

На правах рукописи

**МАКАРОВА**  
**Эмилия Борисовна**

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ  
ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ  
ПОРИСТЫМИ ТИТАНОВЫМИ ИМПЛАНТАТАМИ  
С УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩИМИ НЕРЕЗОРБИРУЕМЫМИ  
НАНОПОКРЫТИЯМИ**

14.03.03 – патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Екатеринбург – 2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении «Уральском научно-исследовательском институте травматологии и ортопедии им. В.Д.Чаклина» Министерства здравоохранения Российской Федерации

**Научный консультант:**

доктор медицинских наук, профессор, академик РАН **Захаров Юрий Михайлович**

**Официальные оппоненты:**

**Брин Вадим Борисович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой нормальной физиологии ГБОУ ВПО «Северо-Осетинской государственной медицинской академии» Минздрава России

**Бутолин Евгений Германович** – доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой клинической биохимии и лабораторной диагностики ГБОУ ВПО «Ижевской государственной медицинской академии» Минздрава России

**Ерохин Александр Николаевич** – доктор медицинских наук, руководитель научной функциональной группы нейромодуляции научной клинко-экспериментальной лаборатории патологии осевого скелета и нейрохирургии ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Минздрава России

**Ведущее учреждение:** Федеральное агентство научных организаций Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно исследовательский институт фармакологии и регенеративной медицины имени Е.Д.Гольдберга»

Защита диссертации состоится «\_\_\_»\_\_\_\_\_2016 года в «\_\_\_» часов на заседании Совета по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Д 208.102.03, созданного на базе Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Уральский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Репина, д. 3.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке имени В.Н.Климова ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России по адресу: 620028, г. Екатеринбург, ул. Ключевская, д.17 и на сайте университета: [www.usma.ru](http://www.usma.ru), с авторефератом на сайте ВАК Министерства образования и науки РФ: [vak2.ed.gov.ru](http://vak2.ed.gov.ru)

Автореферат разослан «\_\_\_»\_\_\_\_\_2016 г.

Ученый секретарь Совета  
по защите докторских и кандидатских диссертаций,  
доктор медицинских наук, профессор

**Базарный  
Владимир Викторович**

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность исследования.** Проблемы замещения дефектов костных тканей для восполнения утраченного объема и поиск факторов, стимулирующих репаративные процессы далеки от решения и актуальны для реконструктивной хирургии и фундаментальных исследований в медицине [Р.В.Деев и др., 2008; Н.А.Корж и др. 2008; С.М.Баринов, 2010; И.А.Кириллова, 2011; Т.В.Павлова и др., 2013; T.S.Gross et al., 2004; K.A.Hing, 2004].

Количество операций по восстановлению костных дефектов, возникающих в результате травм, замедленной консолидации переломов, воспалительных процессов, удаления новообразований с использованием имплантатов и костных трансплантатов увеличивается во всем мире [И.А.Кириллова, 2011]. Это обусловлено как ростом уровня травматизма, тяжести травм, заболеваемости с поражением костно-мышечной системы и соединительной ткани, так и усложнением технологий, увеличением объема реконструктивно-восстановительных операций в травматологии и ортопедии [Статистический сборник Беларусь и Россия, 2009; Т.Н.Воронцова, С.С.Лучанинов, 2012; Российский статистический ежегодник, 2014; Ж.Л.Варакина, 2015].

Использование костных аутооттрансплантатов ограничивается дополнительной травмой, кровопотерей, возможностью развития осложнений с тяжелой степенью выраженности клинических проявлений в 8,6%, со средней и легкой степенью выраженности – в 20,6% [А.И.Швец, В.К.Ивченко, 2008]. Существующие трансплантаты и имплантаты не отвечают всем требованиям регенеративной хирургии и пока не способны заменить аутооттрансплантаты. Так, при использовании аллокости присутствует риск инфицирования реципиента, остеоиндуктивные свойства ее переменны, ограничены возможности получения, положительный результат регистрируют в 69%; резорбирующаяся керамика на основе  $\beta$ -трикальцийфосфата и гидроксиапатита обладает остеокондуктивными, но не остеоиндуктивными свойствами и т.д. [А.И.Швец, В.К.Ивченко, 2008].

По современным представлениям предпочтительным считается использование остеоиндукторов (костный морфогенетический белок-2, -7 и др.

др.), влияющих на собственные остеогенные клетки-предшественницы пациента, сочетая их эффект с резорбируемыми трехмерными синтетическими матрицами, также стимулирующими остеогенез за счет своих химических и структурных особенностей [K.A.Hing K.A, 2004]. Однако пока распространение в мире получили имплантаты из инертных нерезорбируемых материалов – имплантаты из металлов. Распространенность титана и его сплавов в качестве материалов для изготовления костных имплантатов, используемых в ортопедии, травматологии, челюстно-лицевой хирургии, стоматологии, определяется, прежде всего, его высокой биосовместимостью [B.A. Филиппенко, 2011; Y. Özcan M., C.Hämmerle, 2012; Y. Hou et al., 2013], способностью мезенхимальных стволовых клеток адгезировать, пролиферировать и дифференцироваться на поверхности титана [A.A.Докторов, и др., 2007; У.В.Вольперт и др., 2009]. Однако в последнее время *in vitro* доказаны прямые отрицательные эффекты ионов титана на жизнеспособность остеогенных клеток, экспрессию генов, ответственных за дифференцировку в остеогенном направлении [Y.Mine et al., 2010]. *In vivo* возможны как прямые, так и опосредованные через активацию макрофагов отрицательные эффекты металлов на остеогенез. Так, при контакте макрофагов с титановыми поверхностями происходит их активация (R.S. Flatebø et al., 2011), в результате продукция провоспалительных цитокинов (ИЛ-1 $\beta$ , ФНО) увеличивается, а они, в свою очередь, оказывают тормозящее влияние на внутриклеточную передачу механических сигналов в остеоцитах и инициируют апоптоз остеобластов [A.D.Bakker et al., 2009].

Для любых имплантатов желательно, чтобы их поверхность помимо osteoconductive свойств обладала способностью активировать процесс остеогенеза. Исследования свойств углеродных алмазоподобных пленок и нанотрубок *in vitro* показали, что они инициируют дифференцирование клеток костного мозга в остеогенном направлении [S.E.Rodil et al., 2006; R.Olivares, S.E.Rodil, 2007; F.M.P. Tonelli, 2012]. Однако, оценка эффективности применения алмазоподобных плёнок, нанесённых на титановые имплантаты, замещающих костные дефекты и влияния данных композитов на репаративные процессы в костной ране, не проводилась.

Применение пористых металлов, имеющих меньшую жесткость по сравнению с монолитными имплантатами, позволяет приблизиться к решению проблемы биомеханического несоответствия между имплантатом и костной тканью [G.Ryan et al., 2006]. Несмотря на прогресс, достигнутый в технологии изготовления пористых имплантатов и пористых покрытий имплантатов ортопедического профиля, остается много научных задач, требующих решения: определение оптимального объема порового пространства имплантата, размера его пор, увеличивающаяся коррозия при применении имплантата из пористого металла и реакция на неё тканей организма и др.

**Цель исследования** – экспериментально разработать и обосновать применение новых композитных материалов «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), насыщенными 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), насыщенными 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 в эксперименте *in vivo* выявлен стимулирующий эффект на остеогенез композита «пористый титан – алмазоподобная нерезорбируемая пленка – прилипающая фракция клеток аутологичного костного мозга». Раскрыты некоторые молекулярные механизмы регулирования репаративной регенерации при внедрении данных имплантатов в костные дефекты; изучены морфологические, морфометрические, гистохимические, биохимические закономерности репаративной регенерации; выявлено увеличение прочности «на растяжение» новообразованной костной ткани в интерфейсе «костное ложе – имплантат», исследована прочность на сжатие образующегося *in vivo* композита «имплантат – новообразованная в порах костная ткань». Обосновано применение «пористого титана с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой» для замещения дефектов костной ткани [Патент 90678 РФ].

Показано оптимизирующее влияние прилипающей фракции клеток аутологичного костного мозга на остеогенез при трансплантации в дефект

костной ткани имплантата из «пористого титана с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой», предварительно насыщенного прилипающими клетками костного мозга.

Выявлены особенности течения регенераторного процесса, доказано его ускорение при применении композита «пористый титан – алмазоподобная пленка – рекомбинантный человеческий костный морфогенетический белок-2 на деминерализованном костном матриксе и гиалуроновой кислоте» при замещении дефектов длинных трубчатых костей.

Обнаружено торможение остеогенеза и местное легкое раздражающее действие на ранних сроках наблюдения (4-16 недель после операции) при внедрении в дефект костной ткани композита «пористый титан – алмазоподобная пленка – наночастицы синтетического гидроксиапатита».

Проведена комплексная оценка реакций тканей организма на внедрение в дефекты кости имплантатов трех типов: 1) «пористый титан – алмазоподобная пленка – прилипающая фракция клеток аутологичного костного мозга», 2) «пористый титан – композитная пленка (углерод-азот) – прилипающая фракция клеток аутологичного костного мозга», 3) «пористый титан – прилипающая фракция клеток аутологичного костного мозга». Применение «пористого титана – алмазоподобной пленки – прилипающей фракции клеток аутологичного костного мозга» минимизирует реакцию тканей организма на имплантацию.

Определена оптимальная пористость для титановых матриц, изготовленных методом компактирования – не более 40%, обеспечивающая достаточную прочность имплантатов в областях, испытывающих значительные механические нагрузки (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 наличии дефектов (в зависимости от их размера, формы и локализации) 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 имплантатов, 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» в качестве стимуляторов остеогенеза – прилипающей фракции клеток аутологичного костного мозга, 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 максимальная пористость (не более 40%) для титановых имплантатов, изготовленных методом компактирования, обеспечивающая их достаточную механическую прочность при значительных нагрузках.

Разработан способ оценки в эксперименте прочности на разрыв костного регенерата в интерфейсе «костное ложе – имплантат» [Патент 2471248 РФ].

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

### **Реализация результатов работы**

Результаты исследования остеоинтеграции «пористого титана с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой» позволили предложить его в качестве нового имплантационного материала для изготовления имплантатов костной ткани, а так же применение алмазоподобной пленки для увеличения биосовместимости металлических имплантатов.

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 учебном процессе на курсах повышения квалификации врачей травматологов-ортопедов по дополнительной профессиональной программе «Травматология, ортопедия и экстремальная хирургия» в ФГБУ «Уральском научно-исследовательском институте травматологии и ортопедии 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, гистохимическое, 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 остеоинтеграции, 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, 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 8<sup>th</sup> 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 (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), 10<sup>th</sup> 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 научно-практической конференции «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 16 в изданиях, рекомендованных ВАК и рецензируемых зарубежных журналах, 2 монографии, получены 10 патентов 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 иллюстрирована 72 рисунками (в т.ч. микрофотографиями, электронными микрофотографиями), 40 таблицами. Библиографический указатель включает 200 отечественных и 369 зарубежных источников литературы.

### **Личное участие автора**

Автором сформулирована идея исследования, определены его цель и задачи, разработаны методологические подходы к решению задач. Автор лично проводил все манипуляции связанные с клеточными технологиями, участвовал в составе операционной бригады в операциях по внедрению костных имплантатов экспериментальным животным. Все представленные результаты лабораторных исследований получены лично автором, либо при его непосредственном участии. Автором выполнена статистическая обработка, анализ и обобщение полученных результатов исследования.

### **Содержание работы**

**Во введении** сформулированы цель, задачи исследования, положения, выносимые на защиту, научная и практическая значимость работы.

