

Федеральное государственное бюджетное
Образовательное учреждение высшего образования
«Омский государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации

На правах рукописи



Рождественский
Андрей Александрович

**ЗАМЕЩЕНИЕ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ БИОАКТИВНЫМИ
КОМБИНИРОВАННЫМИ ФОСФАТ-СИЛИКАТНЫМИ
ИМПЛАНТАТАМИ
(экспериментальное исследование)**

3.1.8 – травматология и ортопедия

ДИССЕРТАЦИЯ
на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Дзюба Герман Григорьевич

Омск – 2024

ВВЕДЕНИЕ	4
ГЛАВА 1 ПРОБЛЕМА ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ (обзор литературы)	12
1.1 Общие сведения	12
1.2 Биоматериалы природного происхождения	14
1.3 Использование клеточных технологий для стимуляции остеогенеза	16
1.4 Имплантаты на основе минеральных комплексов для замещения дефектов костной ткани	21
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	28
2.1 Описание исходных материалов для получения гранулированных имплантатов	29
2.2 Методы исследования состава, морфологии и свойств исходных порошков и гранул	30
2.3 Этапы экспериментального исследования на животных	33
2.4 Модель эксперимента	35
2.5 Методы исследования	37
2.6 Статистическая обработка данных	40
ГЛАВА 3 ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ КОМПОЗИТНОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ И СИЛИКАТОВ КАЛЬЦИЯ.	43
3.1 Получение композитного материала	43
3.2 Результаты исследования фазового и функционально-группового состава гранул	47
3.3 Результаты исследования дисперсного состава и морфологии гранул	51
3.4 Результаты изучения физических свойств гранул	55
ГЛАВА 4 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ГРУППАХ	58
4.1 Способ получения стандартизированного дефекта костной ткани в условиях эксперимента	58
4.2 Клинические и лабораторные исследования	60
4.3 Оценка результатов исследования в группах	62
4.3.1 Результаты исследований в группе № 1 (группа контроля)	62
4.3.2 Результаты исследований в группе № 2	67
4.3.3 Результаты исследований в группе № 3	73
4.3.4 Результаты исследований в группе № 4	78

Глава 5	СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ГРУППАХ	85
5.1	Сравнение данных лабораторных исследований	85
5.2	Сравнение рентгенологической плотности новообразованной ткани	87
5.3	Сравнение данных, полученных методом РЭМ – ЭДА	91
5.4	Корреляция количества микроэлементов и плотности новообразованной ткани	96
5.4	Данные морфометрических исследований	98
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		101
ВЫВОДЫ		109
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ		111
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:		112
ПРИЛОЖЕНИЕ А		140
ПРИЛОЖЕНИЕ Б		141
ПРИЛОЖЕНИЕ В		142
ПРИЛОЖЕНИЕ Г		143

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Одним из направлений современной травматологии и ортопедии является разработка и получение материалов для заполнения и восстановления костных дефектов, возникающих в результате травм, заболеваний (таких как остеопороз, остеомиелит и т.д.) и/или хирургических вмешательств [8, 12, 13, 22, 41, 55, 75, 161, 165]. По данным литературы свыше 1,5 млрд человек в мире страдают различными остеодеструктивными заболеваниями, которые нуждаются в выполнении оперативного лечения с целью восполнения сформировавшегося дефицита костной ткани [63, 139]. По данным Global View Research объем рынка биоматериалов в 2017 году составлял \$83,9 млрд, прогнозируется, что к 2025 году он увеличится в три раза и достигнет \$240 млрд [33]. По отечественным данным рынок биоматериалов в РФ также непрерывно растет и к 2025 году должен достичь 979 млн. рублей [38, 63].

В настоящее время считается, что в месте дефекта имплантат выполняет временные опорные функции и выступает в роли каркаса для роста костной ткани, постепенно растворяясь в среде организма и оптимизируя при этом остеогенез [126, 166, 175, 187]. В связи с этим современные материалы для имплантации должны обладать высокой биосовместимостью, взаимосвязанной пористостью, способностью деградировать в организме человека, а также механическими свойствами (прочность, жесткость и т.д.), позволяющими выдерживать необходимые физические нагрузки. Через определенное время после имплантации такого материала дефект должен быть полностью замещен новообразованной костной тканью [25, 30, 49, 55, 61, 81, 102, 140, 152, 173, 192].

Степень разработанности темы диссертации

Известно, что кость представляет собой композит, состоящий из нанокристаллов биоапатита и органического матрикса. В связи с этим актуально и востребовано получение материалов на основе фосфатов кальция (ФК), в частности гидроксиапатита (ГА), в виде плотной керамики, цементов, пористых матриксов и гранул на его основе и применение их в клинической практике. Оптимальным

вариантом имплантатов являются сферические гранулы, обеспечивающие рыхлое заполнение костной полости за счёт использования частиц различных размеров, а также возможность введения во внутригранульное пространство лекарственных препаратов для их пролонгированного выделения в месте имплантации. Материалы на основе ГА обладают крайне низкой скоростью резорбции и могут оставаться в месте имплантации в течение продолжительного периода времени.

С целью достижения оптимального баланса между репаративными процессами в костной ткани и резорбцией материала предлагается получение смесей ГА с более растворимыми веществами, в числе которых может рассматриваться силикат кальция (СК), в частности волластонит (ВТ). Данная группа солей содержит анионы SiO_3^{2-} , которые участвуют в формировании органической матрицы кости на начальных этапах её кальцификации, ускоряют процесс усвоения катионов Ca^{2+} и инициируют минерализацию. Однако данные о получении объемных биоматериалов на основе смесей ФК и СК немногочисленны. В этой связи актуально создание и исследование композитов, изготовленных на основе фосфатов и силикатов кальция с целью ускорения остеорегенераторных процессов.

Цель исследования

оптимизация репаративного остеогенеза в метафизарном дефекте бедренной кости путем использования биоактивных имплантатов на основе варьируемого сочетания фосфатов и силикатов кальция в эксперименте

Задачи исследования

1. Изучить физико-химические свойства гранулированных имплантатов с различным массовым соотношениями фосфата и силиката кальция.
2. Разработать экспериментальную модель стандартизированного посттравматического метафизарного компрессионного костного дефекта бедренной кости.

3. Исследовать клинико-рентгенологическую динамику показателей при имплантации фосфатно-кремниевого композита в условиях эксперимента.
4. Сравнить динамику распределения минералов в структуре новообразованной ткани при замещении экспериментального костного дефекта имплантатами с различными соотношениями фосфата и силиката кальция и оценить взаимосвязь с данными МСКТ.
5. Изучить морфологические характеристики новообразованной костной ткани и, с учетом комплекса полученных данных, установить оптимальное соотношение ФК и СК в имплантируемом материале.

Научная новизна исследования

Изготовлены гранулированные имплантаты с различными массовыми соотношениями фосфатов и силикатов кальция (60/40, 50/50, 40/60 масс.% соответственно), а также изучены их физико-химические свойства (плотность, пористость, удельный вес) для дальнейшего исследования их влияния на процессы формирования костной ткани.

Разработан оригинальный способ моделирования посттравматического отграниченного компрессионного костного дефекта бедренной кости и внедрен в экспериментальное исследование.

Впервые выявлены корреляционные связи между динамикой рентгенологических показателей плотности костного регенерата и стадийностью накопления в нем ионов кальция, фосфора и кремния.

С использованием гистоморфометрического исследования определены показатели фрактальности, лакунарности и площади новообразованной ткани при замещении компрессионного костного дефекта биокерамическими имплантатами с различными массовыми соотношениями гидроксиапатита и волластонита.

Определено оптимальное соотношение фосфатов и силикатов кальция в структуре имплантируемого материала.

Положения, выносимые на защиту

1. Накопление ионов кальция, фосфора и кремния находится в прямой сильной корреляционной связи с рентгенологическими показателями плотности костного регенерата и изменяется в соответствии с процессами регенерации и специализации структур в зоне сформированного метафизарного дефекта.
2. Синтетические гранулы, содержащие в своем составе фосфат кальция (гидроксиапатит) и силикат кальция (волластонит) в соотношении 60/40 масс. % обладают лучшим регенераторным эффектом, по сравнению с гранулами, содержащими в своем составе фосфат и силикат кальция в соотношении 40/60 и 50/50 масс % соответственно

Теоретическая и практическая значимость работы

В ходе выполнения работы разработан биоактивный резорбируемый имплантат, предназначенный для восполнения дефектов костной ткани, сочетающий в своем составе оптимальное соотношение фосфатов и силикатов кальция.

Выявленные особенности процессов репаративного остеогенеза и динамики органотипической перестройки структур посткомпрессионного костного дефекта при имплантации фосфат-силикатных комплексов позволили экспериментально оценить эффективность и безопасность применения полученных материалов. Разработанный в ходе настоящего исследования биокомпозит в перспективе может быть внедрен в клиническую практику травматолого-ортопедических отделений многопрофильных стационаров, а также может быть основой для дальнейшего изучения влияния микроэлементов на процессы формирования костной ткани.

Методология и методы исследования

Диссертационная работа основана на экспериментальном исследовании. Проведен анализ результатов применения фосфат-силикатных имплантатов с целью замещения костного дефекта. Выполнено сравнение данных

мультиспиральной компьютерной томографии (МСКТ), растровой электронной микроскопии с энергодисперсионным анализом (РЭМ-ЭДА) и гистологических исследований с морфометрическим анализом. При выявлении корреляционных связей показателей рентгенологической плотности, количества микроэлементов в структуре новообразованной ткани и ее гистологических характеристик произведена оценка влияния имплантатов с различным сочетанием фосфатов и силикатов кальция в своем составе на процесс репаративной регенерации костной ткани.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программного обеспечения Microsoft Excel 2020 и пакета прикладных программ «STATISTICA 10.0». Числовые данные в работе представлены в виде медианы [нижнего; верхнего квартиля] ($Me [LQ; HQ]$), среднего \pm стандартного отклонения ($M \pm m$).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность полученных результатов исследования основана на необходимом объеме экспериментальных данных, достаточном количестве животных, необходимых для получения достоверных данных, определенном по формуле F. Lopez-Jimenez. Анализ полученных результатов проведен с корректным использованием современных статистических методов. Выводы аргументированы и соответствуют поставленным задачам. Заключение и практические рекомендации основаны на результатах диссертационной работы, научно обоснованы, опубликованы в журналах и обсуждены на конференциях, в том числе с международным участием.

Апробация основных положений диссертации

Основные материалы и положения работы представлены и обсуждены на 17 российских конференциях и научных форумах, в том числе с международным участием, в числе которых:

- Региональная научно-образовательная и практическая конференция «Современный взгляд на остеопороз: диагностика, лечение, профилактика.

Перспективы развития Центров профилактики повторных переломов в Российской Федерации и Омской области» (2018, Омск);

- Всероссийская научно-образовательная конференция «Научные достижения и современные технологии в Российской травматологии и ортопедии» (2019, Омск);
- Российский нейрохирургический фестиваль «Нейрофест 5 стихий» (2019, Екатеринбург);
- III межрегиональная научно-образовательная конференция, посвященная памяти профессора Л. Б. Резника «Практические и теоретические вопросы в профилактике повторных переломов при остеопорозе» (2019, Омск);
- XI Всероссийская научно – практическая конференция с международным участием «Цивьяновские чтения» (2019, Новосибирск);
- IV Межрегиональная научно-образовательная и практическая конференция, посвящённая памяти профессора Л. Б. Резника «Патологические низкоэнергетические переломы позвоночника: остеосинтез и оптимизация остеогенеза» (2021, Омск);
- XV международная IEEE научно-техническая конференция (2021, Омск);
- VIII Всероссийская научно – практическая конференция молодых ученых и студентов с международным участием «VolgaMedScience» (2022, Омск);
- Всероссийская научно-практическая конференция, посвященная памяти проф. А.Н. Горячева «Современные технологии профилактики и лечения осложнений в травматологии и ортопедии» (2022, Омск);
- VI Съезд травматологов ортопедов Сибирского федерального округа (2022, Барнаул);
- Всероссийская конференция с международным участием «7 Пироговский форум травматологов-ортопедов» (2022, Республика Дагестан);
- Межрегиональная научно-практическая конференция с международным участием «Политравма. Острые вопросы лечения повреждений опорно-двигательного аппарата вчера, сегодня и завтра» (2022, Благовещенск);
- XII Всероссийский съезд травматологов-ортопедов (2022, Москва);

- Региональная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы современной неврологии и нейрохирургии» (2022, Омск);
- Всероссийская научно-практическая конференция с международным участием «Цивьяновские чтения» (2023, Новосибирск);
- Международный ветеринарный форум «Один мир – одно здоровье: междисциплинарный подход к обеспечению благополучия животных, людей и окружающей среды» (2024, Омск)
- XIV международная научно-практическая конференция «Илизаровские чтения» «Этапная ортопедическая хирургия: плановая и ревизионная» (2024, Курган)

Публикации результатов исследования

По теме диссертационного исследования опубликовано 16 научных работ, из них 3 в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России, получено 2 патента Российской Федерации на изобретение (патент РФ № 2785143 от 05.12.2022 «Способ получения пористых сферических гранул на основе гидроксиапатита, волластонита и желатина», патент РФ № 2802431 от 28.08.2023 «Способ моделирования посттравматического компрессионного костного дефекта», получено 2 свидетельства о регистрации баз данных (свидетельство № 2023624160 от 24.11.2023 «Средние показатели рентгенологической плотности новообразованной костной ткани в зоне метафизарного дефекта», свидетельство № 2023624793 от 20.12.2023 «Количественный анализ Ca, P, Si в структуре новообразованной костной ткани при имплантации фосфат-силикатных гранул в зону метафизарного дефекта».

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа изложена на 143 страницах машинописного текста, иллюстрирована 64 рисунками и 11 таблицами и состоит из введения, пяти глав (обзора литературы, материалов и методов исследования, описания способа получения биоактивного имплантата, результатов исследования, выводов, списка

литературы, в котором приведены 194 источника, из которых 48 отечественных и 146 зарубежных.

Личный вклад автора. Автором самостоятельно проведен анализ научной литературы по теме диссертации, сформулированы цель и задачи исследования, разработаны способ получения композитного биоматериала на основе фосфатов и силикатов кальция, способ моделирования стандартизированного дефекта костной ткани, методология проведения экспериментального исследования. Автором лично проведены все операции на экспериментальных животных, осуществлен забор и подготовка макро- и микропрепаратов, выполнена статистическая обработка данных, обобщение и анализ полученных результатов, сделаны выводы.

Диссертационная работа выполнена в процессе обучения в аспирантуре при ФГБОУ ВО «ОмГМУ» Минздрава России в рамках государственного задания на проведение научных исследований и разработок на тему «Экспериментальное обоснование эффективности воздействия физических и биохимических факторов на процессы репаративной регенерации и специализации соединительной ткани (прикладная)», номер государственной регистрации АААА-А21-121011590005-1.

ГЛАВА 1 ПРОБЛЕМА ЗАМЕЩЕНИЯ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ (обзор литературы)

1.1 Общие сведения

Примерно 1,71 млрд человек в мире страдают различными заболеваниями и нарушениями формирования костно-мышечной системы, и, как следствие, общие расходы на оказание медицинской помощи населению в мирное время возросли до \$100 млрд в год, и эта сумма продолжает увеличиваться [63, 139]. В структуре затрат на здравоохранение мировой рынок биоматериалов, в том числе предназначенных для восполнения дефектов тканей, в 2017 году оценивался в \$83,9 млрд, а в дальнейшем, по данным Global View Research, ожидается постоянный существенный рост его объема, который по прогнозам к 2025 году увеличится примерно в 3 раза и составит \$240 млрд [33]. По отечественным данным рынок биоматериалов в РФ также непрерывно увеличивается и, к 2025 году должен достичь 979 млн. рублей [38, 63].

Дефекты костной ткани, сформировавшиеся в результате различных патологических процессов и оперативных вмешательств, как правило, нуждаются в восполнении с целью восстановления функций пораженных структур сегментов опорно-двигательного аппарата [13, 55, 75, 161, 165]. Полиэтиологический характер образования костных дефектов является основной причиной их высокой встречаемости при врожденных заболеваниях, последствиях травм, дегенеративно – дистрофических процессах, опухолевых поражениях, инфекциях костной ткани, а также некоторых вариантах оперативных вмешательств, в том числе бурно растущем числе эндопротезирований суставов [8, 12, 22, 41].

Используемые в костнопластических операциях биоматериалы достаточно быстро превратились из биологических инертных, в способные оказывать непосредственное стимулирующее влияние на остеобласты, остеокласты и другие клеточные элементы, а также потенцировать необходимые для регенерации специфические реакции, происходящие на молекулярном уровне [166, 187]. Идеальный материал для имплантации должен обладать способностями стимулировать остеогенную дифференцировку и индуцировать благоприятное

микроокружение [25, 55, 102, 152, 192]. Поэтому в настоящее время основной принцип разработки новых продуктов заключается в получении имплантата, способного создавать оптимальные условия или оказывать прямое активное стимулирующее действие на окружающую ткань [61, 81, 116, 192].

