитие аутоиммунного процесса, связанного с нарушением механизмов регуляторного воздействия селезенки на иммунную систему в этой группе.

4.9. Заключение

На протяжении эксперимента не было отмечено гибели подопытных животных, изменения их внешнего вида, поедаемости корма, двигательной активности. Заживление ран протекало первичным натяжением. Отторжения имплантатов не выявлено.

При обследовании животных было обнаружено, что репаративная регенерация дефектов большеберцовых и бедренных костей сопровождалась изменениями в кроветворной, иммунной, костной системе, скелетных мышцах, которые проявлялись преимущественно на ранних сроках наблюдения после имплантации (4-16-ть недели).

При внедрении в дефекты пористых титановых имплантатов были выявлены изменения в кроветворной, иммунной, костной системе в течение всего периода наблюдения (52-е недели после имплантации). Обнаруженные в поздние сроки наблюдения гематологические, биохимические, морфологические, цитологические изменения обусловлены развитием хронического асептического воспалительного процесса, причинами которого могло быть стрессорное ремоделирование костной ткани материнского ложа имплантатов, образование аутоантигенов при контакте тканей организма с инородными поверхностями, активация моноцитарно-макрофагальной системы при контакте с чужеродными поверхностями. При этом часть из них были направлены на модуляцию и ограничение воспалительного процесса.

У животных всех групп клеточная атипия (в костном мозге, лимфатических узлах, селезенке) отсутствовала, выраженность воспалительной реакции была слабая. Использование титана с алмазоподобными пленками ($\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$) минимизировало воспалительные изменения по сравнению с чистым титаном (классифицируемым, как биоинертный материал, соответствующий требованиям, предъявляемым к материалам длительно контактирующим с тканями организма, разрешенным и активно используемым в медицине). Применение композитной пленки ($\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$) приводило к увеличению реакции тканей – периферической крови, костного мозга, лимфатических узлов.

ГЛАВА 5

ПОВЫШЕНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ОСТЕОИНТЕГРАЦИИ ПОРИСТЫХ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ

Оптимизация условий для заживления дефектов костной ткани с последующим восстановлением функции прооперированного сегмента является актуальной проблемой восстановительной медицины. Для решения данной проблемы возможно два принципиальных подхода: технические усовершенствования (применение новых и модернизация используемых средств фиксации, новых костно-замещающих материалов и др.); использование остеоиндукторов, клеточных технологий и продуктов тканевой инженерии [7, 5, 10, 98, 28, 99, 98, 56, 402]. В любом случае целью является интеграция внедренных материалов с тканями организма и продолжительное функционирование образованного композита [140].

5.1. Оптимизация структуры имплантатов путем модификации пористости титановых имплантатов с нерезорбируемыми углеродными алмазоподобными пленками, предварительно насыщенных аутологичными миелокариоцитами

Широкое использование в ортопедии и стоматологии монокристаллических или керамических имплантатов, продемонстрировало, что в течение 15-25 лет после имплантации происходит медленное прогрессирующее асептическое воспаление в области интерфейса костного ложа с имплантатом с прогрессирующей патологической потерей костной массы. Это обусловлено несколькими причинами. Одной из основных является большая жесткость имплантатов из монокристаллического металла или керамики, по сравнению с жесткостью кости (модуль продольной упругости керамики $\text{Al}_2\text{O}_3 \sim 350\text{-}380$ ГПа, $\text{ZrO}_2 \sim 200\text{-}210$ ГПа, стали ~ 210 ГПа, титана ~ 112 ГПа, а свежей кости 10-30 ГПа). Таким образом, даже при функциональных нагрузках деформация костной ткани и имплантата различны. Есть мнение, что монокристаллические имплантаты в принципе не могут интегрироваться с костью, и со временем происходит их миграция и расшатывание. По прогнозам специалистов необходимость в повторных имплантациях будет значительно увеличиваться, особенно у пожилых пациентов. Так, в США к 2040 году прогнозируют увеличение количества тотальных ревизионных эндопротезирований тазобедренных суставов на 137%, коленных суставов на 601% [379]. Для улучшения инкорпорации имплантатов в костное ложе в последние годы активно разрабатывают пористые материалы, в том числе открыто-ячеистые металлы, вспененные металлы или ячеистые металлы. Увеличение пористости металлического имплантата создает лучшие условия для

функционирования кости, поскольку происходит врастание костной ткани в поры имплантата, а это дополнительно фиксирует имплантат по типу «замкового» сцепления. Кроме того, увеличивая степень пористости металла, можно приблизить модуль упругости пористых имплантатов к модулю упругости костной ткани. Однако вопрос о соотношении прочности и пористости имплантатов необходимо решать при замещении дефектов костной ткани конкретной локализации.

В анализируемой группе были исследованы прочностные характеристики имплантатов из пористого титана с алмазоподобными углеродными пленками, имеющими различную объемную долю пор и композитов, образованных данными имплантатами и новообразованной костной тканью, при осевом (одноосном) сжатии. Четыре плоскости имплантатов представляли собой равнобедренные трапеции, две – прямоугольники размером (15 x 10) и (14 x 9) мм (ПТi(a-C)□). Напряжение сжатия относится к физиологическим, испытываемым организмом человека и животных при действии силы тяжести. Расчет модуля нормальной упругости позволяет не только оценить упругость полученного пористого титана с алмазоподобной пленкой и композита «титан-кость», но и имплантата определенной формы.

В данной серии в качестве экспериментальных животных были использованы овцы, которые как экспериментальные животные имеют определенные преимущества перед кроликами. К таким преимуществам относятся – значительная длина костей голени и бедра у овец, один порядок веса взрослых животных и веса тела человека, сопоставимые механические характеристики кости, ее минеральный состав, метаболизм, темп ремоделирования костной ткани овец с темпом ремоделирования костной ткани у человека.

Однако микроструктура костной ткани овец имеет особенности. Отличия касаются в большей степени кортикальной кости. Так у молодых овец до 3-4-х лет костная ткань является преимущественно первичной пластинчатой, содержит значительно меньшее количество Гаверсовых каналов, чем у человека. Губчатая кость молодых овец имеет меньшую жесткость и плотность, но более высокую эластичность за счет большего содержания коллагена [387]. К настоящему моменту подробно охарактеризованы процессы регенерации костной ткани, созданы математические модели, описывающие движения костей тазовых конечностей овец. Исходя из этого, овцы активно используются в ортопедических исследованиях: моделировании критических дефектов, остеоартрита, переломов длинных трубчатых костей, остеопороза, удлинения костей [468]. Известно, что при движении овцы на большеберцовую кость преимущественно оказывают влияние силы сжатия и в меньшей степени – силы сдвига. По величине эти силы составляют примерно половину от соответствующей нагрузки у человека при ходьбе [468].

В качестве характеристики прочности мы использовали условный предел текучести ($\sigma_{0,2}$) Данный показатель соответствует напряжению, при котором остаточная пластическая деформация (не исчезающая после снятия нагрузки) составляет 0,2% от длины испытываемого образца. Данный показатель для пористых материалов зависит не только от свойств материала, но и объема пор, их формы, размера и распределения. Через 8 недель после имплантации ПТi(a-C)□МК условный предел текучести композитов «пористый титан-новообразованная костная ткань» в пределах ошибки измерения не отличался от $\sigma_{0,2}$ исходных имплантатов (при объемной доле пор 30% – 67,5 МПа, 40% – 64,0 МПа, 50% – 33,5 МПа).

Через 24 недели после имплантации ПТi(a-C)□МК образуется композит, прочность и упругие свойства которого отличаются от прочности и упругости исходных имплантатов. Условный предел текучести композита (имплантат-кость) ($\sigma_{0,2}$) по сравнению с исходным значением для имплантатов увеличивался на 32%, 37%, 50% при пористости ПТi(a-C)□МК 30%, 40%, 50%, соответственно.

К 52-ой неделе после операции условный предел текучести ($\sigma_{0,2}$) при внедрении ПТi₃₀(a-C)□МК составил 217,0 % (183,6; 222,1), ПТi₄₀(a-C)□МК – 201,5% (200,8; 204,0), ПТi₅₀(a-C)□МК – 99,16% (91,9; 110,0) от значений для исходных имплантатов.

Для экстраполяции результатов, полученных в эксперименте, в клинику были применены ориентировочные расчеты соответствия напряжений, создаваемых в дистальном отделе бедренной кости человека, и предела прочности композитов, образованных пористой титановой матрицей и костью овцы.

По данным литературы во время ходьбы напряжение в бедренных костях не превышает ~50% от разрушающего, то есть составляет менее 81 МПа. Во время интенсивных прыжков величина напряжения в бедренных костях достигает 80% от разрушающих напряжений при растяжении и 65% при сжатии [65] и, таким образом, составляет ~128 МПа.

В нашем эксперименте мы не определяли предел прочности композитов, поскольку пористые металлические структуры при сдавливании перестают выполнять свою функцию задолго до полного разрушения, а использовали в качестве характеристики прочности – предел текучести при незначительной остаточной деформации (0,2%).

Коэффициент риска определяли как соотношение напряжения, действующего на объект, к предельному (разрушающему) напряжению [153].

Таким образом, образованные композиты «ПТi₃₀(a-C)□МК – новообразованная кость» имеют запас прочности: при ходьбе 80/146,5 ~0,54, при интенсивном прыжке 128/146,5 ~0,87; «ПТi₄₀(a-C)□МК – новообразованная кость» при ходьбе 24,2/128,96 ~0,62, при интенсивном прыжке 128/128,96 ~0,99; «ПТi₅₀(a-C)□МК – новообразованная кость» при ходьбе 80/99,16 ~0,81, при интенсивном прыжке 128/99,16 ~1,29.

Итак, при внедрении имплантатов с пористостью 30% и 40% в дистальный отдел бедра человека максимальные напряжения при физиологической нагрузке (ходьба) и значительных нагрузках (интенсивный прыжок), испытываемые композитами, не будут превышать условный предел текучести этих композитов. Запас прочности при физиологических нагрузках составляет от 0,54 до 0,62, при значительных нагрузках – 0,87-0,99 (фактически он даже выше, поскольку расчет был сделан на основе условного предела текучести, а не предела прочности). При внедрении ПТi₅₀(а-С)□МК имеется риск разрушения композитов при значительных нагрузках (интенсивный прыжок).

Модуль Юнга композитов (модули продольной упругости, характеризующие упругие свойства материалов) «ПТi(а-С)□МК ($\theta = 30, 40$ и 50%) – новообразованная в порах костная ткань» через 8 недель после имплантации не отличался от исходных значений модуля Юнга пористого титана (при объемной доле пор 30% – 4,63 ГПа, 40% – 3,47 ГПа, 50% – 0,56 ГПа). Через 24 недели после операции модуль Юнга композитов превышал исходные значения модуля Юнга имплантатов на 55,9%, 27,1%, 73,2% при пористости имплантатов – 30%, 40%, 50%, соответственно (рисунок 5.1). При этом оставались меньшими, чем в интактной кости овцы (соответственно – 41,1%, 24,5%, 5,39% от интактной кости). Скорость нарастания упругих свойств композитов в течение первых 24-х недель после операции опережала скорость нарастания прочности кости (упругие свойства изменялись от 55,9 до 73,2%, а прочность изменялась от 32% до 50%).

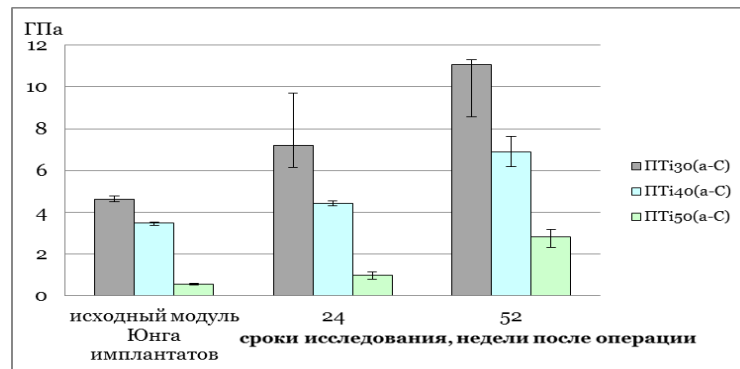


Рисунок 5.1 – Модуль Юнга ПТi(а-С)□МК с объемами пор 30%, 40%, 50% и композитов «ПТi(а-С)□МК – новообразованная в порах костная ткань» после внедрения имплантатов в дефекты большеберцовых и бедренных костей овец (медиана, 25-, 75- процентиля)

Данные результаты ожидаемы, поскольку упругопластические свойства костной ткани преимущественно обеспечивают коллагеновые волокна, определенным образом организованные и ориентированные в ламелле [86]. Ориентированные продольно, они обеспечивают сопротивление растягивающей деформации, перпендикулярно длинной оси

кости – сопротивление сжатию. Минеральный компонент, армируя податливую органическую матрицу после ее формирования, придает ей прочность и жёсткость.

Через 52-е недели после операции модули Юнга композитов не достигают значений модуля Юнга интактной кортикальной пластинки овцы и составляют 65,1%; 40,6% и 16,7% (при объемной доле пор 30%, 40%, 50%, соответственно) (рисунок 5.2).

Относительное значение модуля Юнга ($\Delta E/E_{\text{исх}}$) ожидаемо увеличивалось в ряду $\text{PTi}_{30}(\text{a-C}) \square \text{МК} < \text{PTi}_{40}(\text{a-C}) \square \text{МК} < \text{PTi}_{50}(\text{a-C}) \square \text{МК}$, что объясняется возрастающим объемом костной ткани во внутреннем поровом пространстве композитов за счет большего объема пор, и на графике отражает угол наклона кривых.

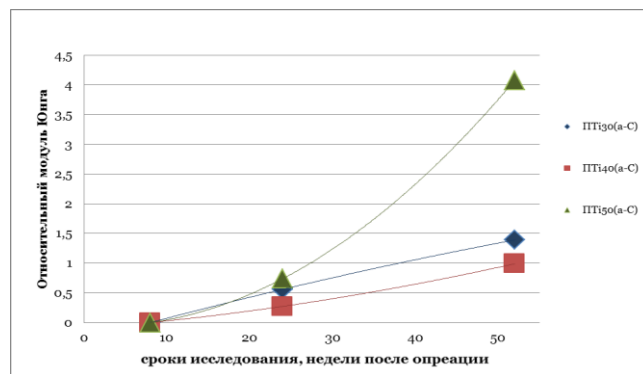


Рисунок 5.2 – Относительные модули Юнга композитов «PTi(a-C)□МК – новообразованная в порах костная ткань» после внедрения имплантатов в дефекты большеберцовых и бедренных костей овец

Увеличение упругости композита в данной ситуации является желательным, поскольку определяет устойчивость материала к нагрузке без пластической деформации.

При контакте PTi(a-C)□МК с костной тканью образуется биометаллический композит, эффективные механические свойства которого зависят от свойств его компонент – пористой металлической матрицы и костной ткани, однако отличаются от них. С точки зрения биомеханики изменение упругих характеристик композита в результате заполнения пор имплантата костной тканью является показателем остеоинтеграции пористого имплантата [157].

5.2. Применение клеточных технологий для оптимизации остеоинтеграции пористых титановых имплантатов

К настоящему времени перспективность применения мезенхимальных стволовых клеток и их потомков различной степени зрелости подтверждена огромным числом экспериментальных исследований с использованием различных животных моделей [103, 198, 4, 93, 110, 148]. В клинической практике считается перспективным использование МСК при

самых различных патологических состояниях: в гематологии – совместно со СКК для лучшего «приживления» последних [447], в травматологии и ортопедии – для лечения дефектов хряща [98, 503], костных дефектов и у пациентов с несовершенным остеогенезом [62, 105, 288], лечении открытых ран [145], в неврологии и нейрохирургии – для лечения нейродегенеративных заболеваний и травм спинного мозга [463], в челюстно-лицевой хирургии и стоматологии [4], онкологии, косметологии, при сердечно-сосудистых заболеваниях [12, 566].

Исследования по восстановлению костных органов доказали зависимость данных процессов от количества трансплантированных остеогенных клеток-предшественниц и указывают на необходимость предварительного увеличения в количестве остеогенных клеток-предшественниц *in vitro* (культивированием или сепарацией) с последующей трансплантацией их в зону дефекта [62, 559]. Известно, что применение МСК на носителях более эффективно, чем введение их в кровеносное русло или непосредственно в место травмы [526]. Следовательно, разработка трехмерных носителей клеточных культур для эффективной трансплантации МСК в очаг поражения является актуальной задачей.

Для исследования эффективности $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ в качестве скэффолдов для прилипающей фракции аутологичных миелокариоцитов было выполнено сравнение остеоинтеграции в большеберцовые и бедренные кости кроликов $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ без клеток и $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$, насыщенных аутологичными миелокариоцитами, увеличенными в количестве инкубацией в течение 14-и суток (рисунок 5.2.1).

Через 2-е недели после имплантации кроликам $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ со стороны надкостницы в области костного ложа были выявлены невыраженные некробиотические изменения, проявлявшиеся гибелью клеток периоста, частичной отслойкой периоста вблизи дефекта. Однако локальное небольшое разрыхление и утолщение внутреннего слоя периоста указывало на то, что фаза ранних посттравматических изменений в сформированном дефекте кости сменилась пролиферативной фазой регенерации. Происходило образование периостальной части костного регенерата, также из периоста в область дефекта кости врастали сосуды (рисунок 5.2.2 а). В костном ложе у краев дефекта было выявлено незначительное количество погибших остецитов, область сформированного дефекта между ложем и внедренным имплантатом заполнена молодыми петлистыми костными трабекулами, между которыми располагались костномозговые элементы и соединительная ткань. На поверхности трабекул расположены многочисленные остеобласты. В периферические поры имплантата врастали первичные костные трабекулы ретикулофиброзной костной ткани с большим количеством остеогенных клеток.



Рисунок 5.2.1 – Кролики. Фото макропрепаратов бедренных костей. 2-е недели после имплантации. Титановые матрицы вытравлены.
а – ПТi₄₀(а-С), предварительно насыщенный миелокариоцитами *in vitro*, увеличенными в количестве инкубацией в течение 14-и суток.
б – ПТi₄₀(а-С)

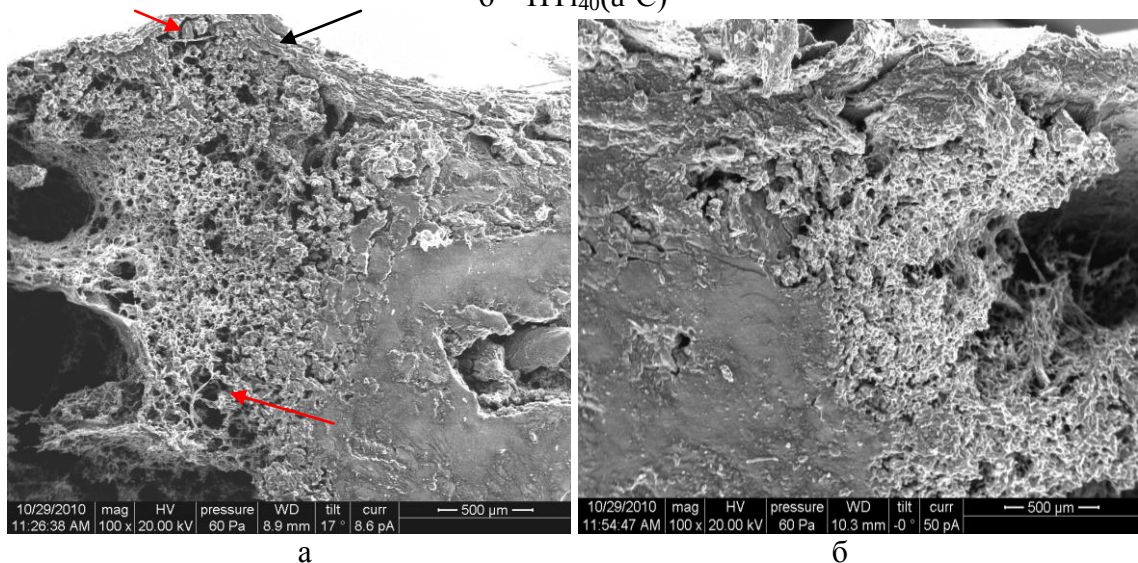


Рисунок 5.2.2 – Кролики. Бедренные кости. Границы материнского ложа – новообразованной в порах имплантатов костной ткани. 2-е недели после имплантации. СЭМ-микрофото. Титановые матрицы вытравлены. а – ПТi₄₀(а-С)МК. Черной стрелкой обозначена зона формирования периостальной части костного регенерата с новообразованными сосудами. Красные стрелки – прорастающие в зону внедрения имплантата сосуды. б – ПТi₄₀(а-С)

На некоторых участках происходило сквозное прорастание молодой костной ткани до центра имплантата (рисунок 5.2.3). На отдельных участках в области дефекта кортикальной пластинки были выявлены ограниченные очаги хондрогенеза.

Через 4-е недели после операции периостальные наложения были незначительны. Кортикальная пластинка была частично восстановлена. Ложе имплантата представлено молодыми и зрелыми костными трабекулами, образующими мелкопетлистую пластинчатую костную ткань.

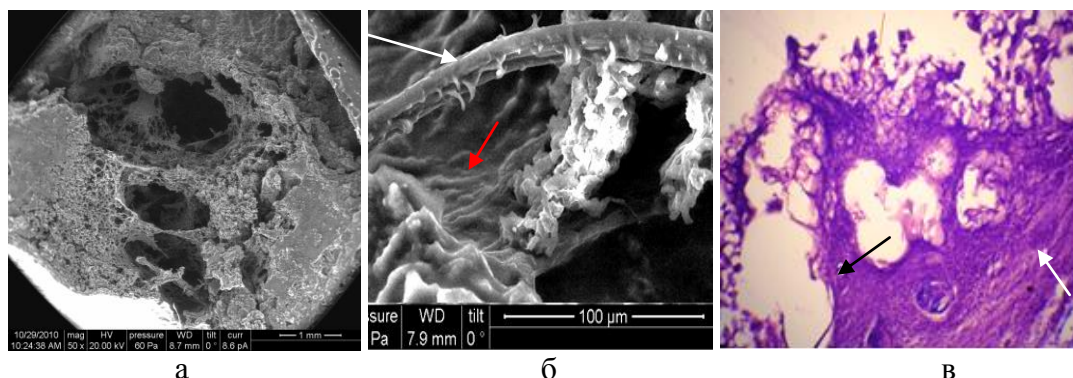


Рисунок 5.2.3 – Кролик, бедренная кость. 2-е недели после имплантации ПТi₄₀(а-С)МК. Титановая матрица вытравлена. а, б – СЭМ-микрофото; в – гистологический срез. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х 100. СМ-микрофото. а – костный дефект, частично заполненный новообразованной костной тканью. б – поверхность новообразованного костного вещества в порах имплантата, с расположенными на ней несколькими веретеновидными клетками (красная стрелка), белой стрелкой обозначен вросший в поры кровеносный сосуд. в – граница области внедрения имплантата. Белая стрелка – зона сформированного дефекта, черная стрелка – первичные костные трабекулы ретикулофиброзной ткани, врастающие в поры имплантата

В ее межтрабекулярных пространствах располагался преимущественно миелоидный костный мозг. Большая часть сообщающихся с поверхностью пор была заполнена новообразованной костной тканью. В периферических отделах области внедрения имплантата остеогенез шел за счет врастающих из материнского ложа молодых костных трабекул пластинчатой костной ткани, которая анастомозировала с ретикулофиброзной костной тканью центральных областей. По краям трабекул располагались остеобласты. Метахромазия матрикса новообразованной костной ткани и плотность клеток уменьшались по сравнению с предыдущим сроком наблюдения.

Костная ткань внутреннего порового пространства, существенно отличалась от интактной – преимущественно не имела пластинчатой организации; немногочисленные остеоны располагались хаотично.

При внедрении ПТi₄₀(а-С) выявленные закономерности были те же, отличия заключались в следующем – через 4-е недели утолщение внутреннего слоя надкостницы в областях прилежащих к дефекту не выражено, неоваскуляризация зоны внедрения имплантата менее выражена, площадь, занимаемая костной тканью, была меньшей, чем при внедрении ПТi₄₀(а-С)МК, в ~1,5 раза. Через 16-ть недель после операции в области внедрения имплантата наряду со зрелыми костными трабекулами сохраняются участки соединительной ткани.

Изучение прочности костного блока с внедренными пористыми титановыми имплантатами не выявило отличий между группами ПТi₄₀(а-С) и ПТi₄₀(а-С) с миелокариоцитами (таблица 5.2.1).

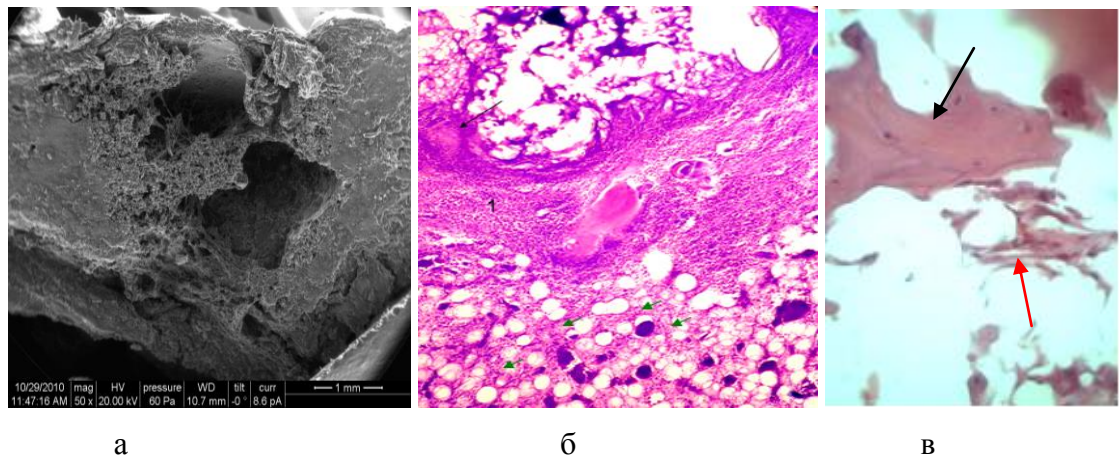


Рисунок 5.2.4 – Кролики, бедренные кости. а, б – 2-е недели после имплантации ПТi₄₀(а-С). в – 4-е недели после имплантации. Титановые матрицы вытравлены. а – СЭМ-микрофото; б, в – гистологические срезы. Окраска гематоксилин-эозином. б – Ув. х 100. в – Ув. х 400 СМ-микрофото. а – костный дефект, частично заполнен новообразованной костной тканью. б – область сформированного костного дефекта. 1 – миелоидный и жировой (зеленые стрелки) костный мозг, расположенный между единичными костными дистрофичными балочками. В периферические поры врастают первичные трабекулы (черная стрелка). в – область внедрения имплантата. Наряду с хорошо сформированной костной трабекулой (черная стрелка) сохраняются участки соединительной ткани (красная стрелка)

Таблица 5.2.1 – Значения относительного предела прочности на растяжение новообразованной костной ткани на границе «костное ложе – имплантат»

Срок исследования /тип имплантата	2-е недели после операции, %	4-е недели после операции, %
ПТi ₄₀ (а-С)	32, 38, 35	31, 55, 43
ПТi ₄₀ (а-С)МК	34, 32, 36, 31	47, 37, 56

Итак, в нашем эксперименте мы ограничились фракционированием миелокариоцитов по их способности адгезировать к поверхностям [113, 295, 296], не выделяя чистую популяцию остеогенных-предшественниц, поскольку в отсутствии нарушения остеогенеза в многокомпонентном клеточном трансплантате сохраняется естественное оптимальное соотношение остеогенных-прекурсоров и клеток, осуществляющих регуляторные воздействия. In vitro мы показали, что при используемых нами условиях культивирования, клетки, прилипающей фракции миелокариоцитов, в порах титановой матрицы формируют межклеточные связи, синтезируют компоненты экстрацеллюлярного матрикса, щелочную и кислую фосфатазы (глава 3, монография). In vivo такой многокомпонентный трансплантат может принимать как непосредственное участие в остеогенезе и ангиогенезе, так и активировать остеогенез и новообразование сосудов. Клетки мезенхимального ряда и иммунокомпетентные клетки, синтезируют более 50 цитокинов. Среди них - основной фактор роста фибробластов (bFGF), факторы роста эндотелия сосудов VEGF-A, -B, -C, -D, которые активируют эндотелиальные клетки-предшественницы, ускоряют рост и миграцию эндотелиоцитов, стимулируют ангиогенез, образование лимфатических сосудов, контролируют

синтез компонентов межклеточного матрикса [344], ФНО- α , ИЛ, интерфероны моделирующие функцию остеогенных и иммунокомпетентных клеток.

При внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, на ранних сроках наблюдения были выявлены признаки активации остеогенеза и васкуляризации регенерата, уменьшение дистрофических изменений в прилежащих к дефекту сегментах кости, что отличало данных животных от контрольных (внедрение $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ без клеток). Таким образом, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ может быть использован в качестве скэффолда для трансплантации клеток в зону поражения кости.

5.3. Применение рекомбинантного костного морфогенетического белка-2 для стимуляции остеогенеза при внедрении пористых титановых имплантатов

Несовершенство нормативно-правовой базы, этические аспекты, отсутствие критериев и системы обеспечения биологической безопасности применяемых препаратов и качества продукции клеточных технологий, риски, ассоциированные с трансплантацией клеток, заставляют искать для стимуляции репаративной регенерации альтернативы клеткам, обладающим потенцией к костеобразованию. Воздействие на остеогенез рекомбинантным КМБ-2, индуцирующим преобразование стволовых полипотентных стромальных клеток и камбиальных остеогенных клеток в остеобласты, одна из них.

Рекомбинантная форма КМБ-2 (рКМБ-2) идентична естественной форме по структуре и обладает высоким остеоиндуктивным потенциалом. В эксперименте (на крысах, кроликах, собаках, приматах) было продемонстрировано, что рКМБ-2 активирует остеогенез, при этом образуется костная ткань, не отличающаяся по морфологическим признакам от костной ткани прилежащей анатомической области, стабилизируется плотность костной ткани в зоне дефекта и всего сегмента конечности. Происходит восстановление критических дефектов костной ткани, при этом процесс остеогенеза инициированный КМБ-2 склонен к самоограничению [124, 60, 529 434, 530, 528, 357, 433, 251]. Учитывая, что период полужизни в организме рКМБ-2 составляет ~ 7 минут за счет ферментативного его расщепления и высокой скорости клиренса [511], для увеличения эффективности использования рКМБ-2 его применяют в сочетании с биологически совместимыми носителями, такими как коллагеновые губки, декальцинированный костный матрикс [425]. У пациентов с открытым переломом голени размещение коллагеновой губки, содержащей рКМБ-2, непосредственно над местом перелома перед ушиванием раны приводило к значительному снижению частоты вторичных вмешательств, общей инвазивности процедур, ускорению заживления переломов и ран, уменьшению воспалительных осложнений по сравнению с рандомизированной группой пациентов, получавших стандартное лечение [311, 304].

Исходя из вышесказанного, задачей данного фрагмента нашей работы была экспериментальная оценка эффективности замещения дефектов костной ткани кроликов $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ в комбинации с рекомбинантным человеческим КМБ-2, связанным с декальцинированным костным матриксом и гиалуроновой кислотой в качестве носителя.

Данный фрагмент работы выполнен совместно с Федеральным Государственным Бюджетным Учреждением «Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва. Человеческий рКМБ-2 (рчКМБ-2) были получены и введены в поры $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ в лаборатории биологически активных наноструктур под руководством доктора биологических наук В.Г. Лунина.

Для решения поставленной задачи сформировали следующие группы: контрольная – моделирование дефекта костной ткани (отрицательный контроль); введение в дефект $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ МК (положительный контроль), имплантация $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$, содержащих носитель КМБ - крошку ДКМ (размером 0,04-0,125 мм) и гиалуроновую кислоту, контроль сохранившегося остеоиндуктивного потенциала ДКМ; опытные – имплантация $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$, содержащих чрКМБ-2 в дозе 0,019-0,036 мг/имплантат на носителе; $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$, содержащих чрКМБ-2 в дозе 0,054-0,068 мг/имплантат на носителе; $\text{PTi}(\text{a-C})$, содержащих чрКМБ-2 в дозе 0,127-0,193 мг/имплантат на носителе.

Некоторым животным помимо рентгенологического исследования была выполнена компьютерная томография, которая не выявила очагов гетеротопической оссификации в мягких тканях, прилежащих к внедренным в большеберцовые и бедренные кости имплантатам.

При морфологическом исследовании через 4-е недели после моделирования незаполненных дефектов костей было выявлено: периостальная реакция в отделах, прилежащих к дефекту, выражена. Со стороны кортикальной пластинки дефект заполнен сетью молодых трабекул с ограниченными очагами хрящевой и соединительной тканей, со стороны костномозгового канала – трабекулы атрофичны, неравномерно окрашены.

Через 16-ть недель после операции края костного дефекта сомкнулись не у всех животных, хотя площадь дефекта значительно уменьшилась. В зоне дефекта были выявлены участки хрящевой ткани, ретикулофиброзная костная, волокнистая соединительная ткани, небольшие скопления клеток красного костного мозга. Новообразованная костная ткань метафиза имела значительные отличия от характерного строения для данной анатомической области: часть новообразованной костной ткани имела неупорядоченное строение, сохранялась метакромазия окраски. Костно-мозговой канал сформирован не полностью.

При внедрении в дефекты имплантатов большая часть сообщающихся с поверхностью пор через 4-е недели после операции были заполнены новообразованной костной тканью различной степени зрелости (рисунок 5.3.1).

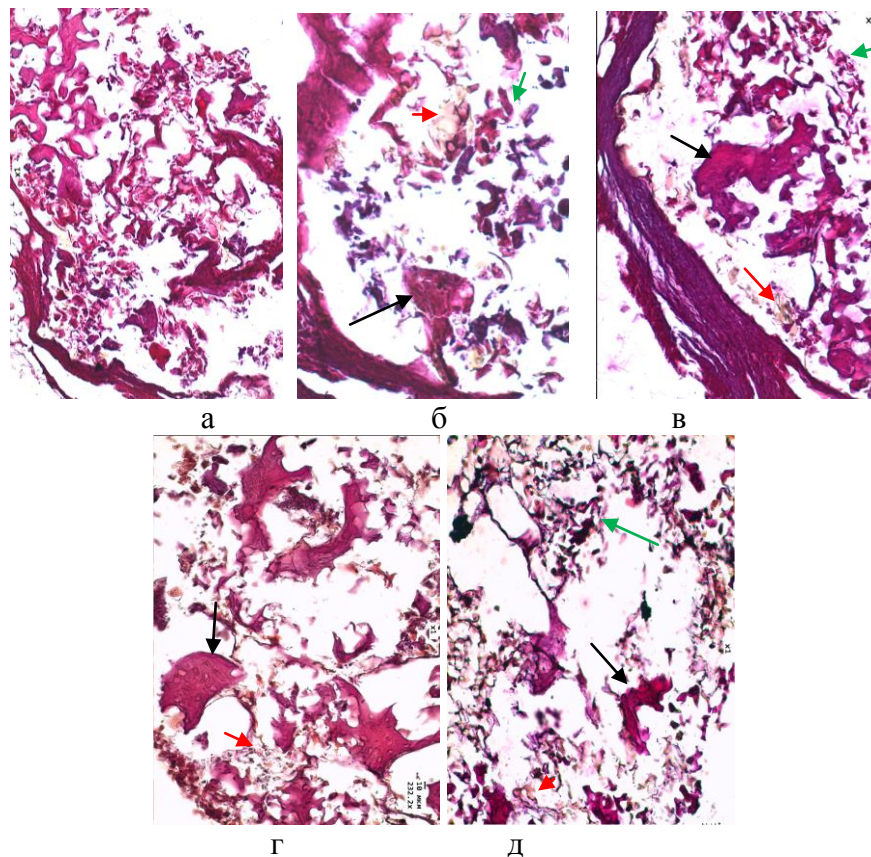


Рисунок 5.3.1 – Кролики. 4-е недели после имплантации, титановые матрицы вытравлены. Гистологические срезы. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х 200. СМ-микрофото.

а – $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. б – $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ с ДКМ и гиалуроновой кислотой. По периферии расположены трабекулы с остеоцитарным строением, всю центральную область внедрения имплантата занимает ретикулофиброзная костная ткань, частицы ДКМ. в – $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ с чрКМБ-2 (0,019-0,036 мг/имплантат) на носителе. Неравномерное распределение зрелой костной ткани по внутреннему поровому пространству. г – $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ с чрКМБ-2 (0,054-0,068 мг/имплантат) на носителе. Зрелые трабекулы новообразованной костной ткани располагаются по периферии и в центральном регионе имплантата.

д – $\text{PTi}(\text{a-C})$ с чрКМБ-2 (0,127-0,193 мг/имплантат) на носителе. Костные трабекулы занимают незначительную площадь внутреннего порового пространства. Более зрелые трабекулы с остеоцитарным строением – черные стрелки, ретикулофиброзная костная ткань – зеленые стрелки, ДКМ – красная стрелка.

Особенности при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ – через 4-е недели после имплантации активность остеогенеза высокая, в периферические поры имплантатов вросли молодые костные трабекулы, поверхность которых была покрыта многочисленными остеобластами. Во внутреннем поровом пространстве – первичные балочки ретикулофиброзной костной ткани. Зрелые костные трабекулы занимали 44,8% (21,5; 55,2) площади новообразованной костной ткани, но распределены по площади были неравномерно. Межтрабекулярные пространства характеризовались высокой плотностью клеточных элементов и васкуляризацией. Через 16-ть

недель после имплантации в зоне внедрения имплантата сеть костных трабекул становилась более плотной, располагались они более упорядоченно по сравнению с предыдущим сроком (рисунок 5.3.2). Плотность клеток костной ткани снижалась. Между трабекулами были выявлены включения кроветворной ткани и жирового костного мозга. Кортикальная пластинка восстановлена полностью, хотя ее высота оставалась ниже, чем до операции. По периферии области внедрения имплантата часть новообразованных костных структур имела плотное сращение с материнским ложем хорошо сформированными костными трабекулами, в центральной части имплантата были расположены первичные костные трабекулы. Были выявлены признаки склерозирования новообразованного костного вещества в ограниченных областях. Площадь зрелой костной ткани в порах имплантата достигала 59,6% (31,7; 61,5).

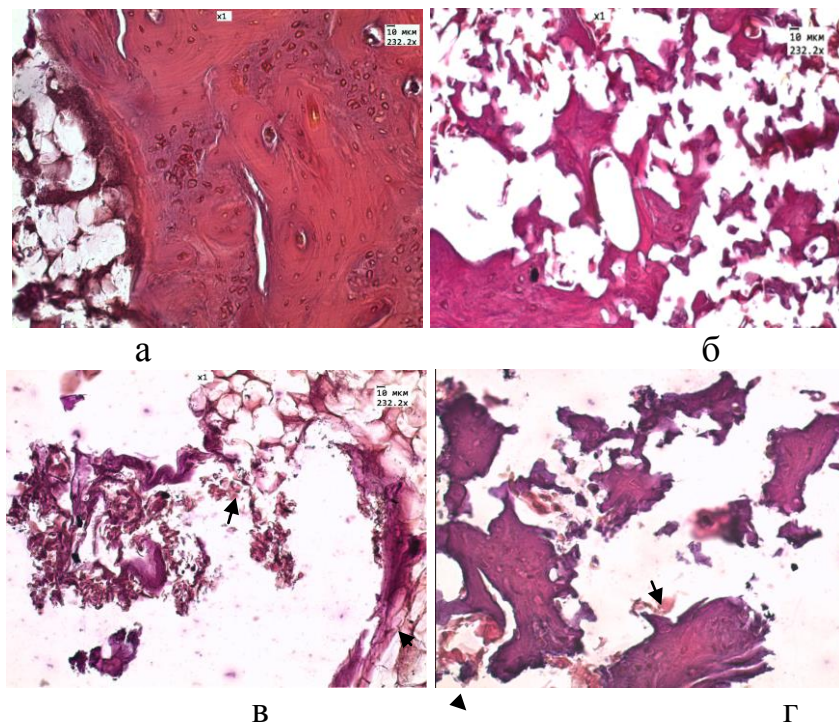


Рисунок 5.3.2 – Кролики. Титановые матрицы вытравлены. Гистологические срезы. Окраска гематоксилин-эозином. Ув. х 200. СМ-микрофото. а, б – ПТi₄₀(а-С)МК; в, г – ПТi(а-С) с чрКМБ-2 (0,127-0,193 мг/имплантат) на носителе. а, в – 4-е недели после имплантации; г, д – 16-ть недель после имплантации. Сеть костных трабекул становится более плотной, располагаются они более упорядоченно. Частицы ДКМ (черные стрелки)

При внедрении ПТi₄₀(а-С) с ДКМ и гиалуроновой кислотой особенность морфологической картины заключалась в следующем: через 4-е недели после имплантации костное ложе было с явлениями дистрофии, отдельные зрелые трабекулы из материнского ложа врастали в периферические поры имплантата. Однако в центральной области имплантата костная ткань не занимала всего порового пространства, а доля зрелой костной ткани была незначительна (17,8% (5,0; 31,5)).

Через 16-ть недель после имплантации в костном ложе склеротические изменения были более выражены, чем при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. Происходило увеличение площади, занятой зрелыми костными трабекулами во внутреннем поровом пространстве до 41,6% (30,0; 45,2). Между трабекулами был обнаружен преимущественно жировой костный мозг.

При внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ с чрКМБ-2 (0,019-0,036 мг/имплантат) на носителе, особенности морфологии заключались в следующем – через 4-е недели после имплантации количество зрелой костной ткани было незначительно, но по площади имплантата она была распределена более равномерно, чем при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ с ДКМ. Площадь, занятая зрелой костной тканью, занимала 31,6% (22,7; 51,2) от площади новообразованной костной ткани. Через 16-ть недель в костном ложе были выявлены признаки дистрофии. Площадь, занятая зрелой костной тканью, занимала 48% (37,9; 54,0). При внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ с чрКМБ-2 (0,054-0,068 мг/имплантат) на носителе особенности морфологии заключались в следующем – через 4-е недели после имплантации периферические отделы и треть внутреннего порового пространства имплантата равномерно заполнены зрелыми костными трабекулами, на которые приходилось 51,6% (39,9; 56,5) площади, занятой костной тканью. Через 16-ть недель в костном ложе выявлены признаки дистрофии и склерозирования, однако они менее выражены, чем в предыдущей группе (доза 0,019-0,036 мг/имплантат).

Особенностью группы $\text{PTi}(\text{a-C})$ с чрКМБ-2 (0,127-0,193 мг/имплантат) на носителе, через 4-е недели после операции площадь зрелой костной ткани в центральных отделах порового пространства была небольшой, в целом она занимала 23,9% (6,5; 35,5). Однако к 16-и неделям отличия от предыдущего срока (4-е недели) были значительны – костное ложе с хорошо прослеживаемыми гаверсовыми каналами, остеоцитарным строением костной ткани. В области внедрения имплантата – зрелые костные балочки заполняли большую часть порового пространства (68,6% (60,2; 73,4)), метахромазия была незначительна (рисунок 5.3.2). Между костными балками располагался преимущественно жировой костный мозг.

У животных всех опытных групп через 16-ть недель после имплантации в поровом пространстве были обнаружены частицы ДКМ как в центральных областях, так и в периферических порах.

Через 4-16-ть недель после операции активность ЩФтерм в гомогенатах сегментов костной ткани, прилежащих к дефектам, увеличивалась во всех группах, по сравнению с интактной костной тканью. Между группами значимого отличия выявлено не было (таблица 5.3.1). За наблюдаемый период после операции не выявлено значимых изменений в активности КФтартр. Таким образом, локальное применение рчКМБ-2 приводит к увеличению активности ЩФтерм в костной ткани прооперированного сегмента.

Таблица 5.3.1 – Активности термолabileйной щелочной фосфатазы в костной ткани при внедрении пористых титановых имплантатов, содержащих рЧКМБ-2
Активность ЩФтерм, ЕД/1 г ткани, медиана (25-,75-квартили)

Группа/срок исследования	дефект костной ткани	PTi (a-C)МК	PTi(a-C), ДКМ и гиалуроновая кислота	PTi(a-C), ДКМ, чРКМБ-2 0,031-0,036 мг/имплантат	PTi(a-C), ДКМ, чРКМБ-2 0,063-0,068 мг/имплантат	PTi(a-C), ДКМ, чРКМБ-2 0,132-0,193 мг/имплантат
интактная костная ткань 0,40 (0,24; 0,44), n=6						
4-е недели	2,20 (1,41; 2,40) n=4	1,82 (1,12; 2,74) n=4	3,09 (1,56; 3,32) n=4	1,58 (1,14; 2,56) n=6	2,09 (1,03; 2,39) n=5	1,33 (0,82; 2,32) n=6
16-ть недель	0,87 (0,75; 1,02) n=4	0,90 (0,86; 0,94) n=4	0,57 (0,75; 1,02) n=4	0,82 (0,75; 0,85) n=6	1,14 (0,86; 1,41) n=9	0,86 (0,6; 1,00) n=10

* $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем (незаполненный дефект)

** $p \leq 0,05$ по сравнению с положительным контролем (PTi₄₀(a-C)МК)

Исследование прочности блока «костное ложе – имплантат» на разрыв выявило, что через 4-е недели после операции при внедрении имплантатов она значимо выше, чем в отрицательном контроле (незаполненный дефект костной ткани). Более функционально зрелая костная ткань образовалась на границе «костное ложе-имплантат» при внедрении PTi₄₀(a-C) с миеокариоцитами и PTi₄₀(a-C) с чРКМБ-2 (0,054-0,068 мг/имплантат) (таблица 5.3.2).

Таблица 5.3.2 – Относительная прочность на разрыв новообразованной костной ткани в интерфейсе «костное ложе-имплантат»

Относительная прочность блока «материнская кость-имплантат», % (медиана, 25- и 75-процентиля)						
Группа/срок исследования	дефект костной ткани	PTi(a-C), миеокариоцитов	PTi(a-C), ДМК	PTi(a-C), ДКМ, чРКМБ-2 0,031-0,036 мг/имплантат	PTi(a-C), ДКМ, чРКМБ-2 0,063-0,068 мг/имплантат	PTi(a-C), ДКМ, чРКМБ-2 0,132-0,193 мг/имплантат
4-е недели	21 (14; 29) n=3	49 * (46; 82) n=3	36 * ** (34; 58) n=3	35 * ** (32; 45) n=3	47 * (33; 49) n=5	38 ** (23; 56) n=3
16-ть недель	40 (39; 41) n=3	64 * (64; 65) n=3	55 * ** (55; 56) n=3	46 * ** (42; 53) n=3	49 * ** (46; 50) n=5	63 * (51; 66) n=7

* $p \leq 0,05$ по сравнению с отрицательным контролем (незаполненный дефект)

** $p \leq 0,05$ по сравнению с положительным контролем (PTi₄₀(a-C)МК)

Через 16-ть недель после имплантации лучшие прочностные характеристики при исследовании на разрыв были выявлены при внедрении PTi₄₀(a-C) с миеокариоцитами и PTi₄₀(a-C) с чРКМБ-2 (0,127-0,193 мг/имплантат). Полученные результаты не противоречат данным авторов, показавших увеличение минеральной плотности костной ткани при локальном применении КМБ-2 [124].

При тестировании КМБ-2 на модели гетеротопической оссификации у безтимусных мышей между концентрацией КМБ-2 (на носителе ДКМ) и остеоиндуктивной активностью была выявлена линейная зависимость [612]. В проведенном нами эксперименте не выявлены морфологические и функциональные различия при применении дозы КМБ-2 ~40 нг/имплантат (остаточная активность ДКМ, содержащего КМБ-2 [62]), и чрКМБ-2 в дозе 0,019-0,036 мг/имплантат. Последующее удвоение дозы чрКМБ-2 до 0,063-0,068 мг/имплантат приводило к увеличению площади зрелой костной ткани и прочности новообразованной костной ткани на разрыв через 4-е недели после имплантации. Еще одно удвоение дозы чрКМБ-2 до 0,132-0,193 мг/имплантат приводило к значительному улучшению результатов через 16-ть недель после операции. Таким образом, в случае использования рчКМБ-2, вопрос используемой дозы приобретает принципиальное значение.

В результате выполненных исследований была показана перспективность сочетанного локального использования $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ в качестве матрицы и рчКМБ-2 в оптимальной дозе (0,063-0,193 мг/имплантат) на носителе ДКМ с гиалуроновой кислотой для активации репаративной регенерации кости.

5.4. Пористые титановые имплантаты, с алмазоподобной пленкой и гидроксиапатитом в порах

В качестве остеокондуктивной матрицы, вызывающей адгезию КМБ, остеобластов, индуцирующей минерализацию новообразованной костной ткани, а также представляющей депо минералов, ГА вызывает давний и постоянный интерес. Материалы на основе фосфатов кальция нетоксичны, биологически совместимы, обладают хорошими остеointеграционными свойствами, поэтому на основе ГА создают композиционные материалы, в том числе содержащие биополимеры, что увеличивает их прочность [551]. Разрабатывают технологии заполнения дефектов костной ткани твердеющими *in situ* материалами на основе ортофосфатов, ГА [13, 172]. Фосфаты кальция часто используют для создания покрытий для имплантатов [80, 100]. Появляются перспективные технологии нанесения фосфатно-кальциевых покрытий на титановые имплантаты.

Фазовый состав покрытия, размер зерна, кристалличность, оказывают существенное влияние на биологические свойства фосфатно-кальциевых покрытий. Установлено, что адгезия остеобластов зависит не только от типа частиц (кристаллический ГА или аморфный фосфат кальция), но и от их размера. Уменьшение частиц до наноразмера и снижение их кристалличности способствует улучшению адгезии, активирует пролиферацию остеобластов и подавляет апоптоз [500, 594, 495]. Имеются данные, что *in vivo* нанофазные покрытия на основе

фосфатов кальция также улучшают остеоинтеграцию пористых имплантатов [385]. Однако в ряде работ отмечается, что наногидроксиапатит в виде покрытия на титановых образцах и частиц, введенных в трехмерную матрицу, снижает количество адгезировавших остеобластов [567, 551].