**В 1 главе** проведен аналитический обзор современной отечественной и зарубежной литературы. Представлены материалы, используемые для изготовления костных имплантатов. Особое внимание уделено данным о влиянии частиц износа и коррозии металлов на остеогенные клетки, местным реакциям, развивающимся при внедрении металлических костных имплантатов.

**Во 2 главе** представлены дизайн исследования, методы исследования и статистической обработки полученных результатов.

Для решения поставленных задач был использован экспериментальный метод. Эксперимент выполнен на 146 половозрелых кроликах породы Белый и Черный Великан стадного разведения (в возрасте 6-12 месяцев, исходного веса 3-4 кг), 9 овцах Романовской породы (6-9 месячных, имевших исходный вес 24-31 кг), 5 мышьях самцах чистой линии СВА/СаЛас (массой 18-20 г).

***Распределение животных по сериям и методы исследования:***

Цитотоксичность образцов *in vitro* оценивали по концентрации ЛДГ в супернатанте культуры клеток. Адгезию миелокариоцитов изучали на полированных дисках титана с пленками и без пленок. Для оценки колониеобразующей способности костномозговые клетки культивировали в жидкой или полувязкой полной культуральной среде в присутствии исследуемых образцов в лунке или непосредственно на поверхности образцов пористого титана (ПТ<sub>40</sub>), ПТ<sub>40</sub> с алмазоподобной нерезорбируемой пленкой (ПТ<sub>40</sub>(а-С)), ПТ<sub>40</sub> с композитной нерезорбируемой пленкой состава – углерод-азот (ПТ<sub>40</sub>(СN<sub>0,25</sub>)). Морфологию клеток изучали после покраски их азур-эозином II в световом микроскопе; организацию клеточного слоя, количество КОЕ в поверхностных порах имплантатов – методом СЭМ.

Для исследования *in vivo* пористые титановые имплантаты получили методом компактирования гранул губчатого титана ТГ-120М. Система пор содержала макроканалы сечением 100-500 мкм, распределенные случайным образом, и микроканалы 2-5 мкм. Пористость имплантатов ( $\theta$ ) составляла 30%, 40%, 50%; ~ 75% пор сообщались с поверхностью. Пористые титановые матрицы были покрыты а-С импульсно-дуговым распылением графитовой мишени в вакууме или СN<sub>0,25</sub> в атмосфере азота<sup>1</sup>.

Насыщение пористых имплантатов аутологичными миелокариоцитами и увеличение количества клеточного материала проводили по одному протоколу для всех типов имплантатов. Клетки костного мозга проникали с током жидкой культуральной среды в поры имплантата и адгезировали на его поверхности. Имплантат с прикрепившимися клетками переносили в новую лунку и

---

<sup>1</sup> Экспериментальные образцы титана и имплантатов были изготовлены в Ордена Трудового Красного Знамени институте физики металлов Уральского отделения РАН.

культивировали при 37°C абсолютной влажности 4% CO<sub>2</sub> 14 суток. Имплантаты внедряли в сформированные дефекты дистальных метафизов бедренных костей и проксимальных метафизов большеберцовых костей экспериментальных животных. Фиксацию имплантатов осуществляли прямой импакцией.

Кроликам внедряли цилиндрические имплантаты (диаметром 4,5 мм, длиной 5 мм),  $\theta$  – 40%. Овцам внедряли трапециевидные в сечении имплантаты (PTi(a-C)□МК). Распределение животных по сериям и количество внедренных имплантатов приведено в таблице 1.

Для проведения морфологического и морфометрического исследований новообразованной костной ткани титановую матрицу удаляли методом глубокого травления по Миргазизову [Р.Г. Хафизов, 2006], затем выполняли стандартную процедуру приготовления гистологических срезов костной ткани, окрашивали их гематоксилином и эозином и по Ван Гизону.

Гистохимическое исследование выполнено на дистальных костных субхондральных фрагментах бедренных костей. Подготовку препаратов осуществляли по методу L.K. Barthel и P.A. Raymond в модификации Ю.В.Маркитановой и М.А.Корч [Корч М.А. и др., 2012; Yu.V.Markitantova et al., 2003]. Активность щелочной фосфатазы (ЩФ) определяли, используя наборы для проведения гистоэнзиматических реакций (Bio Optica, Italia).

Для биохимического исследования фрагменты костной и мышечной тканей помещали в жидкий азот, гомогенаты получали в охлажденном механическом микроизмельчителе. Выделение цитоплазматической и митохондриальной фракций осуществляли дифференциальным центрифугированием при 0/+4°C на рефрижераторной высокоскоростной центрифуге Sorval Biofugen Sfatos. В гомогенатах костной ткани определяли активность общей и термолabileйной ЩФ (ЩФ<sub>общ</sub>, ЩФ<sub>терм</sub>), общей и тартратзависимой кислых фосфатаз (КФ<sub>общ</sub>, КФ<sub>тарт</sub>), общую активность лактатдегидрогеназы (ЛДГ), общую активность малатдегидрогеназы (МДГ), активность сукцинатдегидрогеназы (СДГ), концентрацию лактата, пирувата. В гомогенатах мышц – активность креатинфосфокиназы (КФК), ЛДГ, МДГ, СДГ, концентрацию лактата.

Минеральный состав новообразованной костной ткани и элементный состав мягких тканей определяли методом рентгеноспектрального элементного анализа на микроскопе QUANTA 200 (FEI Company, Нидерланды) с приставкой EGAX E-Sign с

Таблица 1–Дизайн исследования

№ серии	Задача исследования	Экспериментальные животные	Тип, количество внедренных имплантатов	Сроки наблюдения
1	Изучение in vitro цитотоксичности, адгезии, колониеобразующей способности клеток костного мозга	Кролики, мыши		От 4 часов до 32 суток
2	Изучение морфологии, морфометрии новообразованной костной ткани, оценка местного раздражающего действия имплантатов	Кролики	Внедрено: 1 группа – ПТi <sub>40</sub> МК, 44 имплантата 2 группа – ПТi <sub>40</sub> (а-С)МК, 44 имплантата; 3 группа – ПТi <sub>40</sub> (СN <sub>0,25</sub> )МК, 16 имплантатов.	4, 16, 52 недели после операции
3	Изучение прочности «на растяжение» новообразованной костной ткани в интерфейсе «костное ложе – имплантат»; морфологии новообразованной в порах имплантата костной ткани.	Кролики	Внедрено: 1 группа – ПТi <sub>40</sub> МК, 20 имплантатов; 2 группа – ПТi <sub>40</sub> (а-С)МК, 12 имплантатов; 3 группа – ПТi <sub>40</sub> (СN <sub>0,25</sub> )МК, 10 имплантатов.	4, 16, 52 недели после операции
4	Изучение влияния титановых имплантатов на метаболизм костной, мышечной тканей; влияние имплантатов на кроветворение, регионарные лимфатические узлы, селезенку, периферическую кровь.	Кролики	Внедрено: 1 группа – ПТi <sub>40</sub> МК, 36 имплантатов; 2 группа – ПТi <sub>40</sub> (а-С)МК, 34 имплантата; 3 группа – ПТi <sub>40</sub> (СN <sub>0,25</sub> )МК, 36 имплантатов.	4, 16, 52 недели после операции
5	Изучение влияния на свойства новообразованной костной ткани сочетанного использования ПТi <sub>40</sub> (а-С) и прилипающей фракции клеток костного мозга, предварительно культивируемых в порах имплантатов (ПТi <sub>40</sub> (а-С)МК).	Кролики	Внедрено: 1 группа – ПТi <sub>40</sub> (а-С)МК, 6 имплантатов; 2 группа – ПТi <sub>40</sub> (а-С), 6 имплантатов.	2, 4 недели
6	Изучение особенностей остеоинтеграции ПТi <sub>40</sub> (а-С) с внедренным в поры гидроксиапатитом (ГА) и прилипающей фракции клеток костного мозга, увеличенных в количестве культивированием 14 суток (ПТi <sub>40</sub> (а-С)ГА-МК)	Кролики	Внедрено: ПТi <sub>40</sub> (а-С)ГА-МК, 24 имплантата.	4, 16, 52 недели после операции

Продолжение таблицы 1

7	Изучение особенностей остеоинтеграции при сочетанном использовании $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ и рекомбинантного человеческого костного морфогенетического белка-2 (рчКМБ-2) <sup>2</sup> .	Кролики	1 группа - формирование краевых дефектов костной ткани, не заполненных имплантатами (КД) (отрицательный контроль) – 6 КД; Заполнение дефектов: 2 группа – $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ с декальцинированным костным матриксом в порах ( $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ ДКМ), 6 имплантатов; 3 группа $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ с рчКМБ-2 на ДКМ и гиалуроновой кислоте в качестве носителей в порах ( $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ ДКМ-рчКМБ-2)(I), доза рчКМБ-2 – 0,0196-0,0360 мг/имплантат, 10 имплантатов; 4 группа – заполнение дефектов $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ ДКМ-рчКМБ-2(II), рчКМБ-2 – 0,063-0,068 мг/имплантат, 12 имплантатов; 5 группа – $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ ДКМ-рчКМБ-2(III), рчКМБ-2 – 0,132-0,193 мг/имплантат, 11 имплантатов; 6 группа $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ МК, 7 имплантатов (положительный контроль).	4, 16 недель после операции
8	Интактные	Кролики		
9	Определение оптимальной объемной доли пор $\text{PTi}(\text{a-C})$ МК. Изучение прочности «на сжатие» композитов « $\text{PTi}(\text{a-C})$ МК – новообразованная в порах костная ткань»	Овцы	1 группа: $\theta$ – 30% ( $\text{PTi}_{30}(\text{a-C})$ МК), 12 имплантатов; 2 группа: $\theta$ – 40% ( $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ МК), 13 имплантатов; 3 группа: $\theta$ – 50% ( $\text{PTi}_{50}(\text{a-C})$ МК), 11 имплантатов.	4, 24, 52 недели после операции

<sup>2</sup>Данный фрагмент работы выполнен совместно с лабораторией биологически активных наноструктур (руководитель доктор биологических наук В.Г. Лунин) ФГБУ «НИИ эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации.



применением пакета программ Spectrum, позволяющего идентифицировать пики и проводить количественный элементный анализ.

Прочность костной ткани «на растяжение» в интерфейсе «костное ложе – имплантат» определяли по оригинальной методике [Патент 2471248 РФ] на испытательной машине FP-100/1. Механические испытания «на сжатие» проводили по ГОСТ 9550-81 на универсальной испытательной машине типа «ИНСТРОН». По диаграммам «напряжение – деформация» рассчитывали условный предел текучести и модуль Юнга.

Костный мозг получали пункцией головки бедренной кости у наркотизированных животных. Подсчитывали абсолютное количество миелокариоцитов в камере Горяева. В окрашенных (по Нохту) мазках осуществляли морфологическое исследование форменных элементов с дифференцированным подсчетом клеточных элементов.

Для изучения морфологии лимфатических узлов и селезенки готовили серийные срезы толщиной 5-7 мкм (на уровне ворот и полюсов), препараты окрашивали гематоксилином – эозином. В функциональных зонах лимфоузлов осуществляли дифференцированный подсчет клеточных элементов.

В сыворотке периферической крови определяли активность ЩФ<sub>общ</sub>, ЩФ<sub>терм</sub>, КФ<sub>общ</sub>, КФ<sub>тарт</sub>, общий и ионизированный кальций, магний, неорганический фосфат на биохимических анализаторах Express Plus (Bayer HealthCare LLC), Sapphire-400. Концентрацию интерлейкинов-8, -10, С-реактивного белка (СРБ), костного морфогенетического белка-2 (КМБ-2), матричной металлопротеиназы-1 (ММР-1), тканевого ингибитора ММР-1 (ТИМР-1), инсулиноподобного фактора роста-1 (IGF-I) методом иммуноферментного анализа с использованием наборов Cloud-Clone Corp. Organism Species: *Oryctolagus cuniculus* (Rabbit).