Изначально для замещения костных дефектов использовались материалы природного происхождения, среди которых различают: аутогенные ткани, взятые от одного организма; аллогенные ткани, взятые от другого организма одного вида; ксеногенные ткани, взятые от организма другого вида [2, 145]. Однако, общими неблагоприятными факторами, возникающими при использовании таких имплантатов, становятся риски ослабления донорской кости, отрицательные иммунные реакции, ограниченность исходного материала при замещении обширных кавитарных и сегментарных костных дефектов. Поэтому в последнее время большинство исследований были направлены на создание и изучение синтетических остеозамещающих материалов [34, 41], которые по влиянию на репаративную способность костной ткани можно разделить на три группы: биотолерантные, биоинертные и биоактивные [31].

Биотолерантные материалы (нержавеющие стали, сплавы из хрома, кобальта, молибдена и никеля, метакрилаты, полиметакрилаты) при имплантации характеризуются формированием массивной фиброзной оболочки, прорастающей и интимно связанной с самим имплантатом и отделяющей его поверхность от костной ткани. Репаративная регенерация кости происходит в обычные сроки на некотором расстоянии от имплантата и не имеет с ним прямой связи. Основными недостатками этой группы материалов является отсутствие свойств остеоиндуктивности, остеокондуктивности и тот факт, что при их использовании не происходит полноценной органотипической замены костной ткани. Кроме того, при использовании металлосодержащих имплантатов с течением времени неизбежно происходит частичная деградация металлов и свободные ионы могут привести к металлозам в зоне применения [31].

Биоинертные материалы (металлы и металлокерамика на основе оксидов титана, ванадия, циркония или алюминия) не вызывают образования периимплантной

фиброзной ткани и имеют на поверхности защитный слой, который препятствует выходу из имплантатов ионов и проникновению в него агрессивных молекул из окружающей биологической жидкости. В теории, биоинертные материалы не должны претерпевать изменений в своем составе и свойствах за всё время нахождения в организме, тем не менее на практике микрочастицы металла все же поступают в организм (из-за разрушения защитного слоя в результате нагрузок и деформаций), что может привести к развитию воспалительных реакций, а, следовательно, к последующей нестабильности конструкции с повышением риска развития патологических переломов [15].

Биоактивные материалы (кальций – фосфатная керамика, биостекла и другие соединения на основе кремния, полимеры, гели, композиционные материалы) обеспечивают образование сильной химической связи с костной тканью, способствуют её образованию, а также сами служат матрицей в месте имплантации, то есть обладают как остеоиндуктивными, так и остеокондуктивными свойствами. На сегодняшний день эта группа материалов видится самой перспективной, так как применение биоактивных имплантатов является наиболее благоприятным с точки зрения остеоинтеграции и формирования надежной костной структуры [64, 124, 130, 146].

1.2 Биоматериалы природного происхождения

Изначально для замещения костных дефектов использовались биоматериалы природного происхождения, среди которых различают: аутогенные ткани, взятые от одного организма; аллогенные ткани, взятые от другого организма одного вида; ксеногенные ткани, взятые от организма другого вида [2, 127, 142].

Идеальным материалом для остеопластики всегда считалась аутокость, имеющая ряд существенных преимуществ по сравнению с другими имплантами. Одним из основных приоритетных свойств аутокости является полное отсутствие иммунологических и инфекционных осложнений после имплантации, кроме того, аутотрансплантаты обладают не только хорошим остеокондуктивным и остеоиндуктивным эффектом, обусловленным наличием остеогенных клеток и клеток предшественников, но и способностью остеоинтеграции без формирования

отграничивающей капсулы вокруг имплантируемого материала [1, 5, 58, 85, 136, 180].

Согласно литературным данным в процессе интеграции имплантируемого материала выделяют три последовательных фазы: фазу ползущего замещения, во время которой в имплантируемой аутокости преобладают процессы деминерализации; фазу остеогенной регенерации, когда на поверхности резорбируемых костных структур формируется слабоминерализованная пластинчатая кость; фазу минерализации, которая сопровождается усиленным насыщением зон трансплантата биологически активными микро- и макроэлементами [9]. Аутооттрансплантат из гребня подвздошной кости является общепринятым «золотым стандартом» и его достаточно широко применяют с середины 20 века по настоящее время [17, 19, 24, 28, 61, 115, 133]. Но, к сожалению, применение аутологичной костной ткани не лишено недостатков. В послеоперационном периоде достаточно часто встречаются такие осложнения, как: развитие хронического болевого синдрома в зоне забора материала, неврологические нарушения, связанные с повреждением латерального кожного нерва, подвздошно-подчревного, подвздошно-пахового и бедренного нервов, перелом кости (донорского места), формирование гематом, сером, инфекционные поражения, а также выраженная резорбция аутооттрансплантата, которая может достигать 40% от исходного размера трансплантата. Помимо проблем, связанных с забором аутооттрансплантата и последующими осложнениями в послеоперационном периоде в зоне забора, отмечается, что у имплантируемых материалов с течением времени отмечается снижение прочностных характеристик, что может привести к перелому имплантата, возможной его миграции, что в свою очередь потребует повторного оперативного вмешательства [24, 52, 57, 88, 159, 170, 179, 182].

Костные аллоимплантаты все чаще используются из-за своей доступности. Существует три способа подготовки аллоимплантатов: нативный (с сохранением костной структуры и компонентов), деминерализованный (костный матрикс, лишенный минерального компонента) и депротеинизированный (костный матрикс,

лишенный органического компонента) [20, 35, 47, 56, 92, 163]. Аллокость лишена ряда недостатков, присущих применению аутологичной ткани во время оперативных вмешательств. Преимуществом аллокости является возможность заблаговременной подготовки трансплантируемого материала необходимой формы и размера к операции. Процессы интеграции аллокости протекают несколько иначе. Если аутокость обладает остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами, то аллокость, в большей степени остеокондуктивна, так как она лишена в своем составе остеопрогенераторных клеток и может играть лишь роль органической внеклеточной костной матрицы [11, 16, 18, 37, 51, 75, 86, 91, 93]. Репаративная регенерация костной ткани происходит параллельно с процессами резорбции, путем постепенного замещения новой костью оставшегося каркаса, вследствие вырабатываемых в зоне резорбции продуктов некроза, которые выполняют своеобразную роль биогенных стимуляторов – некрогормонов [36, 42, 50]. К недостаткам применения костных аллотрансплантатов можно отнести медленный процесс интеграции, дороговизну имплантатов и возможные ответные иммунологические реакции [15, 24, 48, 55].

1.3 Использование клеточных технологий для стимуляции остеогенеза

Одним из перспективных направлений регенеративной медицины признано использование клеточных технологий в сочетании с классическими хирургическими методами лечения. В настоящее время PRP (platelet rich plasma (плазма, обогащенная тромбоцитами) технология применяется во многих отраслях медицины: косметологии, флебологии, гинекологии, восстановительной медицине, травматологии и ортопедии [113, 186]. В 1965 году M. Urist впервые опубликовал данные исследования, подтверждающие регенераторный потенциал PRP основанный на эффекте местной стимуляции процессов остеогенеза, поскольку именно тромбоциты являются начальным компонентом клеточного ответа при восстановлении тканей [4, 44, 101, 114, 137, 160]. Представленная методика заключалась в введении в зону перелома аутологичной, обогащенной тромбоцитами плазмы крови. После введения из альфа-гранул тромбоцитов выделяются различные факторы роста (PDGF, VEGF, TGF, IGF-I, IGF-II, FGF и

другие) и биологически активные молекулы (эндостатины, ангиопоэтины и тромбоспиндин) [26, 82, 137, 167]. Ранняя клеточная активность, опосредованная тромбоцитами, индуцирует образование сгустка, хемотаксис лейкоцитов, стволовых клеток и участвует в ослаблении воспалительного ответа. Одновременное высвобождение факторов роста активно стимулирующее влияет на процессы регенерации костной ткани. Однако, PRP обладает существенным регенераторным эффектом исключительно при концентрации тромбоцитов, в 5 раз превышающей концентрацию в периферической крови, что требует определенных механизмов забора, подготовки и контроля имплантируемого материала [46, 23].

В 2011 году Г.А. Кесян с соавторами в своем исследовании подтвердил регенераторный потенциал применения PRP при лечении замедленно консолидирующихся и несросшихся переломов трубчатых костей. В ходе выполнения оперативного вмешательства автором выполнялось введение PRP совместно с препаратом на основе фосфата кальция (Коллапан), в 97% случаев были получены положительные результаты от использования данного комплекса, что привело к уменьшению сроков сращения на $11,0 \pm 2,3$ дня и $20,0 \pm 4,3$ дня соответственно [6].

В 2013 году группой ученых в ходе выполнения эксперимента изучался эффект влияния PRP на ранних этапах дистракционного остеогенеза. Авторы вводили в зону роста костной ткани обогащенную тромбоцитами плазму на 0-й, 10-й и 20-й дни эксперимента. Полученные результаты оценивали при помощи МСКТ и гистологический срезов (на 40-й день эксперимента), убедительных данных в пользу остеорегенеративного эффекта от PRP получено не было [97].

В «The spine journal» в 2017 были опубликованы результаты проспективного рандомизированного исследования, посвященного использованию PRP технологии в спинальной хирургии. В исследовании оценивали результаты лечения 62-х пациентов. Им в ходе выполнения оперативного вмешательства по поводу остеохондроза поясничного отдела позвоночника после удаления дегенеративно измененного диска выполнялся спондилодез с использованием аутокости и PRP. Результаты оценивали при помощи рентгенологических методов исследования

(рентгенография каждые 3 месяца и МСКТ каждые 12 месяцев). Согласно полученным данным спондилодез в группе с PRP произошел в более ранние сроки (7,8 месяца против 9,8 в группе контроля) и с большей площадью сращения (572мм^2 против 367мм^2) [141].

В 2020 году были опубликованы результаты мета-анализа, с выборкой в 460 пациентов, посвященные использованию PRP при выполнении спондилодеза. По полученным данным отмечено, что рентгенологические признаки сращения позвонков сформировались раньше в группе пациентов, которым спондилодез выполнялся с использованием PRP. При этом в клинической картине между исследуемыми группами не отмечалось достоверной разницы выраженности болевого синдрома по визуально – аналоговой шкале (ВАШ) [128, 174].

К недостаткам использования PRP технологии в клинической практике можно отнести отсутствие единой стандартизированной технологии её получения, так как по данным мета-анализов именно клеточный состав PRP имеет важнейшее значение в сроках формирования сращения костных структур, и ограничение применения PRP среди пациентов старшей возрастной группы, в связи с инволютивным снижением активности факторов роста. [129]. Также отмечается, что воздействие PRP на окружающие ткани оказывается в течение ограниченного промежутка времени, пока плазма находится в зоне инъекции [105, 128, 154]. В целом, в доступных публикациях пока не сформировано единого мнения об эффективности использования PRP технологии при лечении пациентов травматолого-ортопедического профиля.

В последние десятилетия подкожно-жировая клетчатка привлекает все больше внимания исследователей и врачей в качестве альтернативы костному мозгу, как источнику стволовых и прогениторных клеток для регенеративной медицины [121, 125, 144, 162]. Большой интерес к мультипотентным мезенхимальным стволовым клеткам (ММСК) вызван их установленными биологическими свойствами, а именно, выраженному трофическому действию в области повреждения тканей, секрецией биоактивных молекул, факторов роста, необходимых для регенерации поврежденных тканей, а также возможности

дифференцировки в различных направлениях (адипогенный, хондрогенный и остеогенные пути) [10, 14, 106, 168, 169, 172].

Впервые мультипотентные мезенхимальные стволовые клетки (ММСК) были описаны А. Я. Фриденштейном и его сотрудниками в стенах НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи в 1968 году [103, 120, 155, 158]. Традиционно для оптимизации процессов остеогенеза использовался материал, забираемый из костного мозга, чаще подвздошной, большеберцовой, бедренной кости или грудины. В 2001 – 2002 годах группа авторов, во главе с Zuk и другие доказали, что жировая ткань содержит в своем составе ММСК и эти клетки обладают способностью к трансформации в хрящевую и костную ткань [89, 156, 194]. Позже сообщалось, что из жировой ткани можно выделить значительно большее количество ММСК по сравнению с костным мозгом. Так 100 мл костномозгового трансплантата содержит 6×10^6 ядросодержащих клеток, из которых на долю ММСК приходится не более 0,001-0,01%. Для сравнения число ядросодержащих клеток в жировой фракции $0,5-2,0 \times 10^6$ на грамм ткани, а количество ММСК варьируется от 1 до 10%, таким образом из 100 грамм жировой ткани может быть получено $0,5-10 \times 10^6$ ММСК [32, 54, 62, 111, 157].

Выяснено, что костный мозг и жировая ткань содержат различные типы клеток. Гетерогенную фракцию, отделенную от стромы и адипоцитов принято называть СВФ (стромально – васкулярной фракцией) жировой ткани. В клеточной популяции СВФ в большом количестве содержатся: ММСК (34.6%), перициты, сосудистые адвентициальные клетки, фибробласты, преадипоциты, моноциты, макрофаги, эритроциты, фиброзная ткань и внеклеточный матрикс (ЕСМ) [7, 53, 112, 171, 194]. Фенотип эндотелиальных клеток-предшественников, полученных из жировой ткани, соответствует фенотипу подобных клеток из костного мозга. В то же время их количество во фракции СВФ на 3 - 5 порядков выше, что делает СВФ прекрасным кандидатом для применения в регенеративной медицине. В своем составе СВФ содержит сосудистый эндотелиальный фактор роста, трансформирующий фактор роста, тромбоцитарный фактор роста и основной фактор роста фибробластов в высоких концентрациях [71, 109, 191].

Lendeckel и соавторы в 2004 году впервые использовали СВФ для восполнения дефекта костной ткани. В своем клиническом случае они описывали, что имплантировали СВФ 7-ми летней пациентке с множественными посттравматическими дефектами костной ткани черепа. Спустя 3 месяца по данным МСКТ исследования было отмечено, что произошло восполнение дефицита костной ткани и сращение костных фрагментов [119].

В 2011 году J.Рак успешно применил СВФ для регенерации костной и хрящевой ткани. В ходе выполнения своего исследования J.Рак имплантировал СВФ пациентам с остеонекрозом головки бедренной кости. Уже через 12 недель отмечалось значительное увеличение подвижности пациентов, а по данным МРТ исследования фиксировалось уменьшение дефекта в головке бедренной кости [183].

Группа авторов из Казани в 2013 году опубликовали статью, в которой описывали свой опыт применения СВФ при лечении ложного сустава бедренной кости у пациента. В ходе оперативного вмешательства, после выполнения остеоклазии в зону дефекты были трансплантированы клетки СВФ, по исходу нескольких месяцев отмечался стойкий положительный эффект от процедуры [29, 87].

В 2014 году Zhou с коллегами проводил экспериментальное исследование на животных, в ходе которого изучалось восстановление локтевого сустава при помощи ММСК. В группе животных, которым имплантировали ММСК отмечались активные процессы репаративного остеогенеза, а также более быстрое восстановление костной ткани по сравнению с животными основной группы. [193].

ММСК по сравнению с другими пластическими материалами обладают большим количеством преимуществ, однако к недостаткам методики необходимо отнести жидкое физическое состояние используемой клеточной субстанции – неблагоприятное для полного заполнения костных дефектов, в связи с чем для фиксации МСМК необходим определенный каркас. В отличие от PRP технологии возраст пациента не имеет принципиального значения для использования клеток, но отмечается, что с течением времени их количество в организме снижается [59, 119, 132, 150, 164].

Как и с применением PRP для получения СВФ отсутствует какая-то единая стандартизированная технология, что не позволяет получать идентичный клеточный состав для применения данной методики в широкой клинической практике, также еще не представлено достаточного количества работ, демонстрирующих убедительные отдаленные результаты использования СВФ с целью замещения и восполнения дефектов костных тканей.

1.4 Имплантаты на основе минеральных комплексов для замещения дефектов костной ткани

Являясь одним из основных компонентов нашего организма, кость как орган играет важнейшую роль в защите, поддержании и движении тела. Кость представляет из себя минерализованную матрицу, состоящую на 65% из фосфатов кальция, остальные 35% занимают органические компоненты, включающие коллагены 1 типа, разнообразные фракции неколлагенированных белков и жидкость. Логично, что имплантаты на основе фосфатов кальция, как основного структурного элемента кости, изначально являются биосовместимыми, биоактивными и обеспечивают поддержку формирования кости вокруг имплантата [126, 175]. В связи с этим биоматериалы, содержащие в своем составе фосфаты кальция (ФК), наиболее широко используются, так как обладают определенными остеокондуктивными и остеоиндуктивными свойствами [30, 49, 68, 135, 177]. Прежде считалось, что данными свойствами обладают только аутотрансплантаты, но с течением времени эта позиция изменилась, и в настоящем доказано, что скаффолды из биоматериалов обладают схожими свойствами, но при этом менее остеоиндуктивны [148, 184, 178, 188, 190]. Синтетические биоматериалы на основе фосфатов кальция по своему строению напоминают минерализованный костный матрикс. Результаты проведенных исследований показывают, что ФК могут благоприятно влиять на прикрепление, пролиферацию и распространение макрофагов, а также способствовать экспрессии генов цитокинов, связанных с воспалением (IL-1, IL-6, MCP-1) и последующим ростом ткани [36, 45, 69, 185]. Также уделяется вниманию воздействию ФК на остеогенную дифференцировку

ММСК, что было подтверждено экспрессией генов специфических остеогенных маркеров [78, 96, 149, 176, 181].