Задачей данного фрагмента было обоснование применения $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ с осажденными из водной среды на поверхность пор наночастицами гидроксиапатита, насыщенных аутологичными миелокариоцитами, увеличенными в количестве культивированием в течение 14 суток ($\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$), для стимуляции репаративного остеогенеза на модели дефекта большеберцовых и бедренных костей кроликов.

Для решения поставленной задачи были проанализированы результаты внедрения в большеберцовые и бедренные кости кроликов $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ в качестве контроля и $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$.

Подробное морфологическое описание репаративной регенерации при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ приведено в 3-й главе. Особенности, выявленные при исследовании гистологических препаратов через 4-е недели после имплантации $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$, заключались в следующем – кортикальная пластинка была восстановлена, но новообразованная ткань имела дистрофические изменения большие, чем при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, ее высота оставалась меньшей, чем до операции. Костная ткань ложа имплантата с выраженными признаками дистрофии. На границе у 3-х из 5-и животных между костным ложем и имплантатами были обнаружены ограниченные по протяженности участки тонкой клеточно-волокнутой прослойки. Признаков отторжения инородного тела – гигантских многоядерных клеток – не обнаружено. При внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ новообразованная костная ткань занимала не все поровое пространство имплантата. В области внедрения имплантата располагалась незрелая костная ткань (костный матрикс был с выраженной базофилией неравномерно окрашенный), единичные дистрофичные трабекулы (рисунок 5.4.1), частицы гидроксиапатита (в центральных отделах импланта и по периферии данной области). Площадь, занимаемая зрелой костной тканью, составляла 50,4% (49,8; 50,9), что было меньше, чем у кроликов с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ – 56,8% (55,0; 58,7), однако отличия носили характер тенденций.

При полуколичественной оценке местной реакции на внедрение имплантатов среднее количество баллов в группе составляло – 4,1 (2,0; 4,5), что значимо превышало среднее количество баллов в группе $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ – 0,5 (0; 1). Наиболее часто в области интерфейса «костное ложе – имплантат» обнаруживались признаки воспаления с минимальной степенью активности – наличие макрофагов до 5-и клеток в скоплении (в 5-и случаях из 5-и), других иммунокомпетентных клеток (у 3-х кроликов из 5-и); ограниченную по протяженности фиброзную прослойку между костным ложем и имплантатом (у 3-х из 5-и кроликов),

инородные вещества (у 5-и из 5-и кроликов). По условиям данного эксперимента через 4-е недели после операции на исследуемые образцы $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ у 1-го кролика из 5-и не выявлена реакция раздражения, у 4-х кроликов из 5-и, выявлено легкое раздражающее действие $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ [54].

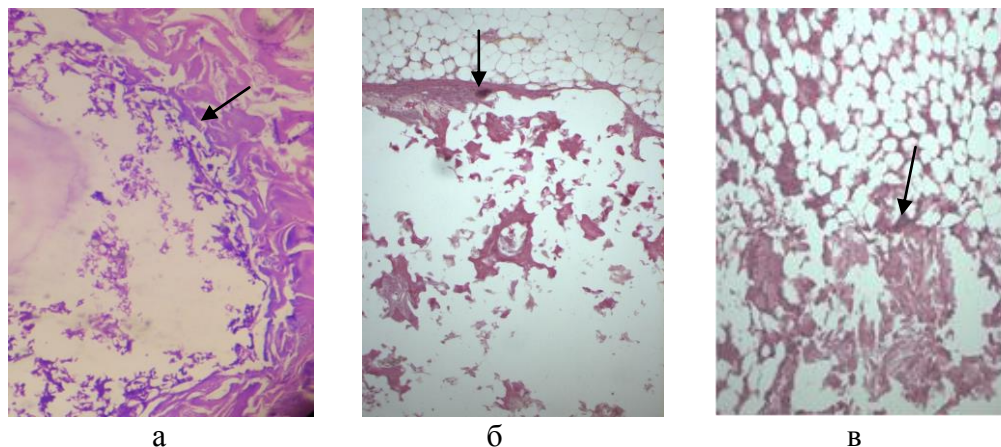


Рисунок 5.4.1 – Кролики, бедренные кости. Имплантация $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА}$. Титановые матрицы вытравлены. а, б, в – гистологические срезы. Окраска гематоксилин-эозином.

Ув. x 100. СМ-микрофото. Границы зоны внедрения имплантата – стрелки.

а – 4-е недели после операции. Незрелая костная ткань, единичные дистрофичные трабекулы.

б – 16-ть недель после операции. в – 52-е недели после операции

Через 16-ть недель после имплантации $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ методом растровой электронной микроскопии выявлено, что сообщающиеся с поверхностью поры заполнены новообразованным васкуляризованным костным веществом с большой плотностью (рисунок 5.4.2). При морфологическом исследовании препаратов из $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ выявлено, что кортикальная пластинка по-прежнему имеет признаки дистрофических изменений. В костном ложе признаки дистрофии и склероза. Поровое пространство заполнено трабекулами костной ткани различной степенью зрелости, часть из них с явлениями дистрофии и склероза, значительная часть трабекул имеет четко выраженное пластинчатое строение. Костные трабекулы были значительно более плотные, чем в предыдущем сроке исследования и при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, количество остеогенных клеток снижалось, клетки располагались в плоских лакунах, матрикс был слабо, но более равномерно окрашенным. Площадь, занимаемая зрелой костной тканью, составляла 58,6% (57,5; 64,4) и не отличалась от данного показателя в группе $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. Между трабекулами располагался костный мозг, преимущественно миелоидный (рисунок 5.4.3).

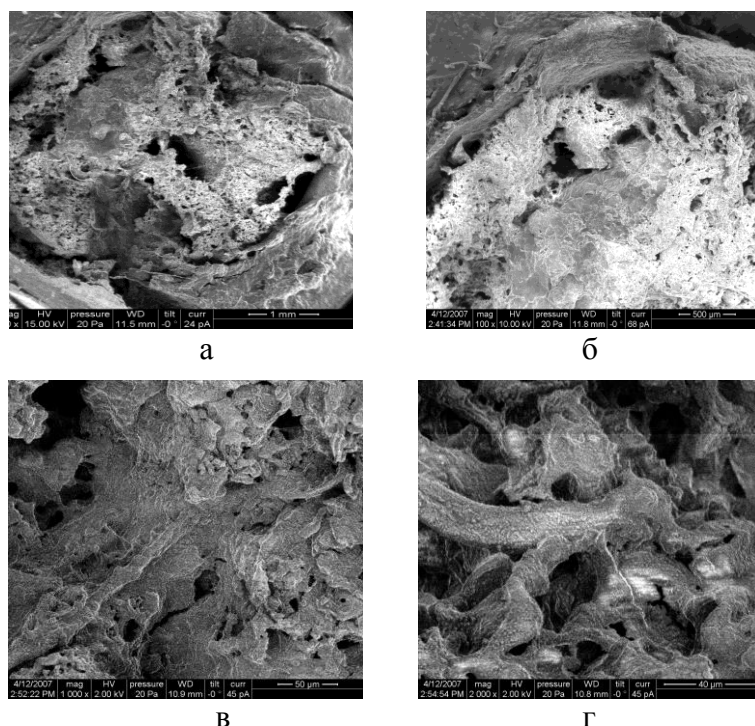


Рисунок 5.4.2 – Кролик. Имплантат – ПТi₄₀ГА-МК. Титановая матрица вытравлена. СЭМ – микрофото. 16-ть недель после операции. а – блок «костное ложе – имплантат с образованной в порах костной тканью». б, в, г – участки этого же блока

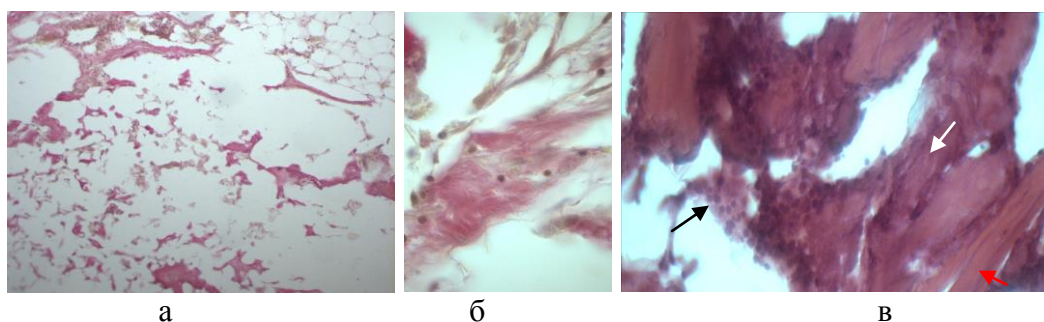


Рисунок 5.4.3 – Кролики. Имплантаты - ПТi₄₀(а-С)ГА-МК. Область внедрения имплантата. Титановые матрицы вытравлены. Гистологические срезы. Окраска гематоксилин-эозином. а – Ув.х40, б, в Ув. х 200. СМ – микрофото. а, б – 4-е недели после операции, единичные трабекулы; б – трабекулы ретикулофиброзной костной ткани, в – 16-ть недель после операции. Костное вещество более зрелое и плотное – молодые трабекулы с метакромазией окраски (белая стрелка), между трабекулами расположен миелоидный костной мозг (черная стрелка), зрелая трабекула с остеоцитами (красная стрелка)

Выявляются места сращения новообразованных трабекул с костным ложем. Признаков отторжения имплантатов не выявлено.

При полуколичественной оценке местной реакции на внедрение имплантатов среднее количество баллов в группе составило – 3,5 (2,5; 4,5), что значительно превышало среднее количество баллов в группе ПТi₄₀(а-С)МК – 0 (0; 0). Наиболее часто в области интерфейса «костное ложе – имплантат» выявляли признаки воспаления с минимальной степенью

активности – редкие макрофаги до 5-и клеток в скоплении (в 3-х случаях из 4-х), другие иммунокомпетентные клетки до 5-и в скоплении (у 2-х из 4-х кроликов); ограниченную по протяженности фиброзную прослойку между костным ложем и имплантатом (у 2-х из 4-х кроликов), инородные вещества – частицы гидроксиапатита (у 3-х из 4-х кроликов). По условиям данного эксперимента через 16-ть недель после имплантации у 1-го кролика из 4-х на исследуемые образцы $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ не выявлено реакции раздражения, у 3-х кроликов (75%) выявлено легкое раздражающее действие $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$, что также значительно больше, чем в группе $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ – 10%.

Через 52-е недели после имплантации $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ кортикальная пластинка была восстановлена. Новообразованная костная ткань в порах имплантата и костное ложе склерозированы, больше, чем при имплантации с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. В порах обнаруживались небольшие частицы гидроксиапатита. Зрелая костная ткань занимала 63,4% (62,6; 66,2) площади, что было сопоставимо с группой $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ – 66,1% (65,9; 68,4).

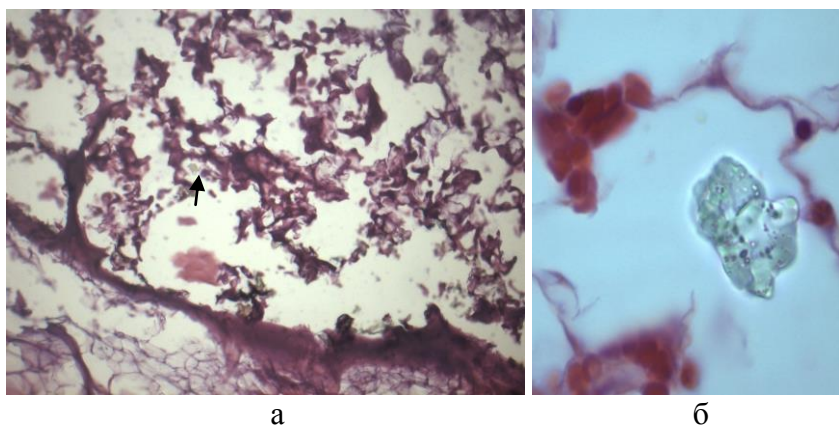


Рисунок 5.4.4 – Кролик. Имплантат – $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$. 52-е недели после операции. Титановая матрица вытравлена. Гистологический срез. Окраска гематоксилин-эозином. а – Ув.х40, б – Ув.х 400. СМ – микрофото. а – костное ложе и зона внедрения имплантата. Костное вещество различной степени зрелости заполняют все поровое пространство, частица нерезорбированного гидроксиапатита (стрелка). б – частица гидроксиапатита

При полуколичественной оценке местной реакции на внедрение имплантатов среднее количество баллов в группе составляло – 1(0; 1,0), по сравнению с группой $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ – 0 (0; 0). В области интерфейса «костное ложе-имплантат» выявляли частицы гидроксиапатита (у 3-х кроликов из 6-и). По условиям данного эксперимента через 52-у недели после имплантации у 6-и кроликов из 6-и на исследуемые образцы $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ реакции раздражения не выявлено [54].

Меньшая скорость заполнения внутреннего порового пространства $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ костной тканью имеет несколько возможных объяснений. Во-первых, наиболее вероятно это связано с протяженной во времени биodeградацией синтетического гидроксиапатита во

внутрипоровом пространстве и медленным замещением его новообразующейся костной тканью.

Действительно, при исследовании внутреннего объема порового пространства даже через 52-е недели после внедрения $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ мы обнаруживали небольшие конгломераты нерезорбированного ГА. Процесс дегградации ГА подробно описан в литературе. Начиная со 2-10-х суток в зону введения ГА мигрировали мононуклеары крови – макрофаги и лимфоциты. Макрофаги, в ряде случаев сливаясь, образовывали многоядерные клетки. В фагоцитах обнаруживали большое количество гранул, содержащих частицы ГА [82, 142, 557]. Через 20-ть суток после имплантации синтетического ГА с коллагеном в 3 мм костный дефект у кроликов часть ГА была не резорбирована, дефект был заполнен новообразованной костной тканью различной степени зрелости и соединительной тканью с большим количеством гигантских клеток. Выявленная картина мало отличалась от контроля (незаполненный имплантатом дефект костной ткани). Через 3-и месяца все дефекты были заполнены зрелой костной тканью, но включения ГА по-прежнему обнаруживали в зоне внедрения имплантата [170]. В нашем эксперименте процесс резорбции ГА, несомненно, замедлялся еще больше труднодоступностью для клеток моноцитарно/макрофагальной системы ГА в порах имплантата. А это в свою очередь привело к большей выраженности дистрофических изменений костной ткани (новообразованной и костного ложа) в силу более медленного восстановления микроциркуляторного русла и кровообращения в прооперированном сегменте. Вследствие этого выраженность склероза костной ткани, как новообразованной, так и костного ложа на поздних сроках наблюдения была значительной.

Выраженное увеличение концентрации неорганического фосфата в области растущей кости может оказать роль влияние на физиологию остеобластов. Так, описан эффект, который оказывает на культуру остеобластов неорганический фосфат в концентрации 1-7 ммоль/л – с увеличением концентрации и времени контакта количество жизнеспособных клеток уменьшалось. Возможный механизм – инициация апоптоза остеобластов и/или их задержка в G_0 -фазе (состояние покоя), уменьшающие пул пролиферирующих остеобластов [92, 238]. При использовании наночастиц гидроксиапатита с большой площадью поверхности происходит их более быстрое растворение, чем кристаллического ГА и более легкое проникновение частиц в клетки, что приводит к накоплению кальция в цитоплазме и вызывает ее некроз [410, 219]. Во внутреннем объеме порового пространства концентрация неорганических фосфатов может локально повышаться, особенно в центральных зонах.

В исследованиях Shi Z. et al. (2009) был продемонстрирован цитотоксический эффект и апоптоз клеток остеогенной саркомы, непосредственно связанный с размером наночастиц: при контакте клеток остеогенной саркома с наночастицами ГА размером 20 нм и 80 нм происходила

потеря контактов клеток с соседними клетками, уменьшение клеток в размерах, набухание митохондрий, изменение формы ядер и уплотнение хроматина. Нано частицы большего размера ГА (80 нм) продемонстрировали большую эффективность, чем наночастицы меньшего размера (20 нм). Во внутриклеточном пути передачи сигнала показано участие каспазы-9 [494, 495]. В нашем эксперименте наночастицы ГА имели размер менее 50 нм, то есть могли инициировать апоптоз клеток остеобластического дифферона.

Основываясь на собственных результатах и литературных данных, мы предлагаем нарушение баланса процессов пролиферации и дифференцировки остеогенных клеток-предшественниц костной ткани и минерализации костной ткани под влиянием локального воздействия наночастиц синтетического ГА. Результаты, выявленные в ходе данного эксперимента – снижение скорости заполнения внутреннего порового пространства костной тканью на ранних сроках наблюдения (4-е недели после операции), и, как следствие, более низкая прочность на разрыв блока «костное ложе – новообразованная в ПТi₄₀(а-С)ГА кость» через 4-16-ть недель по сравнению с ПТi₄₀(а-С)МК. Развитие склероза новообразованной костной ткани (через 16-ть недель после операции) с прогрессированием этого процесса в дальнейшем.

Подтверждают наше предположение следующие доказанные факты: а) ГА снижает экспрессию Runx/Cbfa1 [351, 240] в костной ткани, прилежащей к внедренному титановому имплантату с ГА покрытием. Снижение экспрессии Runx/Cbfa1 вызывает торможение дифференциации линии мезенхимальных клеток – от МСК до преостеобласта [137]. б) ГА стимулирует дифференцировку преостеобластов в остеобласты (увеличивает экспрессию генов остеокальцина, связывающего ионы кальция, коллагена I типа [240], ЩФ [351], что свидетельствует о завершении дифференцировки остеобластов, потери их способности к пролиферации и активации регуляции минерализации матрикса. в) Далее ГА не тормозит дифференцировку остеобластов в остециты (в остеобластах Runx/Cbfa1 задерживает дифференцировку в остециты и продлевает их синтетическую активность [137], а экспрессия Runx/Cbfa1 при контакте с ГА снижается. В результате уменьшается количество пролиферирующих остеогенных клеток-предшественниц, период синтетической активности остеобластов также уменьшается, а регуляторное влияние на минерализацию костной ткани возрастает.

Косвенно данная гипотеза подтверждается исследованием соотношения кальция и фосфора в новообразованной костной ткани в области внедрения имплантата. При внедрении ПТi₄₀(а-С)МК через 16-ть недель после операции соотношение Са/Р в области внедрения имплантата, соответствующей расположению кортикальной пластинки, составляла $1,9 \pm 0,5$

вес.%, при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ – $2,0 \pm 0,07$ вес.%. В интактной компактной костной ткани кроликов соотношение Ca/P было 2,5 вес.%, в губчатой костной ткани – 1,8 вес.%.

Относительная прочность костной ткани на границе «костное ложе – имплантат» на разрыв на ранних этапах эксперимента (4-16-ть недель после имплантации $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$) уступает прочности композитов, образованных при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, к 52-м неделям при испытании прочности на разрыв системы «кость-имплантат» отличий между данными группами не найдено (таблица 5.4.1).

Таблица 5.4.1 – Значения относительного предела прочности на растяжение новообразованной костной ткани на границе «костное ложе – имплантат» по сравнению с нативной костью

Срок исследования /тип имплантата	$\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, %	$\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$, %
4-е недели после операции	69; 43; 58	44; 38; 40
16-ть недель после операции	71; 62; 72	51; 54; 39 *
52-е недели после операции	88; 99; 114; 96	89; 93; 90

* $p \leq 0,05$ – по сравнению с группой $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$.

Причиной низкой прочности системы кость-имплантат при имплантации $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ может быть воспаление, вызванное присутствием твердых частиц, инициирующее в свою очередь резорбцию костной ткани в интерфейсе кость-имплантат. Ряд исследователей отмечает, что до настоящего времени вопрос о влиянии наночастиц на границе имплантат-кость остается открытым и необходимо дальнейшее изучение влияния наночастиц на жизнеспособность клеток, остеолитический процесс, а также понимание достоинства и недостатков нанотехнологий в ортопедии [223, 385].

Кроме того, вероятно чисто механическая причина меньшей прочности блока кость-имплантат при использовании внедренного в поры порошка ГА на ранних этапах после операции. Между новообразованной костной тканью и титановой матрицей располагался слой ГА, который не имел сцепления с поверхностью металла. При разрыве блока кость-имплантат происходило смещение слоя ГА и разрыв блока. Через 52-е недели после операции большая часть ГА была утилизирована фагоцитирующими клетками организма, соответственно и прочность блока кость-имплантат стала сопоставима с прочностью новообразованной кости в имплантатах без внедренного порошка гидроксиапатита.

Одним из убедительных аргументов биоинертности внедряемого имплантата являются минимальные изменения клеточного состава и структуры регионарных лимфатических узлов, в связи с этим мы изучили изменения микроархитектоники лимфатических узлов и их клеточного состава в различных функциональных зонах в ответ на внедрение $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$.

Подробное описание морфологической картины лимфатических узлов при внедрении ПТi₄₀(а-С)МК приведено в 4-й главе.

Особенности морфологии лимфатических узлов, обнаруженные у животных, с внедренными в опытную конечность ПТi₄₀(а-С)ГА-МК, через 4-е недели после операции были следующими – выраженность изменений структурно-функциональных зон и их клеточного состава была намного существеннее по сравнению с изменениями в лимфатических узлах группы ПТi₄₀(а-С)МК, наблюдалась картина реактивной гиперплазии лимфоузлов. Капсула отечна, в подкапсульных синусах значительное количество клеточных элементов. Кортикальное вещество расширено за счет фолликулярной гиперплазии и расширения межузелковых синусов с высокой плотностью клеточных элементов, коркового плато. Лимфатические фолликулы расширены, в них четко определялись расширенные светлые центры, краевые и мантийные зоны, последние истончены. В светлой зоне реактивных центров фолликулов, значительно увеличено относительное количество лимфобластов по сравнению с интактными животными до 172,7% ($p \leq 0,02$) по сравнению с интактными кроликами и значимые изменения по сравнению с ПТi₄₀(а-С)МК ($p \leq 0,017$).

При внедрении ПТi₄₀(а-С)ГА-МК корковое плато регионарных лимфатических узлов занимает в 1,5 раза большую площадь, чем у кроликов с ПТi₄₀(а-С)МК. Увеличена плотность клеточных элементов в корковом плато по сравнению с интактными кроликами (до 120,7%, $p \leq 0,02$) и по сравнению с ПТi₄₀(а-С)МК ($p \leq 0,017$) значительно увеличено относительное количество лимфобластов по сравнению с интактными животным (до 418,2%, $p \leq 0,017$) и с группой ПТi₄₀(а-С)МК ($p \leq 0,012$), соответственно количество лимфоцитов уменьшено (таблицы 5.4.2). обилие нейтрофилов ($p \leq 0,033$), эозинофилов ($p \leq 0,039$), макрофагов.

Паракортикальная зона лимфатических узлов была диффузно расширена у 3-х кроликов из 4-х при внедрении кроликам ПТi₄₀(а-С)ГА-МК, ее площадь увеличена до 192,0% по сравнению с интактными животными, но из-за большого разброса данных различия недостоверны. Увеличена плотность клеточных элементов в паракортикальной зоне по сравнению с интактными кроликами (до 138,5%, $p \leq 0,02$) и с животными, которым внедрили ПТi₄₀(а-С)МК ($p \leq 0,017$), преимущественно за счет молодых клеточных элементов – лимфобластов по сравнению с интактными кроликами (до 1114,3%, $p \leq 0,02$) и с животными с ПТi₄₀(а-С)МК; пролимфоцитов по сравнению с интактными кроликами (до 426,7%, $p \leq 0,02$) и с животными с ПТi₄₀(а-С)МК ($p \leq 0,017$); количество эозинофилов увеличено до 500% ($p \leq 0,02$) по сравнению с интактными кроликами.

При внедрении ПТi₄₀(а-С)ГА-МК мозговое вещество было расширено, отечно у всех кроликов в данной группы. В мягкотных тяжах – венозное полнокровие, хорошо прослеживается инфильтрация плазмócитами, эозинофилами, макрофагами. Мозговые синусы расширены за

счет отека, в них большое количество клеточных элементов. В мозговом веществе были обнаружены комплексы жировых клеток, что обычно является следствием процесса, сопровождающегося гибелью клеток лимфатического узла. Выраженная плазмоцитарно-лимфобластная реакция. Последнее находит отражение в изменениях в лимфоцитогамме – значительное увеличение количества лимфобластов до 1133,3% ($p \leq 0,017$), пролимфоцитов – 533,3% ($p \leq 0,017$), плазмоцитов до 2160,0%. Значительное увеличение количества эозинофилов, макрофагов в мягкотных тяжах по сравнению с интактными животными и с животными с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ с миелокариоцитами.

Через 16-ть недель после операции у животных в морфологической картине лимфатических узлов была выявлена положительная динамика как у животных с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, так и при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$.

У животных, с внедренными в большеберцовые и бедренные кости $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$, через 52-е недели после операции морфологические характеристики большинства структур подколенных лимфатических узлов приближались к характеристикам лимфатических узлов у интактных кроликов. Исключение составляла паракортикальная зона лимфатических узлов, которая оставалась расширенной у животных обеих групп, с уменьшением относительного количества зрелых лимфоидных элементов. Отличие кроликов с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА}$, заключалось в повышенном количестве лимфобластов до 181,8% ($p \leq 0,008$) по сравнению с интактными животными.

Таким образом, в группе животных с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА}$ ответная реакция иммунной системы была значительно более выраженной на ранних сроках наблюдения. Ответ на внедрение имплантов в большеберцовые и бедренные кости носил комбинированный (клеточно-гуморальный) характер. К 52-м неделям наблюдения отличия между двумя группами $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ нивелировались.

5.5. Заключение

Для улучшения остеоинтеграции имплантатов возможно два принципиальных подхода: технические усовершенствования (применение новых и модернизация используемых средств фиксации, применение новых костно-замещающих материалов) и использование остеоиндукторов, в том числе, применение клеточных технологий.

Реализуя возможности технического усовершенствования $\text{PTi}(\text{a-C})$, мы исследовали *in vivo* имплантаты с различным объемом пор, используя в качестве экспериментальных животных овец. Было выявлено, что через 24-е недели после имплантации в порак $\text{PTi}(\text{a-C})\text{МК}$ образуется композит, прочность и упругие свойства которого отличались от исходных

прочности и упругости имплантатов. Эффективные механические свойства композита зависели от свойств его компонент – пористой металлической матрицы и костной ткани, однако отличались от них. С точки зрения биомеханики изменение упругих характеристик композита в результате заполнения пор имплантата костной тканью является показателем остеоинтеграции (монография).

Биомеханические испытания, образующихся композитов «PTi(a-C)-новообразованная в порах костная ткань», проводили на сжатие, поскольку напряжение сжатия относится к физиологическим гравитационным нагрузкам, испытываемым организмом человека и животных постоянно. Условный предел текучести, который является характеристикой прочности, к 52-м неделям после операции при внедрении в костные дефекты конечностей барана PTi₃₀(a-C)МК составлял 146,5 (123,9;149,9) МПа, PTi₄₀(a-C)МК – 128,9 (128,5; 129,4) МПа, PTi₅₀(a-C)МК – 99,2 (90,1;106,4) МПа. Через 52-е недели модуль Юнга, характеризующий упругие свойства данных образцов, не достигал показателей интактной кортикальной кости барана 11,1% (8,6; 11,3), 6,9 (6,2; 7,6), 2,8% (2,3; 3,2) и составлял 65,1%; 40,6% и 16,7% (при объемной доле пор 30%, 40%, 50% соответственно).

При внедрении имплантатов с пористостью 30% и 40% в дистальный отдел бедра человека максимальные напряжения при физиологической нагрузке (ходьба) и значительных нагрузках (интенсивный прыжок), испытываемые композитами, не будут превышать условные пределы текучести этих композитов. При внедрении PTi₅₀(a-C)МК имеется риск разрушения композитов при значительных нагрузках (интенсивный прыжок).

При предварительном насыщении PTi₄₀(a-C) прилипающей фракцией миелокариоцитов, к которой относятся и мезенхимальные стромальные стволовые клетки, с последующим культивированием их в течение 14-и суток для увеличения количества, на ранних сроках наблюдения после имплантации были выявлены признаки активации остеогенеза и васкуляризации образующегося регенерата, уменьшение дистрофических изменений в прилежащих к дефекту сегментах кости и новообразованной костной ткани, что отличало данных животных от контрольных (внедрение PTi₄₀(a-C)). Таким образом, PTi₄₀(a-C) может применяться в качестве скэффолда для трансплантации клеток в зону поражения кости.

В ходе исследования влияния рЧКМБ-2 (на носителе ДКМ с гиалуроновой кислотой), заполнявших поры PTi₄₀(a-C), кроликам были внедрены имплантаты с различными дозами рЧКМБ-2. После имплантации ни в одном случае не было выявлено очагов гетеротопической оссификации в прилежащих мягких тканях. При внедрении PTi₄₀(a-C), содержащих рЧКМБ-2 в оптимальной дозе (0,063-0,193 мг/имплантат), площадь, занятая зрелой костной тканью во внутреннем поровом пространстве имплантата, прочность на разрыв новообразованной кости на границе – «костное ложе – имплантат» были сопоставимы по сравнению с PTi₄₀(a-C)МК.

Полученные результаты указывают на перспективность локального использования рЧКМБ-2, содержащегося в порах $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$, для активации репаративной регенерации кости. Однако вопрос, используемой дозы рЧКМБ-2, имеет принципиальное значение.

При внедрении кроликам в большеберцовые и бедренные кости $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ на ранних сроках наблюдения (4-е недели после операции) выявлена меньшая скорость заполнения порового пространства костной тканью, меньшая ее зрелость, выраженные признаки дистрофии, в костном ложе, начиная с 16-и недель после имплантации - признаки склероза новообразованной костной ткани и костного ложа имплантата (более выраженные, чем у животных с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$), которые прогрессировали в последующем.

При полуколичественной оценке местной реакции на внедрение $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ через 4-16-ть недель после имплантации в 75-80% было выявлено легкое раздражающее действие $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$, что значительно превышало показатели у животных с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ (10%). Наиболее часто в области интерфейса «костное ложе – имплантат» выявляли признаки воспаления с минимальной степенью активности – макрофаги до 5-и клеток в скоплении, другие иммунокомпетентные клетки до 5-и в скоплении; ограниченную по протяженности фиброзную прослойку между костным ложем и имплантатом, инородные вещества – частицы гидроксиапатита. К 52-м неделям после операции отличия по сравнению с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ становятся незначительными. В зоне интерфейса «костное ложе – имплантат» были обнаружены частицы гидроксиапатита (у 3-х кроликов из 6). Через 52-ю неделю после имплантации у 6-и кроликов из 6-и на исследуемые образцы $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ не выявлено реакции раздражения.

Относительная прочность костной ткани на границе «костное ложе – имплантат» на разрыв на ранних этапах эксперимента (4-16-ть недель после имплантации $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$) уступает прочности композитов, образованных при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. К 52-м неделям после имплантации между данными группами не обнаружено отличий в прочности на разрыв системы «костное ложе – имплантат».

Ответ регионарных лимфатических узлов на внедрение $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ был выраженным и носил комбинированный (клеточно-гуморальный) характер. К 52-м неделям наблюдения отличия между двумя группами $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ нивелировались.

Таким образом, введение во внутренний объем $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ и осаждение на его поверхности наночастиц гидроксиапатита, полученных путем механоактивации, привело к ухудшению остеointеграционных свойств пористого титана с алмазоподобной пленкой.

ГЛАВА 6

**МОДЕЛИРОВАНИЕ МЕХАНИЧЕСКИХ СВОЙСТВ БЕДРЕННОЙ КОСТИ
ПРИ ОСТЕОИНТЕГРАЦИИ ПОРИСТЫХ ТИТАНОВЫХ ИМПЛАНТАТОВ
С АЛМАЗОПОДОБНЫМИ ПЛЕНКАМИ**

Одной из задач при разработке имплантатов является биомеханическое обоснование их надежности при использовании в клинике. Благодаря развитому математическому аппарату и возможностям современного программного обеспечения на основе метода конечных элементов возможно с достаточной точностью восстановить поле результирующих механических нагрузок и относительных деформаций костной ткани при имитации физиологических (ходьба, наклон, приседание и др.) и пороговых или критических нагрузок (быстрый бег, прыжки и др.).

При проведении расчетов в пакете ANSYS 16 мы использовали компьютерную 3D-модель бедренной кости человека. В качестве геометрических характеристик были взяты среднестатистические параметры бедренной кости: длина 45 см, общая площадь поверхности кости 716 см^2 , длина костно-мозгового канала 40 см, площадь его поверхности 510 см^2 , губчатая костная ткань занимает $\sim 20\%$ от общей длины кости (по 9 см в дистальном и проксимальном отделах) [520]. Внешний вид модели представлен на рисунке 6.1.

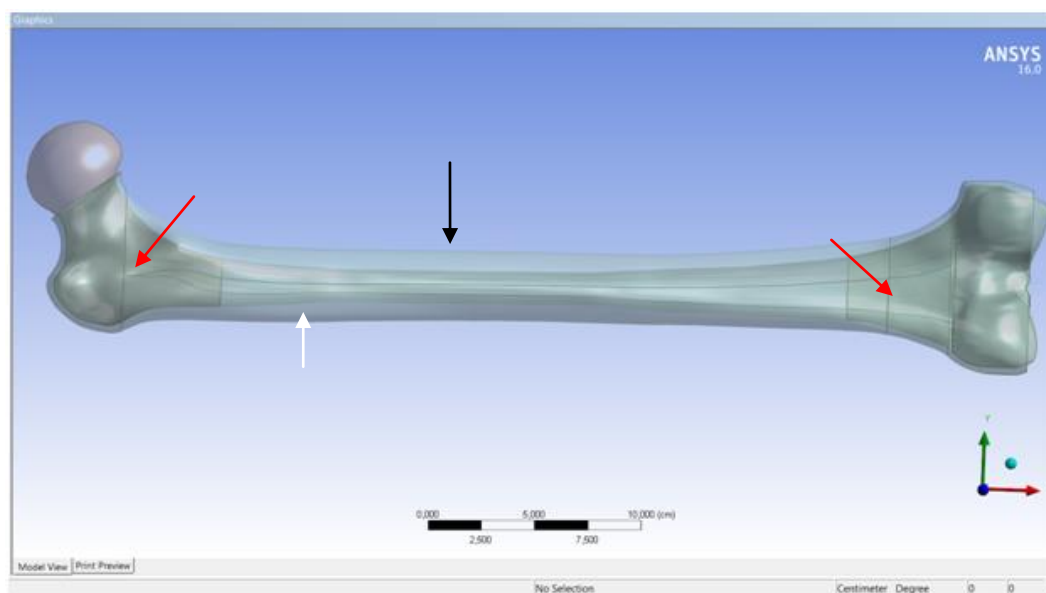


Рисунок 6.1 3D модель бедренной кости человека. Костно-мозговой канал – белая стрелка; кортикальная костная ткань – черная стрелка; губчатая костная ткань – красная стрелка

6.1. Физические характеристики материалов

Для моделирования механических свойств бедренной кости с внедренными в нее пористыми титановыми имплантатами были определены физические характеристики,

непосредственно связанные с прочностью кости, имплантата и композита «имплантат-кость»: плотность материала, модуль Юнга, коэффициент Пуассона, а также предельная прочность кости при одноосных нагрузках на растяжение и сжатие. Параметры кортикальной костной ткани, используемые в конечно-элементной модели, приведены в таблице 6.1. Параметры губчатой составляющей кости приведены в таблице 6.2. Костно-мозговой канал мы считали полым. Физические характеристики ПТi₄₀(а-С) представлены в таблице 6.3.

Таблица 6.1 – Параметры кортикальной костной ткани, используемые в расчетах

Параметр	Значение параметра	Источник
Плотность	2,1 г/см ³	[387, 277]
Модуль Юнга	17260 МПа	[493]
Коэффициент Пуассона	0,3	[209]
Предел упругости на растяжение	121 МПа	[387]
Предел упругости на сжатие	167 МПа	[387]
Предел прочности на растяжение	135 МПа	[387]
Предел прочности на сжатие	205 МПа	[387]

Таблица 6.2 – Параметры губчатой костной ткани, используемые в расчетах

Параметр	Значение параметра	Источник
Плотность	0,5 г/см ³	[426]
Модуль Юнга	80 МПа	[352]
Коэффициент Пуассона	0,28	[209]
Предел упругости на растяжение	11 МПа	[426]
Предел упругости на сжатие	15,5 МПа	[426]
Предел прочности на растяжение	13,5 МПа	[426]
Предел прочности на сжатие	19 МПа	[426]

Таблица 6.3 Физическо-механические характеристики пористых титановых имплантатов (ПТi₄₀(а-С))

Параметр	Значение параметра
Плотность	2,1 г/см ³
Модуль Юнга	3470 МПа
Коэффициент Пуассона	0,3
Предел упругости на растяжение	95 МПа
Предел упругости на сжатие	110 МПа
Предел прочности на растяжение	120 МПа
Предел прочности на сжатие	143 МПа

Учитывая сопоставимость модулей Юнга бедренных костей овцы и человека (модуль Юнга бедренной кости человека составляет 14,7-19,7 ГПа, модуль Юнга бедренной кости овцы – 19,3 ГПа [468]), при характеристике базовых параметров композитов «ПТi₄₀(а-С) - новообразованная в порах костная ткань», использованы параметры прочности композитов, полученные в экспериментах на овцах.

Таблица 6.4 – Модуль Юнга композита «PTi₄₀(a-C)-новообразованная в порах костная ткань»

Срок формирования композита	Модуль Юнга, ГПа
24-е недели после операции	4,4
52-е недели после операции	7,0

6.2. Тестирование модели

Конечно-элементную модель бедренной кости человека проверяли на адекватность в среде ANSYS с использованием параметров, приведенных в таблицах 6.1-6.3. Тестирование проводили при вертикальных нагрузках, приложенных к головке бедра (в области прикрепления круглой связки) в размере, равном половине веса человеческого тела (~ 300 Н) (1) (рисунок 6.2). Указанная величина и направление нагрузки возникают в положении человека среднего веса стоя, когда вес равномерно распределен на обе ноги.

$$(60 \text{ кг} \times 9,81 \text{ м с}^{-2}) / 2 = 294,3 \text{ Н}, \quad (1)$$

где $m = 60 \text{ кг}$ – средняя масса тела человека,

$g = 9,81 \text{ м с}^{-2}$ – ускорение свободного падения.

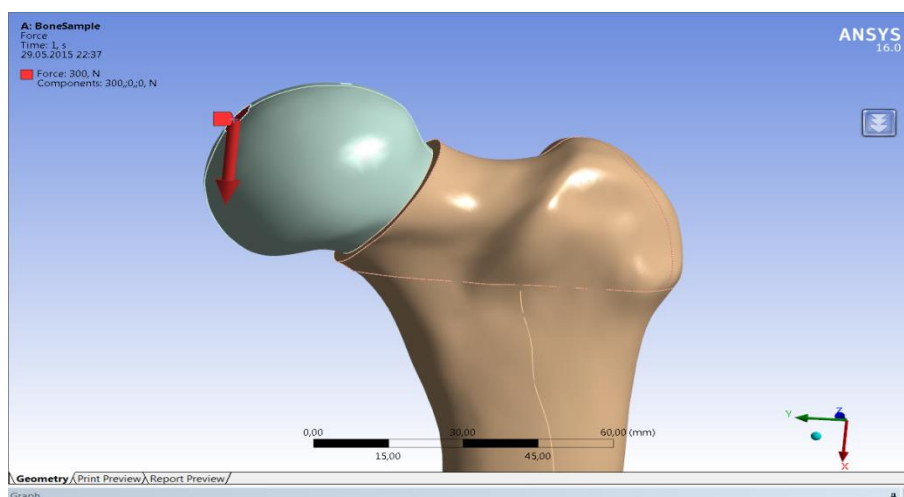


Рисунок 6.2 – 3D модель бедренной кости человека. Схема нагружения модели

Вертикальные нагрузки в размере 900 Н направляли на область головки бедра при моделировании краевого дефекта в области диафиза бедренной кости. Полученные напряжения и относительные деформации сопоставляли с имеющимися в литературе.

Оценку механической реакции кости в ответ на нагрузку проводили по трем параметрам:

- Maximum Principal Stress - наибольшее растягивающее напряжение (MPS), единицы измерения – МПа. При повороте системы координат можно свести распределение напряжений (нормальных и касательных) к эквивалентному распределению с нулевыми касательными напряжениями. В этом случае на элементарный объем будут действовать только напряжения, направленные по нормали, так называемые главные напряжения. Главные напряжения

вычисляются на основе нормальных и касательных напряжений в исходной системе координат с учетом угла поворота. Наибольшее растягивающее напряжение совпадает с наибольшим по длине среди всех нормальных напряжений в преобразованной системе координат. Согласно теории главных напряжений появление трещин (разрушение кости) происходит при превышении растягивающего (сжимающего) напряжения предела упругости при одноосном растяжении (сжатии) [164].

- Equivalent (von-Mises) Stress - эквивалентное напряжение по фон Мизесу. Единицы измерения – МПа. Граница текучести материала может быть задана уравнением относительно трех главных напряжений:

$$(u_1 - u_2)^2 + (u_2 - u_3)^2 + (u_1 - u_3)^2 = 2u_y^2 \quad (2)$$

где u_1, u_2, u_3 напряжения вдоль каждой из трех главных осей,

u_y – предел упругости при одноосном сжатии (растяжении)

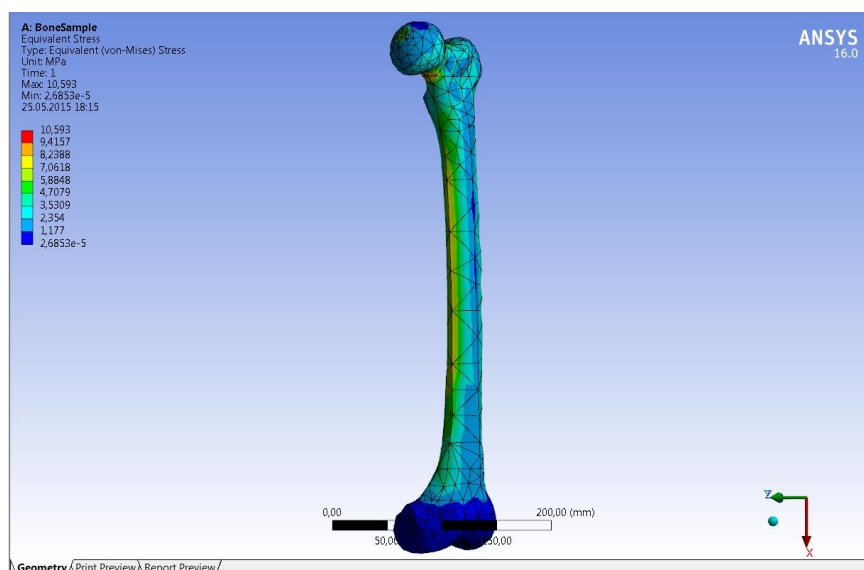
Такой подход применим для пластичных материалов (металлы и др.). Эквивалентное напряжение вычисляется, если поделить обе части уравнения (1) на 2 и извлечь квадратный корень.

$$u_y = \sqrt{\frac{1}{2} ((u_1 - u_2)^2 + (u_1 - u_3)^2 + (u_2 - u_3)^2)} \quad (3)$$

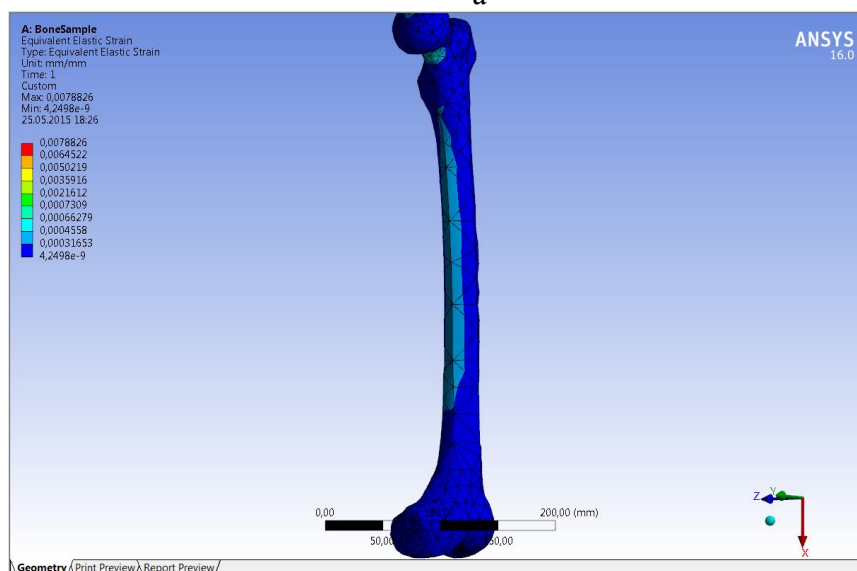
- Equivalent Elastic Strain – эквивалентная упругая деформация. Является безразмерной величиной, единица измерения 1 микрострейн = 10^{-6} . Относительное удлинение вычисляется как отношение разности длины, возникшей в результате деформации, и исходной длины. В трехмерном случае одномерные относительные удлинения, взятые в квадрат, суммируются, и из результирующей суммы берется квадратный корень. Одномерные относительные удлинения вычисляются по закону Гука сообразно с вычислением эквивалентных напряжений.

На первом этапе модельных экспериментов предполагали, что бедренная кость не имеет дефектов. Дистальный эпифиз фиксирован в пространстве (в пакете ANSYS был выбран тип механической связи Fixed Support). Фиксация элементов дистального эпифиза бедра является спорной, т.к. в коленном суставе возможны движения вокруг двух осей: фронтальной и вертикальной (последнее – в положении при согнутом суставе). Однако применение упрощенной модели при расчетах дает удовлетворительные результаты [196, 23].

При нагрузке 300 Н близкие к максимальным (для данного эксперимента) напряжения кортикальной пластинки (~ 7,0-10,6 МПа) возникают в области шейки бедра. По медиальной и латеральной поверхностям диафиза напряжения изменяются от 6 до 8 МПа. В зоне дистального метадиафиза (в зоне формирования в последующем дефекта) от 1,2 до 5,8 МПа (рисунок 6.3(a)).



а



б

Рисунок 6.3 – Конечно-элементная модель бедренной кости человека.
 а – эпюры напряжений в кортикальной костной ткани бедренной кости (МПа);
 б – распределение относительных деформаций (микрострейн) на модели бедренной кости

Под действием приложенной силы в бедренной кости развиваются относительные деформации, их распределение показано на рисунке 6.3 (б). Максимальные относительные деформации возникают в области шейки бедра (450-700 микрострейн) и по медиальной и латеральной поверхностям диафиза (300-450 микрострейн). В области дистального метадиафиза относительная деформация составляет менее 300 микрострейн. Полученные результаты согласуются с результатами экспериментов, описанных в работе [387]: у человека в положении стоя на двух ногах относительная деформация бедренной кости достигает 100-400 микрострейн. При действии вертикальной нагрузки на головку бедра напряженно-деформированное состояние определяется осевым сжатием и изгибом в латерально-медиальном направлении [14]. Небольшие отличия полученных нами результатов относительно результатов экспериментов

других авторов можно объяснить вариабельностью базовых параметров, используемых для моделирования, а также некоторыми различиями в условиях экспериментов (величина прикладываемых нагрузок, характер фиксации дистального эпифиза).

Краевой дефект бедренной кости человека моделировали с медиальной стороны дистального метадиафиза, что соответствовало схеме оперативного вмешательства при выполнении нами экспериментов *in vivo*. Дефект имел цилиндрическую форму, радиус основания - 10 мм, проникал в костномозговой канал.

Анализ напряжений и деформаций, возникающих в бедренной кости с дефектом, выявил, что характер максимальных эквивалентных напряжений в целом меняется. На рисунке 6.4 приведена визуализация эквивалентных напряжений в кортикальной костной ткани в области дефекта при нагрузке в 300 Н. В кортикальной костной ткани в области шейки бедра эквивалентные напряжения не меняются; в области переднемедиальной и заднемедиальной стенок дефекта возрастают почти в 2 раза, по сравнению с соответствующей областью интактной кости, и достигают 4-10,5 МПа. В губчатой костной ткани эквивалентные напряжения меняются незначительно и в проксимальном отделе стенок дефекта составляют 0,003-0,038 МПа. Области максимальных относительных деформаций (550-700 микрострейн) находятся в переднемедиальной и заднемедиальной стенках дефекта. В данной области интактной кости деформации были менее 300 микрострейн. В шейке бедра деформации не отличаются от деформаций, возникающих в интактной кости (550-700 микрострейн). Полученные результаты согласуются с интуитивной оценкой: основную механическую нагрузку несет кортикальная костная ткань, эквивалентные напряжения и относительные деформации концентрируются в области дефекта.

Поскольку значения максимальных напряжений зависят не только от величины прикладываемой нагрузки, но и от размера и локализации дефекта, с целью дальнейшей проверки адекватности предложенной 3D-модели были произведены расчёты напряженно-деформированного состояния, возникающего при формировании краевого дефекта диафиза бедренной кости человека длиной 6 см с угловым размером 180^0 [23] (рисунок 6.5). Фиксация в области дистального метадиафиза была жесткой. К головке бедренной кости прикладывалась вертикальная нагрузка 900 Н.