При статистическом анализе данных использовали непараметрические методы однофакторного дисперсионного анализа для зависимых (тест Уилкоксона) и независимых (тесты Манна-Уитни, Краскала-Уоллиса) групп с применением технологии множественной проверки гипотез на основе поправки Бонферрони, тест Шапиро-Уилка для проверки нормальности распределений [С. Гланц, 1998]. При проведении статистических расчетов, использовался пакет STATISTICA 10, для визуализации данных и построения графиков – пакет Microsoft Excel 2007. Для выполнения расчетов прочности бедренной кости человека, имеющей дефект,

замещенный титановым имплантатом, применялся пакет ANSYS 16 (ANSYS Mechanical), реализующий методы конечно-элементного моделирования.

## РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Глава 3** посвящена изучению остеоинтеграции пористых титановых имплантатов и пористых титановых имплантатов, модифицированных углеродсодержащими пленками.

Жизнеспособность клеток при инкубации миелокариоцитов с образцами композитов ( $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ ,  $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})$ ) была выше, чем при инкубации с образцами  $\text{PTi}_{40}$ . Отмечена более активная адгезия миелокариоцитов на полированный титан с  $\text{CN}_{0,25}$  и увеличение количества фибробластоподобных и кроветворных КОЕ при культивировании клеток костного мозга в присутствии или на образцах пористого титана с углеродсодержащими пленками по сравнению с титаном (контроль).

Клетки-предшественницы костного мозга проникали в поры имплантатов, где были способны к развитию, как в кроветворные клетки, так и в стромальные. 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 (рисунок 1).

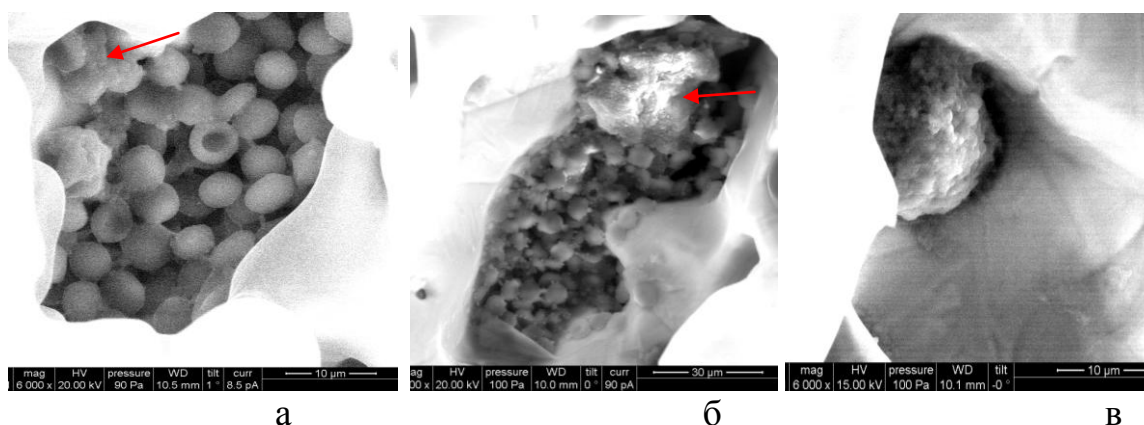


Рисунок 1 – культивирование прилипающей фракции миелокариоцитов кроликов в порах  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ . СЭМ – микрофото.

а – 4 суток, б – 10 суток, в – 17 суток культивирования.

Стрелка – компоненты внеклеточного матрикса

При внедрении кроликам в костные дефекты  $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ ,  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$  и  $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$  уже через 4 недели после операции вырастающие в периферические поры из материнского ложа более зрелые костные трабекулы и более молодая костная ткань мозаичная по строению в центральных областях имплантата смыкались между собой. В результате большая часть сообщающихся 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» и количественным расчетом площади, занимаемой новообразованной костной тканью по сечениям области внедрения имплантатов.

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 также для новообразования незрелой костной ткани в центральных отделах имплантата из мигрировавших туда остеогенных клеток-предшественниц. Через 4-16 недель после операции при использовании имплантатов всех типов отмечалось восстановление кости как органа – восстановление 40-72% ее прочности; васкуляризация зоны дефекта, что приводило к уменьшению проявлений дистрофических изменений новообразованной костной ткани и костного ложа к 16 неделям; образование костного мозга между трабекулами новообразованной костной ткани.

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

Костеобразование в интерфейсе «костное ложе – имплантат» и во внутреннем поровом пространстве происходило активнее при использовании имплантатов с углеродсодержащими пленками. Это выражалось наличием по

периферии области внедрения имплантата распространенной сети молодых костных трабекул, сформированных по ходу пор. В ранние сроки наблюдения на поверхности костных трабекул в бóльшем количестве располагались остеобласты, метахромазия матрикса новообразованных костных структур была меньшей.

В прилежащих сегментах кости при использовании ПТi<sub>40</sub>(а-С)МК через 4 недели после операции количество остеогенных клеток, среднее количество клеток, экспрессирующих ЩФ, и объемная доля площади остеогенных клеток, экспрессирующих ЩФ, значимо превышали данный показатель по сравнению с интактной костной тканью (116%,  $p \leq 0,014$ ; 136%,  $p \leq 0,014$ ; 145%,  $p \leq 0,014$  соответственно); количество остеогенных клеток, объемная доля площади остеогенных клеток, экспрессирующих ЩФ по сравнению с группой животных, с ПТi<sub>40</sub>МК (128%,  $p \leq 0,025$ ; 133%,  $p \leq 0,025$ , соответственно) и по сравнению с сегментами с КД. В гомогенатах костной ткани в этот период также было выявлено увеличение активности ЩФобщ (до 352,1%,  $p \leq 0,014$ ) и ЩФтерм (151,9%,  $p \leq 0,043$ ) по сравнению с интактной костной тканью. Соответствующие изменения ЩФтерм были обнаружены и в периферической крови.

Динамика изучаемых показателей указывает на более длительную по времени активацию остеобластов у животных с ПТi<sub>40</sub>(а-С)МК. При внедрении ПТi<sub>40</sub>МК к 16 неделям после операции были выявлены признаки затухания остеогенеза – в сопредельном сегменте кости снижались активность ЩФ и ее термолабильной фракции, количество клеток, экспрессирующих ЩФ, их доля от общего числа остеогенных клеток, концентрация ЩФтерм в периферической крови. У животных, с внедренными ПТi<sub>40</sub>(а-С)МК в течение всего периода наблюдения сохранялись признаки активности остеогенеза. Даже в конце срока наблюдения (52 недели после операции) у животных с ПТi<sub>40</sub>(а-С)МК сохранялись увеличенными количество остеогенных клеток в прилежащей костной ткани – 119% ( $p \leq 0,033$ ), доля остеогенных клеток, экспрессирующих ЩФ – 118% ( $p \leq 0,033$ ) и объемная доля их площади по сравнению с интактной костной тканью.

В результате у животных с ПТi<sub>40</sub>(а-С)МК увеличение площади зрелой костной ткани во внутреннем поровом пространстве отмечалось в течение всего периода наблюдения и к 52 неделям после операции превышало соответствующий показатель у животных с ПТi<sub>40</sub>МК (рисунок 2).

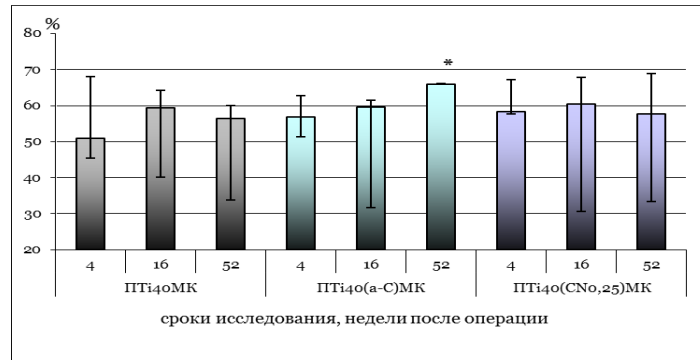


Рисунок 2 – Площадь зрелой костной ткани в порах имплантатов (медиана, 25-, 75-квартили).

\*  $p \leq 0,05$  по сравнению с ПТi<sub>40</sub>МК в соответствующий срок после операции

К отличительным особенностям при использовании имплантатов различных типов относятся выраженность дистрофических и некротических процессов новообразованной костной ткани и костного ложа. Изменения имели следующую степень выраженности ПТi<sub>40</sub>МК > ПТi<sub>40</sub>(CN<sub>0,25</sub>)МК ≈ ПТi<sub>40</sub>(а-С)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 в костной ткани (новообразованной, а также 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 [M.J. Dalby et al., 2008].

На поздних стадиях наблюдения, вероятно, лучшие условия трофики тканей приводили к менее выраженным склеротическим изменениям новообразованной костной ткани (16-52 недели после операции), уменьшающимся в ряду ПТi<sub>40</sub>МК > ПТi<sub>40</sub>(CN<sub>0,25</sub>)МК ≈ ПТi<sub>40</sub>(а-С)МК от средневыраженных до незначительных.

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  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ . В первом случае – это были преимущественно посттравматические некротические изменения и образование в интерфейсе «костного ложа – имплантат» элементов соединительнотканной капсулы (в 28,5%). При внедрении  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$  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%). При внедрении  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$  лишь в одном случае из 12 (8,3%) в интерфейсе «костное ложе-имплантат» были обнаружены элементы соединительнотканной капсулы, что было расценено нами как морфологический признак лучшей остеоинтеграции  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$  по сравнению с  $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ . По условиям данного эксперимента через 4 недели после имплантации у 1 кролика из 14 на исследуемые образцы  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$  было выявлено легкое раздражающее действие имплантата (ГОСТ ISO 10993.6-2011). Через 52 недели после операции среднее количество баллов в группе составило 0 (0; 0) баллов, у 9 кроликов из 9 влияние имплантатов было оценено как «не раздражающее».

Минерализация новообразованной костной ткани во внутреннем поровом пространстве через 16 недель после операции у животных  $\text{PTi}_{40}\text{МК}$  и  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$  групп значимо не различалась, однако отмечалась тенденция в увеличении соотношения Са/Р при использовании имплантатов с алмазоподобными пленками.

Прочность костной ткани на растяжение при внедрении  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$  на границе «костное ложе – имплантат» через 4, 16 недель после операции значимо превышала прочность костного блока при внедрении  $\text{PTi}_{40}\text{МК}$  (таблица 2), что являлось следствием высокой активности остеогенеза и более быстрого восстановления кортикальных пластинок, хотя их высота к 16 неделям оставалась меньшей, чем исходная (на ~ 10-15%). К 52 неделям

различия по прочности блока «костное ложе – новообразованная костная ткань» между группами, с внедренными  $\text{PTi}_{40}\text{МК}$  и  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ , нивелировались и не отличались от прочности интактной кости.

Таблица 2 – Значения относительного предела прочности на растяжение новообразованной костной ткани на границе «костное ложе – имплантат» (в % от интактной кости)

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

■ - разрыв произошел по уровню интактной костной ткани

Более выраженную активацию остеогенеза, выявленную при внедрении  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ , по сравнению с сегментом кости с КД,  $\text{PTi}_{40}\text{МК}$ ,  $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$  мы связываем с комплексом физико-химических особенностей а-С пленки. На ее поверхности располагаются цепочки пиков усеченной пирамидальной формы, образованные фрагментами пучков многослойных нанотрубок высотой ~ 150-200 нм, отдельные выступы достигают высоты более 300 нм. Толщина пучков нанотрубок достигает 200 нм. Среднее расстояние между выступами составляет ~ 30 мкм [И.Ш. Трахтенберг и др., 2005; А.П. Рубштейн и др., 2006].