Особенность эффекта при использовании фосфатов кальция заключается в их благоприятной для последующей регенерации макро- и микроструктуре. На поверхности имплантатов имеется большое количество пор размером от 300 до 500 мкм, что позволяет новообразованной ткани использовать его как матрицу. Wang и соавторы считают, что такая пористость играет решающую роль в процессах васкуляризации и остеоиндукции [140, 173, 184]. Неоспоримое значение имеют также микропоры размером около 50 мкм, благодаря которым увеличивается площадь поверхности имплантата, тем самым улучшается адсорбция белков, ионный обмен и образование минерализованной ткани [45, 77, 148, 184]. Было высказано предположение, что необходимая адсорбция белков происходит из-за электростатических взаимоотношений, побуждаемых имплантатом: с одной стороны, это положительно заряженные ионы Са, а с другой – ионы Р, имеющие отрицательный заряд [134].

Группа ученых в 2016 году опубликовала статью, посвященную использованию гидроксиапатита для замещения дефектов костных тканей. Ими было установлено, что процессы остеогенеза протекают на поверхности имплантата и рядом с ним, но при этом роста костной ткани в структуре имплантата не происходило, что с течением времени приводило к формированию соединительной ткани в его центре [77, 108].

В 2016 году Paulo Santos и соавторы опубликовали статью, в которой сообщалось об использовании фосфатов кальция с целью замещения крупных костных дефектов у экспериментальных животных. Согласно полученным данным авторы сделали вывод, что имплантаты на основе фосфатов кальция являются остеоиндуктивными и способными стимулировать новообразование костной ткани [151].

В 2021 году Jasek Gagala представил результаты своего клинического наблюдения по применению гидроксиапатита при ревизионном эндопротезировании тазобедренного сустава. В течение 10 последующих лет после

оперативного вмешательства все пациенты находились под наблюдением. Клинико-рентгенологическое обследование проводилось спустя 3 месяца после операции и затем 1 раз в год ежегодно. У одного из пациентов спустя 12 месяцев после операции произошла миграция имплантированной конструкции. Остальные пациенты в течение всего срока наблюдения не отмечали каких-либо негативных последствий [84].

ФК широко используются в клинической практике для восполнения дефектов костной ткани, однако они не лишены недостатков, в частности таких как проблема скорости биодеградации данного типа имплантатов. Медленная резорбция ингибирует процессы остеоинтеграции, а быстрая резорбция может привести к недостаточному заполнению костного дефекта [73, 131].

Сравнительные исследования формирования костной ткани при имплантации синтетической кальций – фосфатной керамики (КФК) и ФК, включающих в свою структуру химически связанных кремний, показывают, что кремнийсодержащие материалы обладают высокой биоактивностью [21, 34, 39, 43, 104, 138]. Это может быть связано с Si – индуцирующим изменением свойств материала, а также важной ролью кремния в физиологических процессах роста [60, 83, 107, 117]. Неоваскуляризация является одной из важных проблем с которой сталкивается развитие тканевой инженерии. Физиологические процессы ангиогенеза регулируются сложным взаимоотношением биофизических и биохимических процессов, при этом средняя скорость развития сосудов составляет несколько десятых микрометров в день, что крайне мало для активных регенераторных процессов [94, 98, 122, 192]. Стимулирование процессов ангиогенеза выделено, как одно из основных направлений регенераторной медицины. Поэтому один из основных требований к биоактивному материалу является способность индуцировать процессы образования новых сосудов [66, 69, 95, 98]. Кремнийсодержащие имплантаты поддаются постепенной биологической деградации, по мере которой постепенно высвобождаются ионы, способствующие остео- и ангиогенезу. Ионы кремния способны усиливать функции эндотелиальных клеток

посредством активации сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF), основного фактора роста фибробластов [66, 70, 80, 122].

В 1972 году группа ученых доказала, что кремний необходим для нормального формирования соединительной, хрящевой и костной ткани. Роль кремния в процессах роста остеонной ткани подтверждалась данными рентгеноспектрального анализа, свидетельствующими о большем его накоплении в местах роста молодой кости, где его концентрация повышалась в 25 раз. Максимальное количество кремния визуализировались в цитоплазме остеобластов [3]. На примере изучения их и стромальных стволовых клеток (ССК) было показано, что ортофосфорная кислота потенцирует процессы дифференцировки остеобластов и повышает концентрацию маркеров остеогенеза, включая С-концевой пропептид проколлагена 1 типа (PICP) [40, 143].

Керамические соединения, изготовленные на основе силикатов, обладают лучшими остеointегративными свойствами [99]. Исследования, проводимые с биостеклами показали, что атомная структура вещества улучшает процессы полимеризации, что в свою очередь усиливает абсорбцию белковых молекул на поверхности имплантата и служит своеобразной матрицей для прикрепления, дифференциации и пролиферации стволовых клеток. Состав биоактивных стекол разработан так, чтобы их поверхность вступила в химическую реакцию с определенными компонентами окружающей физиологической среды и образовывались новые связи с внедрением в структуру исходной грануляционной новообразованной костной ткани [65, 67, 153].

Moorthi и соавторы отмечали, что биостекла стимулируют экспрессию цитокинов, что приводит к активизации остеобластов [72, 79, 98, 153]. Ряд исследователей доказали, что кремний способен значительно увеличить экспрессию остеопотенцирующих генов, способствующих накоплению не только ранних маркеров остеогенеза, такие как коллаген 1 типа и щелочная фосфатаза, но и остеокальцин [66, 100]. Chen и др., сообщили, что ионы кремния могут ингибировать секрецию провоспалительных цитокинов и факторов, усиливающих фиброз макрофагов, а кондиционированная среда из макрофагов способна

усиливать остеогенную дифференцировку мультипотентных стволовых клеток костного мозга [76, 123, 189]. Многие публикации последних лет подтвердили, что кремниевая биокерамика способна модулировать микроокружение воспаления, влияя на поведение макрофагов, способствуя остеогенной дифференцировке стволовых клеток [107, 122]. Lee и др., выяснили, что биокерамика способна усилить иммунорегуляторную функцию, а также стимулировать макрофаги, что создавало благоприятную иммунную микросреду для дифференцировки МСК по остеогенному пути [74, 117].

В 2014 году в ходе изучения процессов формирования костной ткани в условиях эксперимента на животных было установлено, что биоактивные имплантаты на основе биостекол обладают хорошим регенераторным потенциалом, но из-за их быстрой биодegradации использовать их как остеоиндуктивный и остеокондуктивный каркас не представлялось возможным [118].

Согласно данным метаанализа, проведенного группой ученых в 2018 году было установлено, что совместное использование фосфатов и силикатов кальция для замещения дефектов костной ткани показывает сравнительно лучшие результаты нежели разрозненное их применение. За счет своей комбинации они потенцируют остеорегенераторное действие друг друга: силикаты стимулируют остеогенную дифференцировку популяцию клеток предшественников и связываются с окружающими тканями, что обусловлено их поверхностной активностью, а фосфаты демонстрируют хорошие остеокондуктивные свойства [110].

Khandmaa Dashnyam и соав., в 2019 году опубликовал полученные данные проведенного экспериментального исследования. Авторами было отмечено, что имплантируемое вещество, покрытое силикатной оболочкой, ускоряло процессы образования гидроксиапатита. Клеточный регенераторный остеогенный потенциал был также подтвержден усиленной экспрессией остеогенных генов (Colla1, ALP и OCN). При имплантации в дефект голени крысы каркас, покрытый силикатной оболочкой, продемонстрировал значительно улучшенное костеобразование

(увеличение объема и плотности кости в 2-3 раза) с одновременными признаками проангиогенеза [66].

В исследовании, опубликованном испанскими учеными в 2020 году, изучались процессы остеогенеза при имплантации гранул с различными сочетаниями фосфатов и силикатов кальция. Отличительной особенностью этой работы было применение высокотемпературной керамики (спекание при температуре 1400*). Авторами отмечался остеогенный эффект, полученный влиянием состава имплантата на мезенхимальные клетки и стимулирование их пролиферации по остеогенному пути [147].

Резюме

Проведя анализ доступных отечественных и зарубежных литературных источников по теме замещения костных дефектов, обращает на себя внимание то, что до сих пор не найден «оптимальный» биоимплантат, который будет обладать универсальными свойствами остеокондукции и остеоиндукции, при этом будет полностью биосовместимым и биорезорбируемым, обеспечивая органотипическое восстановление костной ткани.

У каждого из описанных методов и материалов, применяемых для замещения костных дефектов, есть свои преимущества и недостатки. Использование аутотрансплантата обладает несомненно лучшими свойствами для восполнения дефекта, но при этом присутствует проблема «донорского места», нестабильности имплантата в послеоперационном периоде, ранний остеолит и инфекционные осложнения. Предложенные к использованию аллотрансплантаты, позволяющие восполнить значительный дефицит ткани, лишены свойств остеоиндукции, а в послеоперационном периоде возможны выраженные иммунные, аллергические и реакции тканевой несовместимости.

В конце XX-го века для восполнения дефектов были предприняты попытки использования аутологичных клеток (СВФ, PRP), которые подтвердили свой превосходный регенераторный потенциал. Однако, сдержанность их широкого применения объясняется обширными общими противопоказаниями, недостаточной изученностью системного иммуномодулирующего и иммуносупрессивного

влияния, а также непредсказуемостью локального эффекта в виде индуцирования развития не органотипической, а недифференцированной соединительной ткани в зоне имплантации, кроме того, для их использования, как правило, необходимо введение определенной матрицы, что не всегда удастся возможным осуществить.

В научной литературе представлено значительное количество публикаций отечественных и зарубежных авторов, посвященных изолированному применению фосфатов или силикатов кальция с целью восстановления недостающей костной ткани. К сожалению, лишь в единичных работах проводились исследования возможности совместного применения фосфатов и силикатов кальция в структуре единого биоактивного имплантата с обнадеживающими, но не окончательными результатами.

Учитывая все вышеизложенное, задача создания имплантата, содержащего фосфаты и силикаты кальция в оптимальном количественном соотношении, и способного оказывать активное оптимизирующее действие на процессы репаративного остеогенеза в дефектах костной ткани, выглядит актуальной и востребованной.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На первом этапе работы в условиях лаборатории стоматологического факультета ОмГМУ были получены порошки на основе ГА и ВТ, изучены их физико-химические свойства. На следующем этапе были синтезированы оригинальные гранулированные имплантаты на основе фосфатов и силикатов кальция с различным массовым элементным составом (ГА/ВТ: 60/40, 50/50, 40/60 масс. % соответственно) (рис. 1).



Рисунок 1 – Дизайн первого этапа исследования

После изучения их физико-химических свойств для изучения полученного материала и выбора оптимального соотношения фосфатов и силикатов кальция в разработанном материале было проведено исследование с использованием экспериментальных животных (кролики – самцы породы «Белый Великан») (рис. 2)

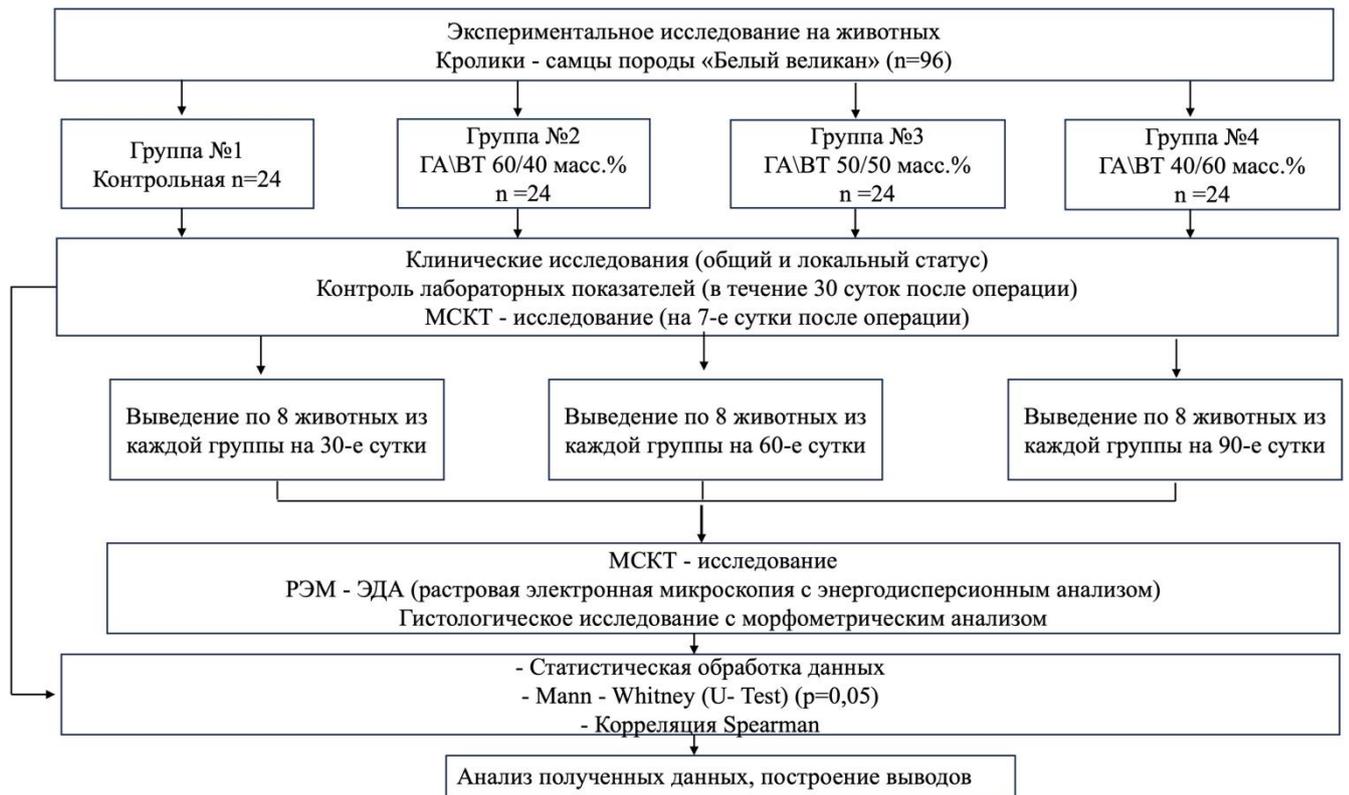
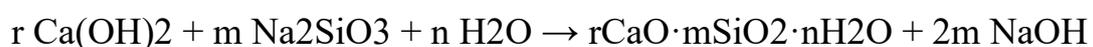


Рисунок 2 – Дизайн исследования

2.1 Описание исходных материалов для получения гранулированных имплантатов

Учитывая влияние силикатов и фосфатов кальция на процессы остео- и ангиогенеза совместное их использование в структуре имплантируемого материала позволит ускорить процессы формирования костной ткани в зоне имплантации. У фосфатов кальция при достаточной низкой скорости биodeградации хорошо выражен остеокондуктивный эффект, в то время как у силикатов, при достаточной высокой скорости деградации, активнее проявляются остеоиндуктивные свойства. Возможно, что их совместное применение в структуре имплантируемого материала позволит оптимизировать процессы формирования костной ткани в зоне костного дефекта.

Порошки на основе ГА и VT получены по методике, основанной на совместном осаждении в водном щелочном растворе ФК и ГСК по реакциям:



и последующем прокаливании продуктов синтеза при 1000 °С на воздухе для получения смесей кристаллических форм солей:



2.2 Методы исследования состава, морфологии и свойств исходных порошков и гранул

Для получения гранул по суспензионной технологии использовали порошки фосфатов и силикатов кальция с различным процентным соотношением в своем составе. Для связывания компонентов между собой использовался 15% водный раствор желатина. В качестве диспергирующей среды использовали натуральное растительное масло («Красная цена», ОАО «Астон», Россия).

По результатам проведенных исследований были получены данные о фазовом, функционально-групповом составе и микроструктуре порошков и гранул.

Рентгенофазовый анализ (РФА) выполняли на дифрактометре «XRD-7000» (Shimadzu, Япония). Предварительно в ступке перетирали гранулы до состояния мелкодисперсного порошка. По дифрактограммам определяли углы 2θ брэгговских отражений и их относительную интенсивность. Качественный анализ фазового состава образца проведен путем сопоставления экспериментальных значений межплоскостных расстояний и относительных интенсивностей дифракционных максимумов с набором соответствующих значений для каждой из предполагаемых фаз в международной базе по данным порошковой дифрактометрии ICDDPDF-2.

ИК-Фурье-спектроскопия с картированием ИК-спектров разработанного материала регистрировали на ИК-Фурье-спектрофотометре «ФТ-801» (Симекс, Россия). Для получения, обработки и расшифровки ИК-спектров использовалось программное обеспечение «ZaIR 3.5» (Симекс, Россия). На этапе подготовки материала к исследованию, гранулы перетирали в порошок в агатовой ступке. Пробоподготовка включала прессование из исследуемого порошка и KBr (осч. – особо чистый), таблеток диаметром 3 мм. Спектры поглощения регистрировали в области от 4000 до 500 см^{-1} с общим числом сканирований равном 25 при спектральном разрешении 4 см^{-1} . Для анализа функционально-группового состава образцов применяли литературные данные по положению максимумов полос поглощения группировок в составе солей кальция и желатина. Расшифровку

качественного состава образцов проводили с помощью библиотек ИК-спектров органических и неорганических веществ, включенных в программу «ZaIR 3.5» (Симекс, Россия).