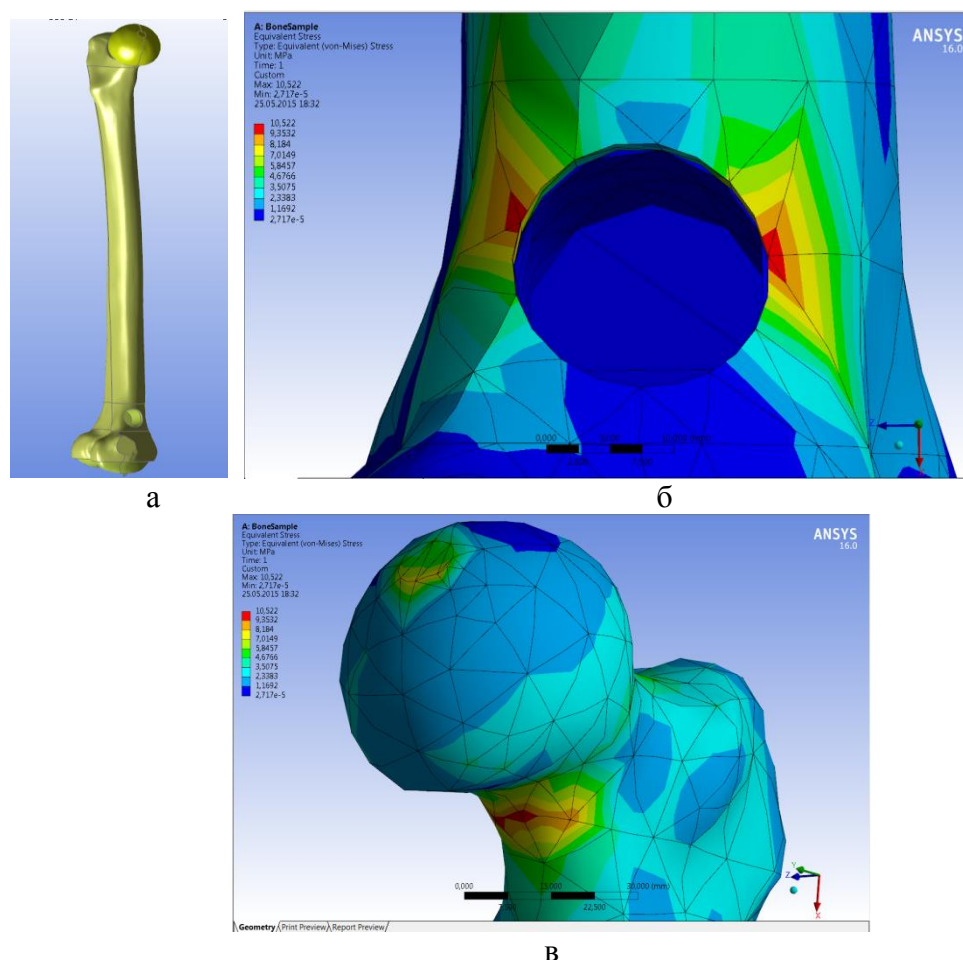


Рисунок 6.4 – Конечно-элементная модель бедренной кости человека.
 а - бедренная кость человека с дефектом в дистальном метафизе;
 б - распределение напряжений в кортикальной костной ткани области смоделированного дефекта (МПа);
 в - распределение напряжений в шейке бедренной кости (МПа)

Соответствующие распределения эквивалентных напряжений в области дефекта представлены на рисунке 6.5, их величина составляет 45 - 54 МПа. Полученные нами значения напряжений на 5-10 МПа ниже напряжений, полученных авторами [23], что обусловлено отсутствием в используемой авторами модели губчатой кости в области эпифизов.

При моделировании напряжений, возникающих в области внедрения $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, (радиус имплантата 10 мм) при нагрузке 300 Н процесс образования композита был разделен на два этапа. На первом этапе связь между имплантатом и костью была механической. Фиксация имплантата осуществлялась за счет силы трения металл-костное ложе.

На рисунке 6.6 визуализировано распределение эквивалентных напряжений в костном ложе на начальном этапе образования композита. Происходит частичное механическое замещение дефекта имплантатом - напряжения в области дефекта в кортикальной пластинке уменьшаются (по передне-медиальной и задне-медиальной стенкам дефекта, т.е. в области максимальных нагрузок в рамках данного эксперимента) с 4,0-10,5 МПа до 4,5-6,9 МПа, но

превышают значения напряжений в соответствующей области в кости без дефекта – 1,2-5,8 МПа.

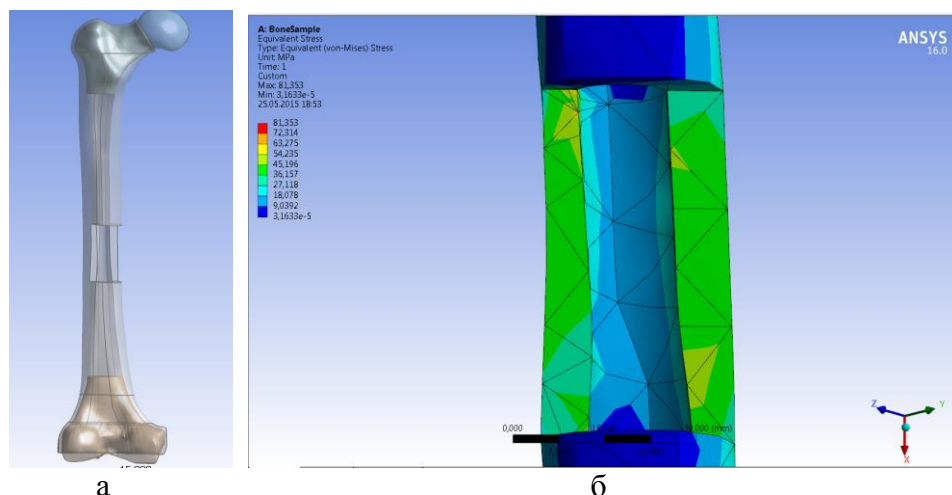


Рисунок 6.5 – Конечно-элементная модель бедренной кости человека.

а – моделирование краевого дефекта в области диафиза.

б – распределение напряжений в кортикальной костной ткани области дефекта диафиза

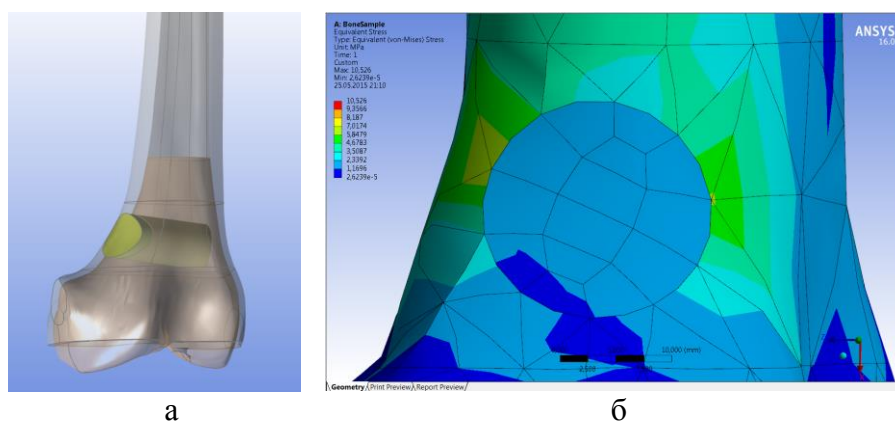


Рисунок 6.6 – Конечно-элементная модель бедренной кости человека после имплантации в дефект дистального метафиза $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. а – бедренная кость человека с имплантатом;

б – распределение напряжений в кортикальной ткани бедренной кости в области смоделированного дефекта и внедренного в него $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ (МПа).

Значения эквивалентных напряжений в кортикальной пластинке невелики, однако, относительные деформации кортикальной пластинки увеличиваются от 300 микрострейн в интактной кости до 350-700 микрострейн в бедренной кости с внедренным $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ при отсутствии интеграции имплантата. Это можно объяснить тем, что имплантат имеет меньшие значения пределов упругости и прочности, чем кортикальная кость.

На рисунке 6.7 визуализированы распределения эквивалентных напряжений в губчатой составляющей бедренной кости и ее относительные деформации. Концентрация напряжений и наибольшая относительная деформация отмечается вблизи верхне-медиальной стенки дефекта и составляет ~ 500-610 микрострейн.

Изменения напряженно-деформированного состояния бедренной кости, выявленные через 24 недели после имплантации незначительны, поэтому детально было проанализировано напряженно-деформированное состояние через 52 недели после имплантации $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. Максимальные эквивалентные напряжения в кортикальной ткани бедренной кости по-прежнему сосредоточены в шейке берда и на передне-медиальной и задне-медиальной стенках дефекта. В области дефекта их величина уменьшается до 3,5-5,9 МПа (рисунок 6.8) и незначительно отличается от величины напряжений, возникающих в интактной кости (1,2-5,8 МПа). Тем не менее, достаточно очевидно, что величина дефекта кости будет одним из факторов, определяющих диапазон напряжений, возникающих в костном ложе и в композите.

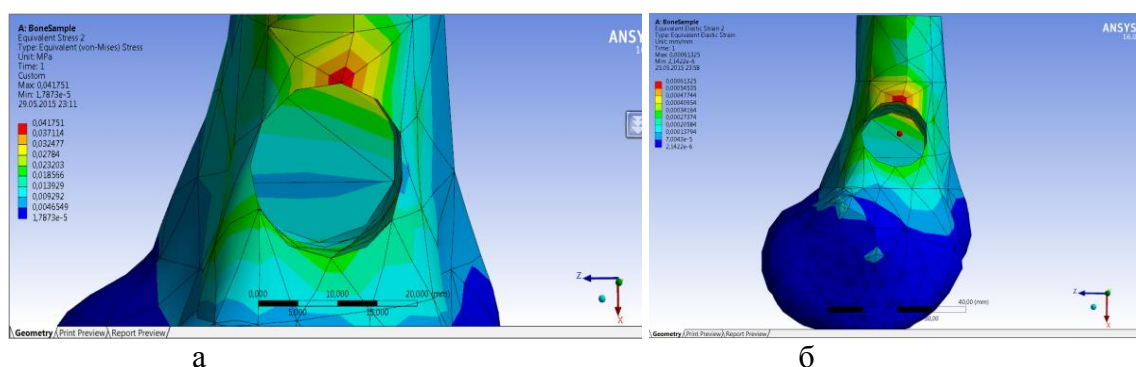


Рисунок 6.7 – Конечно-элементная модель бедренной кости человека с внедренным в дефект дистального метадиафиза $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. а – распределение напряжений в губчатой ткани бедренной кости человека с внедренным в дефект $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ (МПа); б – распределение относительных деформаций в губчатой ткани при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ (микрострейн)

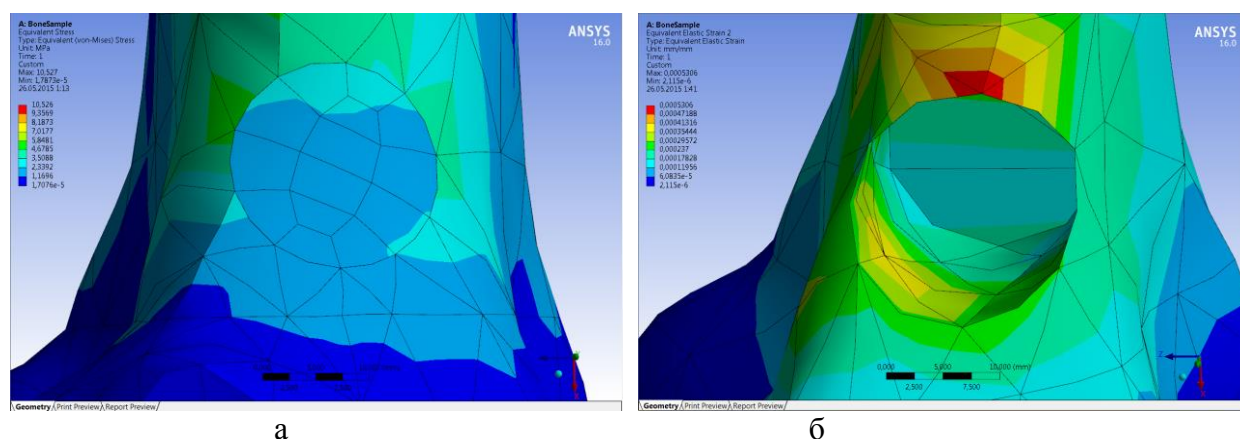


Рисунок 6.8 – Конечно-элементная модель бедренной кости человека с внедренным в дефект дистального метафиза $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ (52 недели после операции). а – распределение напряжений в кортикальной ткани бедренной кости в области внедренного $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ (МПа); б – распределение относительных деформаций в губчатой ткани бедренной кости в области внедрения $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ (микрострейн)

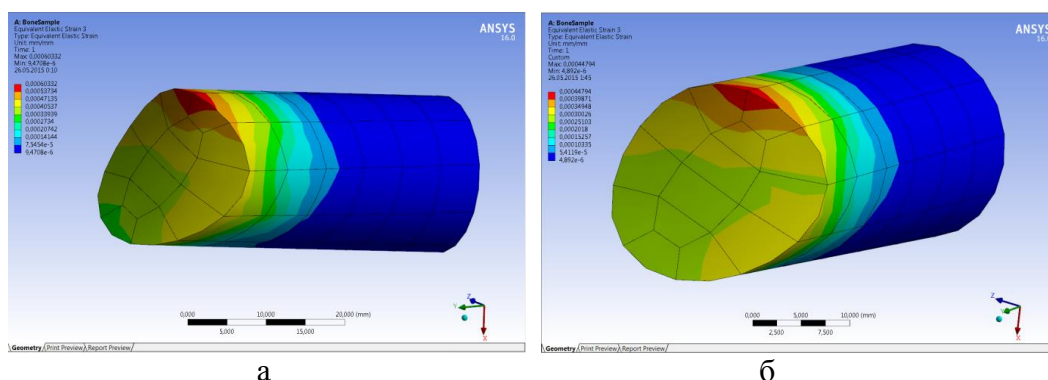


Рисунок 6.9 – конечно-элементная модель ПТi₄₀(а-С)МК а – распределение относительных деформаций непосредственно после имплантации (микрострейн), б – распределение относительных деформаций в композите «ПТi₄₀(а-С) – новообразованная в порах имплантата костная ткань» (микрострейн). 52 недели после операции.

Максимальные относительные деформации губчатой кости дистального метадиафиза изменяются незначительно в течение всего периода наблюдения: после операции - 550-600 микрострейн, через 52 недели после имплантации - 500-530 микрострейн. Для сравнения в интактной костной ткани 270-300 микрострейн.

Эквивалентные напряжения, возникающие в имплантате/композите максимальны в области, прилежащей к проксимальному участку ложа (рисунок 6.9), и увеличиваются со временем: непосредственно после внедрения ПТi₄₀(а-С)МК они составляют 0,9-2,0 МПа, через 52 недели – 1,2-3,1 МПа. Полученные результаты доказывают, что при образовании композита «имплантат-костная ткань» нагрузка со стенок дефекта частично перераспределяется на композит.

Относительная деформация ПТi₄₀(а-С)МК в области наибольших эквивалентных напряжений имеет порядок 500-600 микрострейн непосредственно после внедрения имплантата, относительная деформация композита через 52 недели после операции в этой же области составляет 400-450 микрострейн.

6.3. Заключение

По данным моделирования напряженно-деформированного состояния бедренной кости при вертикальных функциональных нагрузках максимальные величины напряжений развиваются в кортикальной костной ткани в шейке бедра и по медиальной и латеральной поверхностям бедренной кости.

При формировании краевого цилиндрического дефекта (радиусом 10 мм) в дистальном метадиафизе происходит перераспределение напряжений, развивающихся в бедренной кости: максимальные напряжения в кортикальной кости сосредоточены на передне-медиальной и

задне-медиальной стенках дефекта и в шейке бедра. В губчатой ткани – в верхней стенке ложа имплантата. Замещение дефекта $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ не приводит к перераспределению напряжений, возникающих при вертикальных нагрузках, однако уменьшает их величины в стенках дефекта в 1,3 раза на начальном этапе (в отсутствии остеоинтеграции имплантата). Образование композита « $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ - новообразованная в порах имплантата костная ткань» существенно уменьшает (~ в 2 раза для дефекта диаметром 20 мм) напряжения в кортикальной пластинке бедренной кости, которые к концу срока наблюдения незначительно отличаются от напряжений, возникающих в интактной кости в данной области.

Таким образом, универсальная программная система конечно-элементного анализа ANSYS 16.0, предназначенная среди прочего для решения задач механики деформируемого тела, позволяет провести индивидуализированное биомеханическое виртуальное планирование напряжений и деформации, развивающихся в кости с дефектами различной формы, величины и локализации, а так же при замещении их имплантатами. Сравнивая полученные результаты с разрушающими напряжениями, можно оценить перспективность использования имплантатов данного типа при дефектах определенной локализации и размера, необходимость дополнительной внешней фиксации конечности, сроки такой фиксации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Количество выполненных операций с замещением объема кости, с использованием имплантатов и костных трансплантатов, растет [233, 305, 349, 262], при этом использование аллотрансплантатов и ксенотрансплантатов имеет свои ограничения [10, 36]. Проблема замещения дефектов костной ткани костно-пластическими материалами и поиски факторов, инициирующих репаративные процессы, далека от решения и актуальна для современной реконструктивной хирургии, стоматологии и фундаментальных исследований в области морфологии [48, 64, 47].

Важнейшие свойства, которыми должен обладать материал, используемый для изготовления имплантатов костной ткани – это биосовместимость, отсутствие канцерогенности и иммуногенности, остеокондуктивность, остеоиндуктивность, достаточная прочность, чтобы временно не только заместить объем дефекта, но и взять на себя опорную функцию кости, биodeградация (без образования токсичных продуктов) со скоростью равной образованию костной ткани *de novo*, пористость, возможность стерилизовать имплантаты без изменения его качества, доступная цена [143, 62, 27, 95]. Однако пока такого материала для изготовления имплантов не создано, широкое распространение в качестве получили нерезорбируемые инертные материалы, такие как металлы.

Распространенность титана и его сплавов в качестве материалов для изготовления костных имплантатов, элементов крепления, используемых в ортопедии травматологии, челюстно-лицевой хирургии, стоматологии, определяется, прежде всего, его высокой биоинертностью и коррозионной стойкостью [24, 27], способностью к остеоинтеграции, способностью мезенхимальных стволовых клеток адгезировать, пролиферировать и дифференцироваться на поверхности титана [120, 78, 66, 184, 38]. Однако в связи с активным использованием титана и его сплавов для изготовления имплантов, накоплен экспериментальный и клинический материал, подтверждающий, что при внедрении в ткани организма, титан, как и другие металлы, подвергался коррозии [184, 412]. Частицы титана накапливались в прилежащих тканях [289] и распространялись макрофагами и с током лимфы и крови по организму. Эти результаты приобрели особое значение в свете появившихся новых сведений о том, что *in vitro* ионы Ti ингибировали экспрессию Runx2, Osterix и коллагена I типа в остеобластах и усиливали экспрессию RANKL и OPG в остеобластах и эпителиальных клетках. В концентрации 20 ppm ионы Ti снижали жизнеспособность остеобластов, остеокластов, эпителиальных клеток [415]. Данные концентрация являются клинически значимыми, поскольку в мягких тканях, прилежащих к зоне имплантации, титан был обнаружен в концентрациях 50-300 ppm [553, 412]. Следовательно, *in vivo* ионы Ti могут

проявлять прямые, а так же опосредованные, через активацию макрофагов, отрицательные эффекты на жизнеспособность, пролиферацию и функцию остеобластов и остеокластов, вызывать сенсibilизацию, что в результате оказывает большое влияние на биосовместимость и долговременную стабильность имплантатов.

Для повышения интегративных свойств имплантатов существует два принципиальных подхода: 1) технические усовершенствования (применение новых и модернизация используемых средств фиксации, новых костно-замещающих материалов и др); 2) применение пассивной (использование остеокондуктивных материалов для заполнения дефекта костной ткани) или активной стимуляции репаративной регенерации (трансплантация детерминированных остеогенных клеток; воздействие остеоиндукторами – костными морфогенетическими белками; воздействие факторами, активирующими остеогенез, например, TGF- β , инсулиноподобный фактор роста-I) [65]. Конечная цель - интеграция внедренных материалов с тканями организма и продолжительное функционирование образованного композита [65, 66, 36].

Учитывая вышесказанное, целью настоящего исследования была экспериментальная разработка и обоснование применения нового композитного материала «пористых титановых имплантатов, покрытых углеродсодержащими нерезорбируемыми алмазоподобными пленками», для замещения ими дефектов костной ткани без и в комбинации данных имплантатов с адгезированной на их поверхности прилипающей фракцией миелокариоцитов костного мозга; с внесением в имплантат стимулятора регенерации костной ткани - рекомбинантным человеческим морфогенетическим белком-2.

Пористые титановые имплантаты получили методом компактирования, из отсева гранул губчатого титана ТГ-120М (ГОСТ 17746-96, фракция -12 $\pm$ 2). Системы пор титана, содержала макроканалы сечением 100-500 мкм, распределенные случайным образом и поры, оставшиеся в спекаемых гранулах (2-5 мкм). Объемная доля пор составляла 30%, 40%, 50%; ~ 75% пор были сообщающимися с поверхностью. Использование пористых структур дает возможность вплотную подойти к решению одной из серьезных проблем ортопедии – биомеханического несоответствия между имплантатом и окружающей его костной тканью, которое приводит к появлению напряженно деформированного состояния на границе кость-имплантат, ухудшая процесс заживления кости, и нарушая процессы ремоделирования прилегающей костной ткани, в результате, создает условия для развития микроподвижности и инфицирования спицестержневых каналов [89, 146].

Пористые титановые матрицы (PTi₄₀) были покрыты алмазоподобными нерезорбируемыми пленками (a-C), полученными в вакууме импульсно-дуговым распылением графитовой мишени. Или композитными пленками, имеющими химический состав – азот-

углерод (CN_{25}), полученными при распылении графитовой мишени в атмосфере азота. Изменения свойств поверхности имплантатов, в том числе методом нанесения биоинертных или биоактивных покрытий является распространенным способом повышения их биоинертности [146, 41].

Однако имплантационные материалы не всегда способны обеспечить оптимальные условия для репаративной регенерации костной ткани (зрелый и пожилой возраст пациентов, сопутствующие заболевания костной системы, например, остеопороз, значительные размеры дефектов, множественные переломы и др.) в этом случае желательным является дополнительное использование остеогенных клеток-предшественниц, остеоиндукторов или стимуляторов остеогенеза.

Многочисленными экспериментальными и единичными клиническими исследованиями была доказана перспективность трансплантации на трехмерной матрице клеток мезенхимальной линии, предварительно увеличенных в количестве *in vitro*, для оптимизации течения репаративного остеогенеза [138, 7, 103, 68, 12, 303, 340, 339, 399, 279].

Показано, что ММСК имеют большой потенциал для замещения поврежденной костной ткани; при трансплантации остеогенные клетки предшественницы могут выживать и участвовать в регенерации, интегрируясь в состав костного регенерата, они располагаются преимущественно в периваскулярных тканях, дифференцируются в направлении хондро-, фибро- и остеогенеза, участвуют в реваскуляризации зоны поражения; трансплантация клеток-предшественниц позволяет стимулировать репаративные процессы собственных поврежденной тканей, улучшает механические характеристики регенерата [103, 68, 12, 303, 279].

Для оптимизации условий протекания репаративного остеогенеза мы насыщали $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{25})$ прилипающей фракцией аутологичных миелокариоцитов, содержащей остеогенные клетки-предшественницы, после чего увеличивали количество последних культивированием в течение 14-и суток. В качестве альтернативы трансплантации аутологичных клеток костного мозга был оценен эффект внедрения в поры $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ остеоиндуктора – рекомбинантного человеческого костного морфогенетического белка-2, связанного с декальцинированным костным матриксом и гиалуроновой кислоты использовавшихся, в качестве носителей.

Оценка цитотоксичности композитов $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{25})$ в культуре миелокариоцитов, свидетельствует, что жизнеспособность клеток при инкубации миелокариоцитов с образцами композитов $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_x)$ была выше, чем на образцах PTi_{40} . Отмечается большая адгезии миелокариоцитов на $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{25})$ и увеличение количества фибробластоподобных и кроветворных КОЕ при культивировании клеток костного мозга в присутствии образцов титана или на титановой матрице с углеродсодержащими

нерезорбируемыми пленками состава углерод (а-С) и углерод-азот (CN_{0,25}) по сравнению с титаном (контроль).

Клетки-предшественницы костного мозга, проникая в поры имплантатов, были способны к развитию, как в стромальные клетки, так и в кроветворные. В силу особенностей культуральной среды (она не содержала индукторов кроветворных клеток-предшественниц) развитие внесенных клеток шло преимущественно по пути дифференциации стромальных клеток-предшественниц в клетки стромы. Последние продуцировали компоненты экстрацеллюлярного матрикса. Примененная техника давала возможность формировать в порах имплантата единую структуру, состоящую из клеток и компонентов внеклеточного матрикса, полностью покрывающую внутреннюю поверхность пор к 17-21-м суткам культивирования.

При внедрении кроликам в костные дефекты ПТi₄₀МК, ПТi₄₀(а-С)МК и ПТi₄₀(CN_{0,25})МК уже через 4-е недели после операции, вырастающие в периферические поры из материнского ложа более зрелые костные трабекулы и более молодая костная, мозаичная по строению (трабекулы ретикулофиброзной и пластинчатая костная ткань) в центральных районах имплантата смыкались между собой. В результате через 4-е недели после операции большая часть сообщающиеся с поверхностью пор имплантатов при использовании всех тестируемых образцов была заполнена новообразованной костной тканью, что было продемонстрировано при исследовании шлифов блоков – «имплантат-новообразованная в порах ткань». Количественный расчет площади, занимаемой новообразованной тканью по сечениям блоков, после вытравливания титановой матрицы, подтвердил, что ~ 30% площади области внедрения имплантатов (т.е. площади, приходящейся на открытые поры) занято костной тканью.

Остеогенез обеспечивался в большей степени эндостальным механизмом образования кости *de novo*, а так же за счет остеогенных клеток – предшественниц из костного мозга, в меньшей степени – периостальным механизмом. Новообразование костной ткани в порах имплантата осуществлялось двумя путями, протекающими параллельно - контактно и дистантно преимущественно по десмальному типу.

Пористый металлический имплантат служил матрицей для аппозиционного роста кости в периферических отделах имплантата и вырастающих из материнского ложа сосудов, а так же для новообразования незрелой костной ткани в центральных отделах имплантата из мигрировавших туда остеогенных клеток-предшественниц. Результатом репаративного остеогенеза искусственных дефектов, заполненных пористыми титановыми имплантатами с покрытиями (а-С и CN_{0,25}) или без них, предварительно насыщенных миелокариоцитами, было – полное восстановление органотипической архитектоники кости в периферических отделах области внедрения имплантата и частичное – в центральных отделах.

Через 4 – 16-ть недель после операции при использовании имплантатов всех типов отмечалось восстановление кости как органа – восстановление 40-72% прочности; васкуляризация зоны дефекта, восстановление микроциркуляции во всем оперированном сегменте, о чем свидетельствовало уменьшение проявлений дистрофических изменений в костном ложе к 16-и неделям; образование костного мозга между трабекулами новообразованной костной ткани.

Костеобразование в интерфейсе «костное ложе – имплантат» и в во внутреннем поровом пространстве происходило активнее при использовании имплантатов с углеродсодержащими покрытиями, что выражалось по периферии области внедрения имплантата наличием распространенной сети молодых костных трабекул, сформированной по ходу пор, меньшей метакромазией матрикса новообразованной костной ткани, большей клеточностью новообразованных костных структур в ранние сроки наблюдения.

В прилежащих сегментах кости при использовании $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ через 4-е недели после операции количество остеогенных клеток, среднее количество клеток, экспрессирующих ЩФ и объемная доля площади преостеоцитов, экспрессирующих ЩФ, значимо превышало данный показатель по сравнению с интактной костной тканью, с группой животных с $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ и по сравнению с КД. В гомогенатах костной ткани в этот период так же было выявлено увеличение активности ЩФобщ и ЩФтерм по сравнению с интактной костной тканью, соответствующие изменения ЩФтерм были выявлены и в периферической крови. Динамика изучаемых показателей указывает на более длительную по времени активацию остеогенеза. При использовании $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ к 16-и неделям признаки затухания остеогенеза выражены – снижается активность ЩФ и ее термолабильной фракции в оперированном сегменте кости, количество клеток экспрессирующих ЩФ, их доля от общего числа остеогенных клеток. У животных, с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, с 1 по 24-й неделю после операции были выявлены признаки значительной активности остеогенеза. В конце срока наблюдения при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, (52-е недели после операции) некоторые признаки активация дифферона остеобластных клеток сохраняются (так, было увеличено количество остеогенных клеток в сопредельных к имплантатам сегментах костной ткани до 119%, $p \leq 0,033$; объемная доля остеогенных клеток, экспрессирующих ЩФ – 118%, $p \leq 0,033$).

В результате у животных с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ увеличение площади зрелой костной ткани во внутреннем поровом пространстве составило через 4-е недели - 56,8% (51,3; 62,7), через 16-ть недель - 59,6% (31,7; 61,5), к 52-м неделям после операции - 66,0% (65,9; 66,2).

Увеличение количества остеогенных клеток-предшественниц в костной ткани прооперированного сегмента, по сравнению с интактной костной тканью, сегментом кости с КД и с животными с $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ мы связываем с комплексом физико-химических особенностей а-С

пленки. Ее поверхность имеет доменную структуру. По краю домены декорированы цепочками пиков усеченной пирамидальной формы, образованные фрагментами пучков многослойных нанотрубок, высотой $\sim 150\text{-}200$ нм, отдельные конусовидные выступы могут достигать высоты более 300 нм. Толщина пучков нанотрубок может достигать 200 нм. Среднее расстояние между выступами составляет ~ 30 мкм [156].

По данным литературы при культивировании клеток остеобластического дифферона на наноструктурированной поверхности с размерностью более 30-50 нм и определенной формой шероховатости, происходит деформация клеток, в результате механические сигналы поступают в клетку и могут активировать несколько сигнальных путей – Wnt/ β -catenin, что приводит к ингибции рецепторов активируемых пролифераторами пероксисом- γ (PPAR γ) и SOX-9 (факторов транскрипции, активирующих адипогенез); митогенактивируемых киназ (киназ, активируемых экстрацеллюлярными сигналами (ERK1/2^{MAPK}), p38^{MAPK}), стрессактивируемых протеинкиназ (JNK) и сигнального каскада с участием цитоскелета клеток [263]. Происходит обязательное ингибирование экспрессии семейства транскрипционных факторов TWIST (-1 и -2), которые взаимодействуя с доменом ДНК Runx2, угнетают его активацию в ранних предшественниках остеобластов [231]. В результате все пути сходятся в точке экспрессии специфических генов: Runx2, Dlx5, Osterix, Msx2 (факторов транскрипции остеогенеза), запускающих остеогенную дифференцировку [25]. Помимо этого происходит увеличение экспрессии генов кодирующих ростовые факторы (КМБ-2, -4, -7, IFG-1, GM-CFG); матриксные белки – остеопонтин, остеокальцин, костный сиалопротеин, коллаген-1,-5,-11,-12 типов; ферменты – ЦФ, MMP-1; рецепторы к TFG- β , FGF, кальцитонину, белок, связывающий ингибитор ангиогенеза VAI1, белки актин, винкулин (белки цитоскелета, участвующие в образовании фокальный адгезий), регуляторный белок RAK (необходимый для стабилизации актина), WAVE1 (активаторы белкового комплекса – Arp2/3, полимеризующего актин в ламеллоподии [40]) и др. [263].

Однако при значительном увеличении размера шероховатости, «грубости» поверхности многочисленные линии клеток человека пролиферируют и дифференцируются менее активно [364].

Увеличение количества остеогенных клеток в прилежащих и имплантату сегментах кости могло быть обусловлено также снижением поверхностной энергии и соотношения ее полярной и дисперсионной компонент при нанесении а-С пленок на поверхность титана. Доля полярной компоненты а-С пленки составляет (0,24-0,43) и близка к оптимальному значению - 0,3 [460], вызывающему увеличение пролиферативной активности остеогенных клеток, что и

могло быть причиной более быстрого формирования костной ткани на границе имплантат-кость.

При полуколичественной оценке степени местного раздражающего действия на внедрение имплантатов через 4 недели среднее количество баллов в группе $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ составило - 0,5 (0; 1,0), против 1,0 (1,0; 2,0) при внедрении $\text{PTi}_{40}\text{МК}$. Наиболее часто выявляемые признаки местной реакции тканей различались при внедрении $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, если в первом случае - это были преимущественно посттравматические некротические изменения и образование в интерфейсе «костного ложа-имплантат» элементов соединительно тканной капсулы (в 28,5%), то при внедрении композитных имплантатов преимущественно были выявлены - минимальные проявления реакции сосудистого звена в виде 1-3 очагов неоваскуляризации (в 42,9%), и редкие скопления плазматических клеток (состоящие из 2-5-и клеток) (в 14,3%). Лишь в одном случае из 12 (8,3%) в интерфейсе «костное ложе – имплантат» были обнаружены элементы соединительно тканной капсулы, что было расценено нами как морфологический признак лучшей остеоинтеграции $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ по сравнению с PTi_{40} .

По условиям данного эксперимента у кроликов на исследуемые образцы $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ у 13-и кроликов из 14-и реакция была оценена как не раздражающая, у 1-го кролика выявлено легкое раздражающее действие имплантата [54]. Через 52-м недели после операции среднее количество баллов в группе составило 0 (0; 0) баллов, у 9-и кроликов из 9-и обследованных действие было оценено как не раздражающее.

Отличительные особенности при использовании имплантатов различных типов заключались в выраженности дистрофических и некротических процессов новообразованной костной ткани и костного ложа $\text{PTi}_{40}\text{МК} > \text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК} \approx \text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. Вероятно, данные отличия обусловлены большей скоростью заполнения дефекта новообразованными тканями, и, что особенно важно, прорастающими из материнского ложа сосудами. Как следствие – увеличение скорости и полноты восстановления кровоснабжения и микроциркуляции жидкости в костной ткани (новообразованной в области дефекта, а так же - в оперированном сегменте). Это предположение косвенно подтверждают данные литературы о том, что при культивировании мезенхимальных стволовых клеток на наноструктурированных поверхностях происходит увеличение экспрессии генов, кодирующих белки, опосредованно участвующие в регуляции ангиогенеза [263] например, трансмембранный рецептор фактора роста тучных клеток. Тучные клетки регулируют ангиогенез, секретируя факторы роста - VEGF, bFGF, TGF- β ; цитокины - TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8; нейтральные протеазы, гепарин, матричные металлопротеиназы, облегчающие проникновение эндотелиальных клеток в ткани; факторы хемотаксиса, взаимодействующие с моноцитами и лимфоцитами. На поздних стадиях наблюдения, вероятно, лучшие условия трофики тканей приводили к менее выраженным

склеротическим изменениям новообразованной костной ткани (16-52-е недели после операции), уменьшающихся в ряду $\text{PTi}_{40}\text{МК} > \text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК} \approx \text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ от средне выраженных до незначительных.

Минерализация новообразованной костной ткани у животных с $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ значимо не различались, однако отмечалась тенденция в увеличении соотношения Ca/P при использовании имплантатов с алмазоподобными пленками.

Прочность костной ткани при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ на границе «костное ложе – имплантат» на разрыв через 4-е, 16-ть недель после операции значимо превышала прочность костного блока при внедрении $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ и достигала 58% и 71% от прочности интактной кости, соответственно, что являлось следствием высокой активности остеогенеза и более быстрого восстановления кортикальных пластинок, хотя их высота к 16-и неделям оставалась меньшей, чем исходная (на $\sim 10\text{-}15\%$). К 52-м неделям различия по прочности блока «костное ложе – новообразованная в порах костная ткань» между группами, с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, нивелировались. Прочность через 52-е недели после операции не отличалась от прочности интактной кости.

В регуляции репаративной регенерации при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ были задействованы, локальные ростовые факторы и системные гормональные, что отличает данную группу от животных, с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$. Концентрация IGF-1 в периферической крови кроликов с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ увеличена в течение 16-и недель после операции, с максимумом изменений через 4-е недели - 405%, по сравнению с уровнем до операции. Аналогична динамика концентрация КМБ-2: через 4-е недели после операции она возрастает до 319,4% по сравнению с уровнем до операции и значимо превышает аналогичный показатель в группе $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ более чем в 2 раза. Эти данные косвенно подтверждают большую напряженность процессов репаративного остеогенеза и большую их протяженность по времени при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$.

При внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ активность остеогенеза в течение всего периода наблюдения была несколько ниже, чем у животных $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, однако значимо выше, чем в интактной костной ткани и у животных, с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$.

При полуколичественной оценке степени местного раздражающего действия на внедрение имплантатов среднее количество баллов в группе $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ составило - 0 (0; 1,0), через 52-м недели после операции - 0 (0; 0) баллов. Местного раздражающего действия на имплантаты $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ выявлено не было.

Прочность на разрыв на границе «костное ложе – имплантат» в течение 4-16-й недель после операции при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ превышала данный показатель у животных, с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, но уступала прочности костного блока с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$

(через 16-ть недель после операции). К 52-м неделям все отличия между группами по данному показателю нивелировались.

Важно отметить, что выявленные особенности репаративного остеогенеза при использовании определенного типа имплантата, обнаруживаются и в контралатеральных конечностях, однако выраженность этих изменений меньшая.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что алмазоподобная нерезорбируемая пленка является оптимальной для повышения биосовместимости титановых имплантатов, помимо этого данное покрытие обладает способностью стимулировать остеогенез за счет увеличения количества остеогенных клеток-предшественниц, и их функциональной активности. При моделировании дефекта метадиафизов большеберцовых и бедренных костей и внедрения пористых титановых матриц, насыщенных прилипающей фракцией аутологических миелокариоцитов, активность репаративного остеогенеза снижалась в ряду $\text{PTi}_{40}(\text{a-C}) > \text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25}) > \text{PTi}_{40} > \text{незаполненный дефект костной ткани}$.

При внедрении в дефекты пористых титановых имплантатов, насыщенных миелокариоцитами, были выявлены изменения в кроветворной, иммунной, костной системе, скелетных мышцах в течение всего периода наблюдения (52-е недели после имплантации).

При репаративной регенерации краевых дефектов костной ткани в периферической крови в послеоперационном периоде были выявлены - легкая степень нормохромной нормо- или микроцитарной анемии, тромбоцитоз. Изменения количества лейкоцитов и их клеточного состава были взаимосвязаны с периодами репаративного процесса костной и кроветворной тканей. У животных, с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$, обнаружено два периода увеличения количества лейкоцитов периферической крови – в послеоперационном периоде развивался нейтрофильный лейкоцитоз, через 16-ть недель после операции был выявлен лимфоцитарный лейкоцитоз. При внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ в отдаленном периоде (через 40-52-е недели после имплантации), в периферической крови был выявлен третий период увеличения лейкоцитов за счет увеличения количества нейтрофилов.

Через 52-е недели после внедрения имплантатов в костные дефекты в костном мозге, сопредельных к внедренным имплантатам сегментах бедренной кости, снижалось относительное количество молодых эритроидных клеток. Выраженность изменений увеличивалась в ряду $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК} < \text{PTi}_{40}\text{МК} < \text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$. Данные изменения компенсировались тенденцией к увеличению количества ядродержащих элементов костного мозга.

Отсутствие подавляющего действия тестируемых имплантатов на способность клеток костного мозга к образованию КОЕ-э, БОЕ-э подтверждают результаты исследования колониеобразующей активности миелокариоцитов. Количество коммитированных клеток-

предшественниц эритроидного ростка костного мозга, сегмента бедренной кости, прилежащей к имплантату, через 4-е недели после операции значительно увеличивалось при внедрении всех типов тестируемых имплантатов, преимущественно за счет КОЕ-э, данные изменения ассоциируются с костно-мозговой стадией компенсации анемии. После длительного контакта тканей конечности с внедренными костными имплантатами (52-е недели) количество КОЕ эритроидного ростка значительно не отличалось от данного показателя до операции.

В костном мозге прилежащего сегмента кости через 52 недели после имплантации $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ выявлено расширение гранулоцитарного ростка, сопровождающееся развитием лейкоцитоза в периферической крови.

Увеличение количества КОЕ-ГМ костного мозга через 52 недели после имплантации $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ (до 156,5%, $p \leq 0,013$; 164,7%, $p \leq 0,008$; 149,9%, $p \leq 0,02$ соответственно) по сравнению с уровнем до операции указывает на активацию гранулоцитарного ростка при внедрении имплантатов всех типов.

При внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ через 16-ть и 52-е недели, соответственно, после операции происходило значимое увеличение количества лимфоцитов костного мозга.

Колониеобразующая способность предшественниц фибробластоподобных клеток формировать колонии в культуре сохранялась после внедрения имплантатов до конца наблюдения - 52-е недели после имплантации.

Анализ показателей минерального обмена в периферической крови у экспериментальных животных выявил два периода снижения концентрации неорганического фосфата в сыворотке крови у животных всех групп. Гипофосфатемия (через 12-ть и 40-к недель после операции) несмотря на отсутствие изменения концентрации общего и ионизированного кальция (у кроликов, с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$). Внедрение в кости $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ приводит к более значительным изменениям – отмечено снижение концентрации общего кальция в периферической крови на поздних сроках наблюдения (16-я - 52-я недели после операции) по сравнению с уровнем до операции.

У животных всех групп выявлено два периода уменьшения концентрации магния в периферической крови в отдаленные сроки после операции (соответственно через 8-мь и 52-е недели после операции). Гипомагниемия через 8-мь недель соответствует тенденции к увеличению концентрации кальция в крови, что соответствует физиологическим пропорциям. Значимое снижение концентрации магния в крови, выявленное через 40-52-е недели после операции во всех группах животных может быть обусловлено повышением концентрации глюкокортикоидов и катехоламинов на фоне хронического асептического воспаления в зоне внедрения имплантатов.

Методом рентгеноспектрального анализа через 16-ть недель после внедрения в метадиафизы большеберцовых и бедренных костей $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ выявлено значимое увеличение концентрации титана в *m. tibialis anterior* и *m. adductor magnus* до 150,0% (116,7; 166,0) по сравнению с интактными животными. При внедрении пористых титановых имплантатов с алмазоподобными пленками ($\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$) увеличения концентрации титана в названных мышцах не выявлено (соответственно 93,5% (73,6; 101,3; $n=7$) и 108,4% (83,3; 129,2; $n=8$)) по сравнению с контрольными образцами.

Ионы многих металлов (Zn, Co, V, Cd, Ni) оказывают влияние на активность ферментов (глутатион-3-трансфераза, глутатионредуктаза, лактатдегидрогеназа, щелочная фосфатаза [82, 70, 77]. К 52-й неделе после операции активность ферментов - ЛДГц, НАД-МДГц НАД-МДГм, СДГ соответствовали активности данных ферментов у интактных животных. Через 52-е недели наблюдения не выявлено значимых отличий между активностью ферментов в костной ткани при КД и при внедрении пористых титановых имплантатов, а так же различий между животными с внедренными титановыми имплантатами без покрытий и с алмазоподобными покрытиями, что мы расцениваем как свидетельство отсутствия значимого изменения активности исследуемых ферментов при длительном контакте костной ткани с пористыми титановыми имплантатами. Однако выявленное накопление пирувата в костной ткани и значительная активация СДГ (через 52-е недели наблюдения) указывают на изменение характера метаболизма в сегментах костей, прилежащих к сформированным дефектам, причем в большей степени при внедрении в дефекты пористых титановых имплантатов.

Активности исследуемых ферментов (общей ЛДГц, общей НАД-МДГц и НАД-МДГм, КФК, СДГ) в *m. tibialis anterior*, прилежащей к прооперированному сегменту большеберцовой кости, при имплантации $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ и при формировании КД через 52-е недели после операции не отличалась от их активности у интактных животных.

Оценка динамики морфологических, морфометрических параметров, цитоархитектоники структурно-функциональных зон регионарных лимфатических узлов 1-го этапа для тазовых конечностей [161] в ответ на внедрение имплантатов всех тестируемых типов, насыщенных миелокариоцитами показала, что гистологическая картина подколенных лимфатических узлов была сохранена, клеточная атипия отсутствовала. Выраженность изменения структурно-функциональных зон и их клеточного состава была существеннее при внедрении имплантатов всех типов, по сравнению с изменениями в лимфатических узлах конечностей с дефектами костной ткани, не замещенными имплантатами.

На ранних сроках наблюдения (4-е недели) после внедрения в костную ткань имплантатов изменения в регионарных лимфатических узлах, вероятно, были ассоциированы с послеоперационным увеличением количества антигенов и аутоантигенов в регионе лимфосбора

и затрагивали как в Т-, так и В-зависимые зоны. В корковом плато, паракортикальной зоне, мозговом веществе было отмечено снижение относительного количества зрелых лимфоидных элементов и увеличивалось количества молодых – лимфобластов, пролимфоцитов, что свидетельствовало об активации пролиферации бласттрансформированных лимфоцитов. Увеличивалось количество макрофагов (в корковом плато) и эозинофилов (в парокортикальной зоне и мозговом веществе). Динамика изменений носила нелинейный характер. Через 16-ть недель после операции признаки антигенной стимуляции регионарных лимфатических узлов уменьшались при внедрении всех тестируемых имплантатов.

Однако через 52-е недели было вновь отмечено нарастание изменений в регионарных лимфатических узлах. Они были наиболее выражены у животных, с внедренными $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$. Если на ранних сроках после имплантации (4-е недели) реактивность была более выражена в В-зависимых зонах, то через 52-е недели после операции нарастала реактивность в Т-зависимых зонах регионарных лимфатических узлов, активировалась система фагоцитирующих мононуклеаров. В клеточном составе лимфоидной ткани при внедрении $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ наиболее значимые изменения по сравнению с интактными животными были выявлены в паракортикальной зоне – увеличение плотности клеточных элементов, относительного и абсолютного количества лимфобластов, абсолютного пролимфоцитов. Для животных, с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$, в большей степени были характерны - ярко выраженная реакция со стороны эозинофилов в разные сроки наблюдения, так, через 52-е недели после операции у 3-х животных из 4-х была выявлена эозинофильная инфильтрация. А так же уменьшение относительного количества зрелых лимфоидных элементов, которое было выявлено в различные сроки наблюдения и в разных морфологически-функциональных зонах лимфатического узла и увеличение численности плазматических клеток.

У животных, с внедренными в большеберцовые и бедренные кости $\text{PTi}_{40}(\text{а-С})\text{МК}$, через 52-е недели после операции морфологические характеристики большинства структур подколенных лимфатических узлов приближались к характеристикам лимфатических узлов у интактных кроликов. Исключение составляла паракортикальная зона, которой оставалась расширенной, относительное количество зрелых лимфоидных элементов в ней было снижено, количество макрофагов – увеличено.

Обращает на себя внимание, что особенности, характерные для лимфатических узлов при внедрении определенного типа имплантата проявляются и в лимфатических узлах контралатеральной конечности, т.е. процесс приобретал к концу срока наблюдения системный характер. Таким образом, в отдаленный период после имплантации в кости $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, $\text{PTi}_{40}(\text{а-С})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ в регионарных лимфатических узлах были выявлены небольшие, однако имеющие тенденцию к генерализации, изменения гистоархитектоники и клеточного

состава, которые нарастали со временем. Увеличивалась реактивность Т-зависимых зон, активировалась система фагоцитирующих мононуклеаров. Применение PTi(a-C)МК минимизировало изменения в региональных лимфатических узлах.

Гистологическая картина селезенки при моделировании краевых дефектов и внедрении имплантатов всех тестируемых типов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами, была сохранена, клеточная атипия отсутствовала. Через 4-е недели после формирования дефектов большеберцовых и бедренных костей максимальные изменения в селезенке в виде нарушения кровообращения, гиперсидероза красной пульпы, активации В-зависимых зон выявлены у животных с $\text{PTi}_{40}\text{МК}$, что соответствует характеристике изменений в лимфоузлах у этих же кроликов в этот же срок. У животных с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ структурные изменения селезенки были менее выражены, и соответствовали морфо-функциональным изменениям в лимфоузлах.

В группах $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ через 16-52 недели после операции выявлены признаки активации с развитием ответа по клеточному и гуморальному типу, активацию системы фагоцитирующих мононуклеаров и эозинофилов – увеличение размера органа; изменение соотношения белой и красной пульпы в сторону белой пульпы; увеличение периартериальных лимфатических муфт и вторичных фолликулов белой пульпы с расширенными выраженными светлыми центрами, с четкой границей между мантийными зонами и светлыми центрами фолликулов; синусовый гистиоцитоз или эозинофильная реакция. К концу срока наблюдения выраженности клеточного иммунного ответа в белой пульпе селезенки уменьшалась, умеренная стимуляция гуморального иммунного ответа сохранялась.

В морфологической картине селезенки у животных, с имплантированными в дефекты костей $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ выявлены очень слабые морфологические проявления Т-клеточного иммунного ответа, активация В-клеточных реакций в сроке 16-ть недель, а в 52-е недели наблюдается «нормализация» или даже редукция белой пульпы, несоответствующая структурным изменениям в лимфоузлах в этом сроке - диффузное расширение паракортикальной (Т-зависимой) зоны с выраженной эозинофильной клеточной реакцией, увеличение численности плазматических клеток. Группу $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ отличает увеличение численности плазматических клеток и эозинофилов в лимфоузле через 52-е недели после операции по данным гистологического исследования и лимфоцитогаммы, что может указывать на формирование аутоиммунных реакций организма на имплантат данного типа. По данным литературы, гуморальные факторы селезенки вызывают ограничение хронического асептического воспаления, интенсивность иммунного ответа на аутоантигены, иммуносупрессию антителообразующих клеток [181]. В этой связи примечательно, что в селезенке животных этой группы выявлены очень слабые морфологические проявления Т-

клеточного иммунного ответа, активация В-клеточных реакций в сроке 16-ть недель, а в 52-е недели наблюдается «нормализация» или даже редукция белой пульпы, несоответствующая структурным изменениям в лимфоузлах в этом сроке - диффузное расширение паракортикальной (Т-зависимой) зоны с выраженной эозинофильной клеточной реакцией. Таким образом, в данной группе, вероятно, развитие аутоиммунного процесса, связанного с нарушением механизмов регуляторного воздействия селезенки на иммунную систему.

Обнаруженные в поздние сроки наблюдения гематологические, биохимические, морфологические, цитологические изменения обусловлены развитием хронического воспалительного процесса, причинами которого могло быть «стрессорное ремоделирование» в прилежащем к имплантату сегменте кости, образование аутоантигенов при контакте тканей организма с инородными поверхностями, активация моноцитарно-макрофагальной системы при контакте с чужеродными поверхностями и частицами износа. При этом часть из этих изменений была направлена на модуляцию и ограничение воспалительного процесса.

Таким образом, использование титана с алмазоподобными пленками (ПТi₄₀(а-С)МК) минимизировало воспалительные изменения по сравнению с чистым титаном (классифицируемым как биоинертный материал, соответствующий требованиям, предъявляемым к материалам длительно контактирующим с тканями организма, разрешенным и активно используемым в медицине) [24, 78, 130, 184, 35]. Применение композитной пленки (ПТi₄₀(СN_{0,25})МК) приводило к увеличению выраженности реакций тканей (периферической крови, костного мозга, лимфатических узлов).