По данным литературы при культивировании клеток-предшественниц остеобластов на поверхностях, структурированных нанотрубками, ускорение темпов роста количества остеобластов достигало 300-400%, происходила инициация их дифференцирования в остеобластоподобные клетки, экспрессирующие гены и синтезирующие соответствующие белки – остеопонтин, остеокальцин и ЩФ без дополнительной химической индукции [S.Oh et al., 2009].

На наноструктурированной поверхности с размерностью более 30-50 нм и определенной формой шероховатости клетки остеобластического дифферона деформируются. В результате механические сигналы поступают в клетку и могут активировать несколько сигнальных путей:  $\text{Wnt}/\beta\text{-catenin}$ , что приводит к ингибции факторов транскрипции, активирующих адипогенез и хондрогенез ( $\text{PPAR}\gamma$ , и  $\text{SOX-9}$ ); каскады митогенактивируемых киназ: киназ, активируемых

экстрацеллюлярными сигналами (ERK1/2<sup>МАРК</sup>), p38<sup>МАРК</sup>, стрессактивируемых протеинкиназ (JNK) и сигнального каскада с участием цитоскелета клеток (рисунок 3). Происходит обязательное ингибирование экспрессии семейства транскрипционных факторов TWIST (-1 и -2), которые, взаимодействуя с доменом ДНК Runx2, угнетают его активацию в ранних предшественниках остеобластов. В результате все пути сходятся в точке экспрессии специфических генов: Runx2, Dlx5, Osterix, Msx2 (факторов транскрипции остеогенеза), запускающих остеогенную дифференцировку. Происходит увеличение экспрессии генов кодирующих ростовые факторы (КМБ-2, -4, -7, IGF-1, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор); матриксные белки (остеопонтин, остеокальцин, костный сиалопротеин, коллаген-1, -5, -11, -12 типов); ферменты (ЩФ, MMP-1); рецепторы к трансформирующему фактору роста-β, фактору роста фибробластов, кальцитонину; белки цитоскелета и др. [M.J. Dalby et al., 2008].

Увеличение пролиферативной активности остеогенных клеток может быть обусловлено соотношением полярной и дисперсионной компонент поверхностной энергии у α-C пленки. Ее значение составляет 0,24-0,43 и близко к оптимальному значению - 0,3, вызывающему увеличение пролиферативной активности остеогенных клеток [L.Ponsonnet et al., 2003], что так же могло быть причиной более быстрого формирования костной ткани при внедрении ПТi<sub>40</sub>(α-C)МК.

И, наконец, в результате нанесения DLC пленок уменьшается коррозия титана в организме, что было нами продемонстрировано. В результате снижаются прямые отрицательные эффекты его ионов на жизнеспособность остеобластов, остеокластов, эпителиальных клеток, экспрессию Runx2, Osterix в остеобластах, экспрессию RANKL и OPG в остеобластах и эпителиальных клетках [Y. Mine et al., 2010; Mercan S. et al., 2013; Suito H., 2013].

В регуляции репаративной регенерации при внедрении ПТi<sub>40</sub>(α-C)МК были задействованы локальные ростовые факторы и системные гормональные, что отличало данную группу от животных, с внедренными ПТi<sub>40</sub>МК.



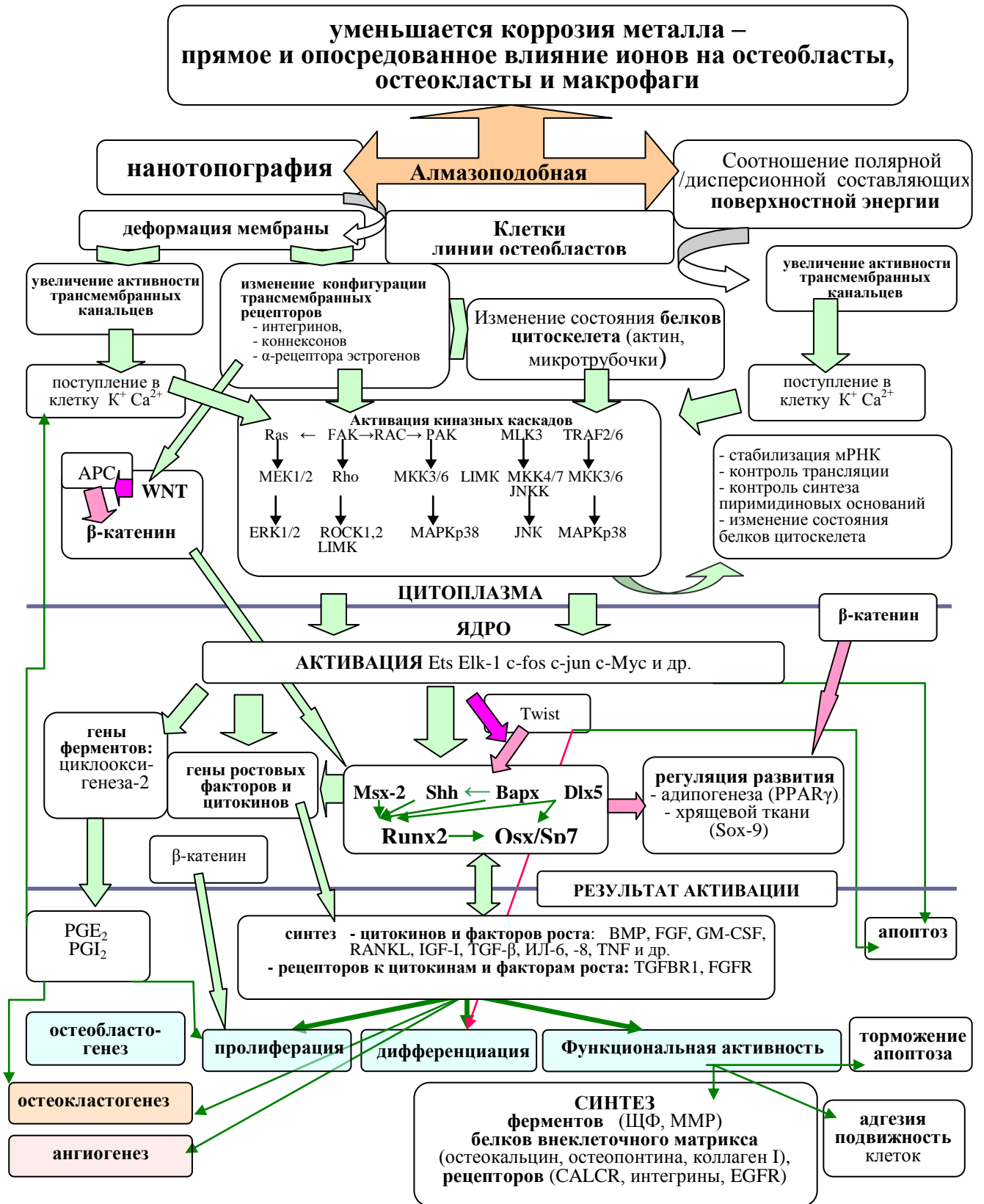


Рисунок 3 – Механизмы влияния алмазоподобной пленки на основные сигнальные пути регуляции остеогенеза, где → торможение, → активация; Ets, Elk-1, c-fos, c-jun, c-Мус – гены транскрипционных факторов; Msx-2, Shh, Vax, Dlx5 – гены транскрипционных факторов, активирующих Runx-2

Концентрация IGF-1 в периферической крови кроликов с ПТi<sub>40</sub>(а-С)МК увеличена в течение 16 недель после операции, с максимумом изменений через 4 недели – 405% ( $p \leq 0,017$ ), по сравнению с уровнем до операции. Сходна динамика концентрации КМБ-2: через 4 недели после операции концентрация КМБ-2 максимальна – 319,4% ( $p \leq 0,017$ ) по сравнению с уровнем до операции и значимо превышает аналогичный показатель в группе ПТi<sub>40</sub>МК более чем в 2 раза. Эти данные косвенно подтверждают большую напряженность процессов репаративного остеогенеза и большую их протяженность по времени при внедрении ПТi<sub>40</sub>(а-С)МК.

При внедрении ПТi<sub>40</sub>(СN<sub>0,25</sub>)МК активность остеогенеза в течение всего периода наблюдения была несколько ниже, чем у животных ПТi<sub>40</sub>(а-С)МК, однако значимо выше, чем в интактной костной ткани и у животных, с внедренными ПТi<sub>40</sub>МК. Местного раздражающего действия на имплантаты ПТi<sub>40</sub>(СN<sub>0,25</sub>)МК выявлено не было. Прочность на растяжение на границе «костное ложе – имплантат» в течение 4-16 недель после операции при внедрении ПТi<sub>40</sub>(СN<sub>0,25</sub>)МК превышала данный показатель у животных, с внедренными ПТi<sub>40</sub>МК, но уступала прочности костного блока при внедрении ПТi<sub>40</sub>(а-С)МК (через 16 недель после операции). К 52 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.

**В 4 главе** представлены материалы по изучению реакций тканей организма на формирование краевых дефектов в большеберцовых и бедренных костях обеих конечностей и внедрение пористых титановых имплантатов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами в одну из конечностей.

В периферической крови в послеоперационном периоде была выявлена легкая степень нормохромной, нормо- или микроцитарной анемии, тромбоцитоз. Изменение количества лейкоцитов и их клеточного состава были взаимосвязаны с периодами репаративного процесса костной и кроветворной

тканей. У кроликов со всеми типами внедренных имплантатов обнаружено два периода увеличения количества лейкоцитов периферической крови. В послеоперационном периоде развивался нейтрофильный лейкоцитоз. Через 4-24 недели после операции выявлены признаки неспецифической воспалительной реакции в периферической крови: концентрация ИЛ-8 имела тенденцию к увеличению через 4 недели после операции; через 16 недель был выявлен лимфоцитарный лейкоцитоз и небольшое, но статистически значимое увеличение концентрации СРБ. По данным морфологического исследования, по динамике количества лейкоцитов и нейтрофилов периферической крови выраженность воспалительной реакции в области операционной раны у экспериментальных животных в эти сроки снижалась. Таким образом, выявленные признаки воспалительной реакции не связаны непосредственно с операционной травмой. При внедрении  $PTi_{40}(CN_{0,25})MK$  в отдаленном периоде (через 40-52 недели после имплантации) в периферической крови был выявлен третий период увеличения количества лейкоцитов.

Изучая локальные эффекты внедренных имплантатов на состояние костного мозга в прилежащем к имплантату сегменте кости, через 52 недели после внедрения имплантатов в костную ткань было выявлено снижение относительного количества молодых эритроидных клеток. Выраженность изменений увеличивалась в ряду  $PTi_{40}(a-C)MK < PTi_{40}MK < PTi_{40}(CN_{0,25})MK$ . Данные изменения компенсировались тенденцией к увеличению абсолютного количества ядродержащих элементов костного мозга.

Отсутствие угнетающего влияния 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 в сегменте бедренной кости, прилежащем к имплантату, через 4 недели после операции значимо увеличивалось при внедрении всех типов тестируемых имплантатов преимущественно за счет более зрелых клеток-предшественниц, образующих КОЕ-э. Данные изменения ассоциируются с костно-мозговой стадией компенсации анемии. После длительного контакта

тканей конечности с внедренными костными имплантатами (52 недели) количество КОЕ-э, БОЕ-э значимо не отличалось от данного показателя до операции при внедрении имплантатов всех типов.