Микроструктуру гранул исследовали методом РЭМ с применением растрового электронного микроскопа «JCM-5700» (JEOL, Япония). Для анализа образец помещали на углеродную токопроводящую липкую ленту, закрепленную на съемной пластине из алюминиевого сплава предметного столика. Предметный столик с образцом помещали в измерительную камеру микроскопа, которую затем откачивали до получения высокого вакуума. Морфологию поверхности образцов исследовали с применением детектора вторичных электронов при ускоряющем напряжении 5-20 кВ. Элементный анализ образцов проводили с использованием безазотного рентгеновского энергодисперсионного спектрометра «JED-2300» (JEOL, Япония).

Содержание желатина и минеральной фазы (суммарно ГА и ВТ) определяли методом гравиметрического анализа с применением муфельной печи «ЭКПС-5» (Смоленское СКТБ СПУ, Россия). Прокаливание проводили в атмосфере воздуха в температурном интервале 25 - 1000 °С со скоростью нагревания 10 °С/мин. Навески гранул (с точностью до 0,0001 г) помещали в фарфоровые тигли и нагревали до определенной температуры, выдерживали 2 часа, после чего охлаждали и взвешивали на аналитических весах. Процесс повторяли циклически, каждый раз увеличивая температуру. В результате по массовым потерям образцов строили ТГ и ДТГ кривые. Содержание желатина определяли по потере массы гранул в температурном интервале 200 - 500 °С. Долю минеральной составляющей устанавливали по данным о массе исходного материала и после его термообработки за вычетом доли желатина.

Размеры полученных гранул определяли методом ситового анализа. Для этого образцы известной массы просеивали через набор стандартных сит с диаметрами ячеек 4, 3, 2, 1 и 0.5 мм. Точную навеску исходных гранул помещали в колонну сит (на сито с самыми крупными ячейками, далее размер ячеек сит последовательно уменьшался) и просеивали в течение 10 минут. По окончании операции собирали

полученные фракции и взвешивали содержимое каждого сита. По полученным данным о массах фракций и исходного образца рассчитывали содержание гранул разных диаметров в исходном материале.

Микротвёрдость образцов измеряли по методу Виккерса на микротвердомере «ПМТ-3М» (ЛОМО, Россия) согласно ГОСТ Р ИСО 6507-4-2009. Для этого гранулы полировали для получения с одной из сторон ровной поверхности и помещали на пластину, которую устанавливали на предметный столик. При измерении микротвёрдости гранул алмазный наконечник в форме правильной четырехгранной пирамиды с углом 136° между противоположными гранями при вершине вдавливали в полированную поверхность образцов под действием нагрузки 20 г в течение 10-15 секунд. После снятия нагрузки микротвёрдость рассчитывали по формуле 1 [38]:

$$HV = \frac{0.189 \cdot P \cdot 10^6}{\langle d \rangle^2}, \quad (1)$$

где:

- HV – микротвёрдость по Виккерсу,
- P – нормальная нагрузка, приложенная к алмазному наконечнику,
- $\langle d \rangle$ – среднее значение длин диагоналей, мкм.

Для каждого образца проводили не менее пяти параллельных измерений.

Для определения средней плотности гранулы взвешивали на аналитических весах (каждую в отдельности с точностью до 0,0001 г) и измеряли их диаметр с помощью микрометра. Значение средней плотности рассчитывали, как отношение массы образца к его объёму по формуле 2 [38]:

$$\rho_m = \frac{m}{V} = \frac{3 \cdot m}{4 \cdot \pi \cdot R^3}, \quad (2)$$

где:

- ρ_m – средняя плотность материала, кг/м³,
- m – масса образца, кг,
- V – объём образца, исходя из предположения о сферической форме частиц,
- R – радиус частиц.

Истинную плотность и открытую пористость материалов определяли пикнометрическим методом. Для этого образцы помещали в чистый высушенный пикнометр объемом 10 мл, заливали дистиллированной водой и оставляли на 24 часа при комнатной температуре. По истечении указанного времени доливали воду до метки пикнометра и взвешивали его. После этого пикнометр освобождали от содержимого, промывали, наполняли дистиллированной водой до метки и снова взвешивали. Истинную плотность вычисляли с точностью до 1 кг/м³ по формуле 3 [38]:

$$\rho = \frac{m \cdot \rho_{\text{в}}}{m + m_2 - m_1}, \quad (3)$$

где:

- ρ – истинная плотность гранулы, кг/м³,
- m – масса гранул, кг, m_1 – масса пикнометра с гранулами и водой, кг,
- m_2 – масса пикнометра только с водой, кг.

Пористость определяли исходя из значений средней и истинной плотности по формуле 4 [38]:

$$\Pi = \frac{\rho - \rho_m \cdot 100}{\rho}, \quad (4)$$

где:

- Π – пористость, %,
- ρ – истинная плотность, кг/м³,
- ρ_m – средняя плотность, кг/м³.

Для каждого образца проводили не менее пяти параллельных измерений.

2.3 Этапы экспериментального исследования на животных

Эксперименты на животных регламентировались в соответствии с международными и российскими нормативно-правовыми документами – Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях: EST №123 от 18.03.1986 и Хельсинской декларацией, этическим комитетом ОмГМУ № 128 от 03.02.2021 г [4].

Во время проведения эксперимента кролики находились в индивидуальных клетках из сетчатого металла с размером ячеек 20×20 мм. Размер индивидуальной клетки составлял 45×50×70 см (ширина, высота и длина соответственно). Кролики питались сбалансированно: 25% рациона составляло сено из бобовых и злаковых трав, 25% - концентрированные корма (смесь зерен овса, ячменя, гороха, кукурузы), 50% рациона – гранулированный корм. Для питья использовалась чистая питьевая вода, которая располагалась в индивидуальных дозаторах. После моделирования костного дефекта животные находились под ежедневным контролем клинического статуса с контролем количества потребляемой пищи и жидкости.

С целью изучения влияния биоактивных имплантатов на процессы репаративного остеогенеза было проведено экспериментальное исследование на 96-ти 3-х месячных кроликах-самцах породы «Белый великан» весом 4000 ± 200 грамм. В ходе выполнения исследования выполняли моделирование дефекта костной ткани дистального метаэпифиза бедренной кости с последующим заполнением сформированной полости биоактивным имплантатом с различным содержанием ФК и СК в своем составе. Применяли имплантаты с соотношением фосфата и силиката кальция соответственно: 60/40, 50/50, 40/60 масс. %, в группе контроля костный дефект биоактивным имплантатом не замещался.

Объем выборки животных был рассчитан по формуле F. Lopez-Jimenez и соавт.:

$$N = \frac{[p_1 \times (100 - p_1)] + [p_2 \times (100 - p_2)] \times 7,9}{(p_2 - p_1)^2}$$

, где:

N – количество экспериментальных животных, которое требуется для получения достоверных выводов;

p_1 – ожидаемое значение основной переменной интереса для одной из сравниваемых групп эксперимента, %;

p_2 - ожидаемое значение основной переменной интереса для другой из сравниваемых групп эксперимента, %.

За значимый результат нами было принято изменение величины показателя как минимум на 50% от исходного, тогда

$$\frac{[50 \times (100 - 50)] + [100 \times (100 - 100)] \times 7,9}{(100 - 50)^2} = 7,9 \approx 8$$

Таким образом, минимально достаточное количество экспериментальных животных в группе, необходимое для получения достоверных результатов, составило 8 кроликов.

Из указанного количества животных рандомизировано были сформированы 4 однородных группы (1 – группа контроля и 3 опытные группы), которые отличались между собой используемым материалом для замещения дефекта (рис.1).

В группе контроля замещение дефекта костной ткани не осуществлялось, в группах 2, 3, 4 в полость дефекта имплантировались биокомпозиты размером 0,2 – 1мм с соотношением фосфатов и силикатов кальция 60/40, 50/50, 40/60 масс % соответственно.

На 7-е сутки после операции выполнялось контрольное МСКТ исследование оперированной нижней конечности. Послеоперационное наблюдение проводили в сроки 30, 60 и 90 суток. По окончании периода наблюдения выполняли эвтаназию экспериментальных животных.

2.4 Модель эксперимента

Для сравнительной оценки эффективности биоактивных имплантов было сформировано 4 группы животных (по 24 животных в каждой группе), которым выполнялось оперативное вмешательство.

Группа 1 (контроль) (n=24): в сформированную полость в дистальном метаэпифизе правой бедренной кости не выполнялась имплантация биоактивного материала.

Группа 2 (n=24): в сформированную полость в дистальном метаэпифизе правой бедренной кости выполнялась имплантация биоактивного материала, который в своем составе имел соотношение фосфатов и силикатов кальция в пропорции 60/40 масс.%.

Группа 3 (n=24): в сформированную полость в дистальном метаэпифизе правой бедренной кости выполнялась имплантация биоактивного материала, который в своем составе имел соотношение фосфатов и силикатов кальция в пропорции 50/50 масс.%.

Группа 4 (n=24): в сформированную полость в дистальном метаэпифизе правой бедренной кости выполнялась имплантация биоактивного материала, который в своем составе имел соотношение фосфатов и силикатов кальция в пропорции 40/60 масс.%.

Перед операцией животных выдерживали на 12-часовой голодной диете и проводили забор крови из латеральной подкожной вены голени для определения биохимических показателей (количество лейкоцитов, кальция, фосфора в периферической крови, а также уровень СРБ и щелочной фосфатазы (ЩФ) с целью оценки реакции организма на имплантацию фосфат-силикатных гранул в зону сформированного метафизарного дефекта. Оперативное вмешательство проводили в условиях операционной.

Анестезиологическое обеспечение осуществляли внутримышечным введением раствора ксилозина гидрохлорида и золазепам гидрохлорида с расчетом дозировки на массу тела. Для контроля за общим состоянием производили замер температуры, пульса и дыхания до введения анестетиков, а затем через 10, 30 и 60 минут. При определении глубины анестезии и степени релаксации учитывали высоту амплитуды грудной клетки, цвет слизистой оболочки ротовой полости и языка, тонус жевательных мышц, экстензоров и флексоров суставов конечностей. Оценивали степень дилатации зрачка на изменение освещенности, наличие корнеального рефлекса, отсутствие болевой чувствительности.

Оперативное вмешательство выполнялось в условиях специализированной ветеринарной операционной над наркозом с соблюдением правил асептики и антисептики.

В условиях операционной в положении животного на спине с фиксированными конечностями после удаления волосяного покрова и 3-х кратной

обработки раствором антисептика. Доступ к дистальному метаэпифизу бедренной кости осуществлялся с латеральной стороны. Сухожилие четырехглавой мышцы бедра и надколенник отводили в медиальную сторону. После обнажения кости при помощи дисковой пилы формировался окончательный дефект кортикальной пластинки и импрессия выделенного костного фрагмента. В сформированную полость погружали гранулы в выбранной дозировке, либо зона дефекта оставалась незаполненной. В дальнейшем эктомированный костный фрагмент возвращался в прежнее положение, отведенные мягкие ткани с надколенником возвращены на исходное место. После обработки краев рану послойно ушивали, накладывали асептическую повязку.

Экспериментальное исследование проводили в течение 90 суток. По окончании 30-х, 60-х, 90-х суток наблюдения животных выводили из эксперимента путем передозировки наркотическими препаратами и производили забор материала для дальнейшего исследования. При помощи фрезы выполняли поперечное пересечение бедренной кости на 2 см проксимальнее сформированного дефекта, в дистальном отделе производили экзартикуляцию в коленном суставе. Полученные макропрепараты помещали в емкость с 10% раствором формалина и транспортировали для проведения исследований.

2.5 Методы исследования

В рамках выполнения работы были использованы следующие методы исследования:

- Лабораторные исследования (с целью оценки репаративного процесса и реакции организма на имплантацию); место выполнения – ОмГМУ, ЦНИЛ, исполнитель – к.м.н. Золотов А.Н.

- МСКТ исследование (с целью оценки формирования дефекта костной ткани и оценки плотности новообразованной ткани в зоне операции); место проведения – ОмГАУ имени П.А. Столыпина, исполнитель к.в.н., доцент Дочилова Е.С.

- морфологическое исследование с морфометрическим анализом (оценивался клеточный состав сформированного регенерата, сравнивались процессы

формирования костной ткани в контрольной и основных группах); место проведения – ФГБОУ ВО ОмГМУ, кафедра патологической анатомии, исполнитель, к.м.н., доцент Маркелова М.В.

- микроскопическое исследование методом электронной микроскопии с элементным анализом (оценивалось распределение микроэлементов в костной ткани в процессе репаративного остеогенеза); место проведения – ОмГТУ, к.п.н., доцент Полонянкин Д.А.

Рентгенологическое исследование

Для проведения рентгенологической оценки в ходе выполнения экспериментального исследования МСКТ исследование выполняли всем животным в одни и те же сроки. Первое исследование выполнялось через 7 суток после оперативного вмешательства. Во время этого исследования оценивался сформированный дефект костной ткани и расположение биоактивного вещества в его полости. Повторные исследования выполнялись при выведении животного из эксперимента на 30-е, 60-е, 90-е сутки для оценки сформированной костной ткани в зоне метафизарного костного дефекта. Измерение плотности выполнялось в 5 выбранных идентичных точках, находящихся в области проксимального, дистального отделов и геометрическом центре костной полости, субкортикальных зонах под резецированной частью и контрлатеральной кортикальной пластинках (рис. 3)

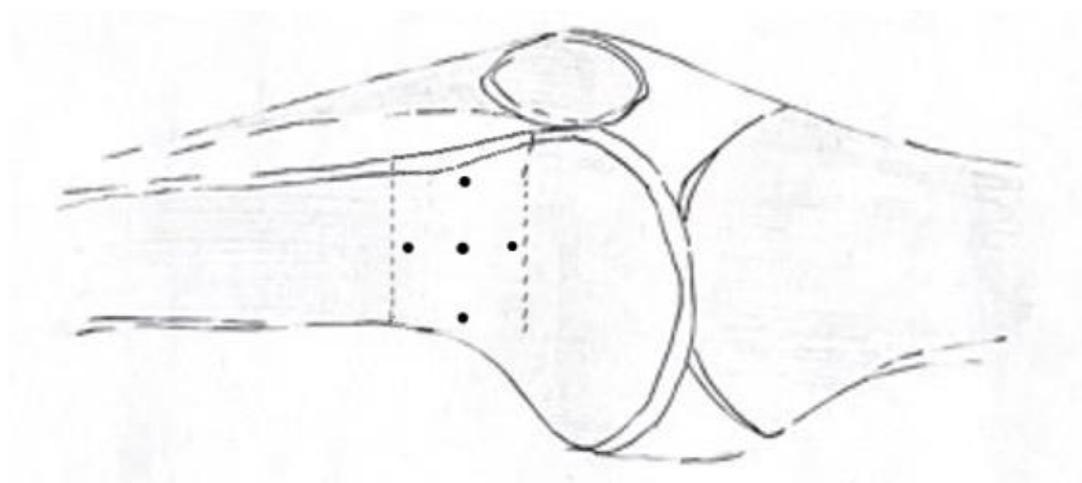


Рисунок 3 – Схематичное изображение точек измерения рентгенологической плотности

Для определения плотности сформированной кости использовалась стандартизированная шкала Хаусфильда (HU). Применение данного метода оценки позволяет, учитывая стандартизированные данные, количественно оценить костный регенерат. Наиболее подходящей классификацией для оценки плотности новообразованной ткани признана шкала С. Misch (1993), которая включает в себя 4 типа:

1. >1250 HU – данная плотность соответствует толстому слою компактной кости
2. 850 - 1250 HU - толстая кость, но с равномерной выраженностью компактного и губчатого вещества
3. 350 - 850 HU – тонкая кость с пористой компактной пластинкой и рыхлым губчатым веществом
4. <350 HU – рыхлое компактное вещество с рыхлой губчатой костью

Гистологическое исследование

Для выполнения гистологического исследования животных выводили из эксперимента на 30-е, 60-е и 90-е сутки. Фрагменты дистального метаэпифиза бедренной кости, включающие области сформированных дефектов резецировали. Полученный материал фиксировали в 10% нейтральном растворе формалина, после чего декальцинировали в 5% растворе азотной кислоты и обезвоживали в спиртах возрастающей крепости (от 60° до 96°), а также в смеси этилового спирта с диэтиловым эфиром (в соотношении – 1:1). В последующем образцы заливали в целлоидин, уплотняли под парами хлороформа, после чего из полученных блоков изготавливали срезы толщиной 7-10 мкм, которые окрашивали по Ван-Гизону, а также гематоксилином и эозином и исследовали под микроскопом «XSZ 158T» (Acorn, Китай), после чего подвергали морфометрическому анализу при помощи программы ImageJ (NIH, США). При проведении морфометрического исследования уделялось внимание показателям фрактальности и лакунарности новообразованной ткани. Фрактальность позволяет оценить степень заполнения изучаемого пространства новообразованными структурами, лакунарность же оценивает количество лакун (пустых зон) в изучаемых тканях. Таким образом чем больше

лакунарность, тем проще организация изучаемого материала, так как отмечается большее количество пустот, меньшее количество изгибов трабекул и их выростов.