Для оптимизации условий заживления дефектов костной ткани при внедрении пористых титановых имплантатов с алмазоподобными покрытиями с последующим восстановлением функции прооперированного сегмента в плане реализации возможности технического усовершенствования ПТi(а-С)□МК мы исследовали *in vivo* имплантаты с различной объемной долей пор – 30%, 40% и 50%.

Через 24-е недели после имплантации в порях ПТi(а-С)□МК с различным объемом пор в последних образуется композит, прочность и упругие свойства которого на сжатие отличались от исходных прочности и упругости имплантатов. Эффективные механические свойства композита зависели от свойств его компонент – пористой металлической матрицы и костной ткани, однако отличались от них. С точки зрения биомеханики изменение упругих характеристик композита в результате заполнения пор имплантата костной тканью является показателем остеоинтеграции.

Условный предел текучести ($\sigma_{0,2}$) композита «имплантат – новообразованная в порях костная ткань», являющийся характеристикой прочности испытуемого образца, к 52-м неделям после операции при внедрении овцам в большеберцовые и бедренные кости ПТi₃₀(а-С)□МК

составлял 146,5 (123,9; 149,9) МПа, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\square\text{МК}$ – 128,9 (128,5; 129,4) МПа $\text{PTi}_{50}(\text{a-C})\square\text{МК}$ – 99,2 (91,1; 106,4) МПа.

Через 52-е недели модули Юнга композитов «имплантат – новообразованная в порах костная ткань», характеризующий упругие свойства материала не достигали показателей модуля Юнга интактной кортикальной кости барана (17 ГПа) и составляли – 11,1 (8,6; 11,3) ГПа, 6,9 (6,2; 7,6) ГПа, 2,8 (2,3; 3,2) ГПа (при объемной доле пор 30%, 40%, 50% соответственно).

В результате ориентировочных расчетов коэффициентов риска мы выявили, что при внедрении имплантатов с пористостью 30% и 40% в дистальный отдел бедра человека максимальные напряжения, испытываемые образованными композитами «имплантат-новообразованная в порах костная ткань», не превышали условных пределов текучести композитов, при физиологических нагрузках (ходьба) и повышенных нагрузках (прыжки). Запас прочности при физиологических нагрузках составлял от 0,54 до 0,9 (фактически он был даже выше, поскольку расчет был сделан на основе предела текучести, а не предела прочности). При внедрении $\text{PTi}_{50}(\text{a-C})\text{МК}$ в бедренную кость человека имеется риск разрушения композитов «имплантат-новообразованная в порах костная ткань» при значительных нагрузках (прыжки).

При внедрении в большеберцовые и бедренные кости кроликов $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$, насыщенных прилипающей фракцией миелокариоцитов, к которой относятся и мезенхимальные стромальные стволовые клетки, и $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ (контроль), на ранних сроках наблюдения были выявлены признаки активации остеогенеза и васкуляризации регенерата, уменьшение дистрофических изменений в прилежащих к дефекту сегментах кости, что отличало данных животных от контрольных (внедрение $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ без клеток). Таким образом, $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ может быть использован, в качестве скэффолда для трансплантации клеток в зону поражения кости.

Несовершенство нормативно-правовой базы, этические аспекты, отсутствие критериев и системы обеспечения биологической безопасности применяемых препаратов и качества продукции клеточных технологий, риски, ассоциированные с трансплантацией клеток, заставляют искать для стимуляции репаративной регенерации альтернативы клеткам, обладающим потенциалом к костеобразованию. Сочетанное локальное применение рЧКМБ-2 в дозе (0,054-0,193 мг/имплантат) на носителе ДКМ с гиалуроновой кислотой с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ в качестве скэффолда является перспективным подходом для активации репаративной регенерации кости. Следует отметить простату применения предсказуемостью и стабильностью биологического действия рЧКМБ-2 на костную ткань.

Применение рЧКМБ-2 приводило к увеличению площади зрелой костной ткани во внутреннем поровом пространстве имплантата, увеличению прочности блока «костное ложе –

имплантат» на разрыв через 4-е недели после операции при внедрении имплантатов была значимо выше, чем в отрицательном контроле (незаполненный дефект костной ткани). Через 4-е недели после операции наиболее функционально зрелая костная ткань образовалась на границе костное ложе – имплантат при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ с чрКМБ-2 (0,054-0,068 мг/имплантат). Через 16-ть недель после имплантации лучшие прочностные характеристики при исследовании на разрыв были выявлены при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ с чрКМБ-2 (0,127-0,193 мг/имплантат), по сравнению с КД и $\text{PTi}_{40}\text{ДКМ}$. Полученные результаты не противоречат данным авторов, показавших увеличение минеральной плотности костной ткани при локальном применении КМБ-2 [122].

При внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ на ранних сроках наблюдения (4-е недели после операции) выявлена меньшая скорость заполнения порового пространства костной тканью, меньшая ее зрелость, признаки дистрофии, в костном ложе выраженные признаки дистрофии, по сравнению с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$. Начиная с 16-и недель после имплантации - признаки склероза новообразованной костной ткани и костного ложа имплантата (более выраженные, чем у животных с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$), прогрессирующие в последующем.

Данный эффект может иметь как чисто механическую причину – присутствие частиц ГА в интерфейсе костная ткань – имплантат снижает прочность данного композита, а пористая структура имплантата значительно задерживает биодеградацию внедренных в поровое пространство наночастиц ГА.

Изменение концентрации неорганического фосфата и кальция в зоне растущей кости может вызвать задержку способных пролиферировать остеогенных клеток-предшественниц в G_0 -фазе, что приводит к уменьшению пула остеобластов.

При внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$ через 4-16-ть недель после имплантации в 75-80% у животных выявлено легкое раздражающее действие имплантатов, что значительно превышает показатели у животных с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ – 10%. Наиболее часто в области интерфейса «костное ложе – имплантат» выявляли признаки воспаления с минимальной степенью активности – редкие макрофаги до 5-и клеток в скоплении, другие иммунокомпетентные клетки до 5-и в скоплении; ограниченную по протяженности фиброзную прослойку между костным ложем и имплантатом, инородные вещества – частицы гидроксиапатита. К 52-м неделям после операции отличия по сравнению с $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ менее значительные, однако сохраняется более выраженный склероз костной ткани. Относительная прочность костной ткани на границе «костное ложе – имплантат» на разрыв на ранних этапах эксперимента (4-16-ть недель после имплантации $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$) уступает прочности композитов, образованных при внедрении $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$, к 52-м неделям после

имплантации при испытании прочности на разрыв системы «кость-имплантат» отличий между данными группами не обнаружено.

Исследование регионарных лимфатических узлов в группе животных с внедренными $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{GA-MK}$ продемонстрировало выраженную ответную реакцию иммунной системы на ранних сроках наблюдения, носившую комбинированный (клеточно-гуморальный) характер. К 52-м неделям наблюдения отличия между двумя группами $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{GA-MK}$ и $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{MK}$ с миелокариоцитами нивелировались. Таким образом, введение во внутренний объем и осаждение на поверхность наночастиц гидроксиапатита, полученных путем механоактивации привело к ухудшению остеointеграционных свойств пористого титана в условиях проведенных экспериментов *in vivo*.

Была показана возможность, используя универсальную программную систему конечно-элементного анализа ANSYS 16.0, предназначенную среди прочего для решения задач механики деформируемого тела, провести индивидуализированное биомеханическое виртуальное планирование напряжений и деформации, развивающихся в кости с дефектами различной формы, величины и локализации, а так же при замещении их имплантатами. Сравнивая полученные результаты с разрушающими напряжениями, можно оценить перспективность использования имплантатов данного типа при дефектах определенной локализации и размера.

Выводы

1. Пористый титан с алмазоподобными и композитными пленками не токсичен *in vitro* для миелокариоцитов, активно адгезирующих и пролиферирующих на данных композитах, формируя кластеры эритроидных и гранулоцитарных клеток, фибробластоподобные элементы; последние пролиферируют, дифференцируются и продуцируют экстрацеллюлярный матрикс, формируя единую структуру из клеток и компонентов внеклеточного матрикса, выстилающую поры имплантатов.

2. Композит «пористый титан - алмазоподобная нерезорбируемая углеродная пленка» (PTi₄₀(a-C)) является остеоиндуктивным материалом, стимулирующим репаративный остеогенез, увеличивая количество остеогенных клеток, клеток, экспрессирующих щелочную фосфатазу, образование более прочной кости в интерфейсе «костное ложе – имплантат» на ранних этапах регенерации, уменьшающим объем незрелой костной ткани в центральных областях внедрения имплантата и минимизируя дистрофические и склеротические изменения в костном ложе и новообразованной костной ткани.

3. Прилипающая фракция клеток костного мозга, увеличенная в количестве культивированием в порах титановой матрицы с алмазоподобной нерезорбируемой углеродсодержащей пленкой, внедренная в костный дефект активирует репаративный остеогенез на ранних сроках наблюдения и уменьшает дистрофические изменения в прилежащих к дефекту сегментах кости. Активность репаративного остеогенеза снижается в ряду PTi₄₀(a-C)МК > PTi₄₀(CN_{0,25})МК > PTi₄₀МК > незаполненный дефект костной ткани.

4. Композит «пористый титан – алмазоподобная нерезорбируемая углеродная пленка – рекомбинантный человеческий костный морфогенетический белок-2 (на носителе декальцинированный костный матрикс, гиалуроновая кислота)» в эффективной дозе оказывает сопоставимое влияние на репаративную регенерацию костной ткани с «пористым титаном – алмазоподобной нерезорбируемой углеродной пленкой – аутомиелокариоцитами». Использование обоих типов композитов увеличивает площадь зрелой костной ткани во внутреннем поровом пространстве имплантата и прочность кости на разрыв в интерфейсе «костное ложе – имплантат» через 4 - 16 недель после операции.

5. Внедрение композита «пористый титан – алмазоподобная нерезорбируемая углеродная пленка – наночастицы гидроксиапатита» в порах имплантата уменьшает скорость заполнения порового пространства костной тканью, ее зрелость, увеличивает в ней и в костном ложе признаки дистрофии и последующего склероза через 4-16 недели после операции.

6. При внедрении пористых титановых имплантатов с миелокариоцитами, пористых титановых имплантатов с алмазоподобными пленками и миелокариоцитами, пористых титановых имплантатов с композитными пленками и миелокариоцитами клеточная атипия (в

костной ткани, костном мозге, лимфатических узлах, селезенке) отсутствовала, выраженность местной воспалительной реакции была слабая. Использование пористых титановых имплантатов с алмазоподобными пленками и миелокариоцитами минимизировало местную воспалительную реакцию, реакцию костного мозга и лимфоидных органов на имплантацию.

7. Объемная доля пор пористых титановых имплантатов, полученных методом компактирования пористых титановых гранул, при внедрении их в области, испытывающие значительные механические нагрузки, не должна превышать 40%.

8. Разработанные объемные анатомически подобные конечно-элементные компьютерные модели бедренной кости с дефектом и кости с дефектом, замещенным имплантатом, позволяют провести индивидуализированное биомеханическое виртуальное планирование развивающихся напряжений и деформаций при различной локализации, размере, форме дефектов, замещаемых пористыми титановыми имплантатами с алмазоподобными пленками, насыщенными миелокариоцитами, в динамике и при различных функциональных нагрузках.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БОЕ-э	–	бурстобразующая эритроидная единица
ДКМ	–	декальцинированный костный матрикс
ИЛ	–	интерлейкин
ИФ	–	интерферон
КД	–	краевой дефект кости, незаполненный имплантатом
КМБ	–	костный морфогенетический белок
КОЕ	–	клетки-предшественницы, пролиферирующие с образованием колоний определенных линий развития клеток в культуре
КОЕ-ГМ	–	гранулоцитарно-макрофагальная КОЕ
КОЕ-э	–	Эритроидная КОЕ
КОЕф	–	фибробластоподобные КОЕ
КФК	–	кретинфосфокиназа
КФобщ	–	кислая фосфатаза общая
КФтарт	–	кислая фосфатаза тартратрезистентная
ЛДГ	–	лактатдегидрогеназа
ММСК	–	мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки
ПТi ₄₀	–	цилиндрические пористые титановые имплантаты, пористость 40%
ПТi ₄₀ МК	–	цилиндрические пористые титановые имплантаты (пористость 40%) насыщенные прилипающей фракцией аутологичных миелокариоцитов, с последующей культивированием в течение 14 суток
ПТi ₄₀ (а-С)	–	цилиндрические пористые титановые имплантаты (пористость 40%) с нерезорбируемой алмазоподобной углеродной пленкой
ПТi ₄₀ (а-С)МК	–	цилиндрические пористые титановые имплантаты (пористость 40%) с нерезорбируемой алмазоподобной углеродной пленкой, насыщенные прилипающей фракцией аутологичных миелокариоцитов, с последующей культивированием в течение 14 суток
ПТi ₃₀ (а-С)□МК	–	трапецевидные в сечении пористые титановые имплантаты (пористость 30%) с нерезорбируемой алмазоподобной углеродной пленкой, насыщенные прилипающей фракцией аутологичных миелокариоцитов, с последующей культивированием 14 суток
ПТi ₄₀ (а-С)□МК	–	трапецевидные в сечении пористые титановые имплантаты (пористость 40%) с нерезорбируемой алмазоподобной углеродной пленкой, насыщенные прилипающей фракцией аутологичных миелокариоцитов, с последующей культивированием 14 суток
ПТi ₅₀ (а-С)□МК	–	трапецевидные в сечении пористые титановые имплантаты (пористость 50%) с нерезорбируемой алмазоподобной углеродной пленкой, насыщенные прилипающей фракцией аутологичных миелокариоцитов, с последующей культивированием 14 суток

PTi ₄₀ (a-C)ГА-МК	–	цилиндрические пористые титановые имплантаты (пористость 40%) с нерезорбируемой алмазоподобной углеродной пленкой, с внедренными в поры наночастицами гидроксиапатита, насыщенные прилипающей фракцией аутологичных миелокариоцитов, с последующей культивированием 14 суток
PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК	–	цилиндрические пористый титановый имплантат (пористость 40%) с углеродсодержащей нерезорбируемой композитной пленкой состава углерод-азот с содержанием азота 20 ат.%, насыщенные прилипающей фракцией аутологичных миелокариоцитов, с последующей культивированием 14 суток
ПолTi	–	полированный титан
ПолTi(a-C)	–	полированный титан с нерезорбируемой алмазоподобной углеродной пленкой
ПолTi(CN _{0,25})	–	полированный титан с углеродсодержащей нерезорбируемой композитной покрытием состава углерод-азот с содержанием азота 20 ат.%
рчКМБ-2	–	рекомбинантный человеческий костный морфогенетический белок -2
СДГ	–	сукцинатдегидрогеназа
СМ-микрофото	–	фотография, полученная при световой микроскопии
СРБ	–	С-реактивный белок
СЭМ	–	сканирующей электронной микроскопии
ЩФобщ	–	щелочная фосфатаза общая
ЩФтерм	–	щелочная фосфатаза термолабильная
a-C	–	углеродная алмазоподобная пленка
APC	–	белок супрессор опухолей
CD	–	кластеры дифференцировки
DLC	–	алмазоподобные пленочные углеродсодержащие структуры
ERK	–	киназы, активируемые экстрацеллюлярными сигналами
FAK	–	протеинкиназа фокальной адгезии
FGF	–	фактор роста фибробластов
GM-CSF	–	гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор
G-CSF	–	гранулоцитарный колониестимулирующий фактор
JNK	–	киназы, фосфорилирующие N-концевой фрагмент c-Jun или стресс-активируемые протеин киназы
LIMK	–	семейство киназ, фосфорилирующих (стабилизирующих) F-актин и кофилин
МАРК	–	митоген-активируемая протеинкиназа
MCP-1	–	моноцитарный хемотаксический протеин-1
МЕК	–	киназа митоген-активируемых протеиновых киназ или киназы MAP-киназ или киназы ER-киназ
МКК	–	МАРК киназа

MMP	– матриксные металлопротеиназы
MLK	– киназа множественных линий
IGF-I	– инсулиноподобный фактор роста-I
PAK	– семейство p21 активируемых киназ
PDGF	– тромбоцитарный фактор роста
PG	– простагландин
PPAR γ	– рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом
R _a	– средняя шероховатость поверхности образцов
R _z	– размах высот по 10 наиболее выступающим точкам поверхности
Raf	– интермедиатор сигнальной трансдукции, фосфорилирует MEK
RANKL	– лиганд рецептора активатора ядерного фактора каппа β , лиганд для рецепторов остеопротегерина и RANK
RAC	– семейство «малых» ГТФ-связывающих белков, регулирующих полимеризацию актина, образование ламеллоподий, первичных фокальных комплексов
Ras	– семейство «малых» мембраносвязанных ГТФ-связывающих белков, участвующих в передаче экстрацеллюлярных сигналов в клетки
Rho	– семейство «малых» ГТФ-связывающих белков, регулирующих ремоделирования актинового цитоскелета, созревание фокальных контактов
Rock	– серин/треониновая киназа, участвующая в структуризации цитоскелета, активируется при связывании с ГТФ-связанной формой Rho
RPMI-1640	– питательная среда для культур различных клеточных линий
Runx2	– ген транскрипционного фактора, связанный с низкорослостью, регулирует специфичные остеобластные гены
SOX-9	– транскрипционный фактор, содержащий ДНК-связывающий домен, осуществляет контроль хондрогенеза (SRY-related HMG (high mobility group) box)
TFPI2	– ингибитор пути тканевого фактора-2
TGF- β	– трансформирующий фактор роста- β
TIMP	– тканевой ингибитор металлопротеиназы
TNF	– фактор некроза опухоли
TRAF	– цитозольный адаптерный белок, ассоциированный с рецептором фактора некроза опухолей
Twist	– семейство транскрипционных факторов, снижающих остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток
Wnt	– гены, кодирующие семейство сигнальных гликопротеинов – ключевых лигандов многих морфогенетических процессов у многоклеточных организмов
θ	– объемная доля пор
θ_w	– краевой угол смачивания по воде

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. 3 составляющие концепции НИИТО им. Р.Р.Вредена (интервью с профессором Рашидом Муртузалиевичем Тихиловым, интервью провел F.Atzrodt – научный консультант, CeramTec GmbH) // CeraNews. – 2013. – № 2. – С.2-6.
2. Аврунин А.С. Остеоцитарное ремоделирование: история вопроса, современные представления и возможности клинической оценки // Травматология и ортопедия России. – 2012. – Т. 63, №1. – С.128-134.
3. Аврунин А.С., Тихилов Р.М. Остеоцитарное ремоделирование костной ткани: История вопроса, морфологические маркеры // Морфология. – 2011. – Т. 139, № 1.– С.86-94.
4. Алексеева И.С. Применение комбинированного клеточного трансплантата на основе мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани у пациентов с дефицитом костной ткани (клинико-экспериментальное исследование): автореф. дис..... д-ра мед.наук / И.С.Алексеева. – М., 2012. – 43 с.
5. Аль-Саяги Яхья Ахмед . Замещение дефектов челюстно-лицевой области комплексами тканей с передней брюшной стенки: автореф.дис....канд.мед.наук / Аль-Саяги Яхья Ахмед. – М., 2004. – 23 с.
6. Анохина Е.Б. Влияние пониженного содержания кислорода на культивируемые мезенхимальные стромальные клетки-предшественники костного мозга крыс: автореф.дис....канд.биол.наук / Е.Б.Анохина. – М., 2007. – 26 с.
7. А.С. 1400616 СССР. МКИ А 61 В 17/56. Способ лечения дефектов костей / Ю.В.Герасимов, А.А.Саркисян, В.В.Козлова, Э.С.Гарибян, В.П.Айвазян, Р.К.Чайлахян, А.Я.Фриденштейн, И.А.Осепян (СССР). – № 4216049/28-14; заявл.31.03.87; опубл.07.06.88 // Открытия. Изобретения. – 1988. – Бюл. 21.
8. Атлас сканирующей электронной микроскопии клеток, тканей и органов / под ред. О.В.Волкова. – М.:Медицина, 1987. – 461 с.
9. Бабаева А.Г., Геворкян Н.М., Зотиков Е.А. Роль лимфоцитов в оперативном изменении программы развития тканей. – М.: Издательство РАМН, 2009. – 108 с.
10. Баграташвили В.Н. Синтез новых минерал-полимерных композитов для имплантологии и тканевой инженерии / В.Н. Баграташвили, А.И. Воложин, А.П. Краснов [и др.] // Современные лазерно-информационные и лазерные технологии: сб. тр. ИПЛИТ РАН; под ред. чл-кор. РАН В.Я.Панченко, проф. В.С.Голубева. – Интерконтакт Наука, 2005. – С.157-165.
11. Базилян Э.А., Смбалян Б.С. Направленная тканевая регенерация в дентальной имплантологии // Клиническая стоматология. – 2008. – № 3. – С. 42-50.

12. Байкова Ю.П. Репарация и васкуляризация инфарктной зоны миокарда у крыс после трансплантации моноклеаров красного костного мозга: автореф.дис....канд. биол.наук / Ю.П.Байкова. – М., 2011. – 27 с.
13. Баринов С.М. Керамические и композиционные материалы на основе фосфатов кальция для медицины // Успехи химии. – 2010. – Т.79 (1). – С.15-32.
14. Батпенов Н.Д. Математическое компьютерное моделирование биомеханического поведения модифицированной ножки эндопротеза тазобедренного сустава / Н.Д.Батпенов, А.М., Мамонов В.Н. Карпов [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2013.– Т.69, № 3. – С.64-71.
15. Батушенко Д.Е. Функциональная анатомия регионарных лимфатических узлов в условиях использования различных методов оптимизации остеогенеза при дефекте большеберцовой кости в эксперименте: автореф.дис.....канд.мед.наук / Д.Е.Батушенко. – Новосибирск, 2004. – 18 с.
16. Белова О.В., Арион В.Я., Сергиенко В.И. Роль цитокинов в иммунологической функции кожи // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2008. – № 1. – С.41-55.
17. Биосовместимость / под ред. В.И. Севастьянова. – М., 1999. – 368 с.
18. Биосовместимые материалы / под ред. Севастьянова В.И., Кирпичникова М.П. – М.: Изд. Медицинское информационное агенство, 2011. – 544 с.
19. Бирюкова Е.В. Остеопороз: точка зрения эндокринолога // Фарматека. – 2012. – №1-12. – С.32-39.
20. Борзунов Д.Ю., Шастов А.Л. «Ишемический» дистракционный регенерат при замещении дефектов длинных костей по Г.А. Илизарову. Вариант решения проблемы. <http://vrach-aspirant.ru>
21. Борискина О.А. Обнаружение прогностически значимых молекулярно-генетических маркеров для ранней высокоточной диагностики развития агрессивного пародонтита: автореф.дис.... канд.мед.наук / О.А.Борискина. – М.: Первый МГМУ им. И. М. Сеченова, 2014. – 24 с.
22. Бородин Ю.И. Функциональная морфология иммунной системы / Ю.И. Бородин, В.Н.Григорьев, А.Ю.Летягин [и др.]; отв. ред. В.В.Виноградов. – Новосибирск: Наука, Сиб. отд-ние 1987. – 235 с.
23. Босяков С.М., Щербаков С.С., Шпилевский И.Э., Алексеев Д.В. О прогнозировании патологического перелома бедренной кости человека, подвергнутой секторальной резекции // Труды БГТУ. – 2013. – № 6. – С.21-23.

24. Ботаева Л.Б. Разработка технологии изготовления металлокерамических изделий для медицины на основе титана с оксидными и кальций фосфатными покрытиями: автореф. дис....канд.тех.наук / Л.Б.Ботаева. – Томск, 2005. – 21 с.
25. Брин В.Б. Кальций-регулирующие гормоны // Избранные лекции по современной физиологии / под ред. М.А. Островского и А.Л. Зефирова. – Казань, 2010. – С. 216-242.
26. Буравкова Л.В., Гершович П.М., Гершович Ю.Г., Григорьев А.И. Механизмы гравитационной чувствительности остеогенных клеток предшественников // Acta Nature. – 2010. – Т.2, №1(4). – С.30-39.
27. Бурьянов А.А., Корж Н.А., Ошкадеров С.П. Металлические материалы для имплантатов ортопедического назначения // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2008. – № 3. – С.5-10.
28. Бухарова Т.Б. Тканеинженерная конструкция на основе пористых керамических 3D-носителей и мультипотентных стромальных клеток для восстановления дефектов костной ткани / Бухарова Т.Б., Фатхутдинов Т.Х., Голштейн Д.В. [и др.] // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2009. – № 1. – С.38-47.
29. Вагапова В.Ш. Экспериментально-морфологическое исследование эффективности применения титана с наноструктурой в качестве имплантатов для ортопедии и травматологии / В.Ш.Вагапова, Ф.Ф.Мухаметов, В.В.Латыш [и др.] // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н.Приорова. – 2008. – № 4. – С.78-83.
30. Варакина Ж.Л. Травматизм и насильственная смертность как факторы риска демографической безопасности (на примере Архангельской области): автореф. дис....д-ра мед.наук / Ж.Л.Варакина. – Архангельск, 2015. – 35 с.
31. Варюшина Е.А. Провоспалительные цитокины в регуляции процессов воспаления и репарации: автореф.дис. ... д-ра биол. наук / Е.А. Варюшина. – СПб., 2012. – 45 с.
32. Вахрушев И.В., Ярыгин Н.В., Ярыгин К.Н. Тканевая инженерия кости путем трансплантации заселенных мезенхимальными стволовыми клетками скэффолдов // Хирург. – 2011. – № 1. – С.48-53.
33. Венедиктова А.А. Роль протеаз различных классов в развитии остеопороза у крыс: автореф.дис. ... канд.биол.наук / А.А.Венедиктова. – Новосибирск, 2009. – 25 с.
34. Волкова С.А., Боровков Н.Н. Основы клинической гематологии: учебное пособие. – Н.Новгород: Изд-во Нижегородской гос. медицинской академии, 2013. – 400 с.
35. Воложин Г.А. Влияние физико-химических свойств поверхности титановых имплантатов и способов их модификации на показатели остеоинтеграции / Г.А.Воложин, А.П.Алёхин, А.М. Маркеев [и др.] // Институт стоматологии. – 2009. – № 3. – С.81-83.
36. Воложин Г.А. Основные виды биосовместимых материалов. – М: МГМСУ, 2010. – 17 с.

37. Волчков С.Е. Сравнительная оценка адгезивной фракции клеток аспирата костного мозга, жировой ткани и пуповинной/плацентарной крови: автореф.дис.... канд. мед. наук / С.Е.Волчков. – Оренбург, 2010. – 28 с.
38. Вольперт У.В. Заживление костных дефектов ветви нижней челюсти кроликов под биоинженерными конструкциями из титана и золотого сплава с ксеногенными мезенхимальными стволовыми клетками / У.В.Вольперт, О.О.Янушевич, А.С. Григорьян [и др.] // Стоматология. – 2009. – № 1. – С.4-8.
39. Воронцова Т.Н., Лучанинов С.С. Мониторинг состояния травматизма и ортопедической заболеваемости взрослого населения Санкт-Петербурга в 2009-2011 гг. и работы амбулаторной травматолого-ортопедической службы города // Профилактик. и клин. медицина. – 2012. – № 2. – С.12-17.
40. Воротников А.В. Хемотаксис: движение, направление, управление // Успехи биологической химии. – 2011. – Т.51. – С.335-400.
41. Вырва О.Е. Модификация поверхностных свойств материалов путем нанесения многослойных покрытий для их применения в ортопедии / О.Е. Вырва, А.В. Зыкова, В.И. Сафонов [и др.] // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2009. – № 4. – С.62-67.
42. Галахов В.Р. Рентгеновская эмиссионная и Рамановская спектроскопия наноконденсатов $CN_{0 \leq x \leq 0.5}$, полученных импульсным дуговым распылением графита в присутствии азота / В.Р.Галахов, Ю.С.Поносов, С.Н.Шамин [и др.] // Физика металлов и металловедение. – 2008. – Т.50, № 5. – С.936-939.
43. Гершович П.М. Влияние моделирования эффектов микрогравитации на цитоскелет и экспрессию генов у мезенхимальных стромальных клеток-предшественников костного мозга человека *in vitro*: автореф.дис. ... канд.биол.наук / П.М.Гершович. – М., 2010. – 25 с.
44. Гланц С. Медико-биологическая статистика. – М.: Изд-во Практика, 1998. – 459 с.
45. Глушкова Т.Г. Морфофункциональные показатели эритроидных элементов красного костного мозга и периферической крови при десимпатизации: автореф.дис. ... канд. биол. наук / Т.Г.Глушкова. – Ижевск, 2004. – 24 с.
46. Гоглова О.О., Богомолов А.Ф. Этика работы с экспериментальными животными // Медицинское право и этика. – 2003. – № 4. <http://ruddoctor.net/medicine2009/index.htm>
47. Гололобов В.Г. Костная ткань – повреждения – регенерация. Закономерные процессы посттравматического остеогистогенеза // Вопросы морфологии XXI века. К 80-летию со дня рождения профессора Алексея Андреевича Клишова: сборник научных трудов / под ред. Р.К. Данилова, С.В. Костюкевича, И.А. Одинцовой. – Вып.2. – СПб.: Изд-во ДЕАН, 2010. – 224 с.

48. Гололобов В.Г. Посттравматическая регенерация костной ткани. Современный взгляд на проблему // Фундаментальные и прикладные проблемы гистологии. Гистогенез и регенерация тканей: труды ВМедА. – СПб.: ВМедА, 2004. – Т. 257. – С.94-109.
49. Гольдберг Е.Д. Усиление стимулирующего действия эритропоэтина на эритропоэз антисеротониновым препаратом при цитостатической миелодепрессии / Е.Д. Гольдберг, А.М. Дыгай, Е.Г. Скурихин [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2009. – № 7. – С.56-59.
50. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзьков Г.Н. Гипоксия и система крови. – Томск: Изд. Томского гос. ун-та, 2006. – 142 с.
51. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. – Томск: Изд. Томского гос. ун-та, 1992. – 272 с.
52. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шерстобоев Е.Ю. Механизмы локальной регуляции кроветворения. – Томск: STT, 2000. – 148 с.
53. Горбачева Т.Б. Рентгенография твердых сплавов // Металлургия. – М., 1985. – 103 с.
54. ГОСТ ISO 10993.6-2011 от 01.01 2013 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации. – М.: Стандарт информ, 2013. – 24 с.
55. ГОСТ Р ИСО 10993.2-1999 от 01.07.2010 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными. – М.: Стандарт информ, 2009. – 16 с.
56. Гребнев Д.Ю., Ястребов А.П., Осипенко А.В. Перспектива использования клеточных технологий для активации регенерации эпителия кишечника старых лабораторных животных после лучевой нагрузки // Научный альманах. – 2015. – № 7 (9). – С.863-864.
57. Гречухин И.В. Актуальные проблемы учета, анализа и профилактики травматизма // Современные проблемы науки и образования. – 2011. – № 6. URL: www.science-education.ru/100-5036
58. Григоровский В.В. Острые травматические ишемические поражения костей: патогенез, морфогенез, дифференциальная диагностика // Журнал АМН Украины. – 2008. – Т.14, № 1. – С.116-133.
59. Григорьян А., Топоркова А. Проблемы интеграции имплантатов в костную ткань (теоретические аспекты) // Техносфера. – М., 2007. – 128 с.
60. Громов А.В. Повышение регенеративного потенциала имплантационного материала на основе костного коллагена и рекомбинантного белка человека rhBMP-2: автореф. дис....канд.мед.наук / А.В.Громов. – М., 2013. – 24 с.

61. Гусев Д.С. Состояние и научное обоснование организационных форм оптимизации стационарной травматологической помощи населению юга России (на примере Астраханской области): автореф дис.... канд. мед. наук / Д.С.Гусев. – СПб., 2014. – 19 с.
62. Деев Р.В. Влияние трансплантарованной культуры остеогенных клеток костного мозга на репаративный остеогенез в области дефекта теменных костей / Р.В.Деев, Н.В.Цупкина, В.Г. Гололобов [и др.] // Цитология. – 2008. – Т.50, № 4. – С.293-301.
63. Деев Р.В. Результаты трансплантации культуры аутологичных стромальных клеток костного мозга в область краевого дефекта длинных трубчатых костей / Р.В. Деев, Н.В. Цупкина, Д.Е. Иванов [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2007. – Т.44, № 2. – С.57-63.
64. Деев Р.В., Исаев А.А., Кочиш А.Ю., Тихилов Р.М. Пути развития клеточных технологий в костной хирургии // Травматология и ортопедия России. – 2008. – № 1(47). – С.65-74.
65. Денисов–Никольский Ю.И., Миронов С.П., Омеляненко Н.П., Матвейчук И.В. Актуальные проблемы теоретической и клинической остеартрологии. – М.: Тип. "Новости", 2005. – 335 с.
66. Докторов А.А. Воздействие титана и золота на пролиферативные свойства мезенхимальных стволовых клеток костного мозга / А.А.Докторов, Ю.И.Денисов-Никольский, Н.Н. Мальгинов [и др.] // Современные наукоемкие технологии. – 2007. – № 9. www.rae.ru
67. Долотина Н.В. Реакция костного мозга при воздействии общей гипертермии в эксперименте: автореф.дис....канд.мед.наук / Н.В.Долотина. – Томск, 2012. – 18 с.
68. Дулаев А.К. Влияние трансплантированной культуры остеогенных клеток костного мозга на репаративный остеогенез в области дефекта теменных костей / А.К.Дулаев, В.Г.Гололобов, Д.Е.Иванов [и др.] // Цитология. – 2008. – № 4. – С.293-301.
69. Дьячков П.Н. Углеродные нанотрубки. Строение, свойства, применения. – М.: БИНОМ «Лаборатория знаний», 2006. – 393 с.
70. Еропкин М.Ю. Культуры клеток как модельная система в биохимико-токсикологических исследованиях: автореф.дис....д-ра биол.наук / М.Ю.Еропкин. – СПб., 2004. – 32 с.
71. Захаров Ю.М. Дальностантные, межклеточные и внутриклеточные механизмы регуляции эритропоэза // Вестн. Уральской медицинской академической науки. – 2013.– № 2. – С.103-106.
72. Захаров Ю.М. Прогресс в изучении эритропоэза in vitro// Гематология и трансфузиология. – 1988. –№12. –С25-33.
73. Захаров Ю.М., Макарова Э.Б. Регуляция остеогенной дифференциации мезенхимальных стволовых клеток костного мозга // Рос.физиологический журнал им.И.М.Сеченова. – 2013. – Т.99, № 4. – С.417-432.

74. Зубов Д.А., Оксимец В.М. Цитокиновая иммунорегуляция репаративной регенерации костной ткани культивированными мезенхимальными стволовыми клетками // Травма. – 2008. – Т.9, №2. – С.145-153.
75. Иванов М.Б., Колобов Ю.Р., Вершинина Т.Н. Структура и механические свойства ультрамелкозернистого титанового сплава ВТ6 после термомеханической обработки в сочетании с обратимым легированием водородом // Титан. – 2006. – Т.19, № 2. – С.60-62.
76. Иванов С.Ю. Синтетические материалы, используемые в стоматологии для замещения дефектов костной ткани / С.Ю.Иванов, Р.Ф. Мухаметшин, А.А. Мураев [и др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 1; URL: www.science-education.ru/107-8345
77. Ильин Д.В. Влияние нанопорошка цинка на активность ферментов ротовой полости in vitro // Молодежь и наука: итоги и перспективы: материалы межрегиональной научно-практической конференции студентов и молодых ученых с международным участием, 18-20 ноября. – Саратов: Изд. Саратовского мед. ун-та. – 2009. – 79 с.
78. Итин В.И. Имплантат – носитель клеточного материала из пористого проницаемого титана / В.И.Итин, Г.А.Прибытков, И.А. Хлусов [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2006. – № 3(5). – С.59-63.
79. Кабак С.Л., Кабак Ю.С. Медиаторы локальной резорбции костной ткани при хроническом апикальном (верхушечном) периодонтите // Современная стоматология. – 2005. – № 4. – С.20-26.
80. Калита В.И. Физика и химия формирования биоинертных и биоактивных поверхностей на имплантатах // Физика и химия обработки материалов. – 2000. – № 5. – С.28-45.
81. Калита В.И., Еременко В.И., Комлев Д.И. Влияние макро- и микроструктуры границы раздела в композиционном материале «цилиндрический титановый имитатор имплантата с выступами-пластмасса» на его механические свойства при сдвиге // Физика и химия обработки материалов. – 2001. – № 1. – С.82-86.
82. Карлов А.В., Шахов В.П. Системы внешней фиксации и регуляторные механизмы оптимальной биомеханики. – Томск: STT, 2001. – 480 с.
83. Кашапова Р.А. Гематологические показатели у кроликов, содержащихся в различных условиях загрязнения окружающей среды: автореф.дис...канд. биол. наук / Р.А.Кашапова. – Казань, 2007. – 19 с.
84. Кашкин К.П. Цитокины иммунной системы: основные свойства и иммунобиологическая активность // Клин. лабораторная диагностика. – 1998. – № 11. – С.21-32.
85. Кетлинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. – С.Петербург: Фолиант. – 2008. – 552 с.

86. Кириллова И.А. Анатомо-функциональные свойства кости как основа создания костно-пластических материалов для травматологии и ортопедии (анатомо-экспериментальное исследование): автореф. дис.... д-ра мед. наук / И.А.Кириллова. – Новосибирск, 2011. – 47 с.
87. Кирич В.Ф., Шапин Ю.Г., Масляков В.В. Изменение показателей микроциркуляции и иммунного статуса в отдаленном послеоперационном периоде после операций на травмированной селезенке // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2007. – № 3(17). – С.98-103.
88. Кирковский Л.В., Акалович С.Т., Чалый Ю.В., Кирковский В.В. Роль интерлейкина-8, дифензинов, фактора некроза опухоли и его рецепторов в процессе реализации воспалительной реакции // Медицинский журнал: научно-практический рецензируемый журнал. – 2008. – №3. – С.8-12.
89. Кирюхин В.Ю., Няшин Ю.И. Задачи управления напряжениями в актуальных проблемах биомеханики // Российский журнал биомеханики. – 2005. – № 9 (4). – С.9-27.
90. Киселева Е.П., Полевщиков А.В. Метод автоматизированного учета НСТ-теста // Клиническая лабораторная диагностика. – 1994. – № 4. – С.27-29.
91. Киченко С.М. Обмен и перераспределение метаболитов в органах и биологических жидкостях при стоматологической патологии: автореф. дис.... д-ра мед. наук / С.М.Киченко. – М., 2006. – 50 с.
92. Климовицкий В.Г., В.Н. Пастернак, Оксимец В.М. Современные аспекты проблем применения мезенхимальных стволовых клеток в травматологии и ортопедии //Ортопедия, травматология и протезирование. – 2008. – № 1. – С.105-110.
93. Ковынцев А.Н. Мезенхимальные стволовые клетки и регионарный лимфатический узел в процессе восстановления костной ткани нижней челюсти в эксперименте: автореф. дис. ... канд. мед. наук / А.Н. Ковынцев. – Новосибирск: Б.и., 2011. – 19 с.
94. Колобов Ю.Р., Иванов М.Б., Голосов Е.В. Формирование наноструктурированных состояний и связанных с ними улучшенных свойств материалов медицинского и технического назначения // Наносистемы, наноматериалы, нанотехнологии. – 2011. – Т. 9, № 2. – С.489-498.
95. Корж Н.А., Кладченко Л.А., Малышкина С.В. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль оптимизации и стимуляции в реконструкции кости // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2008. – № 4. – С.5-14.
96. Корпачев В.В. Гуморальные факторы селезенки в регуляции гормонального баланса и процессов адаптации в организме: автореф. дис.... д-ра мед. наук / В.В.Корпачев. – Киев, 1992. – 33 с.

97. Корч М.А., Кудрявцева И.П., Макарова Э.Б. Усовершенствование методики проводки костной ткани для гистохимического исследования // Вестник травматологии и ортопедии Урала. – 2012. – № 3-4. – С.90-93.
98. Котельников Г.П. Морфологические результаты пластики посттравматических дефектов суставной гиалиновой хрящевой ткани разными видами трансплантатов в эксперименте / Г.П.Котельников, Л.Т.Волова, В.В. Россинская [и др.] // Морфологические ведомости. – 2013. – № 3. – С.62-67.
99. Котельников Г.П. Новый способ пластики дефектов суставного гиалинового хряща комбинированным клеточно-тканевым трансплантатом / Г.П.Котельников, Л.Т.Волова, Ю.В. Ларцев [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2010. – № 1. – С.150-155.
100. Крайнов Ю.А. Морфофункциональная характеристика костеобразования при использовании имплантатов с наноструктурированными биокерамическими покрытиями (экспериментальное исследование) / Ю.А.Крайнов, Д.А.Ланцов, И.В.Маланин [и др.] // Вестник ВолГМУ. – 2009. – Вып.2, № 30. – С.78-82.
101. Краюшкин А.И, Капитонова М.Ю., Александрова Л.И. Функциональная анатомия лимфатического узла с аспектами медицины, основанной на доказательствах // Вестн. ВолГМУ. – 2010. – Вып. 3 (35). – С.3-7.
102. Кривошапко, С.В. Оптимизация хирургического лечения и реабилитации больных с переломами мыщелков большеберцовой кости: автореф. дис. ... канд. мед. наук / С. В. Кривошапко. – Ижевск, 2001. – 17 с.
103. Кругляков П.В. Влияние сингенных мезенхимных стволовых клеток на восстановление костной ткани у крыс при имплантации деминерализованного костного матрикса / П.В. Кругляков, И.Б. Соколова, Н.Н. Зинькова [и др.] // Цитология. – 2005. – № 47(6) – С.466-476.
104. Кузанов А.И. Реваскуляризация костной ткани васкуляризованными надкостнично-кортикальными аутооттрансплантатами: автореф.дис....канд.мед.наук / А.И.Кузанов. – М., 2005. – 26 с.
105. Кулаков А.А., Григорьян А.С., Архипов А.В. Интеграция имплантатов в костную ткань: теоретические аспекты проблемы // Стоматология. – 2010. – Вып.5, № 4. – С.5-8.
106. Лабораторные методы исследования в клинике: справочник / В.В.Меньшиков, Л.Н.Делекторская, Р.П.Золотницкая [и др.]. – М.: Медицина, 1987. – 368 с.
107. Лебедев К.А., Митронин А.В., Максимовский Ю.М., Саган Н.Н. Принципы определения гальванических токов в полости рта и их клиническое обоснование // Стоматология. – 2007. – № 3. – С.11-16.

108. Лебединская О.В. Влияние регуляторных факторов на морфологические, иммунофенотипические функциональные особенности и дифференцировку стромальных клеток предшественников и иммунокомпетентных клеток: автореф. дис....д-ра мед.наук / О.В. Лебединская. – СПб.: С.-Петербург. гос. педиатрическая мед. акад., 2006. – 56 с.
109. Лекции по общей патологической анатомии. Учебное пособие / под ред. академика РАН и РАМН, профессора М.А.Пальцева. — М., 2003. — 254 с.
110. Логовская Л.В., Бухарова Т.Б., Волков А.В. Индукция остеогенной дифференцировки мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток жировой ткани человека // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2013.– № 1.– С.28-34.
111. Луговская С.А., Морозова В.Т., Почтарь М.Е., Долгов В.В. Лабораторная гематология. – М.-Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2006. – 224 с.
112. Лунева С.Н. Состояние хряща и кости коленного сустава собак в условиях удлинения голени // Гений ортопедии. – 2004. – Т. 28, № 1. – С.25-29.
113. Лурия Е.А., Кузнецов С.А., Генкина Е.Н., Фриденштейн А.Я. Образование костной ткани в органных культурах костного мозга человека // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. – 1989. – Т.107, № 5. – С.593-595.
114. Маланин Д.А. Физико-механические свойства границы раздела между костной тканью и имплантатами с различными биоактивными покрытиями / Д.А.Маланин, В.И.Калита, А.И.Мамаев [и др.] // Бюл. Волгоград науч центра РАМН. – 2008. – № 4. – С.47-50.
115. Мамылина Н.В. Адаптационно-компенсаторные реакции в системе эритронов при экспериментальном эмоционально-болевым стрессе: автореф.дис....д-ра биол.наук / Н.В.Мамылина. – Челябинск, 2012. – 43 с.
116. Мардарьев А.Н., Шаров А.А, Барышников А.Ю. Костные морфогенетические белки и их роль в канцерогенезе кожи // Рос. битерапевтический журн. – 2007. – № 6 (3).– С.43-50.
117. Масляков В.В. Травма селезенки: особенности внутрисосудистого компонента микроциркуляции в зависимости от выполненной операции: автореф. дис...д-ра мед.наук / В.В.Масляков. – М., 2010. – 43 с.
118. Матвиенко В.Н. Костный и минеральный метаболизм при удлинении конечности по Илизарову // Теоретические и клинические аспекты дистракционного остеосинтеза: сборник науч.трудов. – Курган, 1982. – С.170-173.
119. Медвецкий А.И., Компанцев В.А., Щербакова Л.И., Маркова О.М. Полимерные соединения: методы получения и характеристики основных типов транспортных систем на их основе // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 3. URL: www.science-education.ru/109-9322.

120. Меликян М.Л, Итин В.И. Динамика минерализации костной ткани в пористом титане и прочностные свойства композита «титан-костная ткань» // Письма в ЖТФ. – 2002. – Т.28. – Вып.16. – С.20-24.
121. Методы биохимических исследований (липидный и энергетический обмен) / под ред. проф. М.И. Прохоровой. – Л.: ЛГУ, 1982. – 272 с.
122. Миронов С.П. Экспериментальная оценка остеоиндуктивности рекомбинантного костного морфогенетического белка / С.П. Миронов, А.Л. Гинцбург, Н.А. Еськин [и др.] // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. – 2010. – № 4.– С.38-44.
123. Миронов С.П., Омеляненко Н.П., Кожевников О.В. Влияние культивированных аутогенных соединительнотканых (стромальных) клеток костного мозга (СККМ) на замедленно формирующиеся дистракционные регенераты у детей // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2011. – Т. 6, Вып. 2. – С.104-112.
124. Миронов С.П., Родионова С.С., Торгашин А.Н., Семенова Л.А Влияние костного морфогенетического белка 2 в составе биоконпозиционного материала на костеобразование и минерализацию кости // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н.Приорова. – 2012. – № 1. – С.3-7.
125. Михайлова Е.В. Каталитические свойства НАД- и НАДФ-малатдегидрогеназы при токсическом поражении печени крыс: автореф.дис.....канд.биол.наук / Е.В.Михайлова. – Воронеж, 2009. – 23 с.
126. Мойсейчик П.Н. Диагностика, профилактика прогнозирование и особенности аллергических реакций в ортопедической стоматологии / П.Н.Мойсейчик, Л.С. Величко, С.А. Наумович [и др.] // Современная стоматология. – 2001. – № 1. – С.7-11.
127. Монастырская Е.А., Лямина С.В., Малышев М.Ю. М1 и М2 фенотипы активированных макрофагов и их роль в иммунном ответе и патологии // Патогенез. – 2008.– Т.6, № 4.– С.31-39.
128. Морган-мл. Э., Мэгид С.М. Анестезиология: пер. с англ. – Книга 2-я. – М.-СПб.: Изд-во БИНОМ-Невский Диалект, 2000. – 366 с.
129. Морозова В.Т., Луговская С.А. Лимфатические узлы. Цитологическая диагностика. – Тверь: ООО «Издательство «Триада», 2003. – 72 с.
130. Мушеев И.У. Применение сплавов титана в клинике ортопедической стоматологии и имплантологии (экспериментально-клиническое исследование): автореф.дис.....д-ра мед.наук И.У.Мушеев. – М., 2008. – 48 с.

131. Неверова Ю.Н., Соловьева М.В. Современные принципы ускорения регенерации костной ткани // Проблемы и перспективы современной науки. – Томск, 2011. – Том 3, № 1. – С.73-75.
132. Нестеров А.В. Особенности регенерации костной ткани черепа при использовании наноструктурированных имплантатов / А.В. Нестеров, Т.В. Павлова, Л.А. Павлова [и др.] // Медицинские науки. – 2011. – № 6. – С.129-133.
133. Нечай В.В. Морфологические изменения внутренних органов и иммунной системы у мышей balb/c в отдаленные сроки после спленэктомии // Рос.медико-биологический вестник. – 2011. – № 3. – С.18-22.
134. Никитин С.Е. Ортезотерапия в системе лечения переломов костей конечностей и их последствий у взрослых: автореф.дис...д-ра мед.наук / С.Е.Никитин. – М., 2012. – 48 с.
135. Оганов В.С. Изменения костной ткани человека в космическом полете: о возможных механизмах остеопении / В.С.Оганов, А.В.Бакулин, В.Е.Новиков [и др.] // Остеопороз и остеопатии. – 2005. – № 2. – С.2-7.
136. Огородова Л.М. Растущая роль имплантов и малоинвазивной хирургии в развитии современной медицины. – М., 2013. – 8 с.
137. Омеляненко Н.П., Слуцкий Л.И. Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия) / под ред. Миронова С.П. – В 2 т. – М.: Изд-во «Известия», 2010. – 600 с.
138. Осепян И.А., Чайлахян Р.К., Гарибян З.С., Айвазян В.П. Лечение несросшихся переломов, ложных суставов и дефектов длинных костей трансплантацией костномозговых фибробластов, выращенных in vitro и импрегнированных в губчатый костный матрикс // Ортопедия, травматология и протезирование. – 1987. – № 9. – С.59-61.
139. Осипенко А.В. Механизмы взаимосвязи гемопоэза и остеогенеза при дистракционном остеосинтезе (экспериментально-клиническое исследование): автореф.дис....д-ра мед.наук / А.В.Осипенко. – Свердловск, 1986. – 30 с.
140. Островский А. Остеогенные материалы в современной пародонтологии и имплантологии // Dent-Inform. – 2001. – № 8. – С.22-30.
141. Павлова И.Е. Особенности функционирования иммунной системы после спленэктомии у пациентов с заболеваниями системы крови и травмами селезенки: автореф.дис...д-ра мед.наук / И.Е.Павлова. – СПб., 2007. – 42 с.
142. Павлова Т.В., Нестеров А.В., Павлова Л.А. Регенерация костной ткани при применении наноимплантатов // Архив патологии. – 2013. – № 6. – С.22-26.
143. Панасюк А.Ф., Ларионов Е.В., Саващук Д.А. Биоматериалы для тканевой инженерии в хирургической стоматологии // Клиническая стоматология. – 2004. – № 2. – С.54-57.