В костном мозге прилежащего сегмента бедренной кости через 52 недели после имплантации ПТi<sub>40</sub>(CN<sub>0,25</sub>)МК выявлено расширение гранулоцитарного ростка с увеличением как относительного, так и абсолютного количества клеток, что соотносится с лейкоцитозом в периферической крови.

Увеличение количества КОЕ-ГМ костного мозга через 52 недели после имплантации ПТi<sub>40</sub>МК, ПТi<sub>40</sub>(а-С)МК и ПТi<sub>40</sub>(CN<sub>0,25</sub>)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.

Способность предшественниц фибробластоподобных клеток формировать колонии в культуре через 4 недели после операции имела тенденцию к увеличению, а через 52 недели после операции значимо не отличалась от уровня до операции.

Исследование показателей минерального обмена в периферической крови экспериментальных животных выявил два периода снижения концентрации неорганического фосфата у животных всех групп - через 12 и 40 недель после операции. У кроликов, с внедренными ПТi<sub>40</sub>(а-С)МК, ПТi<sub>40</sub>(CN<sub>0,25</sub>)МК, изменения концентрации общего и ионизированного кальция не выявлены. Внедрение в кости ПТi<sub>40</sub>МК приводило к снижению концентрации общего кальция в периферической крови на поздних сроках наблюдения (16-52 недели после операции) по сравнению с уровнем до операции.

У животных всех групп выявлено два периода уменьшения концентрации магния в периферической крови соответственно через 8 и 52 недели после операции. Гипомагниемия через 8 недель совпадает с тенденцией к увеличению концентрации кальция в крови, что соответствует физиологическим пропорциям. Снижение концентрации магния в крови, выявленное через 40-52 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 элементного анализа через 16 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 интактной костной тканью. При внедрении  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$  и  $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$  увеличения концентрации титана не выявлено (соответственно 93,5% (73,6; 101,3) и 108,4% (83,3; 129,2)) по сравнению с контрольными образцами.

Ионы многих металлов (Zn, Co, V, Cd, Ni) оказывают влияние на активность ферментов (ЛДГ, ЩФ) [Д.В.Ильин, 2009]. Исходя из вышесказанного, было целесообразно исследовать активность ферментов гликолиза (протекающего в физиологических условиях в костной ткани с большой интенсивностью) и аэробных окислительно-восстановительных реакций (значение которых возрастет в период активации остеогенеза) [Е.Б.Трифорова, 2011] после продолжительного контакта тканей организма с пористыми титановыми имплантатами.

К 52 неделе после операции активность ферментов 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 костной ткани при КД и при внедрении пористых титановых имплантатов, а также различий между животными с внедренными титановыми имплантатами без покрытий и с алмазоподобными покрытиями. Полученные результаты мы расцениваем как свидетельство отсутствия влияния длительного контакта тканей организма с пористыми титановыми имплантатами на активность исследуемых ферментов. Активность 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 недели после операции не отличалась от активности данных ферментов у интактных животных.

Оценка динамики морфологических, морфометрических параметров, структурно-функциональных зон регионарных лимфатических узлов в ответ на внедрение имплантатов всех тестируемых типов, насыщенных миелокариоцитами показала, что гистологическая картина подколенных лимфатических узлов была сохранена, клеточная атипия отсутствовала.

На ранних сроках наблюдения (4 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. Динамика изменений носила нелинейный характер. Через 16 недель после операции признаки антигенной стимуляции регионарных лимфатических узлов уменьшались при внедрении всех тестируемых имплантатов. Однако через 52 недели нарастала реактивность в Т-зависимых зонах регионарных лимфатических узлов и активировалась система фагоцитирующих мононуклеаров. Интенсивность выявленных изменений уменьшалась в ряду  $PTi_{40}(CN_{0,25})MK > PTi_{40}MK > PTi_{40}(a-C)MK$ .

В клеточном составе лимфатических узлов при внедрении  $PTi_{40}MK$  наиболее значимые изменения по сравнению с интактными животными были выявлены в паракортикальной зоне – увеличение плотности клеточных элементов (до 110,2%,  $p \leq 0,014$ ), относительного и абсолютного количества лимфобластов (до 200,0%,  $p \leq 0,022$ ; 232,1%,  $p \leq 0,022$ ), абсолютного количества пролимфоцитов (до 167,9%,  $p \leq 0,005$ ).

Для животных, с внедренными  $PTi_{40}(CN_{0,25})MK$ , в большей степени была характерна реакция со стороны эозинофилов в разные сроки наблюдения, уменьшение относительного количества зрелых лимфоидных элементов, 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  $PTi_{40}(a-C)MK$ , через 52 недели после операции морфологические характеристики большинства структур подколенных лимфатических узлов приближались к характеристикам лимфатических узлов у интактных кроликов.

Исключение составляла паракортикальная зона, которая оставалась расширенной, количество зрелых лимфоидных элементов в ней было снижено, а макрофагов – увеличено. Однако реактивность Т-лимфоцитов может являться дополнительным вектором при регуляции репаративной регенерации тканей (А.Г.Бабаева,1972), в том числе костной ткани.

Причиной, обуславливающей выявленные нами изменения в регионарных лимфатических узлах на поздних сроках наблюдения при внедрении всех типов имплантатов, вероятно, являлось «стрессорное ремоделирование», которое проявляется постоянно поддерживающимися деструктивными, воспалительными и репаративными процессами в костном ложе имплантата, поскольку биомеханическое несоответствие между имплантатами и костью было уменьшено, но не преодолено полностью. Однако наличие «стрессорного ремоделирования» не объясняет различную степень выраженности воспалительной реакции на имплантаты разных типов, поскольку механические характеристики имплантатов не различались.

Увеличение концентрации аутоантигенов может происходить в результате конформационных изменений белковых молекул при адгезии их на металлическую поверхность [В.И.Севастьянов, М.П.Кирпичников, 2011]. Травление плавиковой кислотой (применяемое в процессе изготовления титановых матриц) приводит к увеличению полярной компоненты ( $\gamma^p$ ) поверхностной энергии, изменению проводниковых свойств оксидного слоя титана и увеличивает конформационные изменения адгезировавших на поверхность белков, например, фибриногена [P.Cacciafesta, 2001].

Ряд исследователей считает, что одним из основных механизмов развития асептического воспаления и остеолита в области интерфейса «кость – имплантат» является индуцированный выброс цитокинов и хемокинов, активированных при контакте с поверхностью титана макрофагами М1-типа [М.Вакір, 2012]. М1 макрофаги секретируют провоспалительные и регуляторные цитокины (ИЛ-1 $\beta$ , -6, -10, -12, -23,- 15, -33, ФНО), хемокины (MCP-1 и др.), активные формы кислорода, NO [Е.А.Монастырская, С.В.Лямина, М.Ю.Мальшев, 2008; И.А.Казакова, 2014], которые локально

могут активировать иммунокомпетентные клетки, индуцировать апоптоз остеобластов, ускорять костный катаболизм, активируя TRAP5b в остеокластах [S.Landgraeber, 2008]. Таким образом, уменьшение площади контакта макрофагов с титаном при нанесении алмазоподобной пленки снижает выраженность локальных реакций моноцитов/макрофагов с последующим вовлечением клеток иммунной системы в хронический асептический воспалительный процесс в зоне имплантации в поздние сроки наблюдения.

В результате морфологического исследования селезенки при моделировании краевых дефектов большеберцовых и бедренных костей и внедрении имплантатов всех тестируемых типов, насыщенных аутологичными миелокариоцитами, было выявлено, что через 4 недели структурные изменения селезенки соответствует изменениям в регионарных лимфатических у этих же кроликов в этот же срок.

В группах с ПТi<sub>40</sub>МК и ПТi<sub>40</sub>(а-С)МК через 16-52 недели после операции выявлены признаки активации Т- и В-зависимых зон, системы фагоцитирующих мононуклеаров и эозинофилов. Полученные результаты и данные литературы позволяют предположить, что структурные изменения селезенки, свидетельствующие о ее функциональной активности, направлены на ограничение хронического асептического воспаления, развивающегося при внедрении металлических имплантатов в костную ткань и/или ограничения интенсивности иммунного ответа на аутоантигены. Регуляторное воздействие селезенки осуществляется посредством синтеза гуморальных факторов (низкомолекулярных пептидов и полиаминов), которые регулируют образование ряда гормонов и активность биогенных аминов, а также продукции спленоцитами цитокинов [В.И.Филимонов, 2013].

В морфологической картине селезенки у животных с имплантированными в дефекты костей ПТi<sub>40</sub>(CN<sub>0,25</sub>)МК в сроке 52 недели наблюдается «нормализация» или даже редукция белой пульпы. Данные изменения не соответствуют структурным изменениям в лимфоузлах в этом сроке – диффузное расширение паракортикальной зоны с выраженной эозинофильной клеточной реакцией, увеличение численности плазматических



клеток, что может указывать на формирование аутоиммунных реакций организма при имплантации  $\text{PTi}_{40}(\text{CN}_{0,25})\text{МК}$ , сопровождающегося нарушением механизмов регуляторного воздействия селезенки на иммунную систему.

**В главе 5** представлены результаты модификации композитов «пористый титан – алмазоподобная пленка» с целью оптимизации условий заживления дефектов костной ткани и с последующим более полным восстановлением функции оперированного сегмента. В плане реализации технического усовершенствования имплантатов в эксперименте на овцах нами были исследованы  $\text{PTi}(\text{a-C})\square\text{МК}$  с различной объемной долей пор (30%, 40%, 50%).

Биомеханические испытания, образующихся композитов « $\text{PTi}(\text{a-C})$ -новообразованная в порах костная ткань», проводили «на сжатие», поскольку напряжение «сжатия» относится к физиологическим гравитационным нагрузкам, постоянно испытываемым организмом человека и животных. Через 24 недели после имплантации  $\text{PTi}(\text{a-C})\square\text{МК}$  с различным объемом пор в области внедрения имплантатов образуются композиты. Эффективные механические свойства композитов зависели от свойств его компонент – пористых металлических матриц и костной ткани, однако отличались от них, что является одним из показателей остеоинтеграции [А.П.Рубштейн и др., 2012].

Условный предел текучести ( $\sigma_{0,2}$ ) композита «имплантат – новообразованная в порах костная ткань», являющийся характеристикой прочности испытуемого образца, к 52-м неделям после операции при внедрении овцам в большеберцовые и бедренные кости  $\text{PTi}_{30}(\text{a-C})\square\text{МК}$  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 недели модули Юнга композитов «имплантат – новообразованная в порах костная ткань», характеризующие упругие свойства материала, не достигали показателей модуля Юнга интактной кортикальной кости барана (17 ГПа) [S.Checa, P. J. Prendergast, G. N. Duda, 2011] 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).

Ориентировочные расчеты коэффициентов риска (соотношение напряжения, действующего на объект, к предельному или разрушающему напряжению) показали, 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) – 80 МПа и повышенных нагрузках (прыжки) – 128 МПа [Ю.И.Денисов-Никольский и др., 2005]. При внедрении  $\text{PTi}_{50}(\text{a-C})\text{МК}$  в бедренную кость человека имелся риск разрушения композитов «имплантат – новообразованная в порах костная ткань» при значительных нагрузках, например, при прыжках.

При внедрении в большеберцовые и бедренные кости кроликов  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$ , насыщенных прилипающей фракцией миелокариоцитов и  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$  без клеток (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 для трансплантации клеток в зону поражения кости.