Микроскопическое исследование

Анализ элементного состава ткани области замещаемого костного дефекта, выполнялся методом растровой электронной микроскопии с энергодисперсионным анализом (РЭМ – ЭДА) на растровом электронном микроскопе «JCM-5700», оснащенный рентгеновским энергодисперсионным спектрометром «JED-2300» (JEOL, Япония). Исследовали средний продольный спил толщиной 2 мм метафизарного отдела бедренной кости в области дефекта у животных, выведенных из эксперимента на 30-е, 60-е и 90-е сутки. Перед анализом с поверхности костного фрагмента тщательно удалялись мягкие ткани, включая надкостницу, далее кость высушивали при температуре 38°C в течение четырех недель, затем фрезой наносили борозды, ограничивающие область исследования. В результате получали микрофотографии, данные о содержании кальция, фосфора, кремния в образцах и карты их распределения в структуре исследуемого фрагмента костной ткани.

2.6 Статистическая обработка данных

Статистическую обработку результатов проводили на персональном компьютере с использованием статистических функций в Microsoft Excel 2020 и пакета прикладных программ «STATISTICA 10.0» (Statsoft, США). Основные этапы статистического анализа:

1. Подготовка данных: сбор информации (измерение необходимых критериев), заполнение электронных таблиц, внесение данных в программы статистической обработки;
2. Предварительный анализ: методы описательной статистики, визуализация данных (построение графиков);
3. Сравнение данных, оценка значимости различий;
4. Корреляционный анализ (между плотностью новообразованной тканью и количеством микроэлементов в структуре кости)

В рамках описательной статистики для получения базовой информации были рассчитаны следующие показатели: Медиана (Me), нижний (LQ) и верхний (HQ) квартили, среднего \pm стандартного отклонения ($M \pm m$).

Для проверки гипотезы о нормальном распределении данных использовали кривую Гаусса (рис. 4).

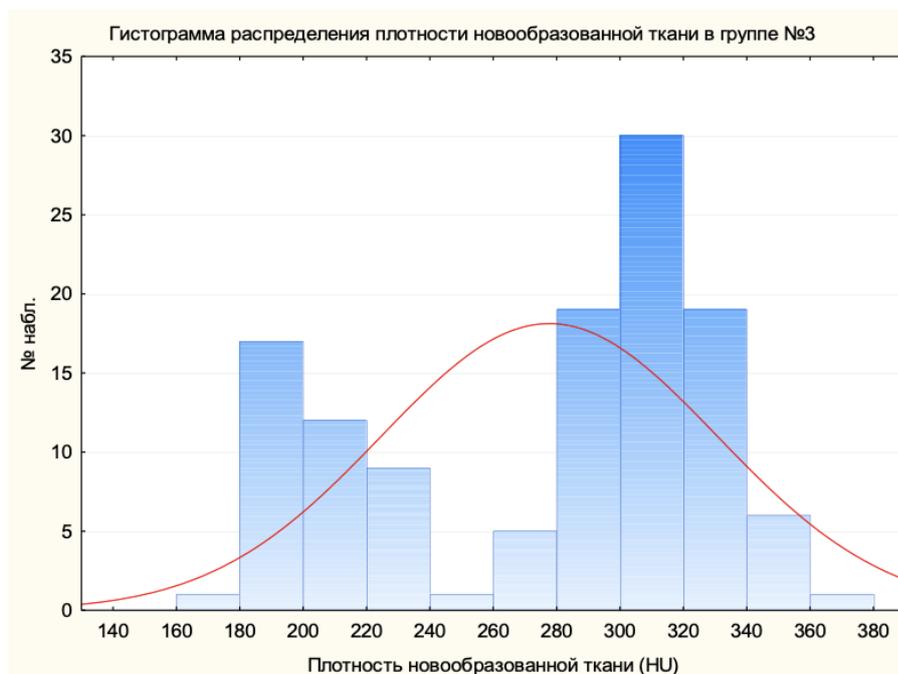


Рисунок 4 – Пример гистограммы, характеризующий отличный от нормального распределения в группах

При отсутствии нормальности определение значимости различий было проведено с помощью непараметрической статистики. Для сравнения двух независимых групп использовали критерий Mann – Whitney (U-test). Критический уровень значимости при проверке статистических гипотез принимался равным 0,05. При гармоничном распределении определение значимости различий проводилось с помощью параметрической статистики t – критерий Стьюдента. Для выявления возможных связей между признаками был проведен корреляционный анализ методом ранговой корреляции Spearman. В результате был получен ряд корреляционных коэффициентов (r_s) по числу переменных, отобранных для анализа.

Сила корреляционной связи оценивалась следующим образом:

- при r от 0,0 до 0,25 или - 0,25 – отсутствие корреляций;
- при r от 0,26 до 0,5 или от - 0,25 до - 0,5 – умеренная корреляция;
- при r от 0,51 до 0,75 или от - 0,51 до - 0,75 – средняя корреляция;
- при r от 0,76 до 1,0 или от - 0,76 до - 1,0 – сильная корреляция.

ГЛАВА 3 ПОЛУЧЕНИЕ И ИЗУЧЕНИЕ КОМПОЗИТНОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ И СИЛИКАТОВ КАЛЬЦИЯ.

Анализируя литературу, пришли к выводу, что использование силикатов кальция в составе биоматериала способствует увеличению его остеоиндуктивных свойств, что актуально в рамках регенеративного подхода. Основными компонентами сферических гранул являются также фосфаты кальция, преимущественно в виде гидроксиапатита, в силу его высокой биосовместимости и близости по химическому составу к костной ткани человека. Получение и исследование физических свойств гранул на основе смесей гидроксиапатита и волластонита явилась исходной задачей работы.

3.1 Получение композитного материала

В качестве исходных материалов для формирования гранул были использованы синтетические керамические порошки, содержащие в своем составе различные количества ГА и ВТ и желатин марки «П-11» (ГОСТ 11293-89) Элементный состав синтетических порошков представлен в таблице 1.

Таблица 1 – Состав исходных порошков ($M \pm m$)

ГА/ВТ, масс.%	W(Ca), масс.%	W(P), масс.%	W(Si), масс.%	Ca/(P+Si)
60/40	$35,3 \pm 0,2$	$9,9 \pm 0,1$	$8,8 \pm 0,2$	$1,39 \pm 0,02$
50/50	$33,9 \pm 0,6$	$8,5 \pm 0,2$	$10,7 \pm 0,7$	$1,30 \pm 0,05$
40/60	$33,6 \pm 0,7$	$6,8 \pm 0,1$	$12,7 \pm 0,4$	$1,24 \pm 0,04$

Примечания:

- * W(Ca), W(P), W(Si) - массовые доли кальция, фосфора и кремния, соответственно, в образцах;
- Ca/(P+Si) - коэффициент, равный отношению мольного количества кальция к мольному количеству фосфора и кремния.

Частицы керамических порошков представляли собой микрокомпозиты кристаллитов ГА и ВТ нанометровых размеров. Медианные диаметры частиц лежат в пределах 99 - 110 мкм (таблица 2).

Таблица 2 – Дисперсный состав и удельная поверхность исходных порошков

ГА/ВТ, масс.%	D(ГА), нм	D(ВТ), нм	D _{median} , мкм	S _{уд.} , м ² /г	d _{пор.} , нм
60/40	11,9	9,5	99,0	-	-
50/50	11,4	12,2	103,6	-	-
40/60	11,0	11,0	110,7	10	6,5

Структура частиц исходных порошков не имела существенных различий и представлена на рис. 5.

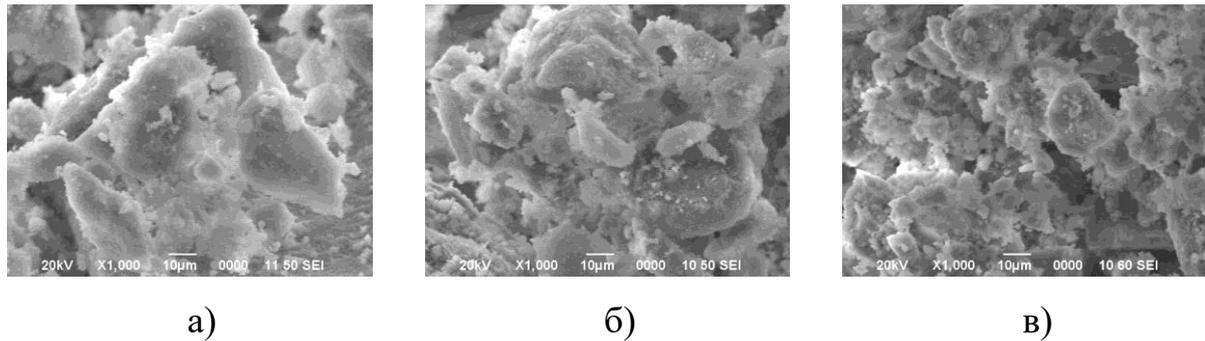


Рисунок 5 – Микрофотографии частиц исходных порошков с пропорцией ГА/ВТ, где: а) 60/40, б) 50/50, в) 40/60 (увеличение x1000)

Дифрактограммы исходных материалов представлены на рисунке 6.

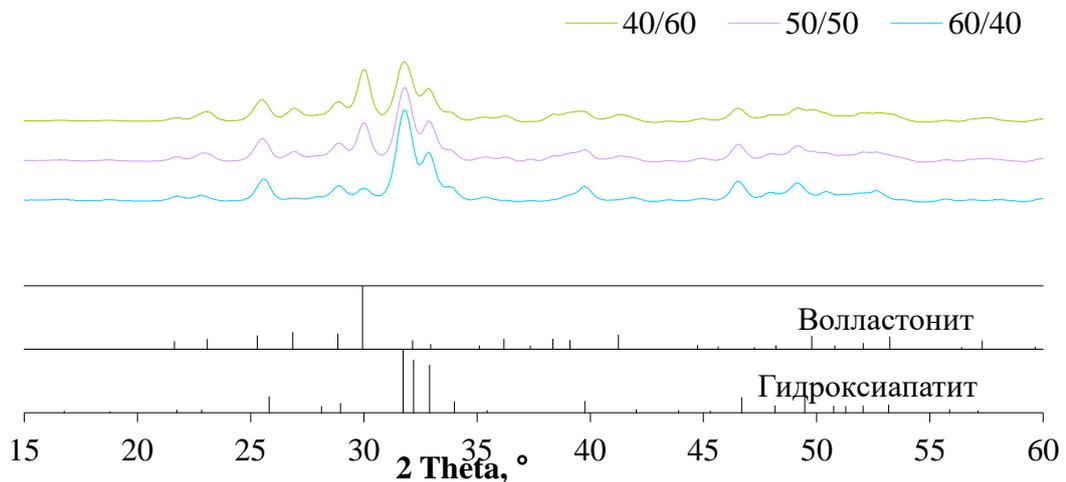


Рисунок 6 – ИК-спектры исходных порошков и чистых веществ – ГА, ВТ и желатина

ИК-спектры исходных материалов соответствовали спектрам гидроксиапатита, волластанита и желатина соответственно (рис. 7).

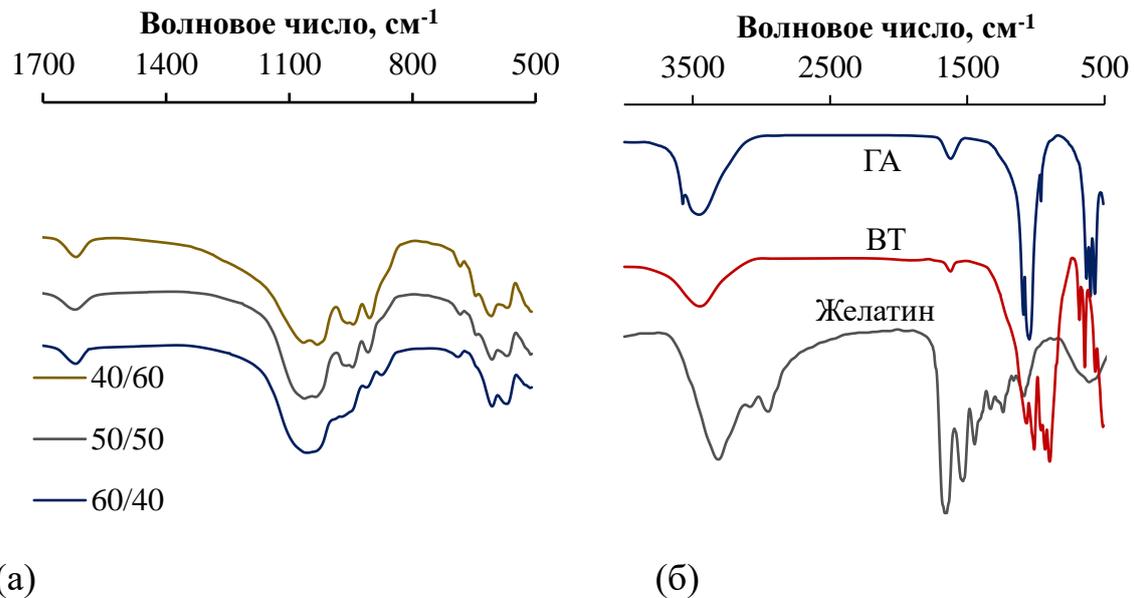


Рисунок 7 – ИК-спектры исходных материалов соответствуют спектрам гидроксиапатита, волластанита и желатина соответственно

Согласно данным физико-химических методов, порошки содержали в своем составе только ГА и ВТ. Примесные компоненты в них обнаружены не были.

Синтез гранулированных имплантатов происходил в несколько этапов. На первом этапе при помощи технических весов с точностью до 0,01 г, взвешивали по 1,00 г керамического порошка с необходимым соотношением фосфатов и силикатов кальция, который впоследствии смешивался с 1,5 мл раствором желатина, предварительно разогретого до температуры в 40°C, быстро перемешивали для получения однородной густой суспензии. Полученную массу капали в растительное масло, которое перемешивалось при помощи магнитной мешалки на скорости 850 об/мин. В результате данного процесса из суспензии, содержащей в своем составе керамический порошок и желатин образовывались сферические гранулы различного размера. Полученные гранулы охлаждали в ледяной бане, после их отфильтровывали и промывали в этаноле для удаления оставшихся фрагментов растительного масла. Затем при помощи термостата гранулы высушивались первоначально при температуре 25°C на протяжении 24 часов, затем в муфельной печи «ЭКПС-5» (Смоленское СКТБ СПУ) при 100 °C в течение 2 часов.

Последовательные этапы производственного процесса по синтезированию материала представлены на рис. 8.

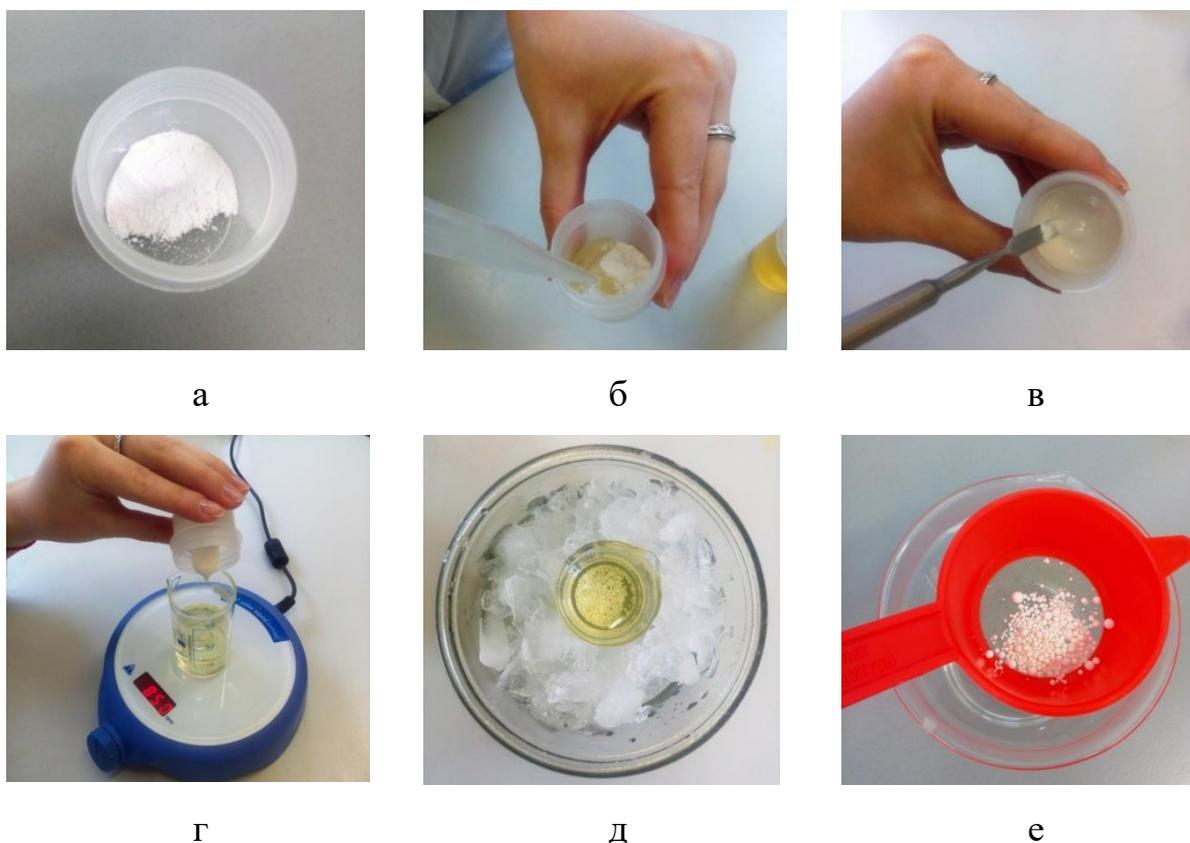


Рисунок 8 – Последовательность действий при получении гранул: (а) подготовка порошка, (б) прибавление желатина, (в) смешение порошка и желатина, (г) прикапывание суспензии к маслу при перемешивании, (д) охлаждение на ледяной бане, (е) отмывка гранул от масла и высушивание на воздухе

В ходе работы получена серия композитных гранул с различными пропорциями ГА и ВТ (60/40, 50/50, 40/60 масс.%) и связующего полимера – желатина (патент РФ №2785143 от 05.12.2022; приложение А). Внешний вид гранул представлен на рисунке 9.