144. Пат. 2 471 248 С1 МПК G09В 23/28. Способ оценки прочности на разрыв системы кость-имплантат в условиях остеointеграции / А.П. Рубштейн, И.Ш. Трахтенберг, Э.Б. Макарова В.А., Мухачев, А.Н. Челноков; ИФН УрО РАН, ФГУ «УНИИИТО им. В.Д. Чаклина Минздравсоцразвития». – № 2011130132/14; заявл.19.07.2011; опубл. 27.12.2012. – Бюл.№ 36.
145. Пат. 2176512 РФ, МПК⁷ А 61 К 35/28, А 61 Р 17/02. Способ стимуляции заживления ран / Л.В.Тихонова, Г.Н.Федоров, Е.П.Кузьмина; Смоленская гос. медицинская академия. – № 99125354/14; заявл.30.11.1999; опубл.10.12.2001. – Бюл.34.
146. Пат. на полезную модель 90678 РФ, МПК¹¹ А 61 F 2/28. Имплантат из пористого материала на основе титана с покрытием / И.Ш.Трахтенберг, А.П.Рубштейн, А.Б.Борисов, В.И. Новожинов, Э.Б.Макарова, А.В.Осипенко, И.Л.Шлыков, В.А.Мухачев (РФ). – № 2009133813/22; заявл.08.09.2009; опубл.20.01.2010, Бюл. № 2. – 1 с.
147. Пат.2274862 РФ, МПК G 01 N 33/573. Способ определения условий энергообеспечения репаративного остеогенеза у собак / С.Ю.Концевая, М.А.Дерхо; Уральская государственная академия ветеринарной медицины. – № 2004115032/15; заявл.18.05.2004; опубл.20.04.2006. – Бюл. № 11.
148. Паюшина О.В. Мезенхимальные стромальные клетки из эмбриональных и дефинитивных источников: фенотипические и функциональные особенности: автореф.дис...д-ра биол.наук / О.В.Паюшина. – М., 2015. – 45 с.
149. Поворознюк В.В, Резниченко Н.А., Майлян Э.А. Остеоиммунология: иммунологические механизмы в патогенезе постменопаузального остеопороза // Эндокринология. – 2013. – № 6 (14). – С.17-22.
150. Поленичкин В.К. Экспериментальное изучение особенностей изменения костной ткани в зоне введения имплантатов из наноструктурированного титана BT1-0 и с кальций-фосфатным покрытием на животных (кроликах) / В.К.Поленичкин, Ю.П.Шаркеев, В.А.Рыков [и др.] // Медицина в Кузбассе. Спецвыпуск. – 2009. – № 2. – С.141-142.
151. Потеряева О.Н. Матриксные металлопротеиназы: строение, регуляция, роль в развитии патологических состояний (обзор литературы) // Медицина и образование в Сибири. – 2010. – № 5. Электронный журнал. – http://www.ngmu.ru/cozo/mos/article/text_full.php?id=449
152. Раскин А.В. Морфофункциональная характеристика костномозгового кроветворения в процессе репаративной регенерации костной ткани у собак: автореф.дис. ... канд.вет.наук / А.В.Раскин. – М., 2002. – 17 с.
153. Риггз Б.Л., Мелтон III Л.Дж. Остеопороз: пер. с англ. – М.-СПб.: ЗАО «Издательство БИНОМ», «Невский диалект», 2000. – 560 с.
154. Ройт А., Бростофф Дж., Мейл Д. Иммунология: пер с англ. – М.: Мир, 2000. – 592 с.

155. Российский статистический ежегодник. Здравоохранение. Раздел 8. – М., 2014.– С. 207-228.
156. Рубштейн А.П. Влияние температуры на формирование рельефа углеродных алмазоподобных пленок и его модификация ионной бомбардировкой / А.П.Рубштейн, И.Ш.Трахтенберг, В.А.Югов [и др.] // Физика металлов и металловедение. – 2006. – Т.102, № 6. – С.671-677.
157. Рубштейн А.П., Макарова Э.Б., Трахтенберг И.Ш., Близнец Д.Г. Влияние углеродных алмазоподобных пленок и наночастиц гидроксиапатита на остеоинтеграционные свойства пористых титановых имплантов // Нанотехника. – 2011. – № 3. – С.73-81.
158. Рубштейн А.П., Макарова Э.Б., Трахтенберг И.Ш., Захаров Ю.М.Биоимплантаты на основе пористого титана с алмазоподобными пленками для замещения костной ткани. – Екатеринбург: РИО УрО РАН, 2012. – 136 с.
159. Савченко С.В., Степанищев И.В., Кузнецов Е.В. Эффективность использования метода фиксации при заборе органов и тканей для электронного микроскопического исследования // Актуальные вопросы судебной медицины и экспертной практики. – Электронный судебно-медицинский журнал. – Новосибирск. – 2009. – Доступ: <http://journal.forens-lit.ru/node/156>
160. Сакалла М.М. Клинико-биохимическое исследование взаимодействия наночастиц меди с бактериальной флорой и ферментами ротовой жидкости у больных кариесом и изучение биологического действия наночастиц в экспериментальных исследованиях: автореф.дис... д-ра мед. наук / М.М.Сакалла. – Саратов, 2012. – 26 с.
161. Сапин М.Р., Юрина Н.А., Этинген Л.Е. Лимфатический узел структура и функция. – М.: «Медицина», 1978. – 272 с.
162. Сатар Ф.А. Особенности физико-химических, кинетических и регуляторных свойств изоформ малатдегидрогеназы из печени крыс при аллоксановом диабете: автореф.дис...канд.биол.наук / Ф.А.Сатар. – Воронеж, 2010. – 24 с.
163. Сафонова О.А. Свойства и регуляция активности НАД- и НАДФ-малатдегидрогеназ в условиях оксидативного стресса в миокарде крыс при ишемии: автореф.дис.....канд.биол.наук / О.А.Сафонова. – Воронеж, 2004. – 24 с.
164. Селиванов В.В. Механика разрушения деформируемого тела. – М.: Изд-во МГТУ им. Н.Э.Баумана, 1999. – 418 с.
165. Семенова А.Н., Дутов А.А., Пинелис И.С. Динамика показателей минерального обмена у больных с переломом челюсти // Забайкальский медицинский вестн. – 2013. – № 1. – С.78-82.

166. Сергеева Ю.В., Гусева Т.П. Аллергия к материалам, применяемым в ортопедической стоматологии // Лечащий врач <http://www.lvrach.ru/2004/03/4531140>.
167. Симбирцев А.С. Интерлейкин-8 и другие цитокины // Иммунология. – 1999. – №4. – С.9-14.
168. Соловьева А.Г., Зимин Ю.В. Способ оценки динамики метаболизма крови при термической травме // Современные технологии в медицине. – 2012. – № 2. – С.116-117.
169. Статистический сборник Беларусь и Россия. 2009. – М.: Росстат, 2009. – 179 с.
170. Тер-Асатуров Г.П. Сравнительное экспериментально-морфологическое исследование эффективности биологических остеопластических материалов в замещении костных дефектов / Г.П.Тер-Асатуров, М.В.Лекишвили, А.Т.Бигваева [и др.] // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2012. – № 1. – С.81-85.
171. Тишевская Н.В. Характер влияния фуллеренола $C_{60}(OH)_{24}$ на эритропоэз *in vitro* / Н.В.Тишевская, Ю.М.Захаров, Е.В.Голуботовский [и др.] // Бюл. эксперим. биологии и медицины. – 2014. – Т.157, № 1. – С.57-60.
172. Ткаченко В.М. Экспериментальное обоснование применения бактерицидного остеointegrativного геля на основе гиалуроновой кислоты и гидроксиапатита для повышения эффективности дентальной имплантации: автореф.дис....канд.мед.наук / В.М.Ткаченко. – М., 2008. – 30 с.
173. Ткачук Е.А. Особенности метаболических изменений при скелетной травме в условиях применения метода чрескостного остеосинтеза по Илизарову: автореф.дис....канд.мед.наук / Е.А.Ткачук. – Казань, 2012. – 22 с.
174. Торбенко В.П. Касавина Б.С. Функциональная биохимия костной ткани. – М.: «Медицина», 1977. – 272 с.
175. Трахтенберг И.Ш. Механические свойства и структура системы пор титана, полученного спеканием компактированной губки / И.Ш.Трахтенберг, А.Б.Борисов, В.И.Новожинов [и др.] // Физика металлов и металловедение. – 2008. – Т.105, № 1. – С.99-104.
176. Трифонова Е.Б. Роль метаболических процессов в формировании иммобилизационного остеопороза // Фундаментальные исследования. – 2011. – № 6. – С.177-181.
177. Турна А.А. Матриксные металлопротеиназы в развитии деструктивных процессов при ревматоидном артрите // Научно-практическая ревматология. – 2010. – № 3. – С.50-64.
178. Уголовный кодекс Российской Федерации. Глава 25, ст. 245 "Жестокое обращение с животными" <http://www.ug-kodeks.ru>
179. Филимонов В.И. Исследование в онтогенезе механизма гуморальной регуляции эритропоэза и роли селезенки в этом процессе: автореф. дис...д-ра мед. наук / В.И.Филимонов. – Новосибирск, 1974. – 47 с.

180. Филимонов В.И. Концепция: серотонин – универсальный ингибитор образования эритропоэтина // Актуальные проблемы регуляции кроветворения и неоангиогенеза: материалы конференции, посвященной 100-летию проф. Р.А.Дымшица. – Челябинск, 1998. – С.44-51.
181. Филимонов В.И. Спленизм – функция селезенки как органа, осуществляющего взаимосвязь систем кровообращения и кроветворения / В.И.Филимонов, Н.В.Степанова, И.Е.Сухомлинова [и др.] // Патология. – 2013. – № 2 (28). – С.92-96.
182. Филиппенко В.А. Исследование коррозионно-химических свойств и биосовместимости субмикрористаллического титана марки BT1-0 / В.А.Филиппенко, Е.К.Севидова, Н.В.Дедух [и др.] // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2011. – № 3. – С.68-72.
183. Фриденштейн А.Я. Клонирование стромальных клеток-предшественников // Методы культивирования клеток. – Л., 1987. – С.257-265.
184. Фролова Е.Н. применение титанового сплава в качестве носителя для стволовых клеток с целью ускорения регенерации дефекта челюсти в эксперименте. – М., 2008. – 23 с.
185. Хафизов Р.Г., Цыплаков Д.Э., Хайруллин Ф.А. Изучение новообразованной ткани внутри пористой структуры никелид титанового имплантата методом глубокого травления по Миргазизову // Российский вестник дентальной имплантологии. – 2006. – № 1/2 (13/14). – С.26-29.
186. Хлусов И.А. Вопросы клеточной технологии и биоинженерии тканей (обзор) // J. Siberian Federal University. Biology. – 2008. – №3. – P.269-294.
187. Ходоренко В.Н., Ясенчук Ю.Ф., Гюнтер В.Э. Биосовместимые пористые проницаемые материалы // stat34521.narod.ru/NiTi/24.pdf
188. Храмова Ю.Р. Экспериментальное животное: основы правового регулирования // Медицинское право. – 2004. – № 2. – С 20-24.
189. Чеканов А.В. Количественный эффект повышения остеоиндуктивности материала за счет включения в него рекомбинантного морфогенетического белка кости rhBMP-2 / А.В.Чеканов, И.С.Фадеева, В.С.Акатов [и др.] // КТТИ. – 2012. – Май. – Вып.VII (2). – С.75-81.
190. Четыре самых тяжелых осложнения в эндопротезировании. Интервью с д-ром Harry E. Rubash // CeraNews. – 2014. – №2. – P.6-10.
191. Чуманов А.Ю. Хирургическое лечение повреждений селезенки с учетом изменений иммунного статуса: автореф.дис...канд. мед.наук / А.Ю.Чуманов. – М., 2011. – 22 с.
192. Шварц Г.Я. Остеопороз, падения и переломы в пожилом возрасте: роль D-эндокринной системы // Русский медицинский журнал. – 2008. – Т.16, № 10. – С.1-10.

193. Шве́ц А.И., Ивченко В.К. Костные трансплантаты и их заменители в хирургии позвоночника // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2008. – № 3. – С.66-69.
194. Шевцов В.И., Борзунов Д.Ю., Митрофанов А.И., Колчев О.В. Стимуляция регенерации костной ткани в полостных дефектах при лечении пациентов с опухолеподобными заболеваниями длинных костей // Гений ортопедии. – 2009. – № 1. – С.107-109.
195. Шевцов В. И. Перспективы применения нанотехнологий в травматологии и ортопедии // Научные основы и перспективы развития онкологии. Нанотехнологии и наноматериалы в медицине: сб. материалов XIX (82) сессии Общего собрания РАМН. – М., 2008. – С.300-336.
196. Шпилевский И.Э., Босяков С.М., Лихачевский Ю.В. Расчет остаточной прочности костей конечностей после выполнения секторальной резекции // Медицинские новости. – 2013. – №10. – С.70-74.
197. Шумилова А.А., Шишацкая Е.И. Материалы для восстановления костной ткани // J.Siberian Federal University. Biology. – 2014. – Т. 2, №7. – С.209-221.
198. Щепкина Е.А., Кругляков П.В., Соломин Л.Н. Трансплантация аутогенных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток на деминерализованном костном матриксе при лечении ложных суставов длинных трубчатых костей // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2007. – Т. 2, Вып.3. – С.67-74.
199. Щетинин С.А. Медико-социальные последствия травматизма в России на рубеже веков // Социальные аспекты здоровья населения. – 2014. – Т. 38, № 4. – С. 16.
200. Юшков Б.Г., Абидов М.Т., Данилова И.Г., Медведева С.Ю. Неиммунологические функции макрофагов. – Екатеринбург: УрО РАН, 2011. – 246 с.
201. Abe E. Essential requirement of BMPs-2/4 for both osteoblast and osteoclast formation in murine bone marrow cultures from adult mice: antagonism by noggin / E.Abe, M.Yamamoto, Y.Taguchi [et al.] // J.Bone Min.Res. – 2000. – Vol.15. – P.663-673.
202. Abedin M., Tintut Y., Demer L.L. Mesenchymal stem cells and the artery wall // Circ. Res. – 2004. – Vol.95, № 7. – P.671-676.
203. Abrahamsson C.K. Chondrogenesis and Mineralization During *In Vitro* Culture of Human Mesenchymal Stem Cells on Three-Dimensional Woven Scaffolds / C.K. Abrahamsson, F. Yang, H.Park [et al.] // Tissue Eng Part A. – 2010. – December. – Vol.16 (12). – P.3709-3718.
204. Aigner S. Fast myosin heavy chain diversity in skeletal muscles of the rabbit: heavy chain IId, not IIb predominates / S.Aigner, B.Gohlsch, N.Hamalainen [et al.] // Eur.J.Biochem. –1993. – Vol.211. – P.367-372.
205. Albrektsson T., Wennerberg A. The impact of oral implants-past and future, 1966-2042 // J.Can.Dent Assoc. – 2005. – Vol.71 (5). – P.327.

206. Al-Jabri T., Mannan A., Giannoudis P. The use of the free vascularised bone graft for nonunion of the scaphoid: a systematic review // *J.Orthop.Surg.Res.* – 2014. – Vol. 9. – P.21.
207. Allen M., Law F., Rushton N. The effect of diamond-like carbon coatings on macrophages, fibroblast and osteoblast – like cells in vitro // *Clinical Materials.* – 1994. – Vol.17. – P.1-10.
208. Altaf H. The inflammatory response to particulate wear debris in the context of total hip replacement. – London, 2007. – 102 p.
209. An Y., Draughn R. Mechanical Testing of Bone and the Bone-Implant Interface. – CRC Press. – 1999. – 648 c.
210. Andrade J.D, Hlady. Protein adsorption and materials biocompatibility: a tutorial review and suggested hypotheses // *Advances in polymer science, biopolymer / non-exclusion HPLC.* – Berlin: Springer, 1986. – Vol.79. – P.1-63.
211. Anissian L. Cobalt ions influence proliferation and function of human osteoblast-like cells / L.Anissian, A.Stark, H. Dahlstrand [et al.] // *Acta Orthop.Scand.* – 2002. – Vol.73. – P.369-374.
212. Archibeck M.J., Jacobs J.J., Roebuck K.A., Glant T.T. The basic science of periprosthetic osteolysis // *J.Bone Jt.Surg.Am.* – 2000. – Vol.82. – P.1478-1489.
213. Arima Y., Iwata H. Effect of wettability and surface functional groups on protein adsorption and cell adhesion using well-defined mixed self-assembled monolayers // *Biomaterials.* – 2007. – Vol.28. – P.3074-3082.
214. Aro H.T. Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2: A Randomized Trial in Open Tibial Fractures Treated with Reamed Nail Fixation / L. Anissian, A. Stark, H. Dahlstrand [et al.] // *J. Bone Jt.Surg.Am.* – 2011. – May. – Vol.93 (9). – P.801-808.
215. Athanasou N.A. Synovial macrophages // *Annals of the Rheumatic Diseases.* – 1995. – Vol.54. – P.392-394.
216. Aubin J.E., Bonnelye E. Osteoprotegerin and its ligand: a new paradigm for regulation of osteoclastogenesis and bone resorption // *Osteoporos.Int.* – 2000. – Vol.11. – P.905-913.
217. Augello A., Bari C. De the Regulation of Differentiation in Mesenchymal Stem Cells // *Human gene therapy.* – 2010. – October. – Vol.21. – P.1-13.
218. Ausk B.J., Gross T.S., Srinivasan S. An agent based model for real-time signaling induced in osteocytic networks by mechanical stimuli // *J.Biomech.* – 2006. – Vol.39. – P.2638-2646.
219. Baby Gayathri S., Kamara J.P. Macrophage and Osteoblast Response to Micro and Nano Hydroxyapatite // *Nano Vision.* – 2011. – 28 February. – Vol.1. – Issue 1. – P.1-53.
220. Back D.L., Young D.A., Shimmin A.J. How do serum cobalt and chromium levels change after metal-on-metal hip resurfacing? // *Clin.Orthop.Rel.Res.* – 2005. – Vol.438. – P.177-181.
221. Baik K.Y. Carbon nanotube monolayer cues for osteogenesis of mesenchymal stem cells / K.Y.Baik, S.Y.Park, K.Heo [et al.] // *SMALL.* – 2011. – Vol.7. – P.741-745.

222. Bakir M. Haemocompatibility of titanium and its alloys // J. Biomaterials Applications. – 2012. – № 27(1). – P.3-15.
223. Balasundaram G., Sato M., Webster T.J. Using hydroxyapatite nanoparticles and decreased crystallinity to promote osteoblast adhesion similar to functionalizing with RGD // Biomaterials. – 2006. – Vol.27. – P.2798-2805.
224. Balla V.K., Banerjee S., Bose S., Bandyopadhyay A. Direct laser processing of a tantalum coating on titanium for bone replacement structures // Acta Biomater. – 2009. – Dec. – № 3. – P. 29-34.
225. Bandyopadhyay A., Espana F., Krishna Balla V. Influence of Porosity on Mechanical Properties and *In vivo* Response of Ti6Al4V Implants // Acta Biomater. – 2010. – April. – №6(4). – P.1640-1648.
226. Barthel L.K., Raymond P.A. In situ hybridization studies of retinal neurons. Vertebrate Phototransduction and the Visual Cycle // Methods in Enzymology; K.Palczewski ed. – 2000. – Vol.316. – Part B. – Academic Press: Orlando, FL. – P. 579-590.
227. Bartold P.M, Narayanan A.S. Biology of the periodontal connective tissues // Quint. Int. – 1998. – Vol.6. – 276 p.
228. Behfar A., Terzic A. Stem Cell Based Cardioregeneration and Adipose Tissue // Adipose Stem Cells and Regenerative Medicine. – 2011. – P.141-154.
229. Bessa P.C., Casal M., Reis R.L. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from the laboratory to the clinic, part I (basic concepts) // J.Tissue Eng.Regen.Med.– 2008.– Vol.2.–P.1-13.
230. Beyan C., Beyan E.A Common Cause of Anemia in Inflammatory Disorders: Anemia of Chronic Disease // Cur.Rheumatology Reviews. – 2005. – Vol.1, № 3. – P.227-230.
231. Bialek P. A twist code determines the onset of osteoblast differentiation / P. Bialek, B. Kern, X. Yang [et al.] // Dev.Cell. – 2004. – Vol.6 (3). – P.423-435.
232. Billi F., Campbell P. Nanotoxicology of metal wear particles in total joint arthroplasty: a review of current concepts // J.Appl.Biomat.Biomech. – 2010. – Vol.8. – P.1-6.
233. Biomaterials in Orthopedics / Edited by Yaszemski M., Trantolo D.J., Lewandrowski K.-U., Hasirci V., Altobelli D. E., Wise D. L. // Marcel Dekker, Inc. – New York, Basel, 2004. – 455 p.
234. Blackwell K.A., Raisz L.G., Pilbeam C.C. Prostaglandins in bone: bad cop, good cop? // Trends Endocrinol.Metab. – 2010. – May. – Vol.21, № 5. – P.294-301.
235. Bobyn J.D. The effect of stem stiffness on femoral bone resorption after canine porous-coated total hip arthroplasty / J.D. Bobyn, A.H. Glassman, H. Goto [et al.] // Clin.Orthop.Rel.Res. – 1990. – Dec. – Vol.261. – P.196-213.

236. Bostrom M.P. Osteoinductive growth factors in preclinical fracture and long bone defects models // *Orthop.Clin.North.Am.* – 1999. – Vol.30. – P.647-658.
237. Bouxsein M.L. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 accelerates healing in a rabbit ulnar osteotomy model / M.L. Bouxsein, T.J. Turek, C.A. Blake [et al.] // *J.Bone Jt.Surg.Am.* – 2001. – Vol.83-A. – P.1219-1230.
238. Boyan B.D., Schwartz Z., Boskey A.L. The Importance of Mineral in Bone and Mineral Research // *Bone.* – Vol.27, № 3. – 2000. – P.341-342.
239. Boyne P.J. Transplantation, implantation and grafts // *Dent Clin.North.Am.* – 1971. – Apr. – Vol.15(2). – P.433-453.
240. Breeding K. The Effect of Hydroxyapatite Nanocrystals on Osseointegration of Titanium Implants: An In Vivo Rabbit Study / K.Breeding, R.Jimbo, M.Hayashi [et al.] // *International J. Dentistry.* – 2014. – Vol. 2014. – 9 p. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/171305>
241. Brodner W. Cup inclination and serum concentration of cobalt and chromium after metal-on-metal total hip arthroplasty / W.Brodner, A.Grübl, R.Jankovsky [et al.] // *J.Arthroplasty.* – 2004. – Vol.19. – P.66-70.
242. Burger E.H., Klein-Nulend J. Mechanotransduction in bone - role of the lacuno-canalicular network // *J. FASEB.* – 1999. – May. – Vol.13, № 9001. – P.S101-S112.
243. Buser D., Dahlin Ch., Schenk R.K. Bone Regeneration in Implant Dentistry. – Quintessence Publishing Co, Inc., 1994. – 262 p.
244. Cacciafesta P. Visualisation of human plasma fibrinogen adsorbed on titanium implant surfaces with different roughness / P. Cacciafesta, K.R. Hallam, A.C. Watkinson [et al.] // *Surface Science.* – 2001. – Vol.491(3). – P.405-420.
245. Cadosch D., Chan E., Gautschi O.P., Filqueira L. Metal is not inert: role of metal ions released by biocorrosion in aseptic loosening – current concepts // *J.Biomed.Mat.Res.A.* – 2009. – Vol.15. – P.1252-1262.
246. Cadosch D. Metal ions: important co-players in aseptic loosening / D.Cadosch, C.L.Schlett, O.P.Gautschi [et al.] // *Orthop.Unfall.* – 2010. – Vol.148 (4). – P.393-397.
247. Canalis E., Economides A.N., Gazzerro E. Bone morphogenetic proteins, their antagonists and the skeleton // *Endocr.Rev.* – 2003. – Apr. – Vol.24 (2). – P.218-235.
248. Candelieri G.A., Liu F., Aubin J.E. Individual osteoblasts in the developing calvaria express different gene repertoires // *Bone.* – 2001. – Apr. – Vol.28 (4). – P.351-361.
249. Case C.P. Widespread dissemination of metal debris from implants / C.P.Case, V.G.Langkamer, C.James [et al.] // *J.Bone Jt.Surg.Br.* – 1994. – Vol.76. – P.701-712.
250. Chai F. Osteoblast interaction with DLC-coated Si substrates / Chai F., Mathis N., Blanchemain N. [et al.] // *Acta Biomaterialia.* – 2008. – Vol.4. – P.1369-1381.

251. Chen G., Deng C., Li Y.-P. TGF- β and BMP Signaling in Osteoblast Differentiation and Bone Formation // *Int.J.Biol.Sci.* – 2012. – Vol.8 (2). – P.272-288.
252. Chen J.Y. Antithrombogenic investigation of surface energy and optical bandgap and hemocompatibility mechanism of Ti(Ta+5)O₂ thin films / J.Y.Chen, Y.X.Leng, X.B.Tian [et al.] // *Biomaterials.* – 2003. – Jun. – № 24 (13). – P.2177-2187.
253. Chnari E. Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) Levels are Predictive of the Osteoinductive Potential of Demineralized BoneMatrix / E.Chnari, M.Javoroncov, A.A.Gertzman [et al.] // 56th Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, New Orlean, March, 6-9th. – 2010. – Poster № 485.
254. Clarke S.A., Revell P.A. Integrin expression at the bone/biomaterial interface // *J.Biomed.Mat.Res.* – 2001. – Vol.57. – P.84-91.
255. Cochran D.L. Bone response to unloaded and loaded titanium implants with a sandblasted and acid-etched surface: a histometric study in the canine mandible / D.L. Cochran, R.K. Schenk, A. Lussi [et al.] // *J.Biomed.Mat.Res.* – 1998. – Vol.40. – P.1-11.
256. Cooper M.S. Glucocorticoids in bone and joint disease: the good, the bad and the uncertain // *Clin. Med.* – 2012. – June. – Vol.12, № 3. – P.261-265. doi: 10.7861/clinmedicine.12-3-261.
257. Cordero J., Munuera L., Folgueira M.D. Influence of metal implants on infection // *J. Bone Jt. Surg.* – 1994. – Vol.76-B. – P.717-720.
258. Corisdeo S. New Insights into the Regulation of Cathepsin K Gene Expression by Osteoprotegerin Ligand / S.Corisdeo, M.Gyda, M.Zaidi [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications.* – 2001. – Vol.285. – P.335-339.
259. Corselli M. Perivascular ancestors of adult multipotent stem cells / M.Corselli, C.-W.Chen, M.Crisan [et al.] // *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* – 2010. – Vol.30, № 6. – P.1104-1109.
260. Coste I. Unavailability of CD147 leads to selective erythrocyte trapping in the spleen / I.Coste, J.-F.Gauchat, A.Wilson [et al.] // *Blood.* – 2001. – Vol.97, № 12. – P.3984-3988.
261. Cui F.Z., Li D.J. A review of investigations on biocompatibility of diamond-like carbon and carbon nitride films // *Surface and Coatings Technology.* – 2000. – Vol.131. – P.481-487.
262. Cunha M.J.S. Effect of Low-Level Laser on Bone Defects Treated with Bovine or Autogenous Bone Grafts: In Vivo Study in Rat Calvaria / M.J.S.Cunha, L.A.Esper, M.C.Sbrana [et al.] // <http://dx.doi.org/10.1155/2014/104230>
263. Dalby M.J. Genomic expression of mesenchymal stem cells to altered nanoscale topographies / M.J.Dalby, A.Andar, A.Nag [et al.] // *J.R.Soc.Interface.* – 2008. – Sep. – Vol.6, №5(26). – P.1055-1065.

264. Dalby M.J. Morphological and microarray analysis of human fibroblasts cultured on nanocolumns produced by colloidal lithography / M.J.Dalby, M.O.Riehle, D.S.Sutherland [et al.] // Eur.Cells and Materials. – 2005. – Vol.9. – P.1-8.
265. Daley B., Doherty A.T., Fairman B., Case C.P. Wear debris from hip or knee replacements causes chromosomal damage in human cells in tissue culture // J.Bone Jt.Surg. Br. – 2004. – Vol.86. – P.598-606.
266. Danko J.C., Lundin C.D. Microstructural Characterization of Microbial Influenced Corrosion in stainless steel // Microstructural Science. – 1997. – Vol.25. – P.73-80.
267. Davies A.P. An unusual lymphocytic perivascular infiltration in tissues around contemporary metal-on-metal joint replacements / A.P. Davies, H.G. Willert, P.A. Campbell [et al.] // J.Bone Jt.Surg.Am. – 2005. – Vol.87. – P.18-27.
268. Davies J.E. Mechanism of Endosseous Integration // Int.J.Prostodont. – 1998. – № 245. – P.391-401.
269. De Boer H.H., Wood M.B. Bone changes in the vascularized fibular graft // J.Bone Jt.Surg. (Br.). – 1989. – Vol.71. – P.374-378.
270. Deckers M.M. Bone morphogenetic proteins stimulate angiogenesis through osteoblast-derived vascular endothelial growth factor A / M.M. Deckers, R.L. van Bezooijen, G.van der Horst [et al.] // Endocrinology. – 2002. – Vol.143. – P.1545-1553.
271. den Boer F.C. Healing of segmental bone defects with granular porous hydroxyapatite augmented with recombinant human osteogenic protein-1 or autologous bone marrow // J.Orthop.Res. – 2003. – Vol.21. – P.521-528.
272. Deshmukh S.R., Birch M.A., McCaskie A.W. Nanotechnology, nanomedicine and orthopaedics//J.Bone & Joint Surgery; British
<http://www.boneandjoint.org.uk/content/nanotechnology-nanomedicine-and-orthopaedics>
273. Dillaman R., Roer R., Gay D. Fluid movement in bone: theoretical and empirical: Proc. of the NASA Symp. on the influence of gravity and activity on muscle and bone // J.Biomechanics. – 1991. – Vol.24, № 1. – Suppl. – P.163-177.
274. Dominici M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller [et al.] // Cytotherapy. – 2006. – Vol.8 (4). – P.315-317.
275. Doorn P.F. Metal wear particle characterization from metal on metal total hip replacements: transmission electron microscopy study of periprosthetic tissues and isolated particles / P.F. Doorn, P.A.Campbell, J.Worrall [et al.] // J. Biomed. Mater. Res. – 1998. – Vol. 42. – P.103-111.
276. du Preez L.A., Bütow K.W., Swart T.J. Implant failure due to titanium hypersensitivity/allergy? – Report of a case // SADJ. – 2007. – Feb. – Vol.62 (1). – P.22-25.

277. Eilertsen K. Simulation of MRI based dose calculations on the basis of radiotherapy planning CT images / K. Eilertsen, L.Nilsen , T.A. Vestad [et al.] // *Acta Oncologica*. – 2008. – Vol.47. – P.1294-1302.
278. Elves M.W., Wilson N., Scales T., Kemp H.B.S. Incidence of metal sensitivity in patients with total joint replacements // *Br.Med.J.* – 1975. – Vol.4. – P.376-378.
279. Emrani H., Davies J.E. Umbilical Cord Perivascular Cells: A Mesenchymal Cell Source for Treatment of Tendon Injuries / H. Emrani, John E. Davies the Open Tissue Engineering and Regenerative // *Medicine J.* – 2011. – № 4. – P.112-119.
280. Epstein N.E. Pros, cons, and costs of INFUSE in spinal surgery // *Surg. Neurol. Int.* – 2011. – Vol.2. – P.10.
281. Erices A., Conget P., Minguell J.J. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood // *Br. J. Haematol.* – 2000. – Vol.109, № 1. – P.235-242.
282. European Commission Scientific Committee on Consumer Products SCCP Opinion on safety of nanomaterials in cosmetic products Adopted by the SCCP after the public consultation on the 14th plenary of 18 December 2007.
http://ec.europa.eu/health/ph_risk/committees/04_sccp/docs/sccp_o_123.pdf.
283. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimentation and other Scientific Purposes, N 123 of 18 March 1986; Protocol of Amendment to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, Strasbourg, 22 June 1998. <http://conventions.coe.int/>
284. Evrard L. Titanium: A New Allergen, Implant Dentistry – глава 23 в книге *Implant Dentistry - A Rapidly Evolving Practice*, Edited by Prof. Ilser Turkeyilmaz (Ed.), ISBN: 978-953-307-658-4, InTech, August, 2011. – 544 p.
285. Fattore A.D., Teti A., Rucci N. Bone cells and the mechanisms of bone remodeling // *Frontiers in Bioscience E4*. – 2012. – January 1. – P.2302-2321.
286. Fauber J. Bone-fusion protein goes from revolutionary advance to health alert after side effects surface // *J. Sentinel* Aug. 28, 2010. <http://www.jsonline.com/news/health/101732913.html>
287. Fauza D. Amniotic fluid and placental stem cells // *Best Pract.Res.Clin.Obstet.Gynaecol.* – 2004. – Vol.18, № 6. – P.877-891.
288. Fibbe W. E. Mesenchymal stem cells. A potential source for skeletal repair *Ann Rheum Dis* . – 2002. – Vol.61, Suppl. II. – P. 1129-1131.
289. Flatebø R.S. Mapping of titanium particles in peri-implant oral mucosa by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry and high-resolution optical darkfield microscopy / Flatebø R.S., Høl P.J., Leknes K.N. [et al.] // *J.Oral.Pathol.Med.* – 2011. – May. – Vol.40 (5). – P.412-420.

290. Fleury C. Effect of cobalt and chromium ions on human MG-63 osteoblasts in vitro: morphology, cytotoxicity and oxidative stress / C.Fleury, A.Petit, F.Mwale [et al.] // *Biomaterials*. – 2006. – Vol.27. – P.3351-3360.
291. Forte G., Petrucci F., Bocca B. Metal allergens of growing significance: epidemiology, immunotoxicology, strategies for testing and prevention // *Inflamm Allergy Drug. Targets*. – 2008. – Sep. – Vol.7 (3). – P.145-162.
292. Franz-Odenaal T.A., Hall B.K., Witten P.E. Buried Alive: How Osteoblasts Become Osteocytes // *Developmental Dynamic*. – 2006. – Vol.235. – Is.1. – P.176-190.
293. Fratzl P. Structure and mechanical quality of the collage-mineral nano-composite in bone / Fratzl P., Gupta H.S., Paschalis E.P. [et al.] // *J.Mater.Chem*. – 2004. – Vol.14. – P.2115-2123.
294. Frayssinet P. Comparative biological properties of HA plasma-sprayed coatings having different crystallinities / P.Frayssinet, F.Tourenne, N.Rouquet [et al.] // *J.Mater.Sci.Mater.Med*. – 1994. – Vol.5, №1. – P.11-17.
295. Friedenstein A.J. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo / A.J.Friedenstein, R.K. Chailakhyan, N.V. Latsinik [et al.] // *Transplantation*. – 1974. – Apr. – Vol.17 (4). – P.331-340.
296. Friedenstein A.J., Chailakhyan R.K., Gerasimov U.V. Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers // *Cell Tissue Kinet*. – 1987. – Vol.20 (3). – P.263-272.
297. Frigerio E., Pigatto P.D., Guzzi G., Altomare G. Metal sensitivity in patients with orthopaedic implants: a prospective study // *Contact Dermatitis*. – 2011. – Vol.64. – P.273-279.
298. Frisken K.W., Dandie G.W., Lugowski S., Jordan G.A. Study of Titanium Release into Body Organs Following the Insertion of Single Threaded Screw Implants into the Mandibles of Sheep // *Australian Dental J*. – 2002. – September. – Vol.47, Is.3. – P.214-217.
299. Fukuchi Y. Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential // *Stem.Cell*. – 2004. – Vol.22, №5. – P.649-658.
300. Gallie W., Robertson D. Transplantation of bone / Y.Fukuchi, H. Nakajima, D.Sugiyama [et al.] // *JAMA*. – 1918. – № 70. – P.1134.
301. Garg A.K., Garg A.K. Bone Biology, Harvesting, Grafting for Dental Implants. – Rationale and Clinical Applications Hardcover – 2004. – October 1. – 279 p.
302. Gelderman M.P. Adverse effects of fullerenes on endothelial cells: Fullerenol C60(OH)24 induced tissue factor and ICAM-1 membrane expression and apoptosis in vitro / M.P.Gelderman, O.Simakova, J.D.Clogston [et al.] // *Int.J.Nanomedicine*. – 2008. – № 3(1). – P.59-68.
303. Gerson Stanton L., Mesenchymal stem cells: No longer second class marrow citizens // *Nature Med*. – 1999. – № 3. – P.262-264.

304. Ghodadra N., Singh K. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in the treatment of bone fractures // *Biologics*. – 2008. – September. – Vol.2 (3). – P.345-354.
305. Giannoudis P.V., Dinopoulos H., Tsiridis E. Bone substitutes: an update (Review) // *Injury*. – 2005. – Nov. – Vol.36, Suppl. 3. – P.S20-27.
306. Gibson L.G. Biomechanics of cellular solids // *J.Biomechanics*. – 2005. – Vol.38. – P.377-399.
307. Gill G.S., Joshi A.B. Long-term results of cemented, posterior cruciate ligament-retaining total knee arthroplasty in osteoarthritis // *Am. J. Knee Surg.* – 2001. – Vol.14. – P.209-214.
308. Glassman S.D. Complications with rhBMP-2 in posterolateral spine fusion: A consecutive series of one thousand thirty-seven cases / S.D. Glassman, J.Howard, J.Dimar [et al.] // *Spine (Phila Pa 1976)*. – 2011. – Oct. – Vol.15, № 36 (22). – P.1849-1854.
309. Goel A., Sangwan S.S., Siwach R.C., Ali A.M. Percutaneous bone marrow grafting for the treatment of tibial non-union // *Injury*. – 2005. – Vol.36. – P.203-206.
310. Goodman S.B. Cellular profile and cytokine production at prosthetic interfaces. Study of tissues retrieved from revised hip and knee replacements / S.B.Goodman, P.Huie, Y.Song [et al.] // *J.Bone Jt.Surg.Br.* – 1998. – Vol.80. – P.531-539.
311. Govender S. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 for treatment of open tibial fractures: a prospective, controlled, randomized study of four hundred and fifty patients / S.Govender, C. Csimma, H.K, Genant [et al.] // *J.Bone Jt.Surg.Am.* – 2002. – Dec. – Vol.84-A(12). – P.2123-2134.
312. Grammatopoulos G. The relationship of wear volume with his topathological features in failed hip resurfacing arthroplasty – An insight on failures associated with pseudotumours: Abstract 13-4022, EFORT 2013 Concept and text: S. Usbeck / G.Grammatopoulos, H.Pandit, A.Kamali [et al.] // *CeraNews*. – 2013. – № 2. – P.6-9.
313. Granchi D. Sensitivity to implant materials in patients undergoing total hip replacement / D.Granchi, E.Cenni, G.Trisolino [et al.] // *J.Biomed.Mat.Res.B.Appl.Biomater.* – 2006. – Vol.77. – P.257-264.
314. Gratton S.E. The effect of particle design on cellular internalization pathways / S.E.Gratton, P.A. Ropp, P.D. Pohlhaus [et al.] // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. – 2008. – Vol. 105 (33). – P.11613-11618.
315. Gross T.S. Why rest stimulates bone formation: a hypothesis based on complex adaptive phenomenon / T.S. Gross, S.L. Poliachik, B.J. Ausk [et al.] // *Exerc.Sport.Sci.Rev.* – 2004. – Vol.32. – P.9-13.
316. Gross U., Strunz V. The Interface of Various Glasses and Glass-Ceramics with a Bony Implantation Bed // *J.Biomed.Mat.Res.* – 1985. – Vol.19. – P.251.

317. Gross V. Interleukin-8 and neutrophil activation in acute pancreatitis / Gross V., Andreesen R, Leser H.-G. [et al.] // *Eur.J.Clin Invest.* – 1992. – Vol.22. – P.200-203.
318. Haddad-Weber M. BMP12 and BMP13 gene transfer induce ligamentogenic differentiation in mesenchymal progenitor and anterior cruciate ligament cells / M.Haddad-Weber, P.Prager, M.Kunz [et al.] // *Cytotherapy.* – 2010. – Vol.12, № 4. – P.505-513.
319. Hallab N.J. Effects of soluble metals on human peri-implant cells / Hallab N.J., Anderson S., Caicedo M. [et al.] // *J.Biomed.Mat.Res.* – 2005. – Vol.74-A. – P.124-140.
320. Hallab N. J., Merrit K., Jacobs J. Current Concepts Review Metal Sensitivity in Patients with Orthopaedic Implants // *J.Bone Jt.Surg.* – 2001. – Vol.83-A, № 3. – March. – P.428-436.
321. Hallab N.J. Concentration- and composition-dependent effects of metal ions on human MG-63 osteoblasts / N.J.Hallab, C.Vermes, C.Messina [et al.] // *J.Biomed.Mat.Res.* – 2002. – Vol.60. – P.420-433.
322. Hallab N.J. In vitro reactivity to implant metals demonstrates a person-dependent association with both T-cell and B-cell activation / N.J.Hallab, M.Caicedo, R.Epstein [et al.] // *J.Biomed Mat.Res.A.* – 2010. – Feb. Vol.92(2). – P.667-682.
323. Hallab N.J., Caicedo M., Finnegan A., Jacobs J.J. Th1 type lymphocyte reactivity to metals in patients with total hip arthroplasty // *J.Orthop.Surg.Res.* – 2008. – Vol.3. – P.6.
324. Han C.S., Wood M.B., Bishop A.T. , Cooney W.P. 3rd. Vascularized bone transfer // *J.Bone Jt.Surg.Am.* – 1992. – Dec. – Vol.74 (10). – P.1441-1449.
325. Hansson S., Norton M. The relation between surface roughness and interfacial shear strength for bone-anchored implants. A mathematical model // *J.Biomech.* – 1999. – Vol.32. – Iss.8. – P.829-836.
326. Harloff T., Hönle W., Holzwarth U. Titanium allergy or not? “Impurity” of titanium implant materials // *Health.* – 2010. – Vol.2, №4. – P.306-310.
327. Harrisson R.G. The stereotropism of embryonic cells // *Science.* – 1911. – Vol.34, № 870. – P.279-281.
328. Hasegawa M. MRI screening of pseudotumors following large-diameter metal-on-metal total hip arthroplasty and metal ion release. Abstract 13-1926, EFORT 2013/2013 Concept and text: S. Usbeck / M.Hasegawa, K. Yoshida, H.Wakabayashi [et al.] // *CeraNews.* – 2013. – №2. – P.6-9.
329. Hedgecock N.L. Quantitative regional associations between remodeling, modeling, and osteocyte apoptosis and density in rabbit tibial midshafts / N.L.Hedgecock, T.Hadi, A.A.Chen [et al.] // *Bone.* – 2007. – Mar. – Vol.40 (3). – P.627-637.
330. Hench L.L. Bioceramics: From Concept to Clinic // *J.Am.Ceramic Soc.* – 1991. – Vol.74, № 7. – P.1487-1510.

331. Hench L.L., Splinter R.J., Alien W.C., Greenlee T.K. Bonding Mechanisms at the Inter face of Ceramic Prosthetic Materials // J. Biomed. Mat.Res. – 1972. – Vol.2, № 1. – P.117-141.
332. Hercus B., Revell P.A. Phenotypic characteristics of T-lymphocytes in the interfacial tissue of aseptically loosened prosthetic joints // J.Mater.Sci.Mat.Med. – 2001. – Vol.12. – P.1063-1067.
333. Hercus B., Saeed S., Revell P.A. Expression profile of T cell associated molecules in the interfacial tissue of aseptically loosened prosthetic joints // J.Mater.Sci.Mater.Med. – 2002. – Vol.13. – P.1153-1156.
334. Hing K.A. Bone repair in the twenty-first century: biology, chemistry or engineering? // Phil. Trans. R. Soc. Lond. A. – 2004. – December. – Vol.352. – P.2821-2850.
335. Hofbauer L.C. Interleukin-1beta and tumor necrosis factor-alpha, but not interleukin-6, stimulate osteoprotegerin ligand gene expression in human osteoblastic cells / L.C.Hofbauer, D.L.Lacey, C.R.Dunstan [et al.] // Bone. – 1999. – Sep. – Vol.25 (3). – P.255-259.
336. Hong C.Y. The role of lipopolysaccharide in infectious bone resorption of periapical lesion / C.Y. Hong, S.K. Lin, S.H. Kok [et al.] // J.Oral.Pathol.Med. – 2004. – Vol.33, № 3. – P.162-169.
337. Hoogduijn M.J. Human heart, spleen, and perirenal fat-derived mesenchymal stem cells have immunomodulatory capacities / M.J.Hoogduijn, M.G.Crop, A.M.Peeters [et al.] // Stem.Cell.Dev. – 2007. – Vol.16, № 4. – P.597-604.
338. Horisaka Y. Subperiosteal implantation of bone morphogenetic protein adsorbed to hydroxyapatite / Y.Horisaka, Y.Okamoto, N. Matsumoto [et al.] // Clin.Orthop. – 1991. – Vol.268. – P.303-312.
339. Horwitz E.M. Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement / E.M.Horwitz, K.Le Blanc, M.Dominici [et al.] // Cytotherapy. – 2005. – Vol.7(5). – P.393-395.
340. Horwitz E.M. Isolated allogeneic bone marrow-derived mesenchymal cells engraft and stimulate growth in children with osteogenesis imperfecta: Implications for cell therapy of bone / E.M.Horwitz, P.L.Gordon, W.K.Koo [et al.] // Proc.Natl.Acad.Sci.USA. – 2002. – Jun. – Vol.25, № 99 (13). – P.8931-8937.
341. Hou R. Comparative study between coral-mesenchymal stem cells-rhBMP-2 composite and auto-bone-graft in rabbit critical-sized cranial defect model / R.Hou, F.Chen, Y.Yang [et al.] // J.Biomed.Mat.Res.A. – 2007. – Jan. – Vol.80(1). – P.85-93.
342. Hou Y. Effects of titanium nanoparticles on adhesion, migration, proliferation, and differentiation of mesenchymal stem cells / Y. Hou, K. Cai, J. Li [et al.] // Int.J. Nanomedicine. – 2013. – Vol.8. – P.3619-3630.

343. Hu Y. TiO₂ nanotubes as drug nanoreservoirs for the regulation of mobility and differentiation of mesenchymal stem cells / Y.Hu, K. Cai, Z. Luo [et al.] // *Acta Biomaterialia*. – 2012. – Vol.8. – Issue 1. – P.439-448.
344. Hughes-Fulford M., Li C.-F. The role of FGF-2 and BMP-2 in regulation of gene induction, cell proliferation and mineralization // *J.Orthop.Surg.Res.* – 2011. – Vol.6. – P.8.
345. Ikeda F. Critical roles of c-Jun signaling in regulation of NFAT family and RANKL-regulated osteoclast differentiation / F.Ikeda, R.Nishimura, T.Matsubara [et al.] // *J.Clin.Invest.* – 2004. – Vol.114, № 4. – P.475-484.
346. Ipach I. The development of whole blood titanium levels after instrumented spinal fusion – is there a correlation between the number of fused segments and titanium levels? / I.Ipach, R.Schäfer, F.Mittag [et al.] // *BMC Musculoskelet Disord.* – 2012. – Aug. – Vol.27, № 13. – P.159.
347. Israel D.I., Nove J., Kerns K.M. Expression and Characterization of Bone Morphogenetic Protein-2 in Chinese Hamster Ovary Cells // *Growth Factors*. – 1992. – Vol.7, №2. – P.139-150.
348. Itala A.I. Pore diameter of more than 100 µm is not requisite for bone in growth in rabbits / A.I.Itala, Y.O.Ylanen, C.Ekholm [et al.] // *J.Biomed.Mat.Res.* – 2001. – Vol.58-A. – P.679-683.
349. Jahangir A.A. Bone-graft substitutes in orthopaedic surgery / A.A.Jahangir, R.M.Nunley, S.Mehta [et al.] // *AAOS*. – January. – 2008. – Issue.
<http://www.aaos.org/news/aaosnow/jan08/reimbursement2.asp>
350. Jaiswal N., Haynesworth S.E., Caplan A.I., Bruder S.P. Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro // *J.Cell Biochem.* – 1997. – Feb. – Vol.64(2). – P.295-312.
351. Jimbo R. Genetic responses to nanostructured calcium-phosphate-coated implants / R. Jimbo, Y. Xue, M. Hayashi [et al.] // *J.Dental Research*. – 2011. – Vol. 90, Is.12. – P.1422-1427.
352. Jones A.C. Elastic properties of the Human proximal femur. Part II // *Femoral Neck Architecture and Properties*. – Chapter 5. – 2008.– P.92-164.
https://digitalcollections.anu.edu.au/bitstream/1885/8791/2/05Chapters5and6_Jones.pdf
353. Kadoya Y. Wear particulate species and bone loss in failed total joint arthroplasties / Y. Kadoya, P.A.Revell, A. Kobayashi [et al.] // *Clin.Orthop.Rel. Res.* – 1997. – Vol.340. – P.118-129.
354. Kanaji A. Cytotoxic effects of cobalt and nickel ions on osteocytes in vitro / Kanaji A., Orhue V., Caicedo M.S. [et al.] // *Orthopaedic Surgery and Research*. – 2014. – Vol.9. – P.91.
355. Kang S.K. Journey of Mesenchymal Stem Cells for Homing: Strategies to Enhance Efficacy and Safety of Stem Cell Therapy / S.K.Kang, Il.S.Shin, M.S.Ko [et al.] // *Stem Cells Int.* – 2012.
<http://dx.doi.org/10.1155/2012/342968>

356. Kasper G. Matrix metalloprotease activity is an essential link between mechanical stimulus and mesenchymal stem cell behavior / G. Kasper, J.D.Glaser, S. Geissler [et al.]// Stem Cells. – 2007. – Vol.25. – P.1985-1994.
357. Kawamura M., Urist M.R. Growth factors, mitogens, cytokines, and bone morphogenetic protein in induced chondrogenesis in tissue culture // Developmental Biology. – 1988. – №130 (2). – P.435-442.
358. Kawasaki K. Effects of recombinant human bone morphogenetic protein-2 on differentiation of cells isolated from human bone, muscle, and skin / K. Kawasaki, M. Aihara, J. Honmo [et al.] // Bone. – 1998. – Vol.23(3). – P.223-231.
359. Keatin J.F., McQueen M.M. Substitutes for autologous bone graft in ortoprddic trauma // J. Bone Jt.Surg.(Br). – 2001. – January. – Vol.83-B, № 1. – P.3-8.
360. Keegan G.M., Learmonth I.D., Case C.P. Orthopaedic metals and their potential toxicity in the arthroplasty patient. A review of current knowledge and future stretegies // J.Bone Jt.Surg.Br. – 2007. – May. – Vol.89-B, № 5. – P.567-573.
361. Khang D. Reduced responses of macrophages on nanometer surface features of altered alumina crystalline phases / D.Khang, P.Liu-Snyder, R.Pareta [et al.] // Acta Biomater. – 2009. – Vol.5, №5. – P.1452-1432.
362. Khosla S., Eghbali-Fatourechi G.Z. Circulationg cells with osteogenic potential // Ann. N.Y. Acad. Sci. – 2006. – Apr. – P.489-497.
363. Kim D.-H. Guided cell migration on microtextured substrates with variable local density and anisotropy / D.-H.Kim, D.H.Kim, C.H.Seo [et al.] // Adv.Funct.Mat. – 2009. – Is.10. – № 19. – P.1579-1586.
364. Kim D.-H., Provenzano P. P., Smith C. L., Levchenko A. Matrix nanotopography as a regulator of cell function Alternate Title:Matrix nanotopography regulates cell function // J.Cell Biol. – 2012. –Vol.197. – P.351-360.
365. Kimmel D.B. A paradigm for skeletal strength homeostasis // J.Bone Min.Res. – 1993. – Vol.8. – Suppl.2. – S.515-522.
366. Kitazawa R. Interleukin-1 Receptor Antagonist and Tumor Necrosis Factor Binding Protein Decrease Osteoclast Formation and Bone Resorption in Ovariectomized Mice / R.Kitazawa, R.B.Kimble, J.L.Vannice [et al.] // J.Clin.Invest.C. – 1994. – December. – Vol.94. – P.2397-2406.
367. Kode J.A., Mukherjee S., Joglekar M.V., Hardikar A.A. Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration // Cytotherapy. – 2009. – Vol.11 (4). – P.377-391.