Несовершенство нормативно-правовой базы, этические аспекты, риски, ассоциированные с трансплантацией клеток, заставляют искать для стимуляции репаративной регенерации альтернативы клеткам, обладающим потенциалом к костеобразованию. Сочетанное локальное применение рчКМБ-2 в эффективной дозе (в нашем эксперименте это 0,054-0,193 мг/имплантат) на носителе (декальцинированном костном матриксе (ДКМ) с гиалуроновой кислотой) с  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$  в качестве скэффолда является перспективным подходом для активации репаративной регенерации кости. Сочетанное применение  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})$  с рчКМБ-2 в эффективной дозе приводило к увеличению площади зрелой костной ткани во внутреннем поровом пространстве имплантата, увеличению прочности блока «костное ложе – имплантат» «на растяжение» через 4-16 недель после операции по сравнению с  $\text{PTi}_{40}$  с ДКМ.

При внедрении  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$  на ранних сроках наблюдения (4 недели после операции) выявлена меньшая скорость заполнения порового пространства костной тканью, меньшая ее зрелость, выраженные признаки дистрофии по сравнению с  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$ . Начиная с 16 недель после имплантации, были выявлены 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 ложе – имплантат» снижает прочность блока «костное ложе – имплантат», а пористая структура имплантата значительно задерживает биодеградацию внедренных в поровое пространство наночастиц ГА. Так, и инициировать апоптоз остеобластов и/или их задержку в  $G_0$ -фазе в результате значительного увеличения концентрации неорганического фосфата во внутреннем поровом пространстве, что приводит к уменьшению пула остеобластов [B.D.Boyan, Z.Schwartz, A.L.Boskey, 2000]. В исследованиях Z.Shi et al. (2009) был продемонстрирован цитотоксический эффект и инициация апоптоза клеток остеогенной саркомы наночастицами ГА размером 20 нм и 80 нм. Во внутриклеточном пути передачи сигнала показано участие каспазы-9 [Z.Shi et al., 2010]. В нашем эксперименте наночастицы ГА имели размер менее 50 нм, то есть могли инициировать апоптоз клеток остеобластического дифферона.

При внедрении  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{ГА-МК}$  через 4-16 недель после имплантации в 75-80% у животных выявлено легкое раздражающее действие имплантатов, что значительно превышает показатели у животных, с внедренными  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$  – 8,3%. Через 16 недель наиболее часто в области интерфейса «костное ложе – имплантат» выявляли признаки воспаления с минимальной степенью активности – редкие макрофаги до 5 клеток в скоплении (в 75,0%), другие иммунокомпетентные клетки до 5 в скоплении; ограниченную по протяженности фиброзную прослойку между костным ложем и имплантатом (в 50%), инородные вещества – частицы ГА (в 75,0%). К 52-м неделям после операции отличия по сравнению с  $\text{PTi}_{40}(\text{a-C})\text{МК}$  были менее значительны.

Однако даже через 52-е недели после внедрения ПТi<sub>40</sub>(а-С)ГА-МК мы обнаруживали небольшие конгломераты нерезорбированного ГА во внутреннем поровом пространстве.

Относительная прочность костной ткани на границе «костное ложе – имплантат» «на растяжение» на ранних этапах эксперимента уступает прочности композитов, образованных при внедрении ПТi<sub>40</sub>(а-С)МК (через 16 недель после имплантации ПТi<sub>40</sub>(а-С)ГА-МК на 28,2%,  $p \leq 0,03$ ). Через 52 недели после имплантации отличий по данному показателю между группами не обнаружено.

Исследование регионарных лимфатических узлов в группе животных с внедренными ПТi<sub>40</sub>(а-С)ГА-МК выявило выраженную ответную реакцию регионарных лимфатических узлов на ранних сроках наблюдения, носившую комбинированный (клеточно-гуморальный) характер. К 52 неделям наблюдения отличия между двумя группами ПТi<sub>40</sub>(а-С)ГА-МК и ПТi<sub>40</sub>(а-С)МК нивелировались. Таким образом, введение во внутренний объем и осаждение на поверхность наночастиц гидроксиапатита, полученных путем механоактивации, привело к ухудшению остеоинтеграционных свойств пористого титана в условиях проведенных экспериментов *in vivo*.

**В главе 6** было продемонстрировано, что использование универсальной программной системы конечно-элементного анализа ANSYS 16.0, предназначенной 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 также при замещении этих дефектов пористыми титановыми имплантатами с алмазоподобными пленками, насыщенными миелокариоцитами. 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.

## Выводы

1. Пористый титан с алмазоподобными и композитными пленками не токсичен *in vitro* для миелокариоцитов, активно адгезирующих и пролиферирующих на данных композитах, формирующих 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» (ПТi<sub>40</sub>(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 активизирует репаративный остеогенез на ранних сроках наблюдения и уменьшает дистрофические изменения в прилежащих к дефекту сегментах кости. Активность репаративного остеогенеза снижается в ряду ПТi<sub>40</sub>(a-C)МК > ПТi<sub>40</sub>(CN<sub>0,25</sub>)МК > ПТi<sub>40</sub>МК > 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 растяжение 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» отсутствовала клеточная атипия в костной ткани, костном мозге, лимфатических узлах, селезенке, 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 РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. **Макарова Э.Б.** Влияние различных образцов титана на адгезивную и метаболическую активность клеток костного мозга / Э.Б.Макарова, В.А.Мухачев, А.П.Рубштейн [и др.] // Травматология и ортопедия XXI века: сборник тезисов докладов 8 съезда травматологов-ортопедов России, г.Самара, 6-8 июня 2006 г. / под ред.акад.РАН и РАМН С.П.Миронова, акад.РАМН Г.П.Котельникова: в 2-х томах. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУВПО «Самарский ГМУ», 2006. – Т.1. – С.256-257.
2. **Макарова Э.Б.** Влияние различных образцов титана на адгезивную и метаболическую активность клеток костного мозга / Э.Б.Макарова, В.А.Мухачев, А.П.Рубштейн [и др.] // Травматология и ортопедия XXI века: сборник тезисов докладов 8 съезда травматологов-ортопедов России, г.Самара, 6-8 июня 2006 г. / под ред.акад.РАН и РАМН С.П.Миронова, акад.РАМН Г.П.Котельникова: в 2-х томах. – Самара: ООО «Офорт»; ГОУВПО «Самарский ГМУ», 2006. – Т.2. – С.1068.
3. Rubshtein A.P. [et al.] Adhesive and Metabolic Activity of Bone-Marrow Cells on Titanium and Titanium Modified by C and CN<sub>x</sub> Films / A.P.Rubshtein, I.Sh.Trakhtenberg, V.A.Yugov, A.B.Vladimirov, V.I.Novozonov, V.A.Osipenko, **Е.В.Макарова**, N.S.Petrovich, V.A.Muchachev // 8<sup>th</sup> international conference on modification of materials with particle beams and plasma flows, Tomsk, Russia, 10-15 september 2006. – Tomsk, 2006. – P.374-377.
4. Трахтенберг И.Ш. [и др.] Нанокompозитные покрытия на основе алмазоподобного углерода для повышения эффективности титановых биоимплантатов / И.Ш.Трахтенберг, А.П.Рубштейн, А.Б.Борисов, А.Б.Владимиров, А.В.Осипенко, **Э.И.Макарова**, В.А.Мухачев // 3 юбилейная Урало-Сибирская научно-промышленная выставка «Научно-промышленная политика и перспективы развития Урала и Сибири»: тезисы научно-практической конференции, 19-23 июня 2007 года, г.Екатеринбург. – Екатеринбург: РАН Уральское и Сибирское отделения, 2007. – С.319-320.
5. **Макарова Э.Б.**, Мухачев В.А., Осипенко А.В., Кудрявцева И.П., Рубштейн А.П., Трахтенберг И.Ш. Исследование биосовместимости имплантатов из пористого титана // Клеточные и нанотехнологии в биологии и медицине: материалы Всероссийской научно-практической конференции. – Курган, 2007. – С.63-65.
6. Trakhtenberg I.Sh., Rubshtein A.P., **Makarova E.B.**, Vladimirov A.B., Yugov V.A., Uemura K. Adhesion and metabolic processes of marrow cells on titanium surface with CN<sub>0,25</sub> film // New Diamond and Nano Carbons: International Conference, May 28-31, 2007, Senri Life Science Center Osaka, Japan: Abstract Book. – P.137.

7. **Trakhtenberg I.Sh., Rubshtein A.P., Makarova E.B., Vladimirov A.B., Yugov V.A., Uemura K. Adhesion and metabolic processes of marrow cells on titanium surface with CN<sub>0.25</sub> film // Diamond&Related Materials. – 2008. – Vol.17. – P.888-891.**
8. **Макарова Э.Б.** [и др.] Влияние различных покрытий образцов титана на культуры костномозговых стромальных клеток / Э.Б.Макарова, Е.Б.Трифонова, И.Л.Шлыков, А.В.Осипенко, А.П.Рубштейн, И.Ш.Трахтенберг, Н.С.Петрович, А.И.Исайкин // Материалы II съезда травматологов-ортопедов Уральского федерального округа. – Курган, 2008. – С.295-296.
9. **Trakhtenberg I.Sh. [et al.] Mechanical properties and the structure of porous titanium obtained by sintering compacted titanium sponge / I.Sh.Trakhtenberg, A.B.Borisov, V.I.Novozonov, A.P.Rubshtein, A.B.Vladimirov, V.A.Osipenko, V.A.Muchachev, E.B.Makarova // The Physics of Metals and Metallography. – 2008. – Т.105, № 1. – P.92-97.**
- 10.Трахтенберг И.Ш. [и др.] Механические свойства и структура системы пор титана, полученного спеканием компактированной губки / И.Ш.Трахтенберг, А.Б.Борисов, В.И.Новожинов, А.П.Рубштейн, А.Б.Владимиров, А.В.Осипенко, В.А.Мухачев, **Э.Б.Макарова** // Физика металлов и металловедение. – 2008. – Т.105, № 1. – С.99-104.
- 11.**Рубштейн А.П., Трахтенберг И.Ш., Макарова Э.Б., Осипенко А.В. Влияние нанокompозитных азотсодержащих углеродных пленок на формирование костной ткани в пористом титановом импланте, содержащем гидроксипатит // Перспективные материалы. – 2009. – № 3. – С.52-56.**
- 12.Рубштейн А.П., **Макарова Э.Б.**, Осипенко А.В., Трифонова Е.Б., Блинец Д.Г., Борисов А.Б. Полезная модификация поверхности металлических имплантатов нанокompозитными алмазоподобными углеродными и дотированными азотом пленками // Нано-2009: тезисы докладов третьей Всероссийской конференции по наноматериалам, 20-24 апреля 2009 года. – Екатеринбург, 2009. – С.791-793.
- 13.Рубштейн А.П., Трахтенберг И.Ш., **Макарова Э.Б.**, Осипенко А.В., Мухачев В.А. Модификация поверхности пористого титана та-С и нанокompозитными CN<sub>x</sub> пленками с целью улучшения медикобиологических свойств имплантатов // Материалы 9-ой Международной конференции «Пленки и Покрытия», 26-29 мая 2009. – СПб., 2009. – С.223-225.
- 14.Рубштейн А.П., Трахтенберг И.Ш., Борисов А.Б., Новожинов В.И., **Макарова Э.Б.**, Осипенко А.В. Влияние нанокompозитных пленок на основе алмазоподобного углерода на формирование клеточных структур из среды с экстракцией костного мозга // Научная сессия Института физики металлов УрОРАН по итогам 2008 года, 23-26 марта 2009 года: тезисы докладов. – Екатеринбург, 2009. – С.38-39.
- 15.**Макарова Э.Б.** [и др.] Использование аутологичных стромальных клеток на имплантах из пористого титана с нанопокpытиями / Э.Б.Макарова, А.И.Исайкин, А.П.Рубштейн, Д.Г.Блинец, Е.Б.Трифонова, И.Ш.Трахтенберг, А.В.Осипенко, И.Л.Шлыков // Лабораторная медицина в свете Концепции развития