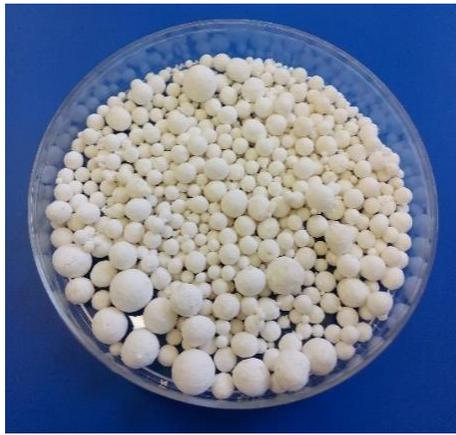


Рисунок 9 – Внешний вид синтезированных гранул

Различный диаметр гранул позволил подобрать оптимальные размеры для заполнения предполагаемого костного дефекта у экспериментальных животных на следующем этапе исследования.

3.2 Результаты исследования фазового и функционально-группового состава гранул

Анализ гранул методом РФА показал, что образцы состоят из хорошо окристаллизованных ГА и ВТ, о чем свидетельствуют четко выраженные и разрешенные пики на дифрактограммах (рис. 10).

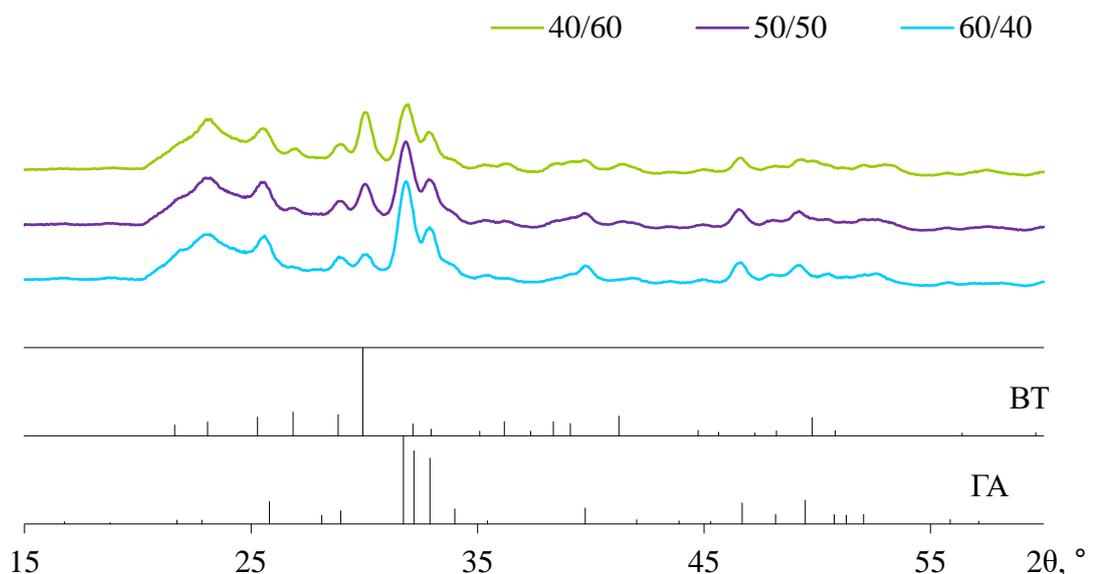


Рисунок 10 – Дифрактограммы гранул из порошков с различным соотношением ГА/ВТ

На присутствие ГА указывают пики при $25,8^\circ$, $28,1^\circ$, $28,9^\circ$, $31,9^\circ$, $32,2^\circ$, $32,9^\circ$,

34,2°, 39,7°, 46,7°, 48,1°, 49,5°, 50,8°, 51,3° по 2 θ . При этом их интенсивность растёт по мере увеличения содержания апатита в составе гранул, что отчетливо видно по рефлексам при 31,9°, 32,9° и 34,2° по 2 θ . Пики, характерные для ВТ, проявляются при 25,3°, 26,9°, 28,9°, 36,2°, 38,3°, 39,1°, 41,2°, 49,8°, по 2 θ и угасают с уменьшением содержания ВТ в составе образцов. Также на дифрактограмме в области 20° – 24° по 2 θ наблюдается пологий пик, который соответствует желатину. Примесные компоненты в составе гранул методом РФА не обнаружены.

Функционально-групповой и фазовый состав гранул установлен методом ИК-Фурье-спектроскопии. Получены ИК-спектры гранул с различным содержанием ГА и ВТ (рис. 11). На ИК-спектрах гранул присутствуют полосы поглощения функциональных группировок PO₄³⁻, OH⁻, SiO₃²⁻ из состава ГА и ВТ, а также моды колебаний органических группировок, характерных для желатина.

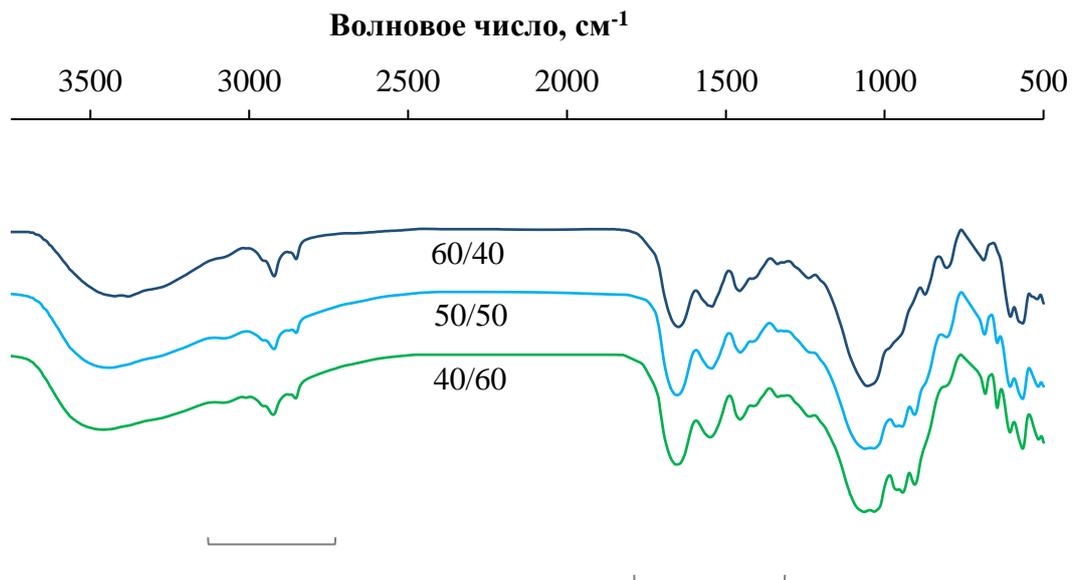


Рисунок 11 – ИК-спектры гранул из порошков с различным соотношением ГА/ВТ

Полосы поглощения при 565, 603, 962, 1040, 1090 см⁻¹ указывают на наличие апатита в составе исследуемого материала. При 565 и 603 см⁻¹ проявляются моды валентных колебаний связей O–P–O, а при 962, 1040 и 1090 см⁻¹ наблюдаются полосы, вызванные симметричными деформационными колебаниями связей P–O в PO₄-тетраэдрах. Для волластонита характерны полосы поглощения при 565, 645, 680, 902, 935, 962, 1018, 1080 и 1200 см⁻¹.

На присутствие в составе гранул желатина указывают моды колебаний органических группировок. В области $1260 - 1400 \text{ см}^{-1}$ фиксируются полосы поглощения, вызванные колебаниями карбоксильных группировок в желатине I типа. Максимум поглощения в области волновых чисел $3270 - 3370 \text{ см}^{-1}$ относится к валентным колебаниям связей N–H.

Анализируя ИК-спектры образцов, можно отметить, что полосы поглощения, характерные для силикатной фазы, становятся более выраженными по мере увеличения содержания ВТ в композитах. В свою очередь, интенсивность полос колебаний фосфат-ионов из состава ГА уменьшается, что согласуется с данными РФА. Также обнаружены полосы поглощения группировок из состава желатина, что также соответствует данным РФА и условиям синтеза. Примесные компоненты и/или следы реактивов, используемых на этапе синтеза и промывки гранул (растительное масло, этиловый спирт) методом ИК-Фурье-спектроскопии также не обнаружены. Это указывает на то, что методика, описанная в пункте 3.1, позволяет получать гранулированные материалы на основе только целевых компонентов – гидроксипатита, волластонита и желатина.

Для определения содержания желатина и минеральной фазы (суммарно ГА и ВТ) в составе гранул проведен термогравиметрический (ТГ) анализ в температурном интервале $25 - 1000 \text{ }^\circ\text{C}$. На рисунке 12 приведены ТГ кривые, полученные для гранул с пропорцией ГА/ВТ в исходном порошке 40/60 (масс. %). ТГ кривые остальных образцов имеют схожий вид, изменения их массы фиксируются при близких температурах. Ступени на кривых ТГ и пики на кривых дифференциальной термогравиметрии (ДТГ) находятся в диапазоне температур порядка $100 - 200 \text{ }^\circ\text{C}$ и $200 - 400 \text{ }^\circ\text{C}$.

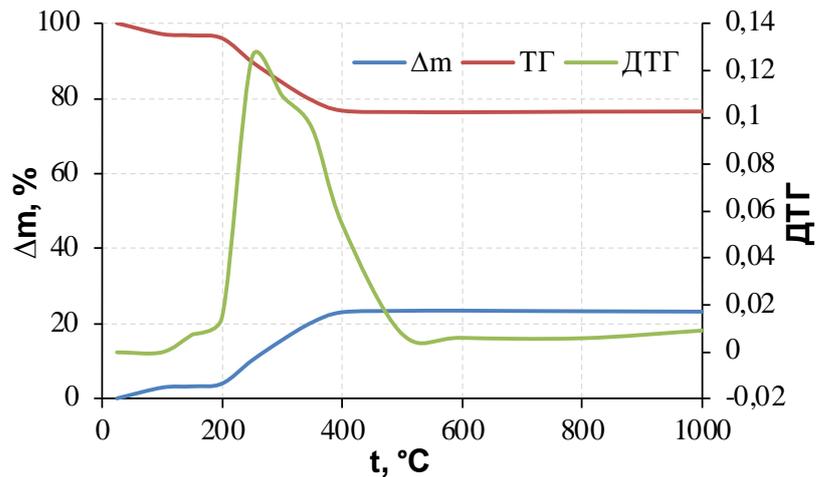


Рисунок 12 – Кривые ТГ и ДТГ для гранул из керамического порошка с соотношением ГА/ВТ 40/60

Согласно результатам исследований, при нагревании до 200 °С снижение массы образцов связано с десорбцией воды с поверхности материалов и удалением структурно-связанных молекул воды. Дальнейшее нагревание приводит к термодеструкции желатина. Его термическое превращение протекает через последовательные стадии дезорганизации спиральной структуры в коллагеновых волокнах, распада цепей, сгорания органических молекул, карбонизации и окисления углерода до CO₂.

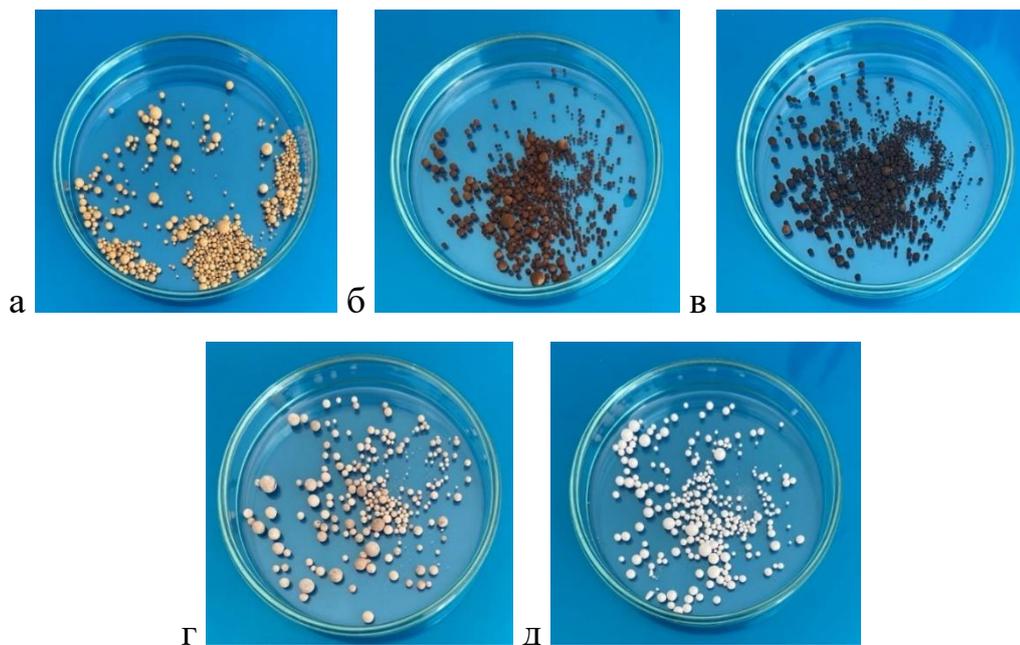


Рисунок 13 – Внешний вид гранул, прокалённых при температурах 200 (а), 250 (б), 300 (в), 400 (г), 500 °С и более (д)

Процесс выгорания желатина хорошо прослеживается по изменению цвета гранул, происходящему по мере роста температуры. О начале преобразования органических компонентов свидетельствует песочный цвет частиц (рис. 13 а). На этапе пиролиза полимера гранулы приобретают темно-коричневый цвет (рис. 13 в), а после полного его выгорания становятся белыми (рис. 13 д).

Гравиметрическое исследование композитных гранул показало, что при высокотемпературной обработке материалы теряют порядка 20 – 25 % массы. При этом потери от 14 до 20 масс. % (табл. 3) наблюдаются на этапе пиролиза желатина, следовательно, данное количество полимера включается в состав материалов в процессе их синтеза.

Таблица 3 – Содержание минеральной составляющей и желатина в гранулах ($M \pm m$)

ГА/ВТ, масс.%	$W_{\text{ГА+ВТ}}$, масс.%	$W_{\text{жел}}$, масс.%
40/60	76.6 ± 5.3	$20.4 \pm 0.3^*$
50/50	85.2 ± 2.8	$13.2 \pm 0.6^*$
60/40	77.1 ± 4.3	18.7 ± 0.5

Примечания:

- $W_{\text{ГА+ВТ}}$ - общее содержание солей в гранулах;
- $W_{\text{жел}}$ - содержание желатина в гранулах.
- * статистически значимые различия ($p < 0,05$)

3.3 Результаты исследования дисперсного состава и морфологии гранул

Ситовой анализ (механическое просеивание образцов через набор лабораторных сит) показал, что полученные гранулы представляют собой полидисперсную систему, состоящую из сферических частиц с диаметрами до 5 мм. При этом основная фракция в образцах всех составов имеет размеры от <0,5 до 2 мм (рис. 14).

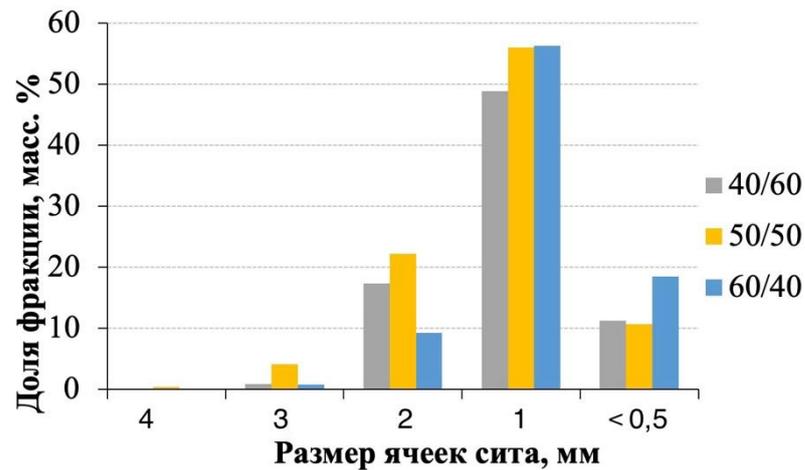


Рисунок 14 – Дисперсный состав гранул различного состава

Внешний вид рассеянных по размеру композитов показан на рис.15.