368. Kokubo S. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a novel biodegradable carrier in a rabbit ulnar defect model / S.Kokubo, R. Fujimoto, S. Yokota [et al.] // *Biomaterials*. – 2003. – Vol.24. – P.1643-1651.
369. Koreny T. The role of fibroblasts and fibroblast-derived factors in periprosthetic osteolysis / T.Koreny, M.Tunyogi-Csapo, I.Gal [et al.] // *Arthritis Rheum*. – 2006. – Sep. – Vol.28, № 54 (10). – P.3221-3232.
370. Korovessis P. Title Metallosis after contemporary metal-on-metal total hip arthroplasty / P.Korovessis, G.Petsinis, M. Repanti [et al.] // *Source J. Bone Jt.Surg.Am*. – 2006. – Jun. – Vol.88(6). – P.1183-1191.
371. Krecisz B., Kiec-Świerczynska M., Bakowicz-Mitura K. Allergy to metals as a cause of orthopedic implant failure // *Int.J.Occupational.Medicin*. – 2006. – Vol.19 (3). – P.178-180.
372. Krenn V. Histopathological Particle Identification (The Krenn Particle Algorithm) / V.Krenn, P.Thomas, M. Thomsen [et al.] // *CeraNews*. – 2013. – № 2. – P.12-17.
373. Kroto H.W. C₆₀: Buckminsterfullerene / H.W.Kroto, J.R.Heath, S.C. Brien [et al.] // *Nature*. – 1985. – Vol.318. – P.162-163.
374. Kumar S., Wan C., Ramaswamy G., Clemens T.L., Selvarangan Ponnazhagan. Mesenchymal Stem Cells Expressing Osteogenic and Angiogenic Factors Synergistically Enhance Bone Formation in a Mouse Model of Segmental Bone Defect // *Molecular Therapy*. – 2010. – Vol.18, № 5. – P.1026-1034.
375. Kwan Tat S. The differential expression of osteoprotegerin (OPG) and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) in human osteoarthritic subchondral bone osteoblasts is an indicator of the metabolic state of these disease cells / S.Kwan Tat, J.P.Pelletier, D.Lajeunesse [et al.] // *Clin.Exp.Rheumatol*. – 2008. – Mar-Apr. – Vol.26(2). – P.295-304.
376. Laino G. An approachable human adult stem cell source for hard-tissue engineering / G.Laino, A.Graziano, R.d'Aquino [et al.] // *J.Cell.Physiol*. – 2006. – Vol.206, № 3. – P.693-701.
377. Landgraeber S. Extrinsic and intrinsic pathways of apoptosis in aseptic loosening after total hip replacement / S.Landgraeber, M. von Knoch, F. Lör [et al.] // *Biomaterials*. – 2008. – Vol.29, № 24-25. – P.3444-3450.
378. Landgraeber S. Over-expression of p53/BAK in aseptic loosening after total hip replacement / S.Landgraeber, M.Toetsch, C.Wedemeyer [et al.] // *Biomaterials*. – 2006. – Vol.27, №15. – P.3010-3020.
379. Landgraeber S., Jäger M., Jacobs J.J., Hallab N.J. The Pathology of Orthopedic Implant Failure Is Mediated by Innate Immune System Cytokines // *Mediators of Inflammation*. – 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/185150>

380. Lang N.P. Early osseointegration to hydrophilic and hydrophobic implant surfaces in humans
Scientific source / N.P.Lang, S.G.E.alvi, G.Huynh-Ba [et al.] // Clin.Oral Implants Res. – 2011. – Vol.22. – P.349-356.
381. Langenfeld E.M., Langenfeld J. Bone Morphogenetic Protein-2 Stimulates Angiogenesis in Developing Tumors // Molecular Cancer Research. – 2004. – Mar. – Vol.2 (3). – P.141-149.
382. Lee F.Y. Repair of bone allograft fracture using bone morphogenetic protein-2 // Clin. Orthop. Rel. Res. – 2002. – Vol.397. – P.119-126.
383. Levine B.R. Ten-year outcome of serum metal ion levels after primary total hip arthroplasty: a concise follow-up of a previous report / B.R.Levine, A.R.Hsu, A.K.Skipor [et al.] // J.Bone Jt.Surg. Am. – 2013. – Mar. – Vol.20, № 95(6). – P.512-518.
384. Lewandowski K.-U., Gresser J.D., Wise D.L., Trantolo D.J. Bioresorbable bone graft substitutes of different osteoconductivities: a histologic evaluation of osteointegration of poly(propylene glycol-co-fumaric acid)-based cement implants in rats // Biomaterials. – 2000. – April. – Vol. 21, Issue 8. – P.757-764.
385. Li L. Repair of enamel by using hydroxyapatite nanoparticles as the building blocks / L.Li, H.Pan, J.Tao [et al.] // J. Mater. Chem. – 2008. – Vol.18. – P.4079-4084.
386. Li X., Liu H., Niu X. The use carbone nanotubes to induce osteogenic differentiation of human adipose-derived MSCs in vitro and ectopic bone formation in vivo // Biomaterials. – 2012. – Vol.33 (19). – P.4818-4827.
387. Liebschner M. Biomechanical considerations of animal models used in tissue engineering of bone // Biomaterials. – 2004. – Vol.25. – P.1697-1714.
388. Linder S., Pinkowski W., Aepfelbacher M. Adhesion, cytoskeletal architecture and activation status of primary human macrophages on a diamond-like carbon coated surface // Biomaterials. – 2002. – Vol.23. – P. 767-773.
389. Loesberg W.A., Walboomers X.F., van Loon J.J.W.A., Jansen J.A. The effect of combined cyclic mechanical stretching and microgrooved surface topography on the behaviour of fibroblasts // J.Biomed.Mat.Res.A. – 2005. – Vol.75 (3). – P.723-732.
390. Loon C.J. The kinematic total knee arthroplasty. A 10- to 15-year follow-up and survival analysis / C.J. Loon, M.A.Wisse, M.C. de Waal Malefijt [et al.] // Arch.Orthop.Traum.Surg. – 2000. – Vol.120. – P.48-52.
391. Lorenzo J., Horowitz M., Choi Y. Osteoimmunology: Interactions of the Bone and Immune System // Endocr. Rev. – 2008. – № 29. – P.403-440.
392. Ma Y.-L. Quantitative associations between osteocyte density and biomechanics, microcrack and microstructure in OVX rats vertebral trabeculae / Y.-L.Ma, R.-C.Dai, Z.-F.Sheng [et al.] // J.Biomechanics. – 2008. – Vol.41, I.6. – P.1324-1332.

393. Machtei E.E. The effect of membrane exposure on the outcome of regenerative procedures in humans; a meta-analysis // J. Periodontal. – 2001. – Vol.72. – P.512-516.
394. MacQuarrie R.A., Fang Chen Y., Coles C., Anderson G.I. Wear-particle-induced osteoclast osteolysis: the role of particulates and mechanical strain // J.Biomed.Mat.Res.B Appl Biomater. – 2004. – Vol.69. – P.104-112.
395. Maezawa K. Seven years of chronological changes of serum chromium levels after Metasul metal-on-metal total hip arthroplasty / K.Maezawa, M.Nozaawa, T.Yuasa [et al.] // J.Arthroplasty. – 2010. – Dec. – Vol.25 (8). – P.1196-1200.
396. Mahendra G., Pandit H., Kliskey K. Necrotic and inflammatory changes in metal-on-metal resurfacing hip arthroplasties. Relation to implant failure and pseudotumor formation // Acta Orthopaedica. – 2009. – Vol.80 (6). – P.653-659.
397. Mandl S., Rauschenbach B. Improving the biocompatibility of medical implants with plasma immersion ion implantation // Surface and Coatings Technology. – 2002. – Vol.156. – P.276-283.
398. Mannion R.J., Nowitzke A.M., Wood M.J. Promoting fusion in minimally invasive lumbar interbody stabilization with low-dose bone morphogenetic protein-2-but what is the cost? // Spine J. – 2011. – Jun. – Vol.11 (6). – P.527-533.
399. Marcacci M. Stem Cells Associated with Macroporous Bioceramics for Long Bone Repair: 6-to 7-Year Outcome of a Pilot Clinical Study / M.Marcacci, E.Kon, V.Moukhachev [et al.] // Tissue engineering. – 2007. – Vol13, №5. – P.947-955.
400. Markitantova Yu.V. Location of the Prox1 gene expression during newt lens and retina regeneration / Yu.V.Markitantova, E.O.Makariev, G.V.Pavlova [et al.] // Dokl. Biol. Sci. – 2003. – Jul-Aug. – № 391. – P.361-364.
401. Martines E., McGhee K., Wilkinson C., Curtis A. A parallel-plate flow chamber to study initial cell adhesion on a nanofeatured surface // IEEE Trans.Nanobioscience. – 2004. – Vol.3, № 2. – P.90-95.
402. Martino M.M. Engineering the Growth Factor Microenvironment with Fibronectin Domains to Promote Wound and Bone Tissue Healing / M.M.Martino, F.Tortelli, M.Mochizuki [et al.] // Sci Transl.Med. – 2011. – September. – Vol.3, Issue 100. – P.89-100.
403. Mata A. Connective tissue progenitor cell growth characteristics on textured substrates / A.Mata, C.Boehm, A.J.Fleischman [et al.] // Int.J.Nanomedicine. – 2007. – Vol.2 (3). – P.389-406.
404. Matharu G. Lymphocytic reactions in revised metal-on-metal hip arthroplasties. Abstract 13-2766, EFORT 2013 / G. Matharu, M. Revell, V.Sumathi [et al.] // CeraNews. – 2013. – № 2. – P.6-9.

405. McAlarney M.E., Oshiro M.A., McAlarney C.V. Effects of titanium dioxide passive film crystal structure, thickness, and crystallinity on C3 adsorption // *Int.J.Oral.Max.Impl.* – 1996. – № 11. – P.73-80.
406. McMurray R., Dalby M.J., Gadegaard N. Nanopatterned Surfaces for Biomedical Applications // *Biomedical Engineering, Trends in Materials Science*, ed.by Laskovski A. N. – 2011. – Vol.22. – January 8. – P.124-167.
407. Means R.T., Krantz S.B. Progress in understanding the pathogenesis of the anemia of chronic disease // *Blood.* – 1992. – Vol.80. – Issue 7. – P.1639-1647.
408. Meirelles da S.L., Nardi N.B. Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization // *Br.J.Haematol.* – 2003. – Nov. – Vol.123 (4). – P.702-711.
409. Meirelles da S.L., Chagastelles P.C., Nardi N.B. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues // *J.Cell Sci.* – 2006. – Vol.119. – Pt.11. – P.2204-2213.
410. Meleti Z., Shapiro I.M., Adams C.S. Inorganic Phosphate Induces Apoptosis of Osteoblast-like Cells in culture // *Bone.* – 2000. – Vol. 27, №3. – P. 359–366.
411. Mendonca G., Mendonca D.B., Aragao F.J., Cooper L.F. Advancing dental implant surface technology: From micron- to nanotopography // *Biomater.* – 2008. – Vol. 29, № 28. – P.3822-3835.
412. Mercan S., Bölükbaş N., Bölükbaş M.K. Titanium element level in pery-implant mucosa // *Biotechnol. and Biotechnol.Eq.* – 2013. – Vol.27 (4). – P.4002-4005.
413. Michael B. Wood M.D. Femoral reconstruction by vascularized bone transfer // *Microsurgery.* – 1990. – Vol.11. – Issue 1. – P.74-79.
414. Migaud H. Metal-on-Metal Bearing: Is This the End of the Line? We Do Not Think So / H.Migaud, S.Putman, A.Combes [et al.] // *HSS J.* – 2012. – Oct. – Vol.8 (3). – P.262-269.
415. Mine Y. Impact of titanium ions on osteoblast-, osteoclast- and gingival epithelial-like cells / Y.Mine, S.Makihira, H.Nikawa [et al.] // *J.Prostodont Res.* – 2010. – Jan. – Vol.54 (1). – P.1-6.
416. Mitchelson A.J. Biomaterial Hypersensitivity: Is It Real? Supportive Evidence and Approach Considerations for Metal Allergic Patients following Total Knee Arthroplasty / A.J.Mitchelson, C.J.Wilson, W.M.Mihalko [et al.] // <http://dx.doi.org/10.1155/2015/137287>
417. Mohiuddin M., Pan H.-A., Hung Y.-C., Huang G.S. Control of growth and inflammatory response of macrophages and foam cells with nanotopography // *Nanoscale Res.Letters.* – 2012. – Vol.7 (1). – P.394.
418. Moilanen E. Nitric oxide synthase is expressed in human macrophages during foreign body inflammation / E.Moilanen, T.Moilanen, R.Knowles [et al.] // *Am.J.Pathol.* – 1997. – Vol.150. – P.881-887.

419. Motskin M. The sequestration of hydroxyapatite nanoparticles by human monocyte-macrophages in a compartment that allows free diffusion with the extracellular environment / M.Motskin, K.H.Müller, C.Genoud [et al.] // *Biomaterials*. – 2011. – Dec. – Vol.32 (35). – P.9470-9482.
420. Mroz T.E., Wang J.C., Hashimoto R., Norvell D.C. Complications related to osteobiologics use in spine surgery: A systematic review // *Spine*. – 2010. – Vol.35. – S.86-104.
421. Müller K., Valentine-Thon E., Hypersensitivity to titanium: Clinical and laboratory evidence // *Neuroendocrinology Letters*. – 2006. – Vol.27. – Suppl. 1. – P.31-35.
422. Müller K.H. The effect of particle agglomeration on the formation of a surface-connected compartment induced by hydroxyapatite nanoparticles in human monocyte-derived macrophages / K.H.Müller, M.Motskin, A.J.Philpott [et al.] // *Biomaterials*. – 2014. – Jan. – Vol. 35 (3). – P.1074-1088.
423. Muller M., Hennig F.F., Hothorn T., Stangl R. Bone-implant interface shear modulus and ultimate stress in a transcortical rabbit model of open-pore Ti6Al4V implants // *J. Biomechanics*. – 2006. – Vol.39. – P.2123-2132.
424. Murdoch A.D. Meadows and Tim E. Hardingham Ph.D. Chondrogenic Differentiation of Human Bone Marrow Stem Cells in Transwell Cultures: Generation of Scaffold-Free Cartilage / A.D.Murdoch, L.M.Grady, M.P.Ablett [et al.] // *Stem cells*. – 2007. – November. – Vol.25, Is.11. – P.2786-2796.
425. Murray S.S. A statistical model to allow the phasing out of the animal testing of demineralised bone matrix products / S.S. Murray, E.J.Brochmann, J.O. Harker [et al.]// *Altern Lab.Anim*. – 2007. – Aug. – Vol.35 (4). – P.405-409.
426. Nafei A., Danielsen C.C., Linde F., Hvid I. Properties of growing trabecular ovine bone. Part I: mechanical and physical properties // *J.Bone Jt.Surg.Br*. – 2000. – Aug. – Vol.82(6). – P.910-920.
427. Nagano M. Differences of bone bonding ability and degradation behaviour in vivo between amorphous calcium phosphate and highly crystalline hydroxyapatite coating / M.Nagano, T.Nakamura, T.Kokubo [et al.] // *Biomater*. – 1996. – Vol.17, №18. – P.1771-1777.
428. Nakahara H., Bruder S.P., Goldberg V.M., Caplan A.I. In vivo osteochondrogenic potential of cultured cells derived from the periosteum // *Clin. Orthop. Relat. Res*. – 1990. – Vol.259. – P.223-232.
429. Nakajima K. Study on patch test reagent for titanium // *Kokubyo Gakkai Zasshi*. – 2007. – Jun. – Vol.74(2). – P.92-98.
430. Nather A., Zheng S. Evolution of Allograft Transplantation // *Allograft Procurement, Processing and Transplantation A Comprehensive Guide for Tissue Banks* / A.Nather, N.Yusof, N.Hilmy. – Chapter 1. – 2010 – 565 p.

431. Nehme A. Effect of alendronate on periprosthetic bone loss after cemented primary total hip arthroplasty: A Prospective Randomized Study / A.Nehme, G.Maalouf, J.-L.Tricoire [et al.] // *Rev.Chirur.Orthop.Rep.de l'Appareil Moteur.* – 2003. – Vol.89, № 7. – P.593-598.
432. Nichols H.L. Coating nanothickness degradable films on nanocrystalline hydroxyapatite particles to improve the bonding strength between nanohydroxyapatite and degradable polymer matrix / H.L.Nichols, N.Zhang, J.Zhang [et al.] // *J.Biomed.Mat.Res.A.* – 2007. – Vol.82. – P.373-382.
433. Niederwanger M., Urist M.R. Demineralized bone matrix supplied by bone banks for a carrier of recombinant human bone morphogenetic protein (rhBMP-2): a substitute for autogeneic bone grafts // *J.Oral.Implantol.* – 1996. – Vol.22 (3-4). – P.210-215.
434. Nogami H., Urist M.R. A substratum of bone matrix for differentiation of mesenchymal cells into chondro-osseous tissues in vitro // *Experimental Cell Research.* – 1970. – № 63 (2-3). – P.404-410.
435. O'Gradaigh D., Compston J.E. T-cell involvement in osteoclast biology: implications for rheumatoid bone erosion // *Rheumatology.* – 2004. – Vol.43. – P.122-130.
436. Oddie G.W. Structure, Function and Regulation of Tartrate-Resistant Acid Phosphatase / G.W.Oddie, G.Schenk, N.Z.Angel [et al.] // *Bone.* – 2000. – Vol.27, № 5. – November. – P.575-584.
437. Oh S. Significantly accelerated osteoblast cell growth on aligned TiO₂ nanotubes / S. Oh, C. Daraio, L.H. Chen [et al.] // *J. Biomedical materials research. Part A.* // *J.Biomed.Mat.Res. A.* – 2006. – Jul. – Vol.78(1). – P.97-103.
438. Oh S. Stem cell fate dictated solely by altered nanotube dimension. / S.Oh, K.S.Brammera, Y.S.J. Li [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2009, №7. – Vol.106. – P. 2130-2135.
439. Oh S. Growth of nano-scale hydroxyapatite using chemically treated titanium oxide nanotubes / S. Oh, R.R.Finones, C. Daraio [et al.] // *Biomaterials.* – 2005. – Vol.26. – P. 4938–4943.
440. Okamura T., Morimoto M., Fukushima D., Yamane G. A skin patch test for the diagnosis of titanium allergy // *J. Dent Res.* – 1999. – Vol.78. – P.1135.
441. Olivares R., Rodil S.E., Arzate H. In vitro studies of the biomineralization in amorphous carbon films // *Surface and Coatings Technology.* – 2004. – Vol.177-178. – P.758-764.
442. Olivares R., Rodil S.E., Arzate H. Osteoinduction properties of graphite-like amorphous carbon films evaluated in-vitro // *Diamond and Related Materials.* – 2007. – Vol.16. – P.1858-1867.
443. Oliveira D.E. Enhancement of in vitro osteogenesis on titanium by chemically produced nanotopography / D.E. Oliveira, S.F.Zalzal, M.M. Beloti [et al.] // *J.Biomed. Mat. Res. Part A.* – 2007. – Mar. – Vol.80 (3). – P.554-564.

444. Osborn J.F. Implantatwerkstoff Hydroxiapatitkeramik. Grundlagen und klinische Anwendung // Quintessenz. – Berlin, 1985. – S.12-47.
445. Ostrup L.T., Frederickson J.M. Distant transfer of a free, living bone graft by microvascular anastomoses. An experimental study // Plast.Reconstr.Surg. – 1974. – Vol.54. – P.274-285.
446. Owen M. Marrow stromal stem cells // J. Cell Sci. – 1988. – Suppl. 10. – P.63-76.
447. Ozawa K. Cell and gene therapy using mesenchymal stem cells (MSCs) / K.Ozawa, K.Sato, I.Oh [et al.] // J. Autoimmun. – 2008. – Vol.30, №3. – P.121-127.
448. Özcan M., Hämmerle C. Titanium as a Reconstruction and Implant Material in Dentistry: Advantages and Pitfalls // Materials. – 2012. – Vol.5. – P.1528-1545.
449. Ozkaynak E. Osteogenic protein-2. A new member of the transforming growth factor-beta superfamily expressed early in embryogenesis // J.Biol.Chem. – 1992. – Vol.267. – P.25220-25227.
450. Pandit H. Necrotic granulomatous pseudo-tumours in bilateral resurfacing hip arthroplasties: evidence for a type IV immune response / H.Pandit, M. Vlychou, D.Whitwell [et al.] // Virchows Arch. – 2008. – Vol.453. – P.529-534.
451. Park J., Bauer S., Schmuki P.. Nanosize and vitality: TiO₂ nanotube diameter directs cell fate // Nano Lett. – 2007. – Jun. – Vol.7(6). – P.1686-1691.
452. Park Y.S. Early osteolysis following second-generation metal-on-metal hip replacement / Y.S.Park, Y.W.Moon, S.J. Lim [et al.] // J.Bone Jt.Surg. Am. – 2005. – Vol.87. – P.1515-1521.
453. Pérez-Ilzarbe M. Comparison of ex vivo expansion culture conditions of mesenchymal stem cells for human cell therapy / M. Pérez-Ilzarbe, M. Díez-Campelo, P. Aranda [et al.] // Transfusion. – 2009. – Sep. – Vol.49 (9). – P.1901-1910.
454. Petersson I.U., Löberg J.E.L., Fredriksson A.S., Ahlberg E.K. Semi-conducting properties of titanium dioxide surfaces on titanium implants // Biomaterials. – 2009. – № 30 (27). – P.4471-4479.
455. Phemister D. The fate of transplanted bone and regenerative power of its various constituents // Surg.Gynecol.Obstet. – 1914. – №19. – P.303.
456. Pierdomenico L., Bonsi L., Calvitti M. Multipotent mesenchymal stem cells with immunosuppressive activity can be easily isolated from dental pulp // Transplantation. – 2005. – Vol.80, № 6. – P.836-842.
457. Pierre C.A. Periprosthetic osteolysis: characterizing the innate immune response to titanium wear-particles / St. C.A. Pierre, M. Chan, Y. Iwakura [et al.] // J.Orthop.Res. – 2010. – Nov. – Vol.28 (11). – P.1418-1424.
458. Pilbeam C.C., Pan L. Effects of prostaglandin E2 on gene expression in primary osteoblastic cells from prostaglandin receptor knockout mice // Bone. – 2002. – Vol.30, № 4. – P.567-573.

459. Polyzois I. [et al.] Local and systemic toxicity of nanoscale debris particles in total hip arthroplasty / I.Polyzois, D.Nikolopoulos, I.Michos, E.Patsouris, S.Theocharis // *J.Appl.Toxicol.* – 2012. – Vol.32. – P.255-269.
460. Ponsonnet L. Relationship between surface properties (roughness, wettability) of titanium and titanium alloys and cell behavior / L.Ponsonnet, K.Reybier, N.Jaffrezic [et al.] // *Materials Science and Engineering C* 23. – 2003. – P.551-560.
461. Poplich L.S. Critical and noncritical size defect healing with osteogenic protein // *Trans. Orthop. Res. Soc.* – 1997. – Vol.22. – P.600.
462. Prockop D.J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues // *Science.* – 1997. – Apr. – Vol.4, № 276 (5309). – P.71-74.
463. Ra J.C. Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans / J.C. Ra, I.S. Shin, S.H. Kim [et al.] // *Stem Cells Dev.* – 2011. – Vol.20, №8. – P. 1297-1308.
464. Ravichandran R. Effects of nanotopography on stem cell phenotypes / R.Ravichandran, S.Liao, C.Ng [et al.] // *World J.Stem.Cells.* – 2009. – December. – Issue 1. – Vol.1, № 31. – P.55-66.
465. Reclaru L., Eschler P.-Y., Lerf R., Blatter A. Electrochemical corrosion and metal ion release from Co-Cr-Mo prosthesis with titanium plasma spray coating // *Biomaterials.* – 2005. – August. – Vol.26. – Issue 23. – P.4747-4756.
466. Refai A.K., Textor M., Brunette D.M., Waterfield J.D. Effect of titanium surface topography on macrophage activation and secretion of proinflammatory cytokines and chemokines // DOI: 10.1002/jbm.a.30075.
467. Regan E.M. Differential patterning of neuronal, glial and neural progenitor cells on phosphorus-doped and UV irradiated diamond-like carbon / E.M.Regan, J.B.Uney, A.D.Dick [et al.] // *Biomaterials.* – 2010. – Vol.31. – P.207-215.
468. Reichert J.C. The challenge of establishing preclinical models for segmental bone defect research / J.C. Reichert, S.Saifzadeh, M.E. Wullschleger [et al.] // *Biomaterials.* – 2009. – Vol.30 (12). – P.2149-2163.
469. Reito A., Pajamäki J., Puolakka T.J., Eskelinen A. Correlation Between Histopathology and Metal Ion Levels in Failed Metal-on-Metal Hips. Poster 036, AAOS 2013 Concept and text: S. Usbeck // *CeraNews.* – 2013. – № 2. – P.6-9.
470. Reizenstein P., Erslev A. The biological response to disease. – New York, Praeger, 1983. – 190 p.
471. Revell P.A. Detection of CoCr particles in the spleen of guinea pigs six weeks after their intraosseous implantation / P.A.Revell, A.M.Gatti, A.Gambarelli [et al.] // *Proc. 7th World Biomaterials Congress.* – Sydney, Australia, 2004. – P.753.

472. Revell P.A. The combined role of wear particles, macrophages and lymphocytes in the loosening of total joint prostheses // *J.R.Soc.Interface*. – 2008. – Nov. – Vol.6, № 5(28). – P.1263-1278.
473. Ricciardi L. Increased serum levels of IL-22 in patients with nickel contact dermatitis / L.Ricciardi, P.L.Minciullo, S.Saitta [et al.] // *Contact Dermatitis*. – 2009. – January. – Vol.60. – Issue 1. – P.57-58.
474. Richard J.P. Chernomordik and B. Leblue Cell-penetrating peptides. A reevaluation of the mechanism of cellular uptake / J.P. Richard, K. Melikov, E.Vives [et al.] // *J.Biol.Chem*. – 2003. – Vol.278, №1. – P.585-590.
475. Riekstina U. Embryonic stem cell marker expression pattern in human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, adipose tissue, heart and dermis / U.Riekstina, I.Cakstina, V. Parfejevs [et al.] // *Stem.Cell.Rev*. – 2009. – Vol.5, № 4. – P.378-386.
476. Rizzo M.T. Arachidonic acid induced c-jun gene expression in stromal cells stimulated by interleukin-1 and tumor necrosis factor- α : Evidence for a tyrosine-kinase-dependent process / M.T.Rizzo, S.H.Boswell, L.Mangoni [et al.] // *Blood*. – 1995. – № 8. – P.2967-2975.
477. Rodil S.E. Osteoblasts attachment on amorphous carbon films / S.E.Rodil, C.Ramirez, R.Olivares [et al.] // *Diamond and Related Materials*. – 2006. – Vol.15. – P.1300-1309.
478. Rodil S.E., Olivares R., Arzate H., Muhl S. Properties of carbon films and their biocompatibility using in-vitro tests // *Diamond and Related Materials*. – 2003. – Vol.12. – P.931-937.
479. Rodionova N.V., Oganov V.S., Zolotova N.V. Ultrastructural changes in osteocytes in microgravity conditions // *Adv. Space Res*. – 2002. – Vol.30, № 4. – P.765-770.
480. Rohanizadeh R., Swain M.V., Mason R.S. Gelatin sponges (Gelfoam) as a scaffold for osteoblasts // *J.Mater Sci.Mat.Med*. – 2008. – Mar. – Vol.19 (3). – P.1173-1182.
481. Ross I.B., Warrington R.J., Halliday W.C. Cell-mediated allergy to a cerebral aneurysm clip: Case report // *Neurosurgery*. – 1998. – Vol.43. – P.1209-1211.
482. Ryan G., Pandit A., Apatsidis D.P. Fabrication methods of porous metals for use in orthopaedic applications // *Biomaterials*. – 2006. – Vol. 27. – P.2651-2670.
483. Salgueiredo E. Biocompatibility evaluation of DLC-coated Si₃N₄ substrate for biomedical applications / E.Salgueiredo, M.Vila, M.A. Silva [et al.] // *Diamond and Related Materials*. – 2008. – Vol.17. – P.878-881.
484. Sampath T.K., Reddi A.H. Dissociative extraction and reconstitution of extracellular matrix components involved in local bone differentiation // *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*. – 1981. – Vol.78 (12). – P.7599-7603.

485. Sandhu H.S. Effective Doses of Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 in Experimental Spinal Fusion / H.S.Sandhu, L.E.A.Kanim, J.M.Kabo [et al.] // *Spine*. – 1996. – September. – Vol.21 (18). – P.2115-2122.
486. Sansone V., Pagani D., Melato M. The effects on bone cells of metal ions released from orthopaedic implants. A review // *Clin.Cases Miner Bone Metab.* – 2013. – Jan-Apr. – Vol.10 (1). – P.34-40.
487. Sato I. Stimulatory effect of prostaglandin F (2alpha) on Na-dependent phosphate transport in osteoblast-like cells / I.Sato, A.Suzuki, A.Kakita [et al.] // *Prostaglandins Leukotrienes Essent. Fatty Acids*. – 2003. – Vol.68. – P.311-315.
488. Sato K. Th17 functions as an osteoclastogenic helper T cell subset that links T cell activation and bone destruction / K.Sato, A.Suematsu, K.Okamoto [et al.] // *J.Exp.Med.* – 2006. – Vol.203. – P.2673-2682.
489. Schalm O.W., Jain N.C., Carroll E.J. *Veterinary Hematology* – 3rd ed. Lea and Febiger. – Philadelphia, 1975. – 807 p.
490. Schermer S. *The Blood Morphology of Laboratory Animals*. – F.A.Davis Company Philadelphia, 1967. – 200 p.
491. Sculean A., Jepsen S. Biomaterials for the Reconstructive Treatment of Periodontal Intrabony Defects. Part I. Bone Grafts and Bone Substitutes // *Perio*. – 2004. – Vol.1. – Issue1. – P.5-15.
492. Seeherman H. Wozney J.M. Delivery of bone morphogenetic proteins for orthopedic tissue regeneration // *Cytokine and Growth Factor Reviews*. – 2005. – Jun. – Vol.16 (3). – P.329-345.
493. Sherekar R.M., Pawar A.N. Numerical Analysis of Human Femoral Bone in Different Phases // *Int.J.Engineering and Innovative Technology*. – 2013. – Vol. 2. – Issue 12. – P.76-79.
494. Shi Z. Size effect of hydroxyapatite nanoparticles on proliferation and apoptosis of osteoblast-like cells / Z.Shi, H X.uang, Y.Cai [et al.] // *Acta Biomater.* – 2009. – Vol.5. – P.338-345.
495. Shi Z. Biological response of osteosarcoma cells to size-controlled nanostructured hydroxyapatite / Z.Shi, X.Huang, B.Liu [et al.] // *Biomater.Appl.July*. – 2010. – Vol.25. – P.19-37.
496. Sicilia A. Titanium allergy in dental implant patients: a clinical study on 1500 consecutive patients / A. Sicilia, S. Cuesta , G. Coma [et al.] // *Clin Oral Implants Res*. – 2008. – Vol.19 (8). – P.823-835.
497. Siddiqi A., Payne A.G., De Silva R.K., Duncan W.J. Titanium allergy: could it affect dental implant integration? // *Clin.Oral.Implants.Res*. – 2011. – Jul. –Vol.22 (7). – P.673-680.
498. Signore M. Identity and ranking of colonic mesenchymal stromal cells / M.Signore, A.M.Cerio, A. Boe [et al.] // *J. Cell. Physiol*. – 2012. – Vol.227, № 9. – P.3291-3300.

499. Silvennoinen R. Optical Sensing of Attached Fibrinogen on Carbon Doped Titanium Surfaces / R.Silvennoinen, V.Vetterl, S.Hasoň [et al.] // *Advances in Optical Technologies*. – 2010. – Article ID 942349. – 7 p.
500. Smith I.O., McCabe L.R., Baumann M.J. MC3T3-E1 osteoblast attachment and proliferation on porous hydroxyapatite scaffolds fabricated with nanophase powder // *Int.J.Nanomedicine*. – 2006. – Vol.1 (2). – P.189-194.
501. Sochart D.H., Hardinge K. Comparison of the Wrightington FC hip with the Charnley low-friction arthroplasty. 10- to 15-year results and survival analysis // *J.Bone Jt.Surg.* – 1998. – Vol.80-B. – P.577-584.
502. Stanley K.T. Immunocompetent properties of human osteoblasts: interactions with T lymphocytes / K.T.Stanley, C. VanDort, C.Motyl [et al.] // *J.Bone Min.Res.* – 2006. – Jan. – Vol.21 (1). – P.29-36.
503. Steinwachs M. R., Guggi Th., Kreuz P.C. Marrow stimulation techniques // *Injury*. – 2008. – Vol.39, № 1. – P.26-31.
504. Struwer J. Effect of Bone Morphogenetic Protein-2 on Tendon–Bone Integration in an In Vitro Cell Culture / J.Struwer, M.Crönlein, E.Ziring [et al.] // *Orthopedics* – 2013. – February. – Vol.36. – Issue 2. – P.200-206.
505. Strunz V. Enossale Implantatmaterialien in der Zahn-, Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie und ihre Entwicklung auf histomorphologischer Grundlage // *Habil.* – Berlin, 1984. – S.79.
506. Stucki J., Schmid C.F., Hämmerle N.P. Long Temporal and local appearance of alkaline phosphatase activity in early stages of guided bone regeneration. A descriptive histochemical study in humans // *Clin.Oral.Impl.Res.* – 2001. – Vol.12. – P.121-127.
507. Suito H. Editor Oral Factors Affecting Titanium Elution and Corrosion: An In Vitro Study Using Simulated Body Fluid / H.Suito, Y.Iwawaki, T.Goto [et al.] // *PLoS One*. – 2013. – Vol.8 (6). – e66052. Published online 2013 Jun 7. doi: 10.1371/journal.pone.0066052
508. Summers B.N., Eisenstein S.M. Donor site pain from the ilium. A complication of lumbar spine fusion // *J.Bone Jt.Surg. Br.* – 1989. – Aug. – Vol.71 (4). – P.677-680.
509. Sun J., Ding T. p53 reaction to apoptosis induced by hydroxyapatite nanoparticles in rat macrophages // *J.Biomed.Mat.Res.A.* – 2009. – Mar. – Vol.1, № 88(3). – P.673-679.
510. Suzawa M. Extracellular matrix-associated bone morphogenetic proteins are essential for differentiation of murine osteoblastic cells in vitro / M.Suzawa, Y.Takeuchi, S.Fukumoto [et al.] // *Endocrinology*. – 1999. – May. – Vol.140 (5). – P.2125-2133.
511. Takaoka K., Koezuka M., Nakahara H. Telopeptide-depleted bovine skin collagen as a carrier for bone morphogenetic protein // *I.Orthop.Res.* – 1991. – Vol.9. – P.902-907.

512. Takayanagi H. Osteoimmunology – a new regulatory mechanism // *Ann. Rheum.Dis.* – 2005. – № 64 (Suppl.3). – P.540.
513. Takayanagi H. Osteoimmunology in 2014: Two-faced immunology-from osteogenesis to bone resorption // *Nat.Rev.Rheumatol.* – 2015. – Feb. – Vol.11 (2). – P.74-76.
514. Takayanagi H. T-cell-mediated regulation of osteoclastogenesis by signaling cross-talk between RANKL and IFN- γ / H.Takayanagi, K.Ogasawara, S.Hida [et al.] // *Nature.* – 2000. – Vol.408. – P.600-605.
515. Tanji Y. Chemical analysis of an artificial biofilm that enhances or inhibits carbon steel corrosion / Y.Tanji, T.Itoh, T. Nakano [et al.] // *Corrosion.* – 2002. – Vol.58. – P.232-239.
516. Thomas P. Hypersensitivity to titanium osteosynthesis with impaired fracture healing, eczema, and T-cell hyperresponsiveness in vitro: case report and review of the literature / P.Thomas, W.D.Bandl, S. Maier [et al.] // *Contact Dermatitis.* – 2006. – Oct. – Vol.55 (4). – P.199-202.
517. Thomas P., Summer B. New Steps in Assessing Implant Tissue Interaction // *CeraNews.* – 2013. – № 2. – P.10-12.
518. Thomson L.F., Law F.C., Rushton N., Franks J. Biocompatibility of diamond-like carbon coatings // *Biomaterials.* – 1991. – Vol.12. – P.37-40.
519. Thorey F., Menzel H., Lorenz C. Osseointegration by bone morphogenetic protein-2 and transforming growth factor beta2 coated titanium implants in femora of New Zealand white rabbits // *Indian J.Orthop.* – 2011. – Jan-Mar. – Vol.45 (1). – P.57-62.
520. Throop A.D.W., Landauer A.K., Clark A.M., Kuxhaus L. Cervine Tibia Morphology and Mechanical Strength: A Suitable Tibia Model? // *J.Biomech Eng.* – 2015. – Vol. 137, № 3. – P.1-5.
521. Tonelli F.M.P. Carbon nanotube interaction with extracellular matrix proteins producing scaffolds for tissue engineering / E.M.P.Tonelli, A.K.Santos, K.N.Gomes [et al.] // *Int. J. Nanomedicine.* – 2012. – Vol.7. – P.4511-4529.
522. Toriumi D.M. Demineralized BoneImplant Resorption With Long-term Follow-up / D.M.Toriumi, Jr.W.F.Larrabee, J.W.Walike [et al.] // *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* – 1990. – Vol.116 (6). – P.676-680.
523. Tschernitschek H., Borchers L., Geurtsen W. Nonalloyed titanium as a bioinert metal – a review // *Quintessence Int.* – 2005. – Vol.36. – P.523-530.
524. Tsuji K., Bandyopadhyay A., Harfe B.D. BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing // *Nat.Genet.* – 2006. – Dec. – Vol.38 (12). – P.1424-1429.
525. Tuominen T. Native bovine bone morphogenetic protein in the healing of segmental long bone defects // *Division of Orthopaedic and Trauma Surgery, University of Oulu, P.O.Box 5000, FIN-90014 University of Oulu.* – Finland, 2001 (Manuscript received 31 August 2001). – 73 p.

526. Uemura T. Transplantation of cultured bone cells using combinations of scaffolds and culture techniques / T.Uemura, J.Dong, Y.Wang [et al.] // *Biomaterials*. – 2003. – Vol.24. – P.2277-2286.
527. Urban R.M. Dissemination of wear particles to the liver, spleen, and abdominal lymph nodes of patients with hip or knee replacement / R.M.Urban, J.J.Jacobs, M.J. Tomlinson [et al.] // *J.Bone Jt.Surg.Am.* – 2000. – Vol.82. – P.457-476.
528. Urist M.R. Bone regeneration under the influence of a bone morphogenetic protein (BMP) beta tricalcium phosphate (TCP) composite in skull trephine defects in dogs / M.R.Urist, O.Nilsson, J.Rasmussen [et al.] // *Clin.Orthop.* – 1987. – Vol.214. – P.295-304.
529. Urist M.R. Bone: formation by autoinduction // *Science*. – 1965. – № 150. – P.893-899.
530. Urist M.R., Lietze A., Dawson E. 8-tricalcium phosphatede livery system for bone morphogenetic protein // *Clin.Orthop.* – 1984. – Vol.187. – P.277-280.
531. US 20040229351 A1 US 10/632,581. Rodriguez A.-M., Dani C., Ailhaud G. Stem cells from adipose tissue, and differentiated cells from said cells. – Оpubл.18.11.2004; заявл.31.07.2003. – Приоритет 31.07.2002.
532. US 20050084533. Polymer composite with internally distributed deposition matter / Howdle S., Shakesheff K., Whitaker M., Watson M. – A1 US 10/506,618 PCT/GB2003/001015. – Оpubл.21.04.2005; заявл.10.03.2003. – Приоритет 13.03.2002.
533. US 5811094 A US 08/420,297. Caplan A.I, Haynesworth S.E. Connective tissue regeneration using human mesenchymal stem cell preparations. – Оpubл.22.09.1998; заявл.11.04.1995. – Приоритет 16.11.1990.
534. Uzumaki E.T., Lambert C.S., Santos A.R., Zavaglia C.A.C. Surface properties and cell behavior of diamond-like carbon coatings produced by plasma immersion // *Thin Solid Films*. – 2006. – Vol.515. – P.293-300.
535. Vamanu C.I. Formation of potential titanium antigens based on protein binding to titanium dioxide nanoparticles / C.I.Vamanu, P.J.Høl, Z.E.Allouni [et al.] // *Int.J.Nanomedicine*. – 2008. – Vol.3(1). – P.69-74.
536. van de Watering F.C. Differential loading methods for BMP-2 within injectable calcium phosphate cement / F.C. van de Watering, J.D.Molkenboer-Kuenen, O.C.Boerman [et al.] // *J.Control Release*. – 2012. – Dec. – Vol.28, № 164(3). – P.283-290.
537. Veber J.N., White E.W. Carbon-metal graded composites for permanent osseous attachment of non-porous metals // *Mater. Res. Bull.* – 1972. – Vol.7, № 9. – P.1005-1016.
538. Vijayaraghavan V., Sabane A.V., Tejas K. Hypersensitivity to Titanium: A Less Explored Area of Research // *J.Ind.Prosthodont.Soc.* – 2012. – Dec. – Vol.12 (4). – P.201-207.
539. Vogel V., Sheetz M. Local force and geometry sensing regulate cell functions // *Nature Rev.Molecular Cell Biology*. – 2006. – April. – Vol.7. – P.265-275.

540. Wang H.S. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord / H.S.Wang, S.C.Hung, S.T.Peng [et al.] // Stem.Cells. – 2004 (a). – Vol.22, № 7. – P.1330-1337.
541. Wang J. Acute toxicity and biodistribution of different sized titanium dioxide particles in mice after oral administration / J.Wang, G.Zhou, C.Chen [et al.] // Toxicol Lett. – 2007. – № 68(2). – P.176-185.
542. Wang Z. BMP-2 encapsulated polysaccharide nanoparticle modified biphasic calcium phosphate scaffolds for bone tissue regeneration / Z.Wang, K. Wang, X. Lu [et al.] // J.Biomed. Mat.Res. A. – 2015. – Apr. – Vol.103 (4). – P.1520-1532.
543. Wani I.H., Padha V., Jan M., Salaria A.Q. Percutaneous bone marrow grafting in delayed union and non-union // Int.J.Medicine and Medical Sciences. – 2013. – Vol.5 (3).– P.110-115.
544. Wapner K.L. Response to Metallic Implants. Chapter 3 of the 'book Spinal Fusion: Science and Technique Cotler J.M., Cotler H.B., editors.– Springer Science & Business Media, 6 dec.2012.– 407p.
545. Warheit D.B. Pulmonary toxicity study in rats with three forms of ultrafine-TiO₂ particles: differential responses related to surface properties / D.B.Warheit, T.R.Webb, K.L.Reed [et al.] // Toxicology. – 2007. – Vol.230. – P.90-104.
546. Warnke P.H. Rapid prototyping: porous titanium alloy scaffolds produced by selective laser melting for bone tissue engineering / P.H.Warnke, T.Douglas, P.Wollny [et al.] // Tissue Engineering. Part C, Methods. – 2009. – Jun. – Vol.15 (2). – P.115-124.
547. Watters T.S., Eward W.C., Hallows R.K. Pseudotumor with Superimposed Periprosthetic Infection Following Metal-on-Metal Total Hip Arthroplasty // J.Bone Jt.Surg.Am. – 2010. – Jul. – Vol. 92, № 7. – P.1666-1669.
548. Weaver C.T. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties / C.T.Weaver, L.E.Harrington, P.R.Mangan [et al.] // Immunity. – 2006. – Vol.24. – P.677-688.
549. Webster T.J., Ahn E.S. Nanostructured biomaterials for tissue engineering bone // Adv. Biochem.Eng.Biotechnol. – 2007. – Vol.103, № 1. – P.275-308.
550. Webster T.J., Siegel R.W., Bizios R. Design and evaluation of nanophase alumina for orthopaedic / dental applications // Nanostruct.Mat. – 1999. – Vol.12, №5. – P.983-986.
551. Wei K. Fabrication of nano-hydroxyapatite on electrospun silk fibroin nanofiber and their effects on osteoblastic behavior / K.Wei, Y.Nakagawa, B.S. Kim [et al.] // J.Biomed.Mat.Res. – 2011. – Vol.97-A. – P.272-280.
552. Weiland A.J., Moore J.R., Daniel R.K. Vascularized bone autografts. Experience with 41 cases // Clin.Orthop.Rel.Res. – 1983. – Vol.175. – P.87-95.

553. Wennerberg A. Titanium release from implants prepared with different surface roughness / A.Wennerberg, A.Ide-Ektessabi, S.Hatkamata [et al.] // Clin.Oral.Impl.Res. – 2004. – Vol.15. – P.505-512.
554. Wennerberg A., Albrektsson T., Albrektsson B., Krol J.J. Histomorphometric and removal torque study of screwshaped titanium implants with three different surface topographies // Clin.Oral Implant Res. – 1996. – Vol.6. – P.24-30.
555. WO 2003101497 A1 PCT/SE2003/000584. Cartela Ab., Donald Gullberg, Evy Lundgren-Aakerlund [et al.] Knockout mice and their use. – Опубл.11.12.2003; заявл.11.04.2003. – Приоритет 12.04.2002.
556. Wong D.A. Neurologic impairment from ectopic bone in the lumbar canal: A potential complication of off-label PLIF/TLIF use of bone morphogenetic protein-2 (BMP-2) / D.A.Wong, A.Kumar, S. Jatana [et al.] // Spine J. – 2008. – Vol.8. – P.1011-1018.
557. Xia Z.D. Macrophages in degradation of collagen/hydroxylapatite (CHA), beta-tricalcium phosphate ceramics (TCP) artificial bone graft. An in vivo study / Z.D.Xia, T.B.Zhu, J.Y. Du [et al.] // Chin. Med. J. (Engl). – 1994. – Vol.107, № 11. – P.845-849.
558. Xiao G. Bone morphogenetic proteins, extracellular matrix, and mitogen-activated protein kinase signaling pathways are required for osteoblast-specific gene expression and differentiation in MC3T3-E1 cells / G.Xiao, R.Gopalakrishnan, D.Jiang [et al.] // J.Bone Miner Res. – 2002.– Jan. – Vol.17 (1). – P.101-110.
559. Yamada M. Effect of cytokines on the proliferation/differentiation of stroma-initiating cells / M.Yamada, S.Suzu, M.Tanaka-Douazono [et al.] // J.Cell.Physiol. – 2000. – Vol.184, № 3. – P. 351-355.
560. Yang J. Changes in cobalt and chromium levels after metal-on-metal hip resurfacing in young, active Chinese patients / J.Yang, B.Shen, Z.Zhou [et al.] // J.Arthroplasty. – 2011. – Jan. – Vol.26 (1). – P.65-70.
561. Yaremchuk K.L., Toma M.S., Somers M.L., Peterson E. Acute airway obstruction in cervical spinal procedures with bone morphogenetic proteins // Laryngoscope. – 2010. – Vol.120. – P.1954-1957.
562. Yokota T. Cell adhesion to nitrogen-doped DLCs fabricated by plasma-based ion implantation and deposition method using toluene gas / T.Yokota, T.Terai, T. Kobayashi [et al.] // Surface & Coatings Technology. – 2007. – Vol.201. – P.8048-8051.
563. Yu W.Q., Jiang X.Q., Zhang F.Q., Xu L. The effect of anatase TiO₂ nanotube layers on MC3T3-E1 preosteoblast adhesion, proliferation, and differentiation // J. Biomed. Mat. Res. A.– 2010. – Sep. – Vol.94 (4). – P.1012-1022.