- здравоохранения России до 2020 года: труды научно-практической конференции (Москва, 28-30 сентября 2009 г.). – М.: Лабора, 2009. – С.380-381.
16. **Трифонова Е.Б., Макарова Э.Б., Осипенко А.В., Гюльназарова С.В.** Роль остеотропных цитокинов в формировании остеопоротических изменений при иммобилизации // *Вестн.Уральской медицинской академической науки.* – 2009. – № 2 (25). – С.68-69.
  17. **Макарова Э.Б.** [и др.] Влияние различных нанопокровтий пористого титана на стромальные клетки / Э.Б.Макарова, А.П.Рубштейн, Е.Б.Трифонова, И.Л.Шлыков, А.В.Осипенко, И.Ш.Трахтенберг, А.И.Исайкин, Н.С.Киселева, Д.Г.Близнец // *Вестн.Уральской медицинской академической науки.* – 2009. – № 2 (25). – С.326-327.
  18. **Макарова Э.Б.,** Осипенко А.В., Близнец Д.Г., Рубштейн А.П., Трахтенберг И.Ш., Исайкин А.И. Влияние нанокompозитных углеродных пленок на формирование костной ткани в пористых титановых имплантах // *Человек и его здоровье: XIV Российский национальный конгресс, 20-23.10.2009: тезисы конгресса.* – СПб., 2009. – С.35-36.
  19. **Макарова Э.Б.,** Киселева Н.С., Кудрявцева И.П., Сметанкина М.А., Рубштейн А.П. Морфологические особенности строения регионарных лимфатических узлов при имплантации пористого титана с композитными нанопокровтиями и внедренными в поры частицами гидроксиапатита // *Вестник травматологии и ортопедии им.В.Д.Чаклина.* – 2010. – № 2. – С.85-88.
  20. **Макарова Э.Б.** Изучение остеointegrативных свойств пористых титановых имплантатов с нанопокровтиями // *Вестник травматологии и ортопедии им.В.Д.Чаклина.* – 2010. – № 2. – С.88-91.
  21. **Макарова Э.Б.,** Рубштейн А.П., Близнец Д.Г., Кудрявцева И.П. Экспериментально-теоретическое обоснование применения пористого титана с алмазным покрытием для замещения дефектов костной ткани // *Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии: сборник тезисов IV Всероссийского симпозиума с международным участием, 21-22 апреля 2010 года, Санкт-Петербург; под ред. акад.РАН и РАМН С.П.Миронова.* – СПб.: Изд-во «Человек и его здоровье», 2010. – С.90-91.
  22. **Rubshtein A.P., Trakhtenberg I.Sh., Makarova E.B.** Surface Modification of Biological Implants by Diamond-Like (DLC) and Nanocomposite (CN<sub>0,25</sub>) Carbon Films // *10<sup>th</sup> International Conference on Modification of Materials with Particle Beams and Plasma Flows: Proceedings, Tomsk, Russia, 19-24 September 2010.* – Tomsk: Publishing House of the IOA SB RAS, 2010. – P.372-375.
  23. **А.П.Рубштейн, Трахтенберг И.Ш., Макарова Э.Б., Близнец Д.Г.** Экспериментальное обоснование применения нанопокровтий на основе алмазоподобного углерода в биомедицине // *Нанотехнологии функциональных материалов (НФМ'10): труды международной научно-технической конференции.* – СПб.: Изд-во Политехн.ун-та, 2010. – 131-132.

24. **Макарова Э.Б., Рубштейн А.П. Использование пористого титана с алмазоподобным покрытием для создания имплантов костной ткани // Клиническая лабораторная диагностика. – 2010. – № 10. – С.11-12.**
25. **Макарова Э.Б.** [и др.] Влияние модификации поверхности пористого титанового имплантата алмазоподобной пленкой на свойства новообразованной костной ткани / Э.Б.Макарова, И.П.Кудрявцева, М.А.Сметанкина, Е.Б.Трифонова, А.П.Рубштейн, И.Ш.Трахтенберг, Д.Г.Близнец // Вестник травматологии и ортопедии им.В.Д.Чаклина. – 2010. – № 3. – С.39-45.
26. **Макарова Э.Б., Рубштейн А.П., Близнец Д.Г.** Пористые титановые имплантаты с алмазоподобным покрытием для замещения костной ткани // Международный журнал экспериментального образования. – 2011. – № 3. – С.142-143.
27. **Макарова Э.Б., Киселева Н.С., Сметанкина М.А., Близнец Д.Г., Рубштейн А.П., Крохина Н.Б.** Сравнительная характеристика морфологической структуры лимфатических узлов кроликов при имплантации пористого титана с композитным нанопокрывтием и внедренными в поры частицами гидроксиапатита // Бюл.экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т.151, № 4.– С.470-473.
28. **Rubshtein A.P., Trakhtenberg I.S., Makarova E.B. Influence of surface modification of orthopedic implants by nanocomposite carbon nitride on their properties // Eur.J.Natur.History. – 2011. – № 2. – P.53-54.**
29. **Макарова Э.Б., Трифонова Е.Б., Близнец Д.Г., Галкин П.В., Рубштейн А.П., Трахтенберг И.Ш.** Сравнение биосовместимости алмазоподобных покрытий титана // Материалы 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», 8-10 июня 2011 года. – Курган, 2011. – С.495.
30. **Киселева Н.С., Макарова Э.Б.** Особенности морфологической структуры лимфатических узлов кроликов при имплантации пористого титана с углеродсодержащим нанопокрывтием и внедренными в поры частицами гидроксиапатита // Медицинская иммунология. – 2011. – Т.13, № 4-5. – С.316-317.
31. **Макарова Э.Б.** [и др.] Биосовместимость образцов титана с алмазоподобными покрытиями с культурой периферических лейкоцитов человека / Э.Б.Макарова, А.П.Рубштейн, Е.Б.Трифонова, И.Ш.Трахтенберг, А.В.Осипенко, С.А.Плотников, Ю.Р.Хузагалеева, П.В.Галкин // Достижения, инновационные направления, перспективы развития и проблемы современной медицинской науки, генетики и биотехнологий: материалы 1 Международной научно-практической конференции, 31 марта 2011 года. – Екатеринбург, 2011. – С.170.
32. **Рубштейн А.П., Владимиров А.Б., Трахтенберг И.Ш., Макарова Э.Б., Плотников С.А., Кудрявцева И.П.** Перспективы применения пленок на основе алмазоподобного углерода для модификации поверхности изделий медицинского назначения // Пленки и покрытия – 2011: труды 10-й

- международной конференции, 31 мая – 3 июня 2011 года. – СПб.: Изд-во Политехнического ун-та, 2011. – С.129-131.
33. Рубштейн А.П., Трахтенберг И.Ш., Волкова Е.Г., **Макарова Э.Б.** Свойства наноразмерного порошка гидроксиапатита, полученного путем механоактивации // Создание и перспективы использования нанокристаллических материалов и нанотехнологий в промышленности: сборник тезисов докладов, представленных на XII Международную конференцию «Дислокационная структура и механические свойства металлов и сплавов», 13-16 июня 2011 года.–Екатеринбург: ИФМ УрО РАН, 2011.–С.86-87.
34. **Макарова Э.Б., Захаров Ю.М., Рубштейн А.П., Исайкин А.И.** Интеграция костной ткани в пористые титановые импланты с алмазоподобными нанопокрывтиями // *Гений ортопедии.* – 2011. – № 4. – С.116-121.
35. 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.
36. **Rubstein A.P. Osseointegration of porous titanium modified by diamond-like carbon and carbon nitride / A.P.Rubstein, E.B.Makarova, I.Sh.Trakhtenberg, I.P.Kudryavtseva, D.G.Bliznets, Yu.I.Philippov, I.L.Shlykov // Diamond&Rel.Mat. – 2012. – Vol.22. – P.128-135.**
37. Трахтенберг И.Ш. [и др.] Имплантат из пористого материала на основе титана с покрытием / И.Ш.Трахтенберг, А.П.Рубштейн, А.Б.Борисов, В.И.Новоженков, **Э.Б.Макарова**, А.В.Осипенко, И.Л.Шлыков, В.А.Мухачев // 40 Международная выставка изобретений в Женеве «INVENTIONS GENEVA»: каталог экспозиции коллективного стенда Свердловской области. – 2012. – С.44-45.
38. **Макарова Э.Б., Рубштейн А.П., Захаров Ю.М.** Применение алмазоподобных пленок для улучшения остеоинтегративных свойств пористых титановых имплантов // V Троицкая конференция «Медицинская физика и инновации в медицине» (ТКИФ-5): сборник материалов, г.Троицк Московской области, 4-8 июня 2012 года. – Том 2. – Троицк, 2012. – С.49-51.
39. **Макарова Э.Б., Захаров Ю.М., Рубштейн А.П.** Особенности метаболических провесов в костной ткани при использовании композитных имплантатов из пористого титана с алмазоподобным нанопокрывтием // *Гений ортопедии.* – 2012. – № 3. – С.147-149.
40. 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.
41. **Makarova E.B., Rubstein A.P., Trakhtenberg I.Sh., Kisilyova N.S., Bliznets D.G.** Osteointegration of Titanium Porous Implants with Carbon Nanocoating and Hydroxyapatite Particles into the Pores // *Hydroxyapatite: synthesis, properties and applications / editors Valeri S.Gshalaev and Aleksandra C.Demirchan.* – New York, 2012. – Chapter XIII. – P.431-445.

42. 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.
43. Осипенко А.В., Трифонова Е.Б., **Макарова Э.Б.** Патогенетические механизмы регенерации и ремоделирования костной ткани. Обзор литературы и собственные данные // Вестник травматологии и ортопедии Урала. – 2012. – № 3-4. – С.94-99.
44. **Макарова Э.Б.** [и др.] Экспериментальное обоснование использования биокомпозитных имплантатов из пористого титана, модифицированных алмазоподобными покрытиями для замещения костной ткани / Э.Б.Макарова, Ю.М.Захаров, А.П.Рубштейн, А.В.Громов, М.С.Бартов, А.С.Карягина, В.Г.Лунин // Технологии оптимизации процесса репаративной регенерации в травматологии, ортопедии и нейрохирургии: сборник тезисов Всероссийской научно-практической конференции / под ред. д.м.н., проф. И.А.Норкина, г.Саратов, 25-26 апреля 2013 года. – Саратов, 2013. – С.25-27.
45. **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.
46. **Макарова Э.Б.,** Сафонова Г.Д., Рубштейн А.П. Влияние различных алмазоподобных покрытий на функцию остеогенных клеток *in vivo* // Вестник травматологии и ортопедии Урала. – 2013. – № 1-2. – С.84-88.
47. **Макарова Э.Б.** и др. Создание и обоснование применения биоимплантатов с использованием нанотехнологий / Э.Б.Макарова, И.Л.Шлыков, Д.Г.Близнец, З.И.Горбунова, А.П.Рубштейн, И.Ш.Трахтенберг, А.В.Громов, М.С.Бартов, А.С.Карягина // Сборник научных трудов XVI съезда ортопедов-травматологов Украины, г. Харьков, 3-5 октября 2013 года. – Харьков, 2013. – С.39-40.
48. Кудрявцева И.П., Сафонова Г.Д., **Макарова Э.Б.** Репаративная регенерация костной ткани при использовании имплантатов из пористого титана с алмазоподобной пленкой (экспериментально-морфологическое исследование) // Вестник травматологии и ортопедии Урала: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием, 10-12 октября 2013, г.Екатеринбург. – 2013. – № 3-4. – С.77-78.
49. **Макарова Э.Б.,** Захаров Ю.М., Сафонова Г.Д., Рубштейн А.П. Оценка остеоиндуктивных свойств алмазоподобных покрытий *in vivo* // XXII съезд физиологического общества имени И.П.Павлова: тезисы докладов, 16-20 сентября 2013 года. – Москва-Волгоград, 2013. – С.317.
50. **Макарова Э.Б., Захаров Ю.М., Киселева Н.С., Блинкова Н.Б., Рубштейн А.П.** Характеристика регионарных лимфатических узлов при замещении дефектов костной ткани пористыми титановыми имплантатами // **Российский иммунологический журнал.** – 2013. – Том 7(16), № 2-3(1). – С.64-66.
51. **Rubshtein A.P.** [et al.] Porous material based on spongy titanium granules: Structure, mechanical properties, and osseointegration // **A.P.Rubshtein,**