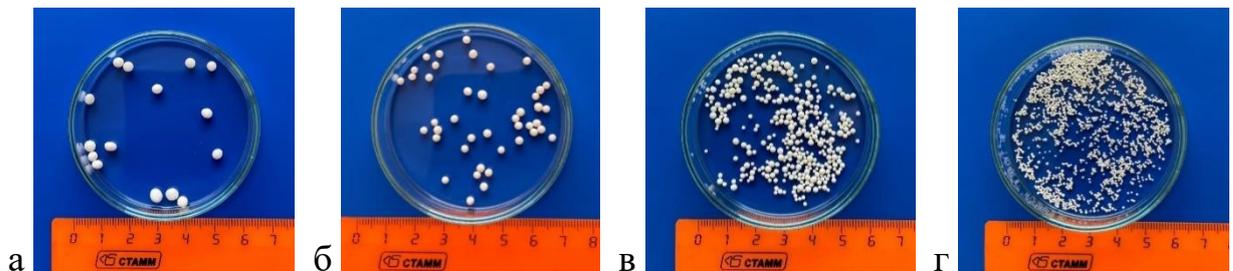


Рисунок 15 – Внешний вид гранул, просеянных через сита с диаметром ячеек 3 мм (а), 2 мм (б), 1 мм (в), <0,5 мм (г)

Исследование микроструктуры гранул всех составов на поверхности и в месте скола проведено методом РЭМ. Микрофотографии образцов представлены на рисунках 16, 17.

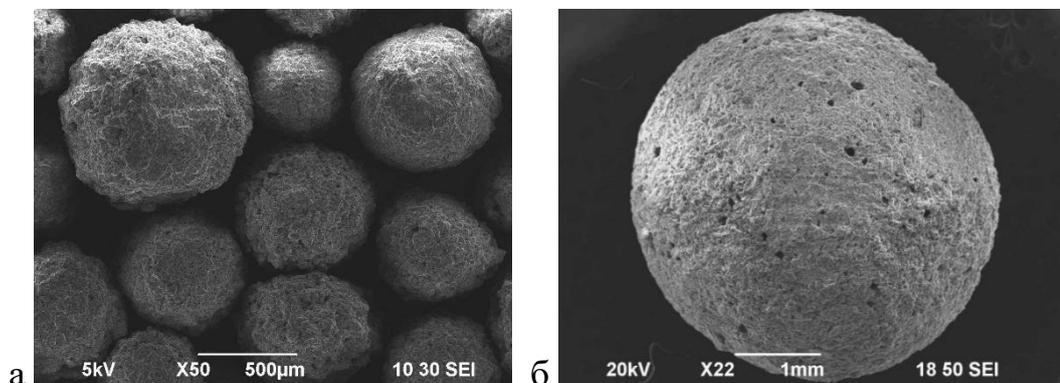


Рисунок 16 – Общий вид гранул на примере образца с соотношением ГА/ВТ 40/60 (увеличение x50 (рисунок а); x22 (рисунок б))

Видно, что поверхность гранул неравномерная, шероховатая, с буграми и впадинами различной формы и размеров. При этом все выступы и края керамических частиц сглажены, по-видимому, за счет покрывающего их слоя желатина.

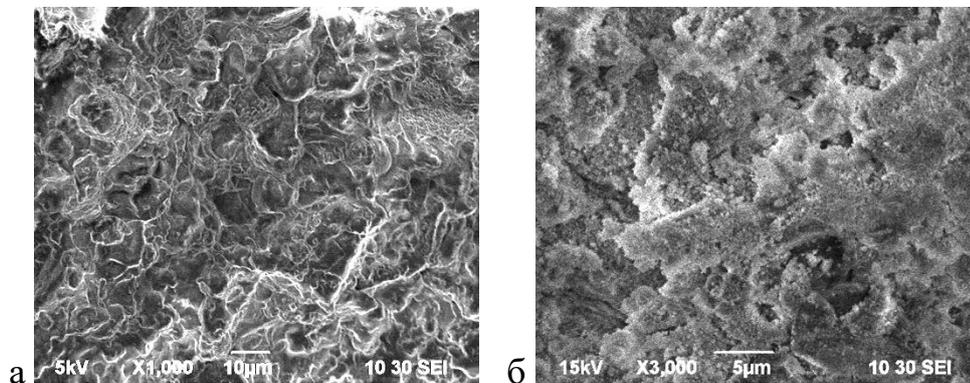


Рисунок 17 – Микрофотографии внешней поверхности (а) и внутренней структуры гранул (б) на примере образца с соотношением ГА/ВТ 60/40 (увеличение $\times 1000$ (рисунок а); $\times 3000$ (рисунок б))

На рисунке 18 представлены микрофотографии гранул в месте скола.

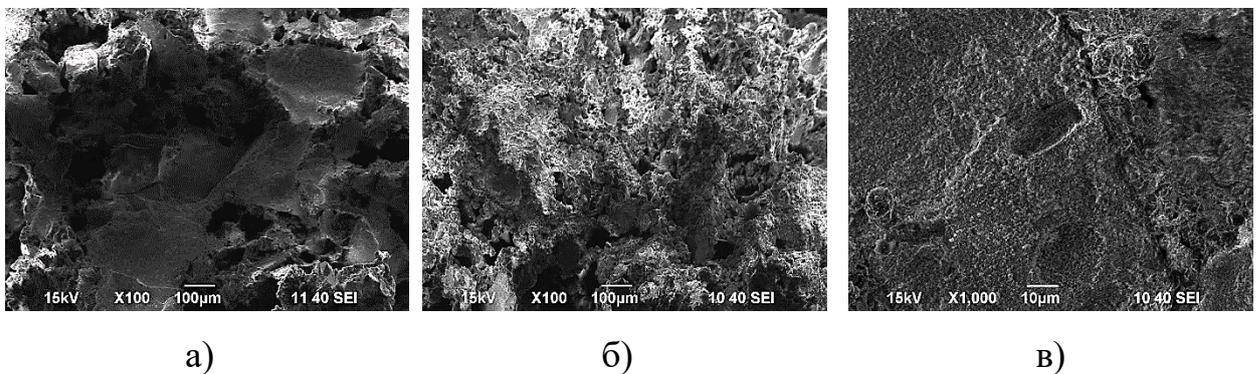


Рисунок 18 – Микрофотографии внутренней структуры гранул с различным соотношением ГА/ВТ, где: а) 60/40, б) 50/50, в) 40/60 (рисунок а, б – увеличение $\times 100$, рисунок в – увеличение $\times 1000$)

На сколе композитных гранул, во внутренней их части различима зернистая структура и просматриваются очертания частиц исходных порошков (рис. 19).

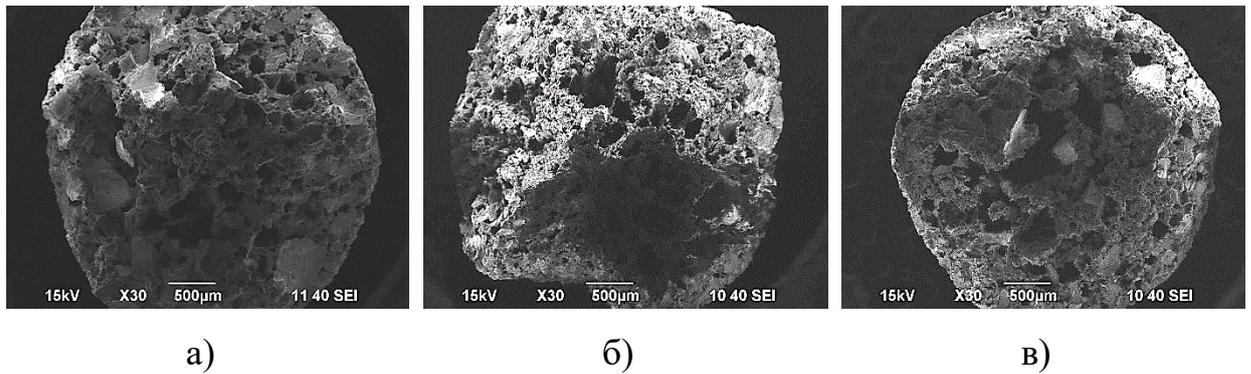


Рисунок 19 – Микрофотографии гранул с различным соотношением ГА/ВТ в месте скола, где: а) 60/40, б) 50/50, в) 40/60 (увеличение х30)

Обращает на себя внимание то, что внутренняя структура композитов характеризуется большим количеством пор и полостей, которые пронизывают весь объем частиц и связываются с поверхностью, образуя систему каналов. Также можно отметить наличие более крупных и объемных полостей в центре гранул. Данная особенность характерна для образцов всех составов и может быть использована при депонировании лекарственных препаратов в материале, что благоприятно в случае их биомедицинского применения.

Выполнялся количественный элементный анализ гранул на их поверхности и в месте скола. Согласно экспериментальным данным, исследуемые образцы содержат Ca, P, Si, O, N, C. При этом отмечалось, что на поверхности гранул содержание компонентов из состава желатина, а именно C и N, больше, чем внутри. Вероятно, это связано с тем, что в процессе высушивания гранул желатин формирует тонкую пленку на их поверхности.

Также был проведен количественный элементный анализ структуры гранул до и после прокаливания. Полученные результаты представлены в таблице 4.

Таблица 4 – Элементный состав композитных и прокаленных гранул

Элемент \ ГА/ВТ	60/40	50/50	40/60
	Содержание элемента в образце, масс. %		
Ca	1,18 / 37,61	0,16 / 33,91	2,04 / 31,41
P	0,80 / 14,51	0,63 / 8,51	0,62 / 3,31
Si	0,47 / 3,71	1,51 / 10,71	2,85 / 17,01
O	45,54 / 44,21	47,33 / 46,91	43,65 / 48,31
N	22,80 / -	9,96 / -	14,52 / -
C	29,21 / -	40,41 / -	36,32 / -

Примечание – * Слева от черты содержание элемента в исходных композитных гранулах, справа от черты – содержание элемента в прокаленных гранулах

Согласно экспериментальным данным, все исходные образцы содержат Ca, P, Si, O, N, C. При этом Ca, P и Si обнаруживаются в небольших количествах, тогда как содержания C и N (составляющих желатина) достигают 30 - 40 масс.%, что может указывать на наличие на исследуемой поверхности органической пленки. После термической обработки в составе гранул обнаруживаются только Ca, P, Si и O, что указывает на полное удаление желатина и сохранение керамического каркаса из ГА и ВТ (табл. 5).

3.4 Результаты изучения физических свойств гранул

Для всех полученных материалов выполнено измерение микротвёрдости, средней и истинной плотности, а также пористости гранул. Результаты экспериментов представлены в таблицах 5 и 6.

Таблица 5 – Физические характеристики гранул ($M \pm m$)

ГА/ВТ, масс. %	HV 0.02	$\rho_{\text{ср}}$, г/см ³	$\rho_{\text{ист}}$, г/см ³
40/60	24.1 ± 0.3	1.01 ± 0.04	2.27 ± 0.14
50/50	26.7 ± 0.4	1.07 ± 0.03	2.61 ± 0.12
60/40	22.2 ± 0.4	1.09 ± 0.03	2.25 ± 0.07

Примечания:

- * HV 0.02 – микротвёрдость по Виккерсу;
- $\rho_{\text{ср}}$, $\rho_{\text{ист}}$ – средняя и истинная плотность гранул.

Полученные значения микротвёрдости находятся в интервале 22 – 27 HV. Данные значения микротвёрдости позволяют использовать материал для заполнения дефектов костной ткани без нарушения формы и размеров частиц.

Средняя и истинная плотность гранул составляют, соответственно, не менее 1.0 и 2.25 г/см³. При смачивании водными растворами (дистиллированной водой, синтетической биологической жидкостью (SBF)) частицы тонут, что должно препятствовать уносу материала из места имплантации.

Таблица 6 – Пористость исходных и прокаленных гранул ($M \pm m$)

ГА/ВТ, масс.%	60/40	50/50	40/60
П ₁ , %	$41 \pm 3^*$	$59 \pm 2^*$	50 ± 4
П ₂ , %	$49 \pm 3^*$	$65 \pm 3^*$	58 ± 3

Примечания:

- П₁ - открытая пористость не прокаленных гранул,
- П₂ - открытая пористость прокаленных гранул.
- * статистически значимые различия между группами ($p < 0,05$)

Пористость гранул после прокаливания составляет порядка 50 % для образцов всех составов (табл. 7). После прокаливания пористость гранул возрастает на 6 – 8 % для каждого состава. Очевидно, это связано с появлением в результате выгорания желатиновой пленки в керамической матрице нанопор, фиксируемых методом

РЭМ.

В среде организма пористость на уровне 50 % обеспечивает проникновение в материал физиологических жидкостей, кровеносных сосудов и остеобластов, а также прорастание и фиксацию костной ткани, что является благоприятным фактором в случае их биомедицинского применения.

Резюме.

Таким образом, в ходе разработки и синтеза оригинального комбинированного фосфат-силикатного имплантата были изучены физико-химические свойства полученного материала, определен микроэлементный состав гранул до и после прокаливания. Выяснено, что после прокаливания полностью исчезли составляющие желатина, сохранился исключительно керамический каркас материала. Обращает на себя внимание изменение количества фосфора в гранулах с соотношением ГА/ВТ 60/40 и 40/60 масс.% соответственно группам, так при 29%-й разнице количества фосфора в исходных гранулах, после прокаливания разница составила 339%. Вероятно, что данная разница может оказать влияние на процессы формирования костной ткани в зоне имплантации, что предстоит выяснить в ходе дальнейшего исследования.

Учитывая, что разработанный имплантат обладает необходимыми прочностными характеристиками оптимальным удельным весом и высокой пористостью структуры представляется возможным его использование для замещения костных дефектов. Одна из особенностей полученного материала – наличие во внутренней структуре крупных пор и полостей, что вероятно может способствовать использованию имплантатов не только для замещения дефектов костных тканей, но и как своеобразную матрицу для депонирования и доставки лекарственных веществ в зону имплантации, что может быть востребовано при лечении инфекционных или опухолевых костных процессов.

ГЛАВА 4 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ГРУППАХ

Наблюдение и оценка процессов репаративного остеогенеза – один из наиболее сложных аспектов идентификации качества новообразованной ткани. Зачастую контроль регенерации осуществляют исключительно лучевыми методами диагностики, но не всегда полученные данные полностью отражают истинную картину. Оценка биохимических показателей крови, морфологические исследования, изучение ионного состава кости являются одними из наиболее достоверных способов контроля за восстановлением костной ткани, которые в совокупности с рентгенографическими методами способны предоставить исследователю исчерпывающую информацию о протекающих процессах. Очевидно на степень выраженности репаративного процесса влияет размер, форма и локализация самого костного дефекта, в связи с чем для решения поставленных задач необходимо было в условиях эксперимента на животных получить такой критический дефект, который, с одной стороны не подвергался бы спонтанному органотипическому восполнению, а с другой, создавал максимально идентичные условия во всех группах животных, исключая влияние локализации и прочих параметров на процессы регенерации и органотипической перестройки, связанные с имплантацией изучаемых материалов.

4.1 Способ получения стандартизированного дефекта костной ткани в условиях эксперимента

На первом этапе исследования для объективизации полученных данных и оценки репаративных возможностей имплантата был разработан и запатентован способ получения стандартизированного дефекта костной ткани у экспериментального животного (ПАТЕНТ № 2802431 от 28.03.2023) (приложение Б).

Для создания посттравматического костного дефекта выполнялся послойный доступ к дистальному метаэпифизу бедренной кости кролика с латеральной стороны. После обнажения кости и удаления надкостницы, используя дисковую пилу (диаметр диска – 20мм, толщина 1мм) производился окончательный выпил

кортикальной пластинки с размерами сторон 10мм и 5мм (длина и ширина соответственно) (рис. 20).

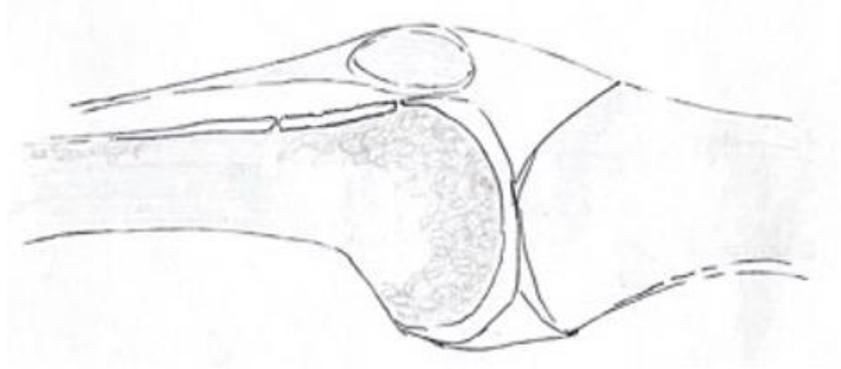


Рисунок 20 – Резецируемый участок костной ткани длиной 10мм (боковая проекция)

Далее выполнялось «вдавление» кортикальной пластинки до контрлатерального кортикального слоя (средняя глубина импрессии 8мм), в результате чего формировался компрессионный перелом подлежащей метаэпифизарной губчатой кости (рис.21).

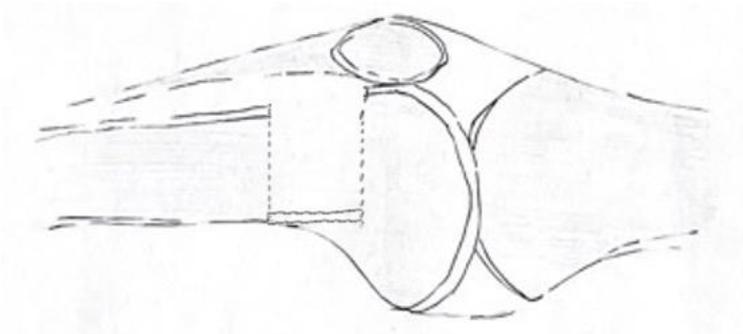


Рисунок 21 – Смещение эктомированной кортикальной пластинки на глубину 8мм (боковая проекция)

Затем при помощи элеватора «вдавленный» фрагмент поднимался и фиксировался к материнской кости в исходном положении. В результате образовывался посттравматический отграниченный от окружающих мягких тканей костный дефект стандартного размера и формы, объем которого составлял $400 \pm 4\text{мм}^3$ (рис. 22).