564. Zanello L.P., Zhao B., Hu H., Haddon R.C. Bone cell proliferation on carbon nanotubes // Nano Lett. – 2006. – Vol.6 (3). – P.562-567.
565. Zegzula H.D. Bone formation with use of rhBMP-2 (recombinant human bone morphogenetic protein-2) / H.D.Zegzula, D.C.Buck, J.Brekke [et al.] // J.Bone Jt.Surg.Am. – 1997. – Dec. – Vol.79(12). – P.1778-1790.
566. Zhang Y. Dedifferentiation and proliferation of mammalian cardiomyocytes / Y.Zhang, T.S.Li, S.T.Lee [et al.] // PLoS One. – 2010. – Vol.5, № 9. – e12559. doi: 10.1371/journal.pone.0012559
567. Zhu X., Eibl O., Scheideler L., Geis-Gerstorfer J. Characterization of nano hydroxyapatite/collagen surfaces and cellular behaviors // J.Biomed.Mat.Res. – 2006. – Vol.79-A. – P.114-127.
568. Zijlstra W.P. Cobalt and chromium ions reduce human osteoblast-like cell activity in vitro, reduce the OPG to RANKL ratio and induce oxidative stress / W.P.Zijlstra, S.K.Bulstra, J.J.A.M. van Raay [et al.] // J.Orthop.Res., conditionaly accepted. – 2012. – Chapter 9. – P.114-128.
569. Zuk P.A. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells / P.A.Zuk, M.Zhu, P.Ashjian [et al.] // Mol.Biol.Cell. – 2002. – Dec. – Vol.13 (12). – P.4279-4295.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Таблица А.1 – Динамика активности фосфатаз в костной ткани конечности с искусственными дефектами

Группы /исследуемые показатели		Активность ЩФ, ЕД/1 г ткани, Медиана (25-,75-квартили)	Активность ЩФтерм, ЕД/1 г ткани, Медиана (25-,75-квартили)	Активность КФтарт, ЕД/1 г ткани, Медиана (25-,75-квартили)
Интактные животные		2,42 (1,88; 3,28) n=8	0,52 (0,28; 0,93) n=8	0,0036 (0,0032; 0,0036) n=4
После операции				
PTi ₄₀ МК	4 недели	4,45 (2,80; 7,16) * n=8	1,62 (0,94; 2,73) * n=8	0,065 (0,0036; 0,019) n=8
	16 недель	2,53 (2,12; 4,83) n=6	0,46 (0,25; 1,07) n=8	0,0037 (0,0027; 0,00810) n=7
	52 недели	1,87 (1,40; 2,27) n=11	0,26 (0,22; 0,47) n=11	0,0027 (0,0014; 0,0054) n=12
PTi ₄₀ (а-С)МК	4 недели	7,88 (3,95; 12,11) * n=12	1,18 (0,90; 1,80) * n=9	0,0072 (0,0036; 0,0126) * n=12
	16 недель	2,70 (1,63; 6,980) n=6	0,74 (0,32; 0,94) * n=8	0,0019 (0,0009; 0,0045) n=8
	52 недели	3,11 (1,98; 4,25) n=11	0,59 (0,30; 0,72) n=11	0,009 (0,0054; 0,0126) n=11
PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК	4 недели	3,17 (1,20; 4,54) n=6	1,60 (0,47; 2,91) * n=4	0,0043 (0,0023; 0,0049) n=6
	16 недель	2,71 (2,68; 6,98) n=5	0,28 (0,24; 0,40) n=6	0,0063 (0,0063; 0,0117)* n=6
	52 недели	2,34 (2,03; 3,70) n=12	1,03 (0,65; 1,87) * n=12	0,0059 (0,0023; 0,0077) n=12

где: * - значимые отличия по сравнению с интактной костной тканью

** - значимые отличия по сравнению с группой с PTi₄₀МК в соответствующий срок после операции

Таблица А.2 – Количество остеогенных клеток и экспрессия ими щелочной фосфатазы в сегменте костной ткани с искусственным дефектом костной ткани

Группы /исследуемые показатели		Количество клеток на 100 мкм ²	Количество клеток, экспрессирующих ЩФ на 100 мкм ²	Средняя площадь клеток, экспрессирующих ЩФ, мкм ²	Доля клеток, экспрессирующих ЩФ, %	Объемная доля площади клеток, экспрессирующих ЩФ
Интактные животные		2,04; 2,18; 1,99; 2,26	1,55; 1,50; 1,62; 1,56	4,04; 5,33; 5,27; 5,46	75,95; 68,74; 81,01; 69,12	0,08; 0,085; 0,085
После операции						
PTi ₄₀ МК	4 недели	1,96; 2,29; 2,04	1,50; 1,60; 1,49	5,94; 5,46; 6,40 *	76,83; 69,80; 72, 83	0,089; 0,087; 0,095*
	16 недель	3,85; 2,39; 2,36 *	1,60; 1,75; 1,70	5,51; 5,20; 5,73	41,41; 73,10; 71,97	0,092; 0,091; 0,097 *
	52 недели	2,43; 1,70; 1,69	1,73; 1,30; 1,40	5,00; 6,94; 6,43 *	71,45; 76,50; 83,20	0,087; 0,09; 0,09 *
PTi ₄₀ (a-C)МК	4 недели	1,86; 2,00; 1,86	1,56; 1,68; 1,57	6,67; 7,08; 6,87 *	83,63; 83,81; 85,32	0,103; 0,119; 0,108 * **
	16 недель	3,14; 2,17; 2,55	2,92; 1,50; 2,11	4,27; 6,46; 5,2	93,09; 69,99; 83,1	0,125; 0,097; 0,091 *
	52 недели	2,16; 2,17; 1,75	1,67; 1,60; 1,32	5,52; 5,59; 6,28 *	77,3; 73,88; 75,06	0,092; 0,09; 0,083
PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК	4 недели	2,20; 1,75; 2,20	1,91; 1,40; 1,58	5,54; 6,37; 6,15 *	83,10; 80,90; 71,80	0,106; 0,089; 0,097 *
	16 недель	2,79; 1,83; 2,50	2,15; 1,38; 1,90	5,73; 6,63; 4,69	76,83; 75,30; 76,23	0,123; 0,092; 0,089*
	52 недели	2,04; 1,95; 1,91	1,44; 1,51; 1,35	5,86; 5,53; 6,56 *	70,58; 77,19; 70,43	0,084; 0,083; 0,088

где: * - значимые отличия по сравнению с интактной костной тканью

** - значимые отличия по сравнению с группой PTi₄₀ в соответствующий срок после операции

Таблица А.3 – Количество остеогенных клеток и экспрессия ими щелочной фосфатазы в сегментах костной ткани с внедренными в искусственные дефекты имплантатами

Группы /исследуемые показатели		Количество клеток на 100 мкм ²	Количество клеток, экспрессирующих ЩФ на 100 мкм ²	Средняя площадь клеток, экспрессирующих ЩФ, мкм ²	Доля клеток, экспрессирующих ЩФ, %	Объемная доля площади клеток, экспрессирующих ЩФ
Интактные животные		2,04; 2,18; 1,99; 2,26	1,55; 1,50; 1,62; 1,56	4,04; 5,33; 5,27; 5,46	75,95; 68,74; 81,01; 69,12	0,08; 0,085; 0,085
После операции						
PTi ₄₀ МК	4 недели	1,85; 2,37; 2,25	1,39; 1,79; 1,79	6,36; 5,05; 5,44	75,19; 75,96; 79,3	0,089; 0,097; 0,091 *
	16 недель	1,96; 2,55; 2,27	1,63; 2,06; 1,7 *	5,61; 5,21; 5,27	84,57; 80,78; 75,05 ***	0,108; 0,092; 0,090 *
	52 недели	2,41; 2,02; 1,59	1,64; 1,5; 1,19	5,22; 5,93; 6,93	68,22; 74,30; 75,00	0,082; 0,089; 0,088
PTi ₄₀ (a-C)МК	4 недели	2,43; 2,44; 2,63 * ** ***	2,07; 2,12; 2,27 * ** ***	6,3; 5,85; 5,11 ***	85,5; 86,8; 86,15 * **	0,107; 0,124; 0,116 * **
	16 недель	2,76; 2,09; 2,49	2,57; 1,7; 2,0 *	5,13; 4,78; 5,06	93,03; 81,57; 80,73 * **	0,084; 0,132; 0,102
	52 недели	4,30; 2,51; 2,58 * ***	1,82; 1,79; 1,59	5,30; 5,89; 6,17	42,2; 71,29; 61,5 ***	0,106; 0,098; 0,096 * **
PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК	4 недели	3,25; 2,05; 2,53 ***	2,74; 1,83; 2,09 * **	4,67; 5,61; 4,84	84,52; 89,29; 82,86 * ** ***	0,128; 0,103; 0,101 * **
	16 недель	2,78; 2,41; 2,87 *	2,16; 2,02; 2,45 * **	5,09; 4,27; 4,48	77,67; 83,99; 85,25	0,086; 0,110; 0,110 *
	52 недели	2,26; 2,40; 2,47	1,55; 1,40; 1,66	5,60; 5,80; 5,00	68,3; 60,3; 67,00	0,087; 0,082; 0,083

где: * - значимые отличия по сравнению с интактной костной тканью
 ** - значимые отличия по сравнению с PTi₄₀ в соответствующий срок после операции
 *** - значимые отличия по сравнению с контралатеральной конечностью с незаполненным дефектом

Таблица А.4 – Динамика активности фосфатаз в костной ткани сегмента с внедренными пористыми титановыми имплантатами

Группы /исследуемые показатели		Активность щелочной фосфатазы, ЕД/1 г ткани, Медиана (25-,75-квартили)	Активность термолабильной щелочной фосфатазы, ЕД/1 г ткани, Медиана (25-,75-квартили)	Активность тартратрезистентной кислой фосфатазы, ЕД/1 г ткани, Медиана (25-,75-квартили)
Интактные животные		2,42 (1,88; 3,28) n=8	0,52 (0,28; 0,94) n=8	0,0036 (0,023; 0,0059) n=12
После операции				
PTi ₄₀ МК	4 недели	2,14 (1,62; 7,55) n=7	1,21 (0,77; 1,44) * n=6	0,0064 (0,0027; 0,0073) n=6
	16 недель	3,2 (2,93; 4,04) n=6	0,58 (0,41; 1,39) n=8	0,0038 (0,0018; 0,0066) n=8
	52 недели	1,57 (1,07; 2,16) * n=11	0,27 (0,23; 0,35) n=10	0,027 (0,0018; 0,063) n=11
PTi ₄₀ (а-С) МК	4 недели	8,52 (5,54; 15,87) * n=11	0,79 (0,69; 1,35) * n=9	0,0067 (0,0027; 0,0180) n=8
	16 недель	4,51 (4,03; 9,81) * n=6	1,07 (0,9; 1,21) * n=9	0,0036 (0,0018; 0,0054) n=9
	52 недели	2,97 (2,15; 3,74) n=12	0,46 (0,19; 0,82) n=12	0,0072 (0,0027; 0,0107) n=12
PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК	4 недели	3,45 (3,15; 4,48) n=9	1,87 (1,56; 2,26) * n=4	0,002 (0,0007; 0,0027) n=5
	16 недель	3,62 (1,57; 5,55) n=6	0,42 (0,18; 0,76) n=6	0,0113 (0,0054; 0,0216) * n=6
	52 недели	2,14 (1,97; 3,31) n=12	0,85 (0,62; 1,52) n=12	0,0040 (0,0018; 0,0077) n=12

где: * - значимые отличия по сравнению с интактной костной тканью

** - значимые отличия по сравнению с PTi₄₀МК в соответствующий срок после операции

*** - значимые отличия по сравнению с контралатеральной конечностью с незаполненным дефектом

Таблица А.5 – Динамика активности фосфатаз в периферической крови кроликов после внедрения в дефекты костной ткани пористых титановых имплантатов

Группы /исследуемые показатели		Активность щелочной фосфатазы, ЕД/л. Медиана (25-,75-квартили)	Активность термолабильной щелочной фосфатазы. ЕД/л, Медиана (25-,75-квартили)	Доля термолабильной щелочной фосфатазы от общей, %. Медиана (25-, 75-квартили)	Активность тартратрезистентной кислой фосфатазы, ЕД/л. Медиана (25-,75-квартили)
PTi ₄₀ МК	до операции	142,0 (83,5; 251,0) n=15	26,0 (13,0; 75,5) n=15	18,5 (8,5; 30,0) n=15	18,9 (16,8;25,03) n=15
	недели после операции	1 74,0 (59,3; 82,3) * n=4	56,0 (47,8; 60,3) n=4	70,8 (58,3; 83,4)* n=4	16,6 (8,3; 17,7) n=5
		2 66,0 (64,5; 153,8) n=6	51,0 (51,0; 54,0) n=6	61,6 (30,1; 81,3) * n=6	14,9 (9,8; 16,7) n=5
		3 85,0 (83,0;86,5) n=4	74,0 (59,3; 82,3) n=4	77,7 (74,8; 80,6) * n=4	16,6 (5,3; 19,7) n=5
		4 191,30 (81,0; 227,5) n=11	60,0 (50,5; 129,5)* n=11	63,1 (38,9; 83,8) * n=11	19,0 (10,4; 37,6) n=11
		8 182,5 (142,0; 245,8) n=8	108,0 (56,3; 157,0)* n=8	63,8 (48,2; 83,5) * n=8	15,6 (12,5; 25,5) n=8
		12 131,0 (113,0; 153,0) n=7	93,0 (70,5; 106,0)* n=7	66,2 (59,7; 72,4) * n=7	16,4 (15,3; 20,1) n=7
		16 123,0 (111,0; 153,0) n=8	89,0 (56,5; 100,78)* n=8	62,4 (55,5; 78,6) * n=8	9,1 (8,6; 11,0) * n=8
		24 114,0 (85,0; 121,0) n=5	80,0 (76,0; 82,0) n=5	74,4 (66,1; 78,6) * n=5	9,8 (7,9; 10,0) * n=5
		32 107,0 (82,0; 113,0) n=5	5,0 (3,0; 15,0) n=5	9,5 (3,6;13,3) n=5	9,0 (8,9; 14,4) n=5
		40 10,30 (76,3; 113,3) n=6	29,0 (9,8; 46,0) n=6	35,6 (11,8; 64,5) n=6	20,4 (18,2; 23,2) n=6
		52 69,5 (61,8; 73,5) n=6	37,0 (26,5; 45,3) n=6	52,9 (31,6;67,6) * n=6	12,4 (11,5; 14,8) n=6
PTi ₄₀ (а-С)МК	до операции	144.5 (73.3; 221,0) n=22	30.5 (24.3; 47.75) n=22	15,9 (7,6; 77,9) n=22	19,7 (9,9; 26,0) n=22
	недели	1 53,0 (41,5;68,0) * n=7	45,0 (33,5; 57,5) * n=7	81,0 (71,7; 83,7)* n=7	15,9 (7,5; 19,9) n=7
		2 52,0 (38,8; 77,0) * n=8	35,0 (29,0; 42,5) n=8	76,0 (51,2; 78,8) n=8	16,5 (5,9; 18,7) n=8
		3 62,0 (56,0; 70,8) * n=8	47,0 (39,0; 54,8) n=8	71,9 (64,9; 76,8)* n=7	17,2 (11,7; 18,3) n=8
		4 146,0 (70,0; 228.3) n=18	51,0 (43,0; 73,0)* n=18	72,7 (64,9; 76,8)* n=17	14.95 (9.5; 23.6) n=18

	после операции	8	204,0 (157,0; 232,0) n=9	90,0 (60,0;131,0)* n=9	52,2 (42,9; 59,4) n=9	23,6(17,7;26,7) n=9
		12	134,0 (109,8;173,3) n=6	78 (69,8;106,5)* n=6	68,3 (58,3; 76,6)* n=6	16,1 (11,2; 22,8) n=6
		16	148,0 (128,0;175,0) n=7	98,0 (95,0;102,0) * n=7	62,8 (50,7; 73,1) n=7	9,0 (7,1; 14,1) * n=7
		24	104,0 (97,5; 124,0) n=6	77,5 (64,5; 80,8) n=6	59,4 (46,5; 80,6) n=6	8,9 (8,3; 10,6) * n=6
		32	151,0 (116,0;153,0) n=5	7,0 (5,0;18,0) n=5	4,3 (3,3; 27,6) n=5	12,1 (8,5; 38,6) n=5
		40	96,0 (88,0;109,0) n=5	16,0 (6,5;48,5) n=7	11,8 (9,3; 33,9) n=5	22,4 (21,5; 32,3) n=7
		52	120,5 (82,0; 153) n=6	48,5 (29,5; 79,5) n=6	56,1 (18,6; 64,2) n=6	13,0 (12,5; 16,0) n=6
ПТi ₄₀ (CN _{0,25}) МК	до операции		220,0 (79,5; 324,5) n=15	38,0 (19,3; 64) n=15	15,5 (9,9; 45,2) n=16	14,4 (11,6; 21,1) n=15
	недели после операции	1	47,0 (37,5; 52,5)* n=3	38,0 (28,5; 42,0) n=3	79,3 (67,9; 80,9) n=3	11,5 (7,7; 18,4) n=3
		2	70,0 (67,3; 150,5)* n=4	57,0 (49,8; 62,5) n=4	79,8 (47,5; 82,3)* n=4	17,2 (7,2; 20,7) n=4
		3	69,0 (58,0; 86,5) n=3	55,0 (46,5;56,5) n=3	80,9 (52,9; 84,1) n=3	15,3 (12,7; 16,2) n=3
		4	127,5 (97,5; 256,0) n=10	73,5 (44,8; 208,0)* n=10	67,4 (60,8; 81,2) * n=10	21,7 (13,3; 30,2) n=10
		8	212,5 (143,5; 255,0) n=7	114,5 (56,0; 172,0)* n=7	62,5 (38,3; 85,7) * n=7	23,9 (10,6; 31,2) n=7
		12	161,0 (121,5; 204,5) n=7	119,5 (88,0; 155,0)* n=7	75,9 (68,6; 81,8) * n=7	19,3 (12,4; 20,9) n=7
		16	157 (106,8; 164,5) n=8	88 (63,8; 114) * n=8	61,4 (49,4; 67,8) * n=8	12,0 (6,9; 15,2) n=8
		24	131,0 (108,8; 139,8) n=6	67,5 (51,0; 78,0) n=6	56,9 (47,1; 58,5) n=6	13,5 (7,8; 13,2) * n=6
		32	90,0 (89,0;105,5) n=3	23,0 (18,0; 30,0) n=3	19,0 (14,4; 42,0) n=3	12,3 (10,8; 21,1) n=3
		40	83,5 (80,0; 97,5) n=6	13,0 (5,5;34,8) n=6	15,5 (5,9; 30,2) n=6	17,6 (16,1; 18,0) n=6
		52	89,0 (70,5; 97,0) n=6	41,5 (39,3; 45,3) n=6	53, 5 (42,6; 56,0) n=6	16,7 (11,8; 22,6) n=6

где: * - значимые отличия по сравнению с активностью фермента до операции у животных в соответствующей группе

** - значимые отличия по сравнению с ПТi₄₀ в соответствующий срок после операции

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Таблица Б.1 – Динамика изменения интегральных лейкоцитарных индексов у кроликов после имплантации пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами

Срок обслед ования	Серия	Лейкоцитарный индекс интоксикации по Кальф-Калифу	Ядерный индекс интоксикации Г. А. Даштоянца	Реактивный ответ нейтрофилов по Хабирову Т.Ш.	Индекс соотношения лейкоцитов и СОЭ	Индекс соотношения лимфоцитов и моноцитов	Индекс соотношения нейтрофилов и моноцитов
(медиана, 25-, 75- квартили) n -количество исследований							
До операц ии	PTi ₄₀ МК n=12	0,48 (0,32; 0,74)	0,055 (0,045; 0,076)	0,91 (0,46; 1,83)	0,23 (0,21; 0,46)	23,3 (15,3; 34,3)	11,5 (9,5; 26,0)
	PTi ₄₀ (a-C)МК n=16	0,36 (0,24; 0,58)	0,053 (0,029; 0,098)	0,67 (0,50; 0,95)	0,28 (0,24; 0,34)	21,8 (17,7; 27,4)	8,8 (8,6; 21,3)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК n=12	0,26 (0,19; 0,54)	0,025 (0; 0,048)	0,54 (0,37; 0,81)	0,30 (0,21; 0,33)	17,5 (11,1; 29,1)	8,8 (6,5; 11,4)
После операции, недели							
1	PTi ₄₀ МК n=4	0,16 (0,10; 0,23)	0,083 (0,045; 0,108)	0,38 (0,24; 0,65)	0,37 (0,28; 0,46)	44,8 (25,6; 63,3)	19,0 (15,7; 24,5)
	PTi ₄₀ (a-C)МК n=7	0,21 (0,15; 0,29)	0,059 (0,038; 0,063)	0,53 (0,34; 0,88)	0,29 (0,24; 0,31)	32,0 (18,4; 59,0)	17,0 (11,8; 34,0)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК n=4	0,29 (0,20; 0,33)	0,053 (0; 0,048)	1,00 (0,62; 1,17)	0,33 (0,28; 0,36)	55,0 (39,3; 58,5)	34,0 (28,0; 37,0)
2	PTi ₄₀ МК n=4	0,09 (0,08; 0,30)	0,043 (0,022; 0,067)	0,11 (0,11; 1,78)	0,73 (0,60; 0,80)	12,3 (10,7; 14,8)	6,0 (4,5; 7,8)
	PTi ₄₀ (a-C)МК n=5	0,23 (0,22; 0,46)	0,071 (0,070; 0,167)	0,80 (0,73; 1,9)	0,55 (0,43; 0,55)	60,0 (25,5; 68,0)	26,0 (23,0; 30,0)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК n=4	0,20 (0,16; 0,23)	0,050 (0,035; 0,057)	0,32 (0,28; 0,41)	0,55 (0,51; 0,56)	26,5 (20,9; 28,3)	16,0 (16,4; 18,8)
3	PTi ₄₀ МК n=4	0,17 (0,16; 0,29)	0,070 (0,054; 0,103)	0,62 (0,31; 0,97)	0,74 (0,64; 0,77)	29,0 (21,5; 29,8)	18,5 (11,7; 18,8)
	PTi ₄₀ (a-C)МК n=7	0,27 (0,22; 0,43)	0,114 (0,096; 0,144)	1,41 (0,69; 1,54)	0,44 (0,41; 0,54)	53,0 (25,1; 57,5)	37,0 (14,6; 40,5)

	ПТi ₄₀ (CN _{0,25}) МК n=4	0,16 (0,15; 0,25)	0,050 (0,038; 0,061)	0,41 (0,36; 0,52)	0,65 (0,54; 0,75)	15,8 (12,7; 36,4)	8,4 (8,0; 23,7)
4	ПТi ₄₀ МК n=10	0,32 (0,24; 0,51)	0,060 (0,013; 0,108)	0,78 (0,42; 1,06)	0,33 * (0,33; 0,56)	23,3 (16,5; 29,0)	9,7 (8,2; 14,3)
	ПТi ₄₀ (a-C)МК n=14	0,51 (0,27; 0,63)	0,095 (0,046; 0,119)	1,17 (0,46; 1,39)	0,31 (0,22; 0,56)	18,0 (10,1; 26,3)	8,9 (6,2; 11,8)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25}) МК n=10	0,56 (0,35; 0,76)	0,031 (0,005; 0,053)	0,66 (0,44; 1,25)	0,28 (0,24; 0,53)	20,0 (8,8; 21,8)	9,2 (7,2; 10,6)
8	ПТi ₄₀ МК n=9	0,42 (0,18; 0,48)	0 (0; 0,055)	0,37 (0,22; 0,72)	0,32 (0,28; 0,38)	28,5 (17,0; 66,0)	15,0 (19,3; 19,0)
	ПТi ₄₀ (a-C)МК n=10	0,57 (0,31; 0,74)	0,030 (0; 0,062)	0,61 (0,31; 2,53)	0,41 (0,32; 0,46)	28,0 (13,8; 65,3)	20,8 (10,0; 23,8)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25}) МК n=8	0,25 (0,18; 0,40)	0,050 (0,043; 0,099)	0,32 (0,27; 0,97)	0,30 (0,28; 0,33)	22,2 (16,1; 41,5)	10,4 (9,0; 13,3)
12	ПТi ₄₀ МК n=7	0,25 (0,19; 0,27)	0,021 (0; 0,062)	0,28 (0,24; 0,43)	0,25 (0,24; 0,33)	18,3 (15,8; 23,0)	7,3 (6,1; 13,2)
	ПТi ₄₀ (a-C)МК n=6	0,29 (0,22; 0,60)	0,050 (0,030; 0,105)	0,97 (0,70; 1,11)	0,30 (0,25; 0,36)	16,0 (13,3; 23,8)	10,8 (6,4; 20,3)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25}) МК n=7	0,18 (0,15; 0,47)	0,057 * (0,047; 0,099)	0,59 (0,42; 0,90)	0,27 (0,25; 0,30)	17,3 (13,1; 20,3)	9,3 (7,8; 10,2)
16	ПТi ₄₀ МК n=9	0,19 (0,17; 0,56)	0,069 (0,040; 0,097)	0,65 (0,43; 1,08)	0,46 (0,37; 0,48)	38,5 (28,3; 69,0)	20,0 (14,8; 24,0)
	ПТi ₄₀ (a-C)МК n=7	0,20 (0,17; 0,38)	0,045 (0,028; 0,054)	0,42 (0,33; 0,57)	0,38 (0,33; 0,58)	19,6 (17,7; 40,5)	10,3 (6,3; 35,4)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25}) МК n=7	0,32 (0,17; 0,43)	0,037 (0,034; 0,055)	0,38 (0,31; 0,44)	0,32 (0,25; 0,44)	30,5 (29,6; 33,3)	17,3 (14,6; 18,4)
24	ПТi ₄₀ МК n=6	0,17 (0,13; 0,40)	0,082 (0,057; 0,104)	0,60 (0,31; 1,10)	0,39 (0,27; 0,76)	19,0 (17,7; 22,7)	11,0 (8,7; 13,0)
	ПТi ₄₀ (a-C)МК n=5	0,22 (0,19; 0,23)	0,077 (0,074; 0,1014)	0,42 (0,41; 0,77)	0,39 (0,31; 0,74)	21,3 (15,2; 27,5)	7,0 (5,0; 9,7)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25}) МК n=5	0,36 (0,15; 0,58)	0,066 (0,053; 0,094)	1,29 (0,32; 1,47)	0,54 * (0,40; 0,67)	17,0 (13,3; 30,8)	11,2 (9,3; 17,5)
32	ПТi ₄₀ МК n=5	0,18 (0,17; 0,32)	0,074 (0,047; 0,088)	0,46 (0,31; 1,30)	0,60 (0,51; 0,61)	14,5 (12,5; 18,0)	9,3 (9,3; 9,7)

	ПТi ₄₀ (a-C)МК n=5	0,45 (0,44; 0,59)	0,061 (0,057; 0,071)	1,33 (1,28; 3,05)	0,40 (0,37; 0,41)	28,5 (17,3; 30,0)	18,5 (14,7; 20,5)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25}) МК n=4	0,32 (0,18; 0,49)	0,090 (0,073 0,095)	0,59 (0,55; 0,87)	0,35 (0,33;0,41)	23,3 (16,% 26,4)	8,0 (5,6; 13,5)
40	ПТi ₄₀ МК n=6	0,57 (0,23; 0,77)	0,074 (0,054; 0,083)	1,36 (0,48; 2,17)	0,85 * (0,71; 1,00)	20,1 (14,5; 22,3)	9,2 (6,1; 10,6)
	ПТi ₄₀ (a-C)МК n=5	0,65 (0,59; 0,66)	0,088 (0,088; 0,094)	1,62 (1,47; 1,69)	0,65 * (0,60; 0,85)	14,5 (90,3; 15,0)	8,8 (6,3; 9,3)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25}) МК n=6	0,37 (0,16; 0,44)	0,100 * (0,05; 0,01)	0,98 (0,43; 2,19)	0,58 * (0,57; 0,65)	22,0 (22,3; 30,5)	12,2 (9,1; 15,8)
52	ПТi ₄₀ МК n=6	0,45 (0,33; 0,62)	0,077 (0,063;0,135)	1,27 (0,76; 1,68)	0,27 (0,24;0,31)	12,2 (7,9; 21,1)	9,8 (6,2; 14,8)
	ПТi ₄₀ (a-C)МК n=6	0,24 (0,12; 0,41)	0,109 * (0,084; 0,133)	1,06 (0,32; 2,62)	0,27 (0,25; 0,30)	27,5 (17,0; 28,0)	14,3 (7,0; 19,5)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25}) МК n=6	0,36 (0,27; 0,38)	0,063 * (0,010; 0,115)	0,40 (0,36; 0,57)	0,30 (0,26; 0,35)	21,0 (14,0; 23,0)	7,0 (5,5; 9,0)

где * - значимое отличие по сравнению с дооперационным уровнем

** - значимое отличие по сравнению с 10-й серией (ПТi₄₀) в соответствующий срок

Таблица Б.2 – Динамика показателей миелограмм кроликов после моделирования краевого дефекта метадиафиза большеберцовых и бедренных костей (медиана, 25-, 75- квантили)

Срок обследования	Серия	Бласты, %	Миело-бласты, %	Промие-циты, %	Миелоциты, %	Метамие-лоциты, %	Палочко-ядерные нейтрофи-лы, %	Сегменто-ядерные нейтрофи-лы, %	Клетки нейтро-фильного ряда,%
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
До операции n=8		0,53 (0,47; 0,76)	1,04 (0,99; 1,17)	3,05 (2,48; 3,20)	9,56 (8,99; 9,85)	9,1 (8,46; 9,70)	12,63 (12,50;13,13)	14,33 (13,62; 15,39)	49,12 (47,27; 49,89)
После операции, недели									
4	ПТi ₄₀ МК n=6	1,13 (0,96; 1,89)	2,11 * (2,06; 2,16)	4,00 * (3,69; 4,03)	7,49 (7,15; 8,15)	9,11 (9,03; 9,45)	12,04 (11,42; 12,70)	14,15 (13,50; 14,50)	46,97 (46,65; 47,16)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	0,78 (0,67; 0,91)	0,97 (0,88; 1,12)	0,99 * (0,96; 1,24)	7,02 * (6,98; 7,09)	8,99 (8,71; 9,09)	10,43 * (10,09; 10,59)	13,97 (13,35; 14,62)	41,41 * (40,56; 42,15)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25}) МК n=4	0,92 (0,82;1,22)	1,18 (1,0; 1,30)	2,80 (2,28; 3,51)	6,55 (4,72; 6,97)	10,73* (9,74; 10,96)	14,91 (13,0; 15,85)	15,24 (14,61;15,72)	51,35 * (45,86;51,50)
16	ПТi ₄₀ МК n=4	0,68 (0,66; 0,85)	1,5 (1,02; 1,64)	2,8 (2,5; 3,06)	8,7 (8,25; 8,96)	10,5 * (10,12; 10,61)	11,90 (9,85; 12,04)	14,80 (14,55;15,42)	48,70 (46,08;49,28)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	0,54 (0,48; 1,05)	0,61 (0,56; 0,98)	1,10 (0,96; 1,85)	5,48 (5,41; 6,12)	9,12 (8,82; 9,50)	10,60 (9,15; 10,96)	14,25 (13,07; 15,80)	41,36 (38,42; 42,41)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25}) МК n=4	0,68 (0,47; 0,85)	1,40 (1,23; 0,54)	2,95 (2,88; 3,07)	7,46 * (7,12; 8,15)	10,50 * (10,11; 11,30)	11,72 * (11,50;12,06)	14,20 (14,03; 15,48)	47,69 (47,09;47,75)
52	ПТi ₄₀ МК n=4	0,55 (0,41; 0,75)	1,20 (0,83; 1,72)	1,18 * (1,08; 1,70)	9,10 (8,81; 9,34)	10,85 * (10,48; 11,43)	10,82 * (10,72; 11,17)	12,83* (11,95; 13,39)	45,35 * (44,53;45,52)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	0,51 (0,36; 0,69)	0,73 (0,42; 1,00)	1,87 (1,26; 2,72)	7,13 (4,82; 9,37)	9,37 (8,58; 10,18)	11,73 (10,33; 13,71)	16,31 (14,29; 16,67)	44,69 (41,29; 50,26)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25}) МК n=4	0,54 (0,49; 0,71)	0,57 * (0,55; 0,61)	2,96 (0,70; 3,06)	8,73 (8,53; 8,98)	10,38 * (10,07; 10,70)	12,88 (12,48; 13,13)	17,47* (16,79; 18,15)	52,31* (51,23; 53,33)

Продолжение таблицы Б.2

Срок об- следо- вания	Серия	Эозинофиль (всех генераций), %	Базофилы (всех генераций), %	Эритро- бласты, %	Пронормо- циты, %	Нормоци- ты базофиль- ные, %	Нормоциты полихро- матофиль- ные, %	Нормоциты оксифиль- ные, %	Клетки эритроид- ного ряда, %
1	2	11	12	13	14	15	16	17	18
До операции n=8		0,26 (0,11; 0,71)	0,21 (0,13; 0,35)	0,96 (0,89; 1,09)	2,04 (1,45; 2,12)	8,44 (7,82; 9,08)	11,43 (10,41; 11,86)	9,60 (8,90; 9,84)	32,06 (31,33; 32,67)
После операции, недели									
4	ПТi ₄₀ МК n=6	0 (0; 0)	0 (0; 0)	2,49 * (2,05; 2,94)	2,29 (1,58; 3,12)	8,39 (7,49; 10,25)	9,71 (9,46; 10,25)	9,94 * (9,87; 10,52)	34,15 * (34,03; 35,24)
	ПТi ₄ (а-С)МК n=4	0 (0; 0,25)	0,16 (0; 0,41)	1,41 * (1,28; 1,66)	2,62 (2,30; 2,93)	10,72 * (10,41; 11,07)	11,22 (10,80; 11,56)	12,17 * (11,40; 12,50)	37,90 * (36,92; 38,95)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	0,05 (0; 0,3)	0,25 (0; 0,85)	2,09 * (1,84; 2,64)	1,49 * (1,33; 2,14)	6,29 (5,84; 6,81)	10,15 * (10,1; 10,37)	10,05 (8,99; 10,92)	30, 35 (29,30; 31,64)
16	ПТi ₄₀ МК n=4	1,30 (0; 1,50)	0 (0; 0,60)	0,61 (0,55; 1,95)	0,63 (0,52; 1,24)	8,54 (7,15; 10,20)	11,50 (10,23; 12,14)	10,25 (9,52; 10,79)	31,26 (29,42; 35,14)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	0 (0; 0,21)	0 (0; 0)	1,20 (1,15; 1,48)	1,20 * (1,12; 2,02)	10,59 (10,20; 11,64)	10,52 (10,40; 12,06)	11,60 (10,23; 12,81)	37,30 (33,3; 37,62)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	0 (0; 0,50)	0 (0; 0)	0,58 * (0,54; 0,63)	0,82 * (0,74; 0,92)	7,95 (7,83; 8,12)	11,20 (10,23; 11,54)	8,12 (7,94; 8,56)	28,29 * (28,27; 29,16)
52	ПТi ₄₀ МК n=4	0,15 (0; 0,40)	0 (0; 0,25)	0,50 (0,45; 0,56)	0,70 (0,67; 0,73)	9,81 (9,29; 10,36)	12,45 (11,93; 12,95)	10,24 * (10,19; 10,35)	33,99; (33,15; 34,31)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	0 (0; 0,50)	0,11 (0; 0,36)	1,36 (0,40; 2,23)	1,90 (0,89; 2,85)	10,57 (8,10; 12,27)	12,57 (11,54; 13,82)	10,05 (9,33; 11,26)	36,40 (31,46; 41,20)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	0 (0; 0,26)	0,16 (0; 0,41)	0,51 * (0,47; 0,55)	0,57 * (0,54; 0,60)	7,12 (7,02; 7,18)	10,77; (10,60; 11,18)	8,33 (8,03; 8,69)	27,40 * (27,13; 27,70)

где * - значимое отличие по сравнению с интактными животными

Продолжение таблицы Б.2

Срок обследо- вания	Серия	Моноциты, %	Лимфоциты, %	Плазмоциты, %	Мегакариоциты, %	Ретикулярные клетки, %
1	2	19	20	21	22	23
До операции n=8		9,24 (4,50; 9,62)	9,51 (8,89; 10,14)	0,88 (0,70; 0,97)	0,15 (0; 0,29)	0,86 (0,20; 0,92)
После операции, недели						
4	ПТi ₄₀ МК n=6	7,36 (5,86; 8,03)	6,89 (6,74; 9,12)	0,10 (0; 0,50)	0 (0; 0)	0,63 (0,48; 0,82)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	7,02 (6,89; 7,31)	8,55 (7,80; 9,29)	0,84 (0,66; 1,03)	0,15 (0; 0,40)	0,77 (0,74; 0,81)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	7,44 (7,19; 8,93)	7,16 (6,30; 8,26)	0,30 (0,05; 0,68)	0 (0; 0)	0,78 (0,66; 0,90)
16	ПТi ₄₀ МК n=4	4,62 (4,15; 4,96)	9,82 (9,45; 9,96)	0,96 (0,52; 0,99)	0 (0; 0)	0,94 (0,93; 1,25)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	7,05 (6,85; 7,24)	8,23 (6,14; 9,83)	0,79 (0,47; 1,05)	0,12 (0; 0,52)	0,73 (0,57; 0,90)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25}) МК n=4	7,08 (6,45; 8,61)	11,40 * (10,30; 12,50)	1,20 (0; 1,50)	0 (0; 0,50)	0,95 (0,92; 1,15)
52	ПТi ₄₀ МК n=4	6,95 (6,65; 7,07)	9,68 (8,76; 10,37)	0,50 (0,47; 0,60)	0 (0; 0,25)	0,75 (0,68; 0,83)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	6,82 (6,41; 7,03)	7,98 (5,95; 9,87)	0,56 (0,50; 0,67)	0 (0; 0,10)	0,59 * (0,47; 0,71)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	8,60 (7,57; 9,91)	8,28 * (7,87; 8,46)	0,05 (0; 0,3)	0 (0; 0)	0,83 (0,81; 0,85)

где * - значимое отличие по сравнению с интактными животными

Таблица Б.3 – Динамика изменения индексов, характеризующих костномозговое кроветворение, у кроликов после моделирования краевого дефекта метадиафиза большеберцовых и бедренных костей

Срок обследования	Серия	Лейкоэритро-бластическое соотношение	Индекс созревания нейтрофилов	Индекс созревания эритрокариоцитов
До операции n=8		1,92 (1,83; 1,97)	0,79 (0,73; 0,81)	0,66 (0,62; 0,67)
После операции, недели				
4	ПТi ₄₀ МК n=6	1,76 (1,71; 1,88)	0,80 (0,73; 0,83)	0,58 (0,57; 0,60)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	1,51* (1,44; 1,59)	0,71 (0,68; 0,72)	0,61 (0,60; 0,62)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	2,14 (1,92; 2,25)	0,80 (0,72; 0,88)	0,60 (0,60; 0,61)
16	ПТi ₄₀ МК n=3	1,95 (1,75; 2,05)	0,83 (0,80; 0,87)	0,67 (0,62; 0,73)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	1,61 (1,51; 1,79)	0,64 (0,61; 0,73)	0,62 (0,62; 0,63)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=3	2,36 * (2,24; 2,42)	0,83 (0,75; 0,84)	0,67 (0,66; 0,68)
52	ПТi ₄₀ МК n=4	1,81 (1,78; 1,87)	0,89 * (0,88; 0,94)	0,67 (0,66; 0,68)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	1,71 (1,35; 2,09)	0,65 (0,54; 0,80)	0,62 (0,58; 0,70)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	2,50 * (2,46; 2,54)	0,73 (0,71; 0,75)	0,70 * (0,70; 0,71)

где * - значимое отличие по сравнению с интактными животными

Таблица Б.4 – Миелограмма кроликов после внедрения пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами (медиана, 25-, 75- квартили)

Срок обсле- дован ия	Серия	Бласты, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Миело- бласты, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Промиело- циты, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Миелоциты, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Метомие- лоциты, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Палочко- ядерные нейтрофи-лы, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Сегменто- ядерные нейтрофи-лы, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Клетки нейтро- фильного ряда,% (медиана, 25-, 75- квартили)
До операции n=8		0,53 (0,47; 0,76)	1,04 (0,99; 1,17)	3,05 (2,48; 3,20)	9,56 (8,99; 9,85)	9,1 (8,46; 9,70)	12,63 (12,50;13,13)	14,33 (13,62; 15,39)	49,12 (47,27; 49,89)
После операции, недели									
4	PTi ₄₀ МК n=6	0,64 (0,52;2,50)	1,85 (1,84; 2,06)	3,85* (3,18; 4,65)	8,08 (6,41; 8,85)	8,30 (8,11; 8,63)	11,00 (10,36;12,95)	14,05 (12,77;14,95)	45,20 (44,67;46,37)
	PTi ₄₀ (а-С)МК n=4	0,74 (0,72 0,92)	1,08 (0,96; 1,45)	1,52 (1,48; 2,96)	9,52 (9,15; 10,20)	9,85 (8,84;10,23)	12,57 (12,25;13,06)	14,85 (14,05;14,93)	47,89 (47,63;49,35)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК n=4	0,67 (0,66;1,06)	1,08 (0,99; 1,10)	2,85 (2,50;3,50)	7,06 (6,62; 9,34)	11,51* (11,50; 11,6)	14,51 (14,30;15,02)	16,20 (16,01;16,42)	52,12 * (50,67;54,34)
16	PTi ₄₀ МК n=3	0,85 (0,65;0,99)	1,23 (1,20; 1,24)	2,28 (0,98; 3,31)	9,15 (7,15; 9,45)	9,72 (9,55; 9,96)	11,12 * (10,52;11,20)	12,84 * (12,61; 3,05)	44,11 * (42,96;45,82)
	PTi ₄₀ (а-С)МК n=4	0,86 (0,84; ,92)	0,88 * (0,81; 0,91)	2,89 (2,25; 3,05)	8,56 * (7,15; 9,56)	9,12 (9,11; 9,23)	12,50 (11,06;12,54)	13,52 (13,24;14,06)	46,10 (43,72; 7,83)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК n=3	0,65 (0,58;0,77)	1,11 (1,00; 1,25)	2,97 (2,84; 3,11)	8,81 (7,66; 9,66)	10,12 (9,87; 10,46)	11,25 (10,63;12,20)	14,32 (13,97; 4,83)	46,92 (46,81;48,40)
52	PTi ₄₀ МК n=4	0,54 (0,52;0,59)	1,20 (1,05; 1,23)	1,90 * (1,18; 2,03)	9,15 (9,03; 9,60)	10,60 * (10,05;10,62)	10,55 (10,52; 1,03)	15,08 (14,74; 5,40)	47,16 (46,81; 7,50)
	PTi ₄₀ (а-С)МК n=4	0,64 (0,61;0,81)	1,15 (1,14; 1,23)	2,55 (2,40; 2,65)	9,16 (9,15; 10,02)	10,12 (9,56;10,25)	13,02 (11,84; 3,03)	14,25 (13,25;14,50)	48,64 (47,83;48,97)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) МК n=4	0,55 (0,53; ,55)	1,01 (0,98; 1,04)	2,27 (2,06; 2,44)	9,65 (9,30;10,03)	9,29 (9,12; 9,93)	14,79 * (13,89;15,61)	17,55 * (17,40;17,95)	54,04 * (52,93;54,78)

** - значимое отличие по сравнению с 10-й серией (PTi₄₀МК) в соответствующий срок.

Продолжение таблицы Б.4

Срок об- следо- вания	Серия	Эозинофилы (всех генераций), % (медиана, 25-, 75- квартили)	Базофилы (всех генераций), % (медиана, 25-, 75- квартили)	Эритро- бласты, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Пронормо- циты, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Нормоциты базофиль- ные, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Нормоциты полихро- матофильные, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Нормоциты оксифиль- ные, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Клетки эритроидного ряда, % (медиана, 25-, 75- квартили)
До операции n=8		0,26 (0,11; 0,71)	0,21 (0,13; 0,35)	0,96 (0,89; 1,09)	2,04 (1,45; 2,12)	8,44 (7,82; 9,08)	11,43 (10,41; 1,86)	9,60 (8,90; 9,84)	32,06 (31,33;32,67)
После операции, недели									
4	ПТi ₄₀ МК n=6	0 (0; 0,5)	0 (0; 0)	1,37 (1,05; 2,15)	2,51 (2,15; 3,04)	8,44 (8,12; 8,65)	10,21 * (9,41; 10,54)	10,35 * (9,63;10,64)	34,00 (33,40;34,06)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	0 (0; 0,58)	0,40 (0; 0,50)	0,63 (0,62; 0,85)	0,64* (0,63; 0,68)	8,92 (8,08; 8,96)	9,96 (9,75; 10,43)	9,45 (9,02; 10,25)	29,53 (27,92;32,75)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25}) n=4	0 (0; 0,32)	0 (0; 0)	1,80 (0,65; 1,96)	1,10 * (0,93; 1,50)	5,65 (5,52; 6,15)	9,91 * (9,88; 10,24)	10,66 (8,60; 10,80)	29,12 (27,35; 29,54)
16	ПТi ₄₀ МК n=3	0 (0; 0)	0 (0; 0,58)	1,15 (0,50; 1,89)	0,98* (0,61; 0,99)	9,95 (8,06; 9,96)	10,55 (9,74; 10,96)	11,08 (7,85; 12,50)	33,71 (26,76; 36,30)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	0 (0; 0,32)	0,21 (0,10; 0,23)	0,64 (0,55; 0,87)	0,85* (0,85; 0,92)	9,85 (9,16;10,20)	12,25 (11,64;12,41)	9,56 (9,44;10,15)	33,34 (32,10; 34,11)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25}) МК n=3	0,1 (0; 0,35)	0 (0; 0,42)	0,72 (0,64; 0,86)	0,74 * (0,57; 0,90)	8,54 (8,07; 9,77)	10,45 (9,95; 10,70)	11,05 (10,13;11,82)	30,53 (30,34;33,04)
52	ПТi ₄₀ МК n=4	0,1 (0; 0,96)	0 (0; 0,41)	0,55 * (0,52; 0,58)	0,57 * (0,55; 0,62)	8,45 (8,15; 9,06)	13,58 (12,01;14,89)	9,05 (8,86; 9,35)	31,81 (30,53;33,10)
	ПТi ₄₀ (а-С) МК n=4	0,25 (0; 0,50)	0 (0; 0,14)	0,56 * (0,48; 0,82)	0,92 (0,57; 2,15)	8,75 (8,55; 9,48)	10,55 (10,23;10,89)	10,02 (9,86; 10,21)	31,59 (30,33; 33,48)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25}) МК n=4	0,85 (0,10; 1,85)	0 (0; 0,25)	0,48 * ** (0,41; 0,52)	0,49 * (0,42; 0,57)	7,00 (6,50; 7,59)	9,66 * ** (9,07; 10,25)	6,04 * ** (5,54; 6,48)	23,65 * ** (23,32; 23,95)

Продолжение таблицы Б.4

Срок обследования	Серия	Моноциты, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Лимфоциты, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Плазмоциты, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Мегакариоциты, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Ретикулярные клетки, % (медиана, 25-, 75- квартили)
До операции n=8		9,24 (4,50; 9,62)	9,51 (8,89; 10,14)	0,88 (0,70; 0,97)	0,15 (0; 0,29)	0,86 (0,20; 0,92)
После операции, недели						
4	ПТi ₄₀ МК n=6	7,08 (5,61; 7,20)	8,85 (7,13;10,50)	0,43 (0,10; 0,86)	0 (0; 0,25)	0,88 (0,82; 0,89)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	5,91 (5,88; 6,05)	10,05 (10,05;11,10)	0,21 (0,12; 0,73)	0 (0; 0,50)	0,92 (0,89;0,93)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	6,55 (6,12; 7,05)	9,4 (8,18;10,02)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,88 (0,82; 0,89)
16	ПТi ₄₀ МК n=3	5,02 (4,55; 6,84)	10,11 (9,67; 12,50)	0,25 (0; 0,57)	0 (0; 0,10)	0,87 (0,85; 0,95)
	ПТi ₄₀ (а-С) n=4	7,12 (6,75; 7,15)	10,22 * (9,11; 11,24)	0,58 (0; 0,74)	0 (0;0)	0,84 (0,77; 0,86)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=3	7,28 (5,95; 7,85)	9,70 (9,36; 10,22)	0,41 (0; 0,84)	0 (0; 0,26)	0,92 (0,84; 0,94)
52	ПТi ₄₀ МК n=4	7,01 (6,30; 7,53)	9,65 (9,08; 10,20)	0,21 (0,21; 0,52)	0 (0; 0,10)	0,62 (0,61; 0,65)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	7,01 (5,02; 7,15)	9,06 (8,15; 9,52)	0,85 (0,65; 0,96)	0 (0; 0,10)	0,68 (0,63; 0,73)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	6,52 (6,18; 8,11)	11,13 * (10,27;11,55)	0,32 (0; 0,74)	0 (0; 0,05)	0,73 (0,70; 0,76)

где * - значимое отличие по сравнению с интактными животными

** - значимое отличие по сравнению с 10-й серией (ПТi₄₀МК) в соответствующий срок

Таблица Б.5 – Динамика изменения индексов, характеризующих костномозговое кроветворение, у кроликов после имплантации пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами

Срок обследования	Серия	Лейкоэритро-бластическое соотношение	Индекс созревания нейтрофилов	Индекс созревания эритрокариоцитов
До операции n=8		1,92 (1,83; 1,97)	0,79 (0,73; 0,81)	0,66 (0,62; 0,67)
После операции				
4	ПТi ₄₀ МК n=6	1,80 (1,76; 1,84)	0,77 (0,71; 0,84)	0,60 (0,58; 0,63)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	2,22 (1,90; 2,31)	0,79 (0,74; 0,82)	0,67 (0,66; 0,68)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	2,34 (2,28; 2,42)	0,68 (0,66; 0,71)	0,69 (0,69; 0,71)
16	ПТi ₄₀ МК n=3	1,78 (1,60; 2,34)	0,84 (0,82; 0,92)	0,65 (0,64; 0,66)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	1,87 (1,82; 1,92)	0,77 (0,74; 0,88)	0,65 (0,64; 0,67)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=3	2,11 (1,87; 2,19)	0,84 (0,79; 0,91)	0,68 (0,65; 0,69)
52	ПТi ₄₀ МК n=4	1,95 (1,92; 2,12)	0,78 (0,77; 0,89)	0,72 * (0,67; 0,72)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	2,08 (1,86; 2,09)	0,84 (0,76; 0,89)	0,67 (0,61; 0,69)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	2,94 * (2,77; 3,12)	0,66 * ** (0,64; 0,69)	0,66 (0,66; 0,68)