- I.Sh.Trakhtenberg, E.B.Makarova, E.B.Triphonova, D.G.Bliznets, L.I.Yakovenkova, A.B.Vladimirov // Materials Science and Engineering C 35 (2014) 363-369.**
52. **Макарова Э.Б., Захаров Ю.М., Блинкова Н.Б., Киселева Н.С., Рубштейн А.П., Кобылкин К.С. Реакция периферических органов лимфатической системы на внедрение пористых титановых имплантатов к костную ткань // Российский иммунологический журнал.–2014.–Том 8(17), № 2(1).–С.99-101.**
53. **Макарова Э.Б.** [и др.] Создание и обоснование применения биоимплантатов с использованием пористого титана с алмазоподобными покрытиями // Э.Б.Макарова, Ю.М.Захаров, И.Л.Шлыков, Д.Г.Близнаец, А.П.Рубштейн, А.В.Громов, М.С.Бартов, А.С.Карягина // X юбилейный Всероссийский съезд травматологов-ортопедов, Москва, 16-19 сентября 2014 года: сборник материалов ООО «АТОР». – М.: ЦИТО, 2014. – С.514.
54. **Макарова Э.Б.** [и др.] Титан биоинертен? / Э.Б.Макарова, Ю.М.Захаров, Н.Б.Блинкова, Н.С.Киселева, А.П.Рубштейн, И.П.Кудрявцева, М.А.Корч // Вестник травматологии и ортопедии Урала. – 2014. – № 1-2. – С.14-21.
55. **Rubshtein A.P., Vladimirov A.B., Makarova E.B., Plotnikov S.A.** Osseointegration and elastic properties of porous titanium – diamond-like carbon – bone tissue composite // International Congress on Energy Fluxes and Radiation Effects: Abstracts. – Tomsk: Publishing House of IAO SB RAS, 2014. – P.334.
56. **Rubshtein A.P., Makarova E.B., Rinkevich A.B., Medvedeva D.S., Yakovenkova L.I., Vladimirov A.B.** Elastic properties of a porous titanium-bone tissue composite // **Materials Science and Engineering C 52 (2015) 54-60.**
57. **Макарова Э.Б., Кобылкин К.С., Рубштейн А.П.** Моделирование напряженно-деформированного состояния бедренной кости при внедрении пористого титанового имплантата с алмазоподобными пленками, насыщенного миелокароцитами // Актуальные вопросы оказания травматолого-ортопедической помощи при травмах и заболеваниях костей и суставов: материалы Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Чаклинские чтения – 2015», Екатеринбург, 22-23 октября 2015 года. – С.55-57.
58. **Макарова Э.Б., Захаров Ю.М., Осипенко А.В., Кудрявцева И.П., Рубштейн А.П., Корч М.А.** Особенности формирования костной ткани на титановых матриксах с алмазным покрытием *in vitro* и *in vivo* // Клеточные технологии – практическому здравоохранению, 2015: материалы IV межрегиональной научно-практической конференции, 21-23 октября 2015 г. – Екатеринбург, 2015. – С.52-56.

#### ПАТЕНТЫ РФ

1. Пат. на полезную модель 90678 РФ, МПК<sup>11</sup> 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.
2. Пат. 2471248 РФ, МПК G 09 В 23/28. Способ оценки прочности на разрыв системы кость-имплант в условиях остеоинтеграции / А.П.Рубштейн, И.Ш.Трахтенберг, **Э.Б.Макарова**, В.А.Мухачев А.Н.Челноков; Учреждение Российской академии наук Ордена Трудового Красного Знамени Институт физики металлов Уральского отделения РАН, ФГУ «Уральский НИИТО им.В.Д.Чаклина» Минздрава и соцразвития Российской Федерации. – № 2011130132/14; заявл.19.07.2011; опубл.27.12.2012, Бюл.№ 36 – 11 с.
  3. Пат. на полезную модель 129795 РФ, МПК<sup>11</sup> А 61 В 17/56. Транспедикулярный винт с покрытием из алмазоподобного углерода / И.Л.Шлыков, К.А.Бердюгин, **Э.Б.Макарова**, А.П.Рубштейн, И.Ш.Трахтенберг, А.Б.Владимиров (РФ). – № 2013105671/14; заявл.11.02.2013; опубл.10.07.2013, Бюл. № 19. – 2 с.
  4. Пат. на полезную модель 133406 РФ, МПК<sup>11</sup> А 61 В 17/60. Стержень для чрескостного остеосинтеза / С.В.Гюльназарова, **Э.Б.Макарова**, А.А.Ганжа, А.П.Рубштейн, И.Ш.Трахтенберг (РФ). – № 2013125595/14; заявл.03.06.2013; опубл.20.10.2013, Бюл. № 29. – 1 с.
  5. Пат. на полезную модель 133407 РФ, МПК<sup>11</sup> А 61 В 17/72. Интрамедуллярный стержень с покрытием из алмазоподобного углерода / И.Л.Шлыков, К.А.Бердюгин, **Э.Б.Макарова**, А.П.Рубштейн, И.Ш.Трахтенберг, А.Б.Владимиров (РФ). – № 2013125597/14; заявл.03.06.2013; опубл.20.10.2013, Бюл. № 29. – 1 с.
  6. Пат. на полезную модель 133717 РФ, МПК<sup>11</sup> А 61 В 17/56. Пластина для накостного остеосинтеза / И.Л.Шлыков, К.А.Бердюгин, **Э.Б.Макарова**, А.П.Рубштейн, И.Ш.Трахтенберг, А.Б.Владимиров (РФ). – № 2013125600/14; заявл.03.06.2013; опубл.27.10.2013, Бюл. № 30. – 1 с.
  7. Пат. на полезную модель 135251 РФ, МПК<sup>11</sup> А 61 В 17/60. Стержень для чрескостного остеосинтеза с покрытием / С.В.Гюльназарова, **Э.Б.Макарова**, А.А.Ганжа, А.П.Рубштейн, И.Ш.Трахтенберг (РФ). – № 2013136592/14; заявл.05.08.2013; опубл.10.12.2013, Бюл. № 34. – 1 с.
  8. Пат. на полезную модель 151211 РФ, МПК<sup>11</sup> А 61 В 17/56. Резьбовой стержень для аппарата внешней фиксации при лечении повреждений задних отделов таза / К.А.Бердюгин, И.Л.Шлыков, А.В.Рунков, **Э.Б.Макарова**, А.П.Рубштейн, А.Б.Владимиров (РФ). – № 2014138845/14; заявл.25.09.2014; опубл.27.03.2015, Бюл. № 9. – 1 с.
  9. Пат. на полезную модель 154335 РФ, МПК<sup>11</sup> А 61 F 2/32. Эндопротез тазобедренного сустава с покрытием / К.А.Бердюгин, И.Л.Шлыков, **Э.Б.Макарова**, А.П.Рубштейн, А.Б.Владимиров, О.В.Бердюгина (РФ). – № 2014140639/14; заявл.07.10.2014; опубл.20.08.2015, Бюл. № 23. – 1 с.
  10. Пат. на полезную модель 154362 РФ, МПК<sup>11</sup> А 61 F 2/38. Эндопротез коленного сустава с покрытием / К.А.Бердюгин, И.Л.Шлыков, **Э.Б.Макарова**, А.П.Рубштейн, А.Б.Владимиров, О.В.Бердюгина (РФ). – № 2014140625/14; заявл.07.10.2014; опубл.20.08.2015, Бюл. № 23. – 1 с.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БОЕ-э	–	бурстобразующая эритроидная единица
ДКМ	–	декальцинированный костный матрикс
КД	–	краевой дефект кости, незаполненный имплантатом
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
ПТi <sub>40</sub>	–	цилиндрические пористые титановые имплантаты, пористость 40%
ПТi <sub>40</sub> МК	–	цилиндрические пористые титановые имплантаты (пористость 40%) насыщенные прилипающей фракцией аутомиелокариоцитов, с последующим культивированием в течение 14 суток
ПТi <sub>40</sub> (а-С)	–	цилиндрические пористые титановые имплантаты (пористость 40%) с нерезорбируемой алмазоподобной углеродной пленкой
ПТi <sub>40</sub> (а-С)МК	–	цилиндрические пористые титановые имплантаты ( пористость 40%) с нерезорбируемой алмазоподобной углеродной пленкой, насыщенные прилипающей фракцией аутомиелокариоцитов, с последующим культивированием в течение 14 суток
ПТi <sub>30</sub> (а-С)□МК	–	трапецевидные в сечении пористые титановые имплантаты (пористость 30%) с нерезорбируемой алмазоподобной углеродной пленкой, насыщенные прилипающей фракцией аутомиелокариоцитов, с последующим культивированием в течение 14 суток
ПТi <sub>40</sub> (а-С)□МК	–	трапецевидные в сечении пористые титановые имплантаты (пористость 40%) с нерезорбируемой алмазоподобной углеродной пленкой, насыщенные прилипающей фракцией аутомиелокариоцитов, с последующим культивированием в течение 14 суток
ПТi <sub>50</sub> (а-С)□МК	–	трапецевидные в сечении пористые титановые имплантаты (пористость 50%) с нерезорбируемой алмазоподобной углеродной пленкой, насыщенные прилипающей фракцией аутомиелокариоцитов, с последующим культивированием в течение 14 суток
ПТi <sub>40</sub> (а-С)ГА-МК	–	цилиндрические пористые титановые имплантаты (пористость 40%) с нерезорбируемой алмазоподобной углеродной пленкой, с внедренными в поры наночастицами гидроксиапатита, насыщенные прилипающей фракцией аутомиелокариоцитов, с последующим культивированием в течение 14 суток
ПТi <sub>40</sub> (СN <sub>0,25</sub> )МК	–	цилиндрические пористый титановый имплантат (пористость 40%) с углеродсодержащей нерезорбируемой композитной пленкой состава углерод-азот, азота 0,20 ат.%, насыщенные прилипающей фракцией аутомиелокариоцитов, с последующим культивированием в течение 14 суток
рчКМБ-2	–	рекомбинантный человеческий костный морфогенетический белок -2
θ	–	объемная доля пор

**МАКАРОВА**  
**Эмилия Борисовна**

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ  
ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ  
ПОРИСТЫМИ ТИТАНОВЫМИ ИМПЛАНТАТАМИ  
С УГЛЕРОДСОДЕРЖАЩИМИ НЕРЕЗОРБИРУЕМЫМИ  
НАНОПОКРЫТИЯМИ**

14.03.03 – патологическая физиология

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
доктора медицинских наук

Автореферат напечатан по решению диссертационного совета Д 208.102.03  
ГБОУ ВПО УГМУ Минздрава России от 10 декабря 2015 года.