где * - значимое отличие по сравнению с интактными животными

Таблица Б.6 – Динамика концентрации микроэлементов в периферической крови при формировании краевых дефектов большеберцовых и бедренных костей обеих тазовых конечностей у кроликов и внедрении пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами, в одну из конечностей

Срок обследования	Тип внедренных имплантатов	Концентрация общего кальция (медиана, 25-, 75-квартили) моль/л	Концентрация ионизированного кальция (медиана, 25-, 75-квартили) моль/л	Концентрация магния (медиана, 25-, 75-квартили) моль/л	Концентрация неорганического фосфата (медиана, 25-, 75-квартили) моль/л
До операции	PTi ₄₀ МК	3,34 (3,10; 3,53) n=15	1,69 (1,67;1,76) n=6	0,85 (0,77;0,94) n=15	1,17 (0,90;1,30) n=15
	PTi ₄₀ (а-С)МК	3,15 (3,03; 3,30) n=22	1,66 (1,62;1,75) n=6	0,89 (0,85;0,99) n=22	1,16 (0,96; 1,25) n=22
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК	3,19 (3,08; 3,28) n=15	1,75 (1,69;1,78) n=6	0,87 (0,71;0,95) n=15	1,01 (0,87; 1,51) n=15
После операции, недели					
1	PTi ₄₀ МК	3,16 (3,02;3,35) n=	1,63 (1,56; 1,7) n=6	0,75 (0,73;0,78) n=4	1,07 (1,02; 1,12) n=4
	PTi ₄₀ (а-С)МК	3,15 (3,07;3,27) n=7	1,74 (1,64;1,83) n=6	0,88 (0,84;0,99) n=7	1,08 (1,05; 1,11) n=7
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК	3,24 (3,09; 3,56) n=4	1,55 (1,05;1,66) n=6	0,84 (0,81;0,87) n=4	1,17 (1,11;1,34) n=4
2	PTi ₄₀ МК	3,23 (3,06; 3,24) n=6	1,85 (1,64; 1,87) n=6	0,78 (0,76;0,83) n=6	0,84 (0,78; 1,12) n=6
	PTi ₄₀ (а-С)МК	3,17 (3,08; 3,2) n=6	1,84 (1,77;1,94) n=6	0,79 (0,74; ,85) n=6	0,79 (0,67; 0,96) n=6
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК	3,17 (3,09; 3,30) n=4	1,87 (1,77;1,94) n=6	0,88 (0,79; ,97) n=4	0,81 (0,73; 1,09) n=4
3	PTi ₄₀ МК	3,09 (3,02; 3,27) n=4	1,69 (1,65; 1,7) n=6	0,86 (0,79; 0,92) n=4	0,97 (0,94; 1,00) n=4
	PTi ₄₀ (а-С)МК	3,04 (2,95; 3,17) n=7	1,85 (1,78;1,94) n=6	0,88 (0,77; ,91) n=7	0,92 (0,90; 1,02) n=7
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК	3,02 (3,01; 3,24) n=4	1,84 (1,73;1,85) n=6	0,88 (0,88; 0,98) n=3	0,93 (0,92; 1,14) n=3
4	PTi ₄₀ МК	3,34 (3,22; 3,6) n=15	1,69 (1,63; 1,69) n=6	0,84 (0,78;0,89) n=15	1,12 (1,06; 1,38) n=15
	PTi ₄₀ (а-С)МК	3,22 (2,98; 3,3) n=19	1,83 (1,61;1,93) n=6	0,85 (0,79;0,93) n=19	1,13 (0,98; 1,21) n=19
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК	3,35 (3,19; 3,50) n=15	1,72(1,70;1,77) n=6	0,85 (0,79;0,92) n=15	1,15 (1,04;1,33) n=15
8	PTi ₄₀ МК	3,41 (3,36; 3,47) n=8	1,84 (1,80;1,87) n=6	0,76* (0,69; 0,90) n=8	1,01* (0,93; 1,08) n=8
	PTi ₄₀ (а-С)МК	3,35 (3,32; 3,39) n=8	1,65 (1,61;1,66) n=6	0,86 (0,66; 0,89) n=8	1,2 (0,97; 1,47) n=8
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК	3,33 (3,17; 3,43) n=7	1,7 (1,64; 1,77) n=6	0,76* (0,74; 0,80) n=7	1,07 (1,05; 1,37) n=7
12	PTi ₄₀ МК	3,35 (3,24; 3,36) n=7	-	0,80 (0,76; 0,94) n=7	0,96* (0,86; 1,16) n=7
	PTi ₄₀ (а-С)МК	3,20 (3,20; 3,3) n=7	-	0,89 (0,87; 0,89) n=7	0,86* (0,74; 0,98) n=7
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК	3,2 (3,14; 3,28) n=6	-	0,82 (0,76; 0,90) n=6	1,03* (1,00; 1,15) n=6

16	ПТi ₄₀ МК	3,22*(3,10; 3,31) n=8	1,64 (1,62;1,65) n=6	0,78 (0,77; 0,81) n=8	0,98* (0,93; 1,07) n=8
	ПТi ₄₀ (а-С)МК	3,21 (3,14; 3,23) n=7	1,72 (1,67; 1,74) n=6	0,74 (0,72; 0,80) n=7	1,06 (0,85; 1,10) n=7
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК	3,24 (3,10; 3,39) n=8	1,61 (1,57;1,65) n=5	0,89 (0,77; 0,89) n=8	0,98 (0,92; 1,11) n=8
24	ПТi ₄₀ МК	2,98 (2,95; 3,19) n=5	1,67 (1,60; 1,89) n=6	0,89 (0,88; 0,91) n=5	1,07 (0,94; 1,24) n=5
	ПТi ₄₀ (а-С)МК	3,27 (3,10; 3,29) n=6	1,68 (1,60;1,71) n=5	0,99 (0,96; 1,00) n=6	1,18 (1,12; 1,24) n=6
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК	3,33 (3,29; 3,35) n=6	1,73 (1,67;1,76) n=6	0,87 (0,82; 0,89) n=6	1,07 (0,94; 1,24) n=6
32	ПТi ₄₀ МК	3,16 (3,14; 3,19) n=5	-	0,74 (0,68; 0,78) n=5	0,91 (0,93; 1,04) n=5
	ПТi ₄₀ (а-С)МК	3,26 (3,11; 3,27) n=4	-	0,80 (0,79; 0,81) n=4	0,92 (0,89; 1,03) n=4
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК	3,25 (3,18; 3,25) n=5	-	0,76 (0,72; 0,79) n=5	0,99 (0,93; 1,04) n=5
40	ПТi ₄₀ МК	3,10*(3,00; 3,20) n=6	1,76 (1,75;1,76) n=6	0,71* (0,52;0,79) n=6	1,00 (0,92; 1,11) n=6
	ПТi ₄₀ (а-С)МК	3,18 (3,01; 3,25) n=5	1,76 (1,75;1,76) n=5	0,73 (0,68; 0,74) n=5	1,06 (0,86; 1,15) n=5
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК	3,17 (3,06; 3,29) n=5	1,79 (1,78;1,79) n=6	0,82* (0,74; 0,85) n=5	1,00 (0,92; 1,03) n=5
52	ПТi ₄₀ МК	3,19 (3,17; 3,23) n=6	1,65 (1,63;1,70) n=6	0,82 (0,62; 0,82) n=6	0,91 *(0,80; 1,11) n=6
	ПТi ₄₀ (а-С)МК	3,2 (3,09; 3,27) n=5	1,67 (1,63;1,70) n=6	0,72* (0,65; 0,86) n=5	0,97 *(0,81; 1,01) n=5
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК	3,2 (3,15; 3,29) n=6	1,76 (1,67;1,79) n=6	0,83 (0,77; 0,86) n=6	0,91 *(0,79; 1,00) n=6

где * - значимое отличие по сравнению с интактными животными

Таблица Б.7 – Динамика активности ферментов в гомогенатах метадиафизов o.tibia, o.femur, прилежащих к краевому дефекту, медиана (25-квартиль; 75-квартиль)

Срок обследо- вания	Серия	общая ЛДГ (цитоплазма- тическая фракция) МЕ/1 г ткани	общая НАД- МДГ (цито- плазма- тическая фракция) МЕ/1 г ткани	общая НАД- МДГ (мито- хондриальная фракция) МЕ/1 г ткани	СДГ МЕ/1 г белка
Интактные		44,5 (35,1; 91,0) n=7	20,8 (14,7; 32,7) n=7	0,68 (0,46; 1,45) n=8	7,77 (5,16; 12,22) n=4
После операции, недели					
4	ПТi ₄₀ МК	38,4 (24,9; 92,5) n=8	20,5 (9,9; 30,2) n=4	0,14 * (0,10; 0,15) n=5	9,37 (8,46; 14,31) n=4
	ПТi ₄₀ (а-С) МК	16,1 (12,5; 37,1) n=8	12,8 (8,1; 31,1) n=10	0,68 (0,37; 6,09) n=11	7,4 (5,28; 13,57) n=11
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25}) МК	42,1 (23,0; 49,1) n=6	13,6 (10,3; 46,8) n=6	0,10 (0,05; 0,31) n=6	5,8 (3,74; 12,04) n=4
16	ПТi ₄₀ МК	18,0 * (9,5; 31,1) n=8	12,6 (9,9; 17,8) n=5	0,14 (0,11; 1,49) n=7	7,11 (3,48; 11,66) n=8
	ПТi ₄₀ (а-С)	22,7 (18,3; 35,3) n=8	12,0 (7,2; 25,6) n=6	0,34 (0,05; 0,8) n=8	13,53 (8,19; 18,93) n=6
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})	40,7 (18,9; 92,7) n=6	21,6 (14,7; 38,3) n=5	0,99 (0,80; 1,71) n=4	11,57 (7,75; 18,10) n=6
52	ПТi ₄₀	40,5 (26,4; 65,9) n=11	22,1 (15,1; 36,6) n=8	0,74 (0,10; 1,99) n=11	31,22 (12,53; 48,85) n=11
	ПТi ₄₀ (а-С)	29,9 (23,2; 34,6) n=11	23,2 (12,3; 25,9) n=11	0,66 (0,46; 1,55) n=11	20,36 (6,17; 37,32) n=10
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})	63,1 (38,5; 99,4) n=11	36,2 (13,1; 54,7) n=11	2,02 (0,72; 2,27) n=9	29,70 (14,62; 42,65) n=10

где * - значимое отличие по сравнению с интактными животными

Таблица Б.8 – Динамика активности ферментов в гомогенатах метадиафизов o.tibia, o. femur, прилежащих к внедренным в кость пористым титановым имплантатам.
Медиана (0,25-квартиль; 0,75-квартиль)

Срок обследо- вания	Серия	общая ЛДГ (цитоплазма- тическая фракция) МЕ/г ткани	общая НАД-МДГ (цитоплазматическая фракция) МЕ/г ткани	общая НАД- МДГ (мито- хондриальной фракции) МЕ/г ткани	СДГ МЕ/г белка
Интактные		44,5 (35,1; 91,0) n=7	20,8 (14,7; 32,7) n=7	0,68 (0,46; 1,45) n=8	7,77 (5,16; 12,22) n=4
После операции, недели					
4	ПТi ₄₀	29,2 (15,9; 46,6) n=6	10,3 (6,4; 12,1) n=8	0,14 * (0,10; 0,15) n=4	4,95 (3,91; 9,92) n=4
	ПТi ₄₀ (а-С)	24,7* (12,2; 35,14) n=11	16,2 (9,5; 32,7) n=11	0,81 (0,45; 1,77) n=11	14,93 (5,42; 20,36) n=11
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})	25,5 (24,5; 30,6) n=5	17,3 (9,6; 32,1) n=5	0,29 (0,18; 0,51) n=5	6,73 (3,81; 10,66) n=5
16	ПТi ₄₀	26,6 (18,7; 32,4) n=8	13,0 (8,0; 27,6) n=8	0,08 * (0,03; 0,40) n=8	12,5 (6,79; 17,85) n=6
	ПТi ₄₀ (а-С)	45,9 (26,1; 57,8) n=10	22,9 (6,4; 40,3) n=9	0,34 (0,23; 1,73) n=10	11,07 (5,11; 21,35) n=6
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})	41,3 (23,4; 48,2) n=6	9,3 (2,6; 32,1) n=6	1,29 (0,90; 1,68) n=4	10,86 (6,33; 11,88) n=6
52	ПТi ₄₀	31,3 (15,1; 96,5) n=11	32,0 (15,9; 49,0) n=11	0,89 (0,78; 3,98) n=11	33,9 (28,27; 96,9) n=7
	ПТi ₄₀ (а-С)	42,5 (11,7; 82,5) n=11	23,0 (9,5; 60,4) n=11	0,35 (0,31; 1,47) n=11	13,53 (6,78; 24,43) n=10
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})	32,1 (13,1; 54,7) n=11	23,5 (13,1; 54,7) n=11	0,60 (0,17; 3,40) n=11	19,60 (8,48; 30,84) n=11

где * - значимое отличие по сравнению с интактными животными

Таблица Б.9 – Динамика активности ферментов в гомогенатах m. tibialis anterior кроликов после формирования краевых дефектов_метадиафизов большеберцовых и бедренных костей. Медиана (25-квартиль; 75-квартиль)

Срок обсле- - дован ия	Серия	общая ЛДГ (цито- плазма- тическая фракция) МЕ/1 г ткани	общая НАД- МДГ (цито- плазма- тическая фракция) МЕ/1 г ткани	общая НАД-МДГ (мито- хондриаль ная фракция) МЕ/1 г ткани	СДГ МЕ/1 г ткани	КФК МЕ/1 г ткани
Интактные n=4		872,6 (623,6; 971,8)	235,6 (156,6; 331,5)	11,5 (8,1; 18,0)	8,82 (6,3; 13,8)	116,8 (11,7; 165,4)
После операции, недели						
4-я	ПТi ₄₀	567,3 (547,8; 1132,0) n=5	130,2 (70,4; 166,2) n=4	33,3 (25,5; 58,7) n=4	6,8 (3,2; 8,1) n=5	17,0 (10,1; 136,5) n=4
	ПТi ₄₀ (а-С)	756,4 (568,8; 846,0) n=10	69,7 (51,5; 170,1) n=5	17,8 (10,7; 29,8) n=4	11,6 (4,5; 15,8) n=9	33,8 (25,4; 135,9) n=9
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})	483,7 (341,8; 887,2) n=4	139,4 (55,5; 164,9) n=4	26,1 (14,3; 77,44) n=4	4,0 (2,4; 10,4) n=4	23,4 (14,2; 88,1) n=4
16-я	ПТi ₄₀	487,5 (376,0; 855,1) n=4	467,2 (247,4; 706,9) n=4	22,8 (17,3; 45,0) n=4	9,3 (4,9; 11,3) n=4	95,5 (61,1; 110,1) n=4
	ПТi ₄₀ (а-С)	838,6 (721,8; 919,7) n=5	360,4 (166,8; 445,7) n=4	19,1 (12,5; 34,1) n=5	14,4 (7,5; 25,1) n=4	113,4 (31,3; 113,9) n=5
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})	799,3 (691,7; 970,3) n=4	298,1 (233,8; 336,4) n=4	38,4 (14,4; 96,5) n=4	19,8 (13,0; 23,6) n=4	72,0 (62,6; 92,3) n=4
52-я	ПТi ₄₀	939,4 (792,4; 965,3) n=6	363,2 (352,7; 452,3) n=5	17,0 (1,8; 30,4) n=6	19,4 (18,4; 30,1) n=6	139,5 (99,0; 205,2) n=6
	ПТi ₄₀ (а-С)	858,0 (640; 1028,7) n=5	402,7 (312,8; 473,9) n=4	18,5 (17,3; 21,7) n=5	14,9 (7,1; 24,1) n=5	95,9 (19,4; 134,6) n=5
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})	1093,6 (951,0; 1177,5) n=6	393,5 (198,2; 508,8) n=4	21,8 (4,7; 45,9) n=6	14,0 (7,6; 30,2) n=4	83,3 (49,5; 230,4) n=6

где * - значимое отличие по сравнению с интактными животными

Таблица Б.10 – Динамика активности ферментов в гомогенатах *m. tibialis anterior* кроликов после внедрения в краевой дефект метадиафиза большеберцовых и бедренных костей пористых титановых имплантатов. Медиана (25-квартиль; 75-квартиль)

Срок обследования	Серия	общая ЛДГ (цитоплазматическая фракция) ЕД/1 г ткани	общая НАД-МДГ (цитоплазматическая фракция) ЕД/1 г ткани	общая НАД-МДГ (митохондриальной фракции) ЕД/1 г ткани	СДГ ЕД/1 г ткани	КФК ЕД/1 г ткани
Интактные n=5		872,6 (623,6; 971,8)	235,6 (156,6; 331,5)	11,5 (8,1; 18,0)	8,82 (6,3; 13,8)	116,8 (11,7; 165,4)
После операции, недели						
4-я	PTi ₄₀	629,9 (416,4; 1116,1) n=5	150,4 (111,8; 174,6) n=4	16,7 (11,5; 35,8) n=4	9,04 (3,24; 11,8) n=5	18,2 * (12,7; 68,8) n=4
	PTi ₄₀ (a-C)	582,2 (464,4; 828,2) n=11	364,1 (2,8; 391,1) n=5	24,7 (20,5; 71,3) n=6	5,2 (2,22; 10,58) n=10	47,6 (26,7; 139,5) n=10
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})	547,0 (336,4; 871,9) n=4	164,9 (102,1; 325,8) n=4	13,6 (11,3; 36,4) n=4	2,3 (0,8; 5,8) n=4	34,7 (12,6; 84,1) n=4
16-я	PTi ₄₀	561,5 (371,8; 830,7) n=4	527,4 (158,0; 705,0) n=3	14,9 (7,7; 27,2) n=4	11,4 (3,5; 23,6) n=4	92,0 (45,4; 156,6) n=4
	PTi ₄₀ (a-C)	726,7 (634,2; 916,4) n=5	298,2 (188,0; 412,3) n=4	19,5 (7,4; 44,8) n=5	28,5 (17,0; 33,9) n=5	54,5 (25,6; 140,6) n=4
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})	751,0 (674,7; 852,2) n=4	336,9 (217,5; 411,3) n=4	62,3 (9,1; 210,4) n=4	9,92 (2,8; 24,8) n=4	127,6 (96,3; 409,4) n=4
52-я неделя	PTi ₄₀	960,5 (886,5; 1072,9) n=6	328,3 (294,6; 367,4) n=6	11,8 (1,3; 12,5) n=6	13,5 (5,7; 15,8) n=6	101,5 (71,6; 182,7) n=6
	PTi ₄₀ (a-C)	840,4 (777,6; 1133,6) n=5	389,3 (264,4; 401,0) n=5	25,3 (20,1; 37,9) n=5	18,0 (4,9; 36,0) n=5	135,9 (124,2; 189,5) n=5
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})	969,0 (929,3; 1018,4) n=6	360,7 (204,5; 436,9) n=6	15,6 (2,0; 47,5) n=6	31,1 (24,7; 32,8) n=6	106,7 (27,5; 225,5) n=6

где * - значимое отличие по сравнению с интактными животными

Таблица Б.11 – Площадь подколенных лимфатических узлов кроликов при формировании краевых дефектов большеберцовых и бедренных костей

Срок обследования	Серия	Площадь срединного среза лимфатического узла в конечности с незаполненным краевым дефектом, мм ² (медиана, 25-, 75- квартили)	Площадь срединного среза лимфатического узла в конечности с внедренными в дефект имплантатами, мм ² (медиана, 25-, 75- квартили)
До операции	14,5 (9,3; 24,5), n=6		
После операции			
4-я неделя	ПТi ₄₀	32,9 (25,6; 38,1), n=4	35,6 (29,1; 52,3), n=4
	ПТi ₄₀ (a-C)	24,9 (24,4; 27,1), n=5	43,9 (24,4; 44,22), n=5
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})	32,0 (27,5; 32,6), n=5	25,3 (22,4; 27,9), n=4
52-я неделя	ПТi ₄₀	11,5 (8,0; 22,1), n=5	23,1 (13,9; 24,1), n=4
	ПТi ₄₀ (a-C)	17,0 (11,9; 23,2), n=4	18,9 (15,6; 23,3), n=4
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})	33,0 (14,9; 40,8), n=4	24,3 (16,1; 27,3), n=4

где * - значимое отличие по сравнению с интактными животными

Таблица Б.12 – Микроанатомическая организация подколенных лимфатических узлов кроликов при формировании краевых дефектов метадиафиза большеберцовой и бедренной костей

Срок обследования	Серия	Капсула, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Корковое плато, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Паракортикальная зона, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Мозговое вещество, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Фолликулы со светлыми центрами, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Фолликулы без центров размножения, % (медиана, 25-, 75-квартили)
До операции n=4		3,22 (2,47; 3,81)	22,68 (20,76; 26,13)	20,80 (17,96; 25,93)	37,65 (33,69; 40,48)	5,54 (1,74; 9,61)	7,85 (7,66; 9,77)
После операции							
4-я неделя	ПТi ₄₀ n=5	7,82 * (3,83; 9,44)	38,66 (32,69; 46,28)	7,87 (4,33; 31,77)	34,10 (17,16; 37,82)	3,93 (3,26; 12,22)	3,35 (2,19; 5,51)
	ПТi ₄₀ (а-С) n=5	4,38 (3,42; 5,59)	20,32 (20,30; 21,91)	25,89 (25,71; 42,89)	33,50 (23,93; 35,85)	5,64 (4,05; 6,42)	3,70 (3,42; 4,78)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25}) n=5	7,48 (6,30; 7,77)	21,71 (18,49; 28,06)	28,24 (28,04; 28,62)	29,96 (23,39; 30,06)	5,69 (5,52; 7,52)	4,36 (3,54; 5,02)
52-я неделя	ПТi ₄₀ n=4	3,95 (3,49; 5,38)	20,83 (15,88; 23,00)	38,80 (29,12; 48,91)	35,12 (25,80; 39,51)	2,09 (0; 8,5)	4,95 (2,89; 6,04)
	ПТi ₄₀ (а-С) n=4	4,72 (3,7; 6,45)	13,42 (6,66; 21,02)	30,42 (28,00; 38,63)	38,97 (28,49; 50,32)	3,88 (2,09; 5,81)	4,92 (3,17; 6,29)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25}) n=4	4,27 (2,45; 7,39)	17,62 (12,07; 23,53)	26,93 (26,49; 30,36)	38,57 (31,10; 43,63)	7,20 (5,46; 8,30)	3,58 (2,82; 6,40)

где * - значимое отличие по сравнению с интактными животными

Таблица Б.13 – Динамика изменения плотности клеточных элементов в подколенных лимфатических узлах у кроликов после моделирования краевого дефекта (в контралатеральной конечности внедрены пористые титановые имплантаты)

Срок после операции	Характеристика внедренного имплантата	Корковое плато (медиана, 25-, 75- квартили)	Герминативная зона (медиана, 25-, 75-квартили)	Паракортикальная зона (медиана, 25-,75-квартили)	Мозговое вещество (медиана, 25-,75- квартили)
До операции n=6		460,5 (457,0; 481,0)	393,5 (341,0; 418,0)	424,5 (421,0; 462,0)	377,5 (308,0; 468,0)
4 недели	PTi ₄₀ n= 5	520,0 (508,0; 561,0)	367,0 (362,0; 390,0)	461,0 (418,0; 515,0)	467,0 (444,0; 501,0)
	PTi ₄₀ (a-C) n=10	472,5 (459,0; 489,0)	386,5 (368,0; 399,0)	450,0 (428,0; 476,0)	449,0 (429,0; 461,0)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) n=4	494,0 (477,5; 511,5)	373,0 (357,0; 385,0)	469,5 (428,5; 487,5)	470,0 (462,5; 476,5)
16 недель	PTi ₄₀ n=4	512,0 (468,0; 528,0)	395,0 (338,0; 418,0)	491,0 (422,0; 507,0)	433,0 (409,0; 501,0)
	PTi ₄₀ (a-C) n=4	502,0 (462,5; 517,0)	383,0 (366,0; 398,0)	438,0 (409,5; 457,0)	432,0 (417,0; 439,0)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) n=4	490,0 (408,0; 519,0)	396,0 (361,0; 412,0)	457,0 (395,0; 471,0)	432,0 (347,0; 475,0)
52 недели	PTi ₄₀ n=6	506,0 (495,0; 521,0)	411,0 (406,0; 416,0)	480,0 (457,0; 501,0)	425,5 (400,0; 468,0)
	PTi ₄₀ (a-C) n=5	489,0 (406,0; 646,0)	349,0 (323,0; 368,0)	324,0 (312,0; 407,0)	311,0 (299,0; 313,0)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25}) n=4	501,0 (486,0; 520,0)	418,0 (409,0; 439,0)	477,5 (464,0; 489,5)	424,0 (404,0; 457,5)

где * - значимое отличие по сравнению с интактными животными

Таблица Б.14 – Клеточный состав лимфатических узлов кроликов после моделирования краевого дефекта метадиафиза большеберцовых и бедренных костей

КОРКОВОЕ ПЛАТО							
Срок обследо- вания, недели после операции	Серия	Лимфобласты, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Пролимфоциты, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Лимфоциты, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Нейтрофилы, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Эозинофилы, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Макрофаги, % (медиана, 25-, 75- квартили)
1	2	3	4	5	6	7	8
Интактные животные n=6		1,1 (0,8; 1,4)	1,8 (1,4; 2,0)	96,2 (95,6; 96,4)	0 (0; 0)	0,1 (0; 0,2)	1,0 (0,8; 1,2)
После операции							
4	ПТi ₄₀ МК n=5	2,4 (1,6; 2,4)	2,8 (2,2; 3,0)	92,2 * (92,0; 94,4)	0 (0; 0)	0,4 * (0,4; 0,6)	1,8 (1,4; 1,8)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК N=10	2,2 * (2,0; 2,6)	3,1 (2,4; 3,4)	92,1 * (90,8; 93,2)	0,1 (0; 0,2)	0,2 (0,2; 1,2)	1,8 * (1,8; 2,0)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	2,0 * (1,8; 2,3)	2,6 (2,3; 2,9)	92,5 * (92,0; 93,1)	0 (0; 0,1)	0,7 * (0,5; 0,9)	2,0 * (1,8; 2,3)
16	ПТi ₄₀ МК n=4	1,0 (0; 1,6)	2,4 (1,2; 2,8)	93,2 (93,0; 96,6)	0 (0; 0,2)	0,4 (0; 0,6)	1,8 * (1,5; 2,0)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	2,4 * (2,3; 2,5)	3,1 * (3,0; 3,4)	91,9 * (91,5; 92,5)	0,2 (0,1; 0,2)	0,3 (0,1; 0,6)	1,9 * (1,8; 2,0)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	2,0 * (1,8; 2,2)	2,6 * (2,6; 2,8)	93,4 * (93,0; 93,6)	0 (0; 0)	0,2 (0,2; 0,2)	1,8 * (1,4; 2,0)
52	ПТi ₄₀ МК n=6	1,7 (1,6; 1,8)	2,1 (2,0; 2,2)	94,1 (93,6; 94,6)	0 (0; 0)	0,2 (0; 1,0)	1,8 * (1,4; 2,0)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=5	1,0 (1,0; 1,8)	2,2 (1,8; 2,4)	94,4 * (94,0; 96,0)	0 (0; 0)	0,2 (0; 0,2)	1,6 (1,4; 1,6)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	1,6 (1,2; 1,9)	1,8 (1,6; 2,1)	94,9 (94,2; 95,2)	0 (0; 0,1)	0,4 (0; 0,8)	1,3 (1,0; 1,9)

Продолжение таблицы Б.14

ГЕРМИНАТИВНЫЕ ЦЕНТРЫ				
Срок обследования, недели после операции	Серия	Центробласты, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Центроциты, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Лимфоциты, % (медиана, 25-, 75- квантили)
1	2	9	10	11
Интактные животные n=6		30,0 (28,8; 30,2)	34,5 (32,2; 36,8)	37,1 (35,0; 37,4)
4	ПТi ₄₀ МК n=5	32,2 (30,2; 32,8)	33,2 (31,8; 36,6)	34,0 (31,2; 36,6)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК N=10	30,2 (28,8; 32,0)	33,0 (30,8; 35,0)	36,4 (34,0; 39,2)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	30,2 (28,7; 30,5)	33,1 (30,5; 34,9)	36,4 (34,9; 40,5)
16	ПТi ₄₀ МК n=4	26,4 (24,8; 28,4)	30,0 * (26,0; 31,0)	43,6 * (40,6; 49,2)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	28,6 (26,7; 31,2)	35,3 (30,6; 38,5)	35,4 (33,0; 40,0)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	34,4 (26,6; 34,8)	38,0 (30,2; 39,6)	27,6 (25,6; 43,2)
52	ПТi ₄₀ МК n=6	28,4 (26,2; 31,2)	30,4 (27,4; 33,0)	41,2 (35,8; 46,4)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=5	30,0 (26,0; 38,0)	30,2 (28,0; 36,8)	39,8 (25,2; 46,0)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	29,2 (27,5; 30,5)	33,4 (31,5; 34,6)	37,4 (35,5; 40,4)

Продолжение таблицы Б.14

ПАРОКОРТИКАЛЬНАЯ ЗОНА								
Срок обследо- вания, недели после операции	Серия	Лимфобласты, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Пролимфоциты, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Лимфоциты, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Плазматические клетки, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Нейтрофилы, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Эозинофилы, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Макрофаги, % (медиана, 25-, 75- квантили)
1	2	12	13	14	15	16	17	18
Интактные животные n=6		0,7 (0,4; 1,0)	1,5 (1,0; 1,8)	95,9 (94,8; 96,8)	0,1 (0; 0,2)	0 (0; 0)	0,2 (0; 0,2)	1,5 (1,4; 1,8)
4	ПТi ₄₀ МК n=5	1,6 (1,6; 1,8)	2,0 (2,0; 2,4)	93,8 (93,6; 94,6)	0 (0; 0,2)	0 (0; 0)	0,6 (0; 0,8)	1,8 (1,8; 2,0)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК N=10	1,7 * (1,6; 2,0)	2,3 (1,8; 2,6)	92,9 * (92,0; 94,6)	0,2 (0,2; 0,4)	0 (0; 0,2)	0,5 (0; 1,2)	1,7 (1,4; 2,0)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	1,8 (1,4; 1,8)	2,3 (1,8; 2,5)	93,3 * (92,7; 93,8)	0,2 (0,1; 0,3)	0,2 (0,1; 0,4)	0,7 * (0,4; 1,0)	1,8 * (1,8; 1,9)
16	ПТi ₄₀ МК n=4	1,0 (1,0; 2,0)	1,8 (1,8; 2,2)	94,6 (94,0; 95,2)	0 (0; 0,2)	0 (0; 0)	0,4 (0,4; 0,6)	1,6 (1,4; 1,8)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	1,2 (1,0; 1,8)	1,9 (1,8; 2,2)	93,7 * (92,7; 94,3)	0,4 (0,1; 0,7)	0 (0; 0,1)	0,9 (0,2; 1,4)	1,9 (1,7; 2,3)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	2,2 (1,2; 2,4)	3,0 (1,8; 3,0)	93,0 (92,4; 94,6)	0 (0; 0,2)	0,2 (0,2; 0,2)	0 (0; 0,2)	1,8 (1,2; 2,0)
52	ПТi ₄₀ МК n=6	1,8 * (1,8; 1,8)	2,3 (2,0; 2,4)	93,7 * (93,0; 94,6)	0 (0; 0)	0 (0; 0,2)	0,3 (0,2; 1,2)	1,5 (1,4; 2,0)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=5	2,0 * (1,8; 2,0)	1,8 (1,8; 2,4)	94,2 (93,4; 94,2)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,4 (0,2; 0,4)	1,8 (1,8; 1,8)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	1,5 (1,1; 1,7)	2,3 (2,1; 2,4)	93,0 * (92,6; 93,6)	0,4 ** (0,3; 0,6)	0,1 * (0; 0,4)	1,0 (0,2; 1,8)	1,5 (1,4; 1,8)

Продолжение таблицы Б.14

МОЗГОВОЕ ВЕЩЕСТВО								
Срок обследо- вания, недели после операции	Серия	Лимфобласт ы, иммунобласт ы% (медиана, 25-, 75- квантили)	Пролимфоц иты, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Лимфоциты, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Плазматиче ские клетки, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Нейтрофил ы, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Эозинофил ы, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Макрофаги, % (медиана, 25-, 75- квнртили)
1	2	19	20	21	22	23	24	25
Интактные животные n=6		0,9 (0,8; 1,2)	1,2 (1,0; 1,6)	94,3 (93,8; 95,2)	0,5 (0,2; 1,4)	0 (0; 0,2)	0,2 (0,2; 0,2)	1,8 (1,4; 2,2)
4	ПТi ₄₀ МК n=5	2,2 * (2,0; 2,2)	2,4 (2,2; 2,8)	90,8 * (89,8; 91,4)	0,8 (0,6; 0,8)	0 (0; 0,2)	1,4 (1,0; 1,6)	2,4 (1,8; 2,6)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК N=10	1,8 * (1,8; 2,0)	2,1 (1,8; 2,4)	92,2 * (91,6; 92,2)	0,7 (0,4; 1,0)	0 (0; 0)	0,9 (0,4; 1,2)	2,0 (2,0; 2,2)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	1,7 * (1,5; 1,9)	2,4 * (2,0; 2,8)	92,4 (92,0; 93,3)	0,3 (0,2; 0,6)	0,2 (0,2; 0,2)	0,8 (0,5; 1,0)	1,8 (1,8; 2,0)
16	ПТi ₄₀ МК n=4	1,6 (1,2; 1,8)	2,0 * (2,0; 2,2)	93,0 (92,6; 94,4)	0,2 (0,2; 0,6)	0,2 (0; 0,2)	0,4 (0,2; 1,0)	2,0 (2,0; 2,2)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	1,5 (1,2; 1,7)	2,3 (1,7; 2,8)	92,4 * (91,9; 92,7)	0,9 (0,5; 1,0)	0,2 (0,1; 0,2)	0,5 (0,1; 1,2)	2,4 (2,2; 2,6)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	2,0 * (1,6; 2,4)	2,6 * (2,2; 2,8)	92,0 * (91,4; 93,0)	0,6 (0,4; 1,0)	0 (0; 0)	0,4 (0,2; 0,8)	2,4 (1,4; 2,8)
52	ПТi ₄₀ МК n=6	1,5 * (1,2; 1,8)	2,0 * (2,0; 2,4)	94,2 (93,2; 94,8)	0,5 (0,4; 0,6)	0,1 (0; 0,2)	0,2 (0; 0,2)	1,8 (1,4; 2,2)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=5	2,0 * (2,0; 2,2)	2,4 (2,0; 2,4)	92,2 (92,0; 92,6)	0,6 (0,6; 1,0)	0 (0; 0)	0,2 (0,2; 0,4)	1,8 (1,8; 2,0)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	1,0 (0,8; 1,3)	1,6 (1,4; 1,9)	92,6 (91,7; 2,3)	1,9 ** (1,6; 2,3)	0,1 (0; 0,2)	0,5 (0,2; 1,3)	2,0 (1,8; 2,3)

* - значимое отличие от интактных животных, ** - значимое отличие от группы ПТi₄₀МК,

Таблица Б.15 – Микроанатомическая организация подколенных лимфатических узлов кроликов при внедрении в большеберцовые и бедренные кости пористых титановых имплантатов

Срок обследования, недели после операции	Серия	Капсула, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Корковое плато, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Паракортикальная зона, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Мозговое вещество, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Фолликулы с центрами размножения, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Фолликулы без центров размножения, % (медиана, 25-, 75-квартили)
До операции n=4		3,22 (2,47; 3,81)	22,68 (20,76; 26,13)	20,80 (17,96; 25,93)	37,65 (33,69; 40,48)	5,54 (1,74; 9,61)	7,85 (7,66; 9,77)
После операции							
4	PTi ₄₀ МК n=4	3,67 (3,30; 5,39)	27,15 (22,59; 50,54)	19,70 (17,28; 23,16)	29,21 (11,76; 30,67)	8,87 (5,53; 23,95)	7,07 (2,21; 7,95)
	PTi ₄₀ (a-C)МК n=4	3,37 (2,81; 3,53)	21,90 (19,92; 25,36)	30,66 (29,11; 38,72)	30,59 (24,95; 38,36)	4,56 (2,96; 12,69)	3,81 (2,72; 4,36)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	3,08 (2,23; 3,50)	21,43 (16,80; 27,08)	31,23 (30,03; 31,82)	35,63 (27,42; 49,70)	2,32 (1,41; 4,78)	5,29 (2,50; 6,50)
52	PTi ₄₀ МК n=5	3,61 (3,50; 4,32)	22,57 (17,69; 34,74)	37,63 (34,32; 41,45)	26,36 (17,16; 27,61)	3,26 (2,79; 6,19)	2,93 (1,30; 3,35)
	PTi ₄₀ (a-C)МК n=4	3,97 (3,14; 5,52)	25,69 (19,44; 31,54)	28,24 (24,29; 30,25)	36,20 (22,78; 42,32)	3,97 (2,14; 5,67)	4,34 (2,87; 10,05)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	4,26 (2,45; 7,39)	17,62 (12,07; 23,53)	26,93 (26,49; 30,36)	38,57 (31,10; 43,63)	7,2 (5,46; 8,30)	3,58 (2,82; 6,40)

где * - значимое отличие по сравнению с интактными животными

Таблица Б.16 – Динамика изменения плотности клеточных элементов в подколенных лимфатических узлах у кроликов после имплантации пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами

Срок обследования, недели после операции	Характеристика внедренного имплантата	Корковое плато (медиана, 25-, 75-квартили)	Герминативная зона (медиана, 25-,75-квартили)	Паракортикальная зона (медиана, 25-,75-квартили)	Мозговое вещество (медиана, 25-,75- квартили)
До операции n=6		460,5 (457,0; 481,0)	393,5 (341,0; 418,0)	424,5 (421,0; 462,0)	377,5 (308,0; 468,0)
4	PTi ₄₀ МК n=4	471,0 (414,0; 563,5)	393,5 (365,0; 413,0)	453,0 (419,0; 514,5)	444,0 (431,5; 456,0)
	PTi ₄₀ (а-С)МК n=8	494,0 (415,0; 511,5)	389,0 (364,0; 413,0)	456,5 (435,5; 464,5)	436,0 (425,5; 472,0)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	512,5 * (500,0; 523,5)	394,5 (380,0; 449,5)	482,5 * (474,0; 499,0)	481,0 (460,0; 518,5)
16	PTi ₄₀ МК n=4	498,0 (496,0; 518,0)	380,0 (347,0; 392,0)	427,0 (410,0; 493,0)	413,0 (412,0; 418,0)
	PTi ₄₀ (а-С)МК n=4	485,3 (412,0; 540,0)	407,7 (333,0; 490,0)	457,0 (424,0; 485,0)	424,3 (397,0; 464,0)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	488,0 (449,0; 489,0)	400,0 (342,0; 401,0)	461,0 (448,0; 468,0)	461,0 (459,0; 477,0)
52	PTi ₄₀ МК n=7	496,0 * (487,0; 518,0)	391,0 (380,0; 420,0)	468,0 (453,0; 474,0)	418,0 (403,0; 444,0)
	PTi ₄₀ (а-С)МК n=5	476,0 (444,0; 512,0)	387,0 (350,0; 401,0)	415,0 (409,0; 418,0)	355,0 (301,0; 360,0)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	497,0 * (491,0; 520,5)	406,5 (402,0; 445,0)	474,5 (468,5; 489,5)	417,5 (403,5; 465,0)

где * - значимое отличие по сравнению с интактными животными

Таблица Б.17 – Клеточный состав лимфатических узлов кроликов после моделирования краевого дефекта и внедрения пористых титановых имплантатов

Срок обсле-дова- ния, недели после операции	Серия	КОРКОВОЕ ПЛАТО					
		Лимфобласты, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Пролимфоциты, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Лимфоциты, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Нейтрофилы, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Эозинофилы, % (медиана, 25-, 75- квантили)	Макрофаги, % (медиана, 25-, 75- квантили)
Интактные животные n=6		1,1 (0,8; 1,4)	1,8 (1,4; 2,0)	96,2 (95,6; 96,4)	0 (0; 0)	0,1 (0; 0,2)	1,0 (0,8; 1,2)
4	ПТi ₄₀ МК n=4	1,7 (1,4; 2,2)	2,2 (2,1; 2,5)	93,6 * (93,0; 94,3)	0,1 (0; 0,3)	0,3 (0,2; 0,4)	1,7 * (1,5; 2,0)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=8	2,0 * (1,9; 2,2)	2,8 (2,1; 3,0)	92,4 * (91,7; 92,8)	0 (0; 0,2)	0,6 * (0,3; 1,1)	1,9 * (1,7; 2,3)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	2,1 (1,5; 2,6)	3,0 (2,4; 3,0)	92,1 (91,9; 94,2)	0 (0; 0,1)	0,7 (0,3; 0,8)	1,5 (1,1; 2,1)
16	ПТi ₄₀ МК n=4	1,2 (1,0; 1,4)	1,8 (1,8; 2,0)	95,0 (94,2; 95,6)	0 (0; 0,2)	0,2 (0,2; 0,8)	1,8 (1,0; 1,8)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	2,0 * (1,8; 2,2)	2,8 * (2,6; 3,0)	93,1 * (92,6; 93,6)	0,1 (0; 0,2)	0,32 (0; 0,8)	1,7 * (1,4; 2,0)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	2,0 * (1,8; 2,2)	2,6 (2,4; 2,8)	93,8 * (91,6; 94,0)	0 (0; 0)	0 (0; 1,0)	1,8 (1,6; 2,4)
52	ПТi ₄₀ МК n=7	1,6 (1,0; 1,8)	2,2 (1,8; 2,4)	94,6 (93,4; 96,0)	0 (0; 0,2)	0 ,2 (0; 0,6)	1,2 (1,0; 1,8)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=5	1,0 (1,0; 1,2)	1,6 (1,2; 1,8)	96,0 (95,2; 96,0)	0 (0; 0)	0 (0; 0,8)	1,4 (1,0; 1,8)
	ПТi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	1,5 (1,1; 1,9)	2,1 (1,6; 2,3)	94,4 (94,2; 95,6)	0 (0; 0)	0,3 (0,1; 0,5)	1,2 (1,2; 1,5)

Продолжение таблицы Б.17

ГЕРМИНАТИВНЫЕ ЦЕНТРЫ				
Срок обследования, недели после операции	Серия	Центробласты, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Центроциты, % (медиана, 25-, 75- квартили)	Лимфоциты, % (медиана, 25-, 75- квартили)
Интактные животные n=6		30,0 (28,8; 30,2)	34,5 (32,2; 36,8)	37,1 (35,0; 37,4)
4	ПТi ₄₀ МК n=4	26,5 (25,2; 27,4)	29,5 * (28,6; 31,1)	44,2 * (41,5; 46,2)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=8	29,9 (28,4; 30,2)	31,4 (29,7; 33,7)	38,7 (36,1; 41,9)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	31,3 (27,6; 33,7)	32,9 (29,5; 37,9)	35,8 (28,4; 42,9)
16	ПТi ₄₀ МК n=4	26,2 (26,2; 32,2)	30,2 (28,0; 38,0)	43,6 (29,8; 45,4)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	28,7 (26,6; 31,4)	30,3 (28,2; 34,4)	41,0 (37,6; 45,2)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	28,8 (26,0; 30,6)	29,8 * (28,8; 30,2)	41,0 * (39,6; 45,2)
52	ПТi ₄₀ МК n=7	30,0 (24,2; 30,2)	32,4 (28,8; 32,8)	37,4 (37,2; 46,8)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=5	31,4 (30,6; 40,0)	32,8 (32,6; 42,0)	36,0 (18,0; 36,6)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	29,5 (27,1; 31,3)	34,0 (31,4; 35,0)	35,5 (33,7; 41,5)

Продолжение таблицы Б.17

ПАРАКОРТИКАЛЬНАЯ ЗОНА								
Срок обследования, недели после операции	Серия	Лимфобласты, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Пролимфоциты, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Лимфоциты, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Плазмоциты, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Нейтрофилы, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Эозинофилы, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Макрофаги, % (медиана, 25-, 75-квартили)
Интактные животные n=6		0,7 (0,4; 1,0)	1,5 (1,0; 1,8)	95,9 (94,8; 96,8)	0,1 (0; 0,2)	0 (0; 0)	0,2 (0; 0,2)	1,5 (1,4; 1,8)
4	ПТi ₄₀ МК n=4	1,5 (1,2; 1,6)	2,0 (2,0; 2,0)	93,8 * (93,3; 94,3)	0,1 (0; 0,3)	0 (0; 0,1)	0,6 (0,3; 0,8)	2,2 (1,7; 2,3)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=8	2,0 * (1,7; 2,0)	2,5 * (2,1; 2,9)	92,6 * (91,0; 93,6)	0,2 (0; 0,8)	0 (0; 0,3)	0,8 * (0,6; 1,4)	1,8 (1,4; 1,8)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	1,6 (1,1; 2,1)	2,3 (1,9; 2,7)	93,3 * (92,2; 94,4)	0,2 (0,1; 0,2)	0,2 (0; 0,6)	0,7 (0,3; 0,8)	1,8 (1,6; 2,0)
16	ПТi ₄₀ МК n=4	1,6 (1,2; 1,6)	2,0 (1,4; 2,0)	94,6 (93,2; 94,8)	0,2 (0,2; 0,2)	0 (0; 0)	0,2 (0,2; 1,2)	1,8 (1,4; 2,2)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=4	1,4 (1,0; 2,0)	1,8 * (1,4; 2,2)	93,7 * (92,6; 94,8)	0,3 (0; 0,6)	0,1 (0; 0,2)	0,7 (0,2; 1,6)	2,0 (1,8; 2,2)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	1,8 (1,0; 2,0)	2,8 (2,0; 2,8)	93,6 * (93,2; 93,8)	0,2 (0; 0,2)	0 (0; 0,4)	0,2 (0; 0,8)	1,8 (1,6; 1,8)
52	ПТi ₄₀ МК n=7	1,4 * (1,2; 2,0)	2,0 (1,8; 2,4)	94,8 (92,6; 95,4)	0 (0; 0,2)	0 (0; 0,2)	0,2 (0; 0,2)	1,8 (1,2; 1,8)
	ПТi ₄₀ (а-С)МК n=5	1,4* (1,4; 1,8)	1,8 (1,8; 2,0)	94,0* (93,8; 94,4)	0 (0; 0)	0 (0; 0)	0,4 (0,2; 0,6)	2,0* (2,0; 2,0)
	ПТi ₄₀ (СN _{0,25})МК n=4	1,4 (1,0; 1,9)	2,0 (1,8; 2,3)	92,6 * (91,6; 94,3)	0,5 (0,3; 0,7)	0,2 ** (0,1; 0,2)	1,1 (0,4; 1,8)	1,8 (1,4; 2,2)

Продолжение таблицы Б.17

МОЗГОВОЕ ВЕЩЕСТВО								
Срок обследования, недели после операции	Серия	Лимфобласты, иммунобласты, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Пролимфоциты, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Лимфоциты, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Плазматические клетки, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Нейтрофилы, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Эозинофилы, % (медиана, 25-, 75-квартили)	Макрофаги, % (медиана, 25-, 75-квартили)
Интактные животные n=6		0,9 (0,8; 1,2)	1,2 (1,0; 1,6)	94,3 (93,8; 95,2)	0,5 (0,2; 1,4)	0 (0; 0,2)	0,2 (0,2; 0,2)	1,8 (1,4; 2,2)
4	PTi ₄₀ МК n=4	1,9 * (1,7; 2,3)	2,4 * (2,2; 2,7)	91,6; * (90,9; 92,5)	0,6 (0,4; 0,9)	0,2 (0,1; 0,2)	0,6 * (0,4; 1,3)	2,1 (1,9; 2,3)
	PTi ₄₀ (а-С)МК n=8	1,8 * (1,7; 2,1)	2,1 * (2,0; 2,4)	92,1 * (91,9; 93,6)	0,6 (0,4; 0,8)	0 (0; 0)	0,9 (0,2; 1,2)	1,9 (1,6; 2,2)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	1,7 (1,3; 2,0)	2,1 (1,9; 2,4)	92,8 (92,2; 93,6)	0,4 (0,2; 0,7)	0 (0; 0)	0,9 (0,3; 1,6)	1,8 (1,8; 1,9)
16	PTi ₄₀ МК n=4	1,6 * (1,4; 2,4)	1,6 (1,2; 1,8)	93,6 (92,0; 94,4)	0,2 (0,2; 0,6)	0 (0; 0)	0,4 (0,4; 0,8)	1,8 (1,8; 2,8)
	PTi ₄₀ (а-С)МК n=4	1,6 * (0,8; 2,2)	2,3 * (1,8; 2,8)	91,8 * (90,8; 92,6)	1,0 (0,8; 1,4)	0 (0; 0,2)	0,7 (0; 2,0)	2,3 (1,6; 2,8)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	2,0 (1,0; 2,2)	2,6 * (1,8; 3,0)	92,2 * (92,0; 93,6)	0,8 (0,6; 0,8)	0 (0; 0)	0 (0; 1,8)	2,2 (2,0; 2,4)
52	PTi ₄₀ МК n=7	1,4 (1,0; 2,0)	1,8 * (1,6; 2,4)	94,0 (91,6; 95,0)	0,8 (0,2; 1,0)	0 (0; 0,2)	0,4 (0,2; 0,6)	1,8 (1,6; 2,8)
	PTi ₄₀ (а-С)МК n=5	1,6 * (1,4; 1,6)	1,6 (1,4; 2,0)	93,8 (93,0; 94,2)	1,0 (0,4; 1,0)	0 (0; 0,2)	0,2 (0,2; 0,6)	1,7 (1,4; 2,6)
	PTi ₄₀ (CN _{0,25})МК n=4	1,0 (0,9; 1,0)	1,8 (1,6; 1,9)	92,3 * (91,0; 93,2)	1,8 * ** (1,8; 2,2)	0,2 (0,1; 0,3)	0,3 (0,1; 0,9)	2,2 (1,9; 3,1)

где * - $p \leq 0,05$ по сравнению с интактными животными** - $p \leq 0,05$ по сравнению с PTi₄₀МК