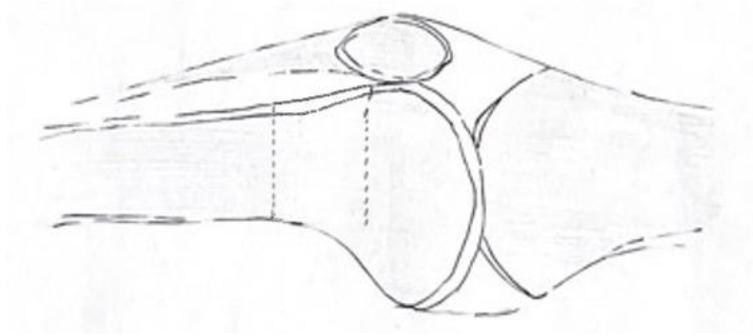


Рисунок 22 – Сформированная зона компрессии губчатой ткани

Получение дефекта метафизарной зоны бедренной кости у экспериментального животного было подтверждено при помощи МСКТ исследования (рис. 23).



а)



б)

Рисунок 23 – МСКТ зоны сформированного дефекта: а - эктомированный фрагмент кортикальной пластинки внедрен в спонгиозную ткань, б - фрагмент «поднят» и фиксирован в исходном положении

4.2 Клинические и лабораторные исследования

После моделирования костного дефекта животные находились под ежедневным контролем клинического статуса: оценивалось их общее состояние, сохранение аппетита и жажды, температура тела *per rectum*, опороспособность конечности, заживление послеоперационной раны, наличие или отсутствие отека, гиперемии, повышение локальной температуры оперированной конечности. Лабораторные исследования сыворотки крови всех групп животных выполнялись

на 7-е, 14-е и 30-сутки. При биохимическом исследовании крови были проанализированы уровень кальция, фосфора и щелочной фосфатазы, WBC, СРБ.

Наиболее значимые изменения в клиническом статусе животных были зафиксированы в период с 1 по 6 сутки. В первые сутки после моделирования дефекта и установки биоактивного материала животные всех исследуемых групп оставались вялыми, мало двигались, не опирались на оперированную конечность. Было зафиксировано снижение аппетита, увеличение потребления жидкости (до 500 мл), средняя температура тела у животных составляла $40,03 \pm 0,08$ °С, а среднее значение локальной температуры оперированной конечности – $40,5 \pm 0,1$ °С. У всех животных отмечалась местная гиперемия, отечность и болезненная реакция на пальпацию оперированной конечности. На 2-е сутки у животных сохранялось снижение аппетита, болевая реакция, однако зона гиперемии уменьшалась, улучшилась активность и частично восстановилась опороспособность. Среднее значение температуры у животных составило $39,8 \pm 0,1$ °С, местной – $40,2 \pm 0,1$ °С. На 3-и сутки у животных восстановились аппетит и двигательная активность, жажда снизилась (объем потребляемой жидкости – 350 мл). Местный отек и болевая чувствительность не регистрировались. Среднее значение температуры тела составило $39,4 \pm 0,2$ °С, местной – $39,6 \pm 0,2$ °С. К 5-ым суткам после операции фиксировали только незначительное повышение местной температуры конечности – $39,2 \pm 0,2$ °С, остальные показатели клинического статуса вернулись к дооперационным, с 6-х суток отмечалось полное восстановление клинического статуса у животных всех наблюдаемых групп. В послеоперационном периоде статистической разницы между показателями температуры тела не было зафиксировано.

4.3 Оценка результатов исследования в группах

4.3.1 Результаты исследований в группе № 1 (группа контроля)

Оценка сформированной ткани выполнялась на сроке наблюдения в 30, 60 и 90 суток с использованием метода МСКТ.

На сроке в 30 суток в зоне сформированного дефекта определялась полость, без признаков восстановления нормальной костной архитектоники. Края сформированной полости ровные, прослеживался дефект кортикальной пластинки. На глубине дефекта и под эктомированной кортикальной пластинкой отмечались зоны повышенной рентгенологической плотности. Признаков замещения дефекта не определялось (рис. 24).

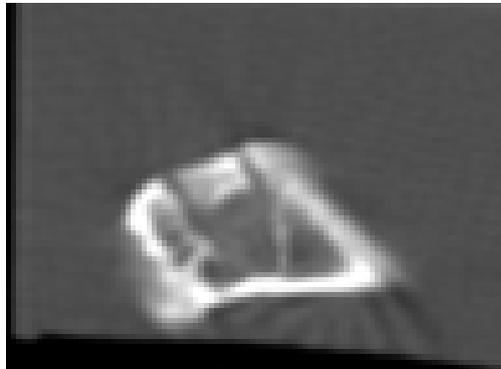


Рисунок 24 – МСКТ зоны дефекта в группе № 1, срок 30 суток

На срок в 60 суток на контрольном МСКТ исследовании зона дефекта по-прежнему визуализировалась, в сравнении с исследованием, проведенным на 30-е сутки, зона дефекта уменьшилась. Структура полости определялась как неоднородная, визуализируются очаги повышенной плотности в субкортикальной зоне и в области контралатеральной кортикальной пластинки. Отмечалось частичное сращение эктомированной кортикальной пластинки в дистальном отрезке (рис. 25).

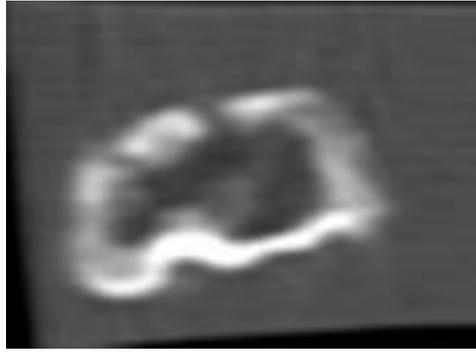


Рисунок 25 – МСКТ зоны дефекта в группе № 1, срок 60 суток

На срок в 90 суток зона дефекта визуально отличалась от окружающих костных структур. Отмечалось практически полное сращение эктомированной кортикальной пластинки в дистальном отделе и частичное в проксимальной части. Зона дефекта заполнена новообразованной тканью с различной структурой и расположенной преимущественно под резецированным фрагментом (рис. 26).

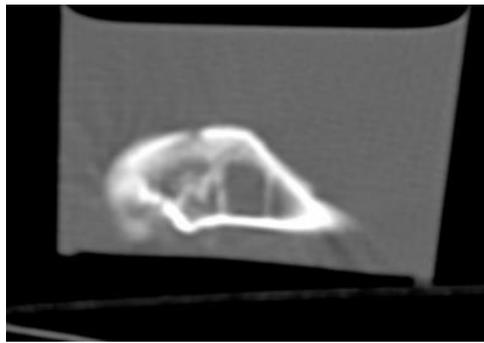


Рисунок 26 – МСКТ зоны дефекта в группе № 1, срок 90 суток

Для оценки рентгенологической плотности сформированной костной ткани использовалась классификация С. Misch. Согласно данной классификации, плотность губчатой костной ткани составляет от 300 до 800 единиц Хаунсфильда (НУ).

В данной группе средний показатель плотности новообразованной ткани в области сформированного дефекта к исходу 30-ти суток составлял 189,1 [175,0; 198,5] НУ, к окончанию 60-х суток плотность возросла и достигла уровня 246,1 [230,5; 257,0] НУ, а к окончанию 90-х суток, демонстрируя последовательную положительную динамику, показатель плотности достиг значения 287,1 [276,0; 296,5] НУ. Такие относительно высокие средние данные не полностью соответствовали МСКТ-картине, на которой убедительные признаки именно

костной регенерации обнаруживали только в области остеотомированного кортикального слоя и прилежащей к ней эндостальной зоне. В центральных отделах метафизарного дефекта параметры заполнившей дефект ткани были значительно ниже показателей плотности, характерной для несформированной губчатой кости, что в целом определило и минимальный уровень интегративного результата, не соответствующего даже 4 типу по классификации С. Misch.

Для оценки процессов остеогенеза при помощи растровой электронной микроскопии с энергодисперсионным анализом производился количественный подсчет микроэлементов в зоне формирования костной ткани. Оценивалось содержание кальция, фосфора и кремния в структуре образованной ткани. Массовое количество кальция с течением времени постепенно увеличивалось с уровня 14,61 [13,95; 15,22] масс.% на 30-е сутки, 26,11 [23,75; 28,45] масс.% на 60-е сутки и до уровня 28,41 [26,15; 30,22] масс.% на 90-е сутки, наибольший «скачок» в динамике количества кальция был зафиксирован между 30 и 60 сутками, когда произошло увеличение практически на 80% (рис. 27).

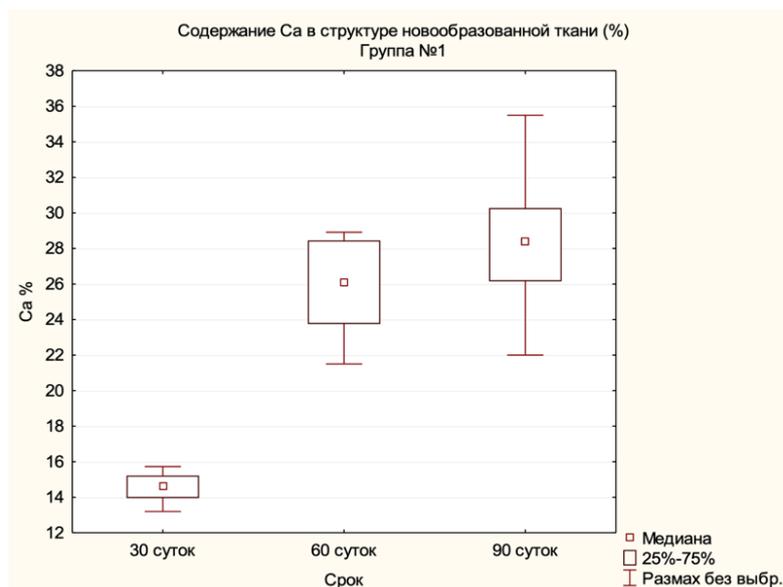


Рисунок 27 – Содержание кальция (Ca) в структуре новообразованной ткани по срокам (группа № 1)

Количество фосфора в новообразованной ткани в течение всего срока наблюдения также имело восходящую тенденцию и происходило чуть менее

активно, чем увеличение кальция с уровня 6,64 [6,39; 7,18] масс.% на 30-е сутки исследования до 11,75 [11,23; 12,32] масс.% на 90-е сутки (рис. 28).

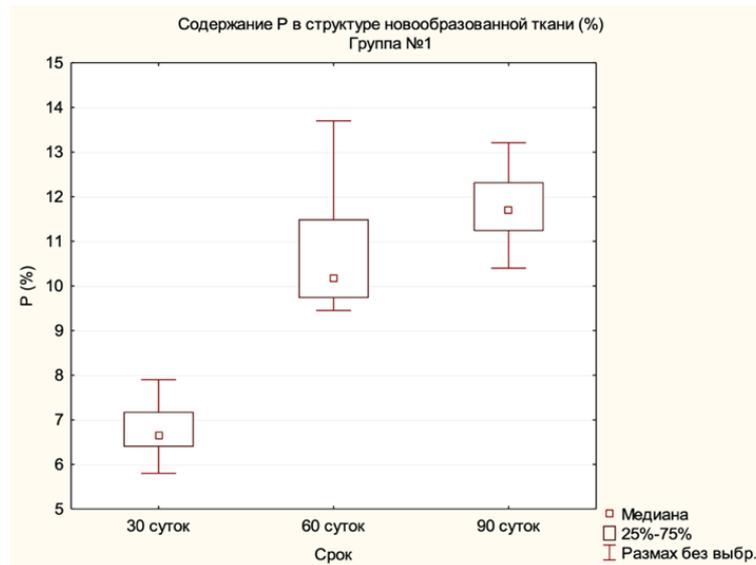


Рисунок 28 – Содержание фосфора (P) в структуре новообразованной ткани по срокам (группа № 1)

Обращала на себя внимание тенденция изменения количества кремния, наибольшее значение было получено по исходу 30-ти суток (0,75 [0,51; 0,81] масс.%) и, с течением времени, постепенно снижалась до 0,04 [0,02; 0,09] масс. % к исходу 90-х суток, то есть на протяжении всего срока исследования мы наблюдали, как количество кремния в структуре новообразованной ткани уменьшилось более чем в 15 раз (рис. 29).

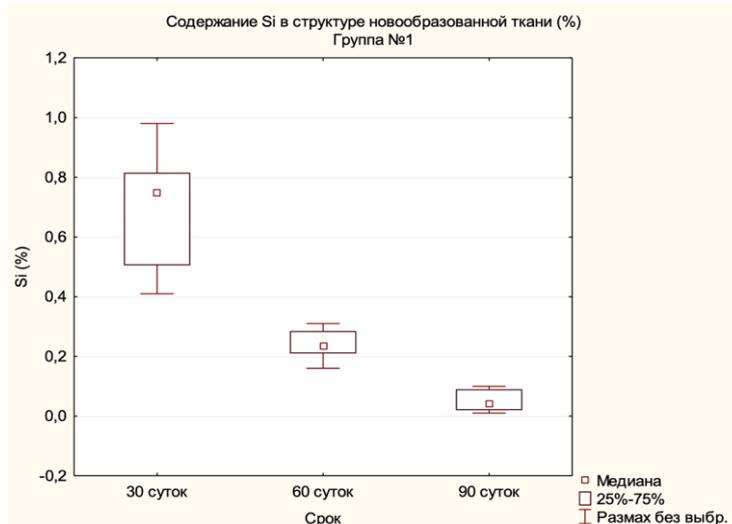


Рисунок 29 – Содержание кремния (Si) в структуре новообразованной ткани по срокам (группа № 1)

В группе №1 замещение костного дефекта остеоиндуктивным материалом не выполнялось. На 30-е сутки проводилось гистологическое исследование, по результатам которого отмечалось, что между резецированным фрагментом и костным ложем непрерывного костного сращения не наблюдалось, их объединяла волокнистая соединительная ткань с участками ретикулофиброзной слабоминерализованной незрелой костной ткани. В проекции дефекта от компактной пластинки в межтрабекулярных промежутках по направлению к внутренним участкам метаэпифиза формировалась рыхлая волокнистая соединительная ткань (рис. 30). Площадь новообразованной ткани составила в зоне сформированного метафизарного дефекта составила 3,11 [1,92; 4,08] %, фрактальность в данной зоне составляла 0,48 [0,29; 0,61], а лакунарность 1,75 [1,51; 1,95]

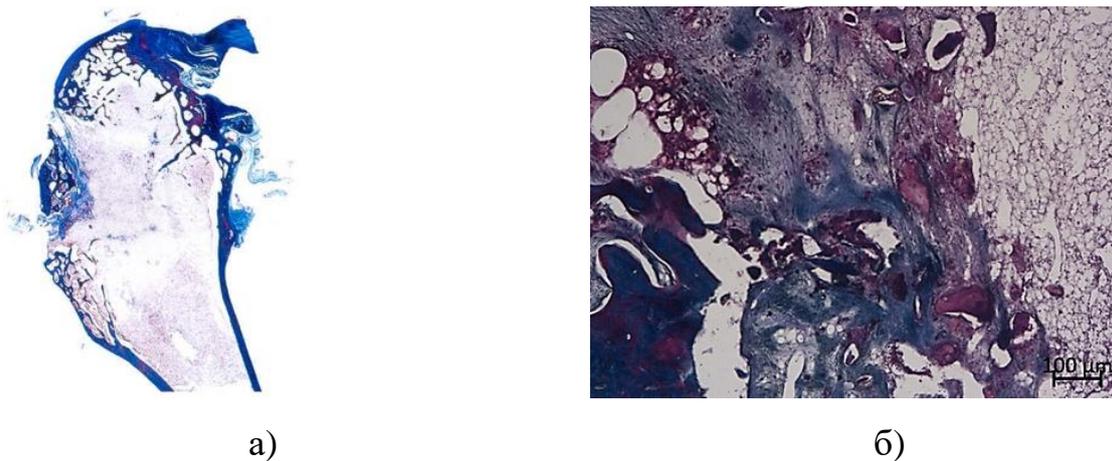


Рисунок 30 – Гистологические препараты зоны метафизарного дефекта. а - гистотопограмма метафизарного отдела бедренной кости (окраска по Массону, увеличение x1,5); б - формирующаяся рыхлая соединительная ткань в зоне дефекта (окраска по Массону, увеличение x50)

На 90-е сутки в данной группе наблюдалось неполное сращение эктомированного костного фрагмента с окружающей костной тканью (рис. 31 а), однако с наружной поверхности между проксимальной частью отломка и верхней границей имплантационного костного ложа костное объединение прерывалось на 200 – 250 мкм участком рыхлой волокнистой соединительной ткани. Костная ткань частично заполняла собой сформированную полость, новообразованная ткань

представлена немногочисленными мелкими костными трабекулами, большая часть из которых располагается субкортикально в зоне эктомированного фрагмента. Зона дефекта широко заполнена волокнистой соединительной тканью (рис. 31 б). Площадь новообразованной ткани составила в зоне сформированного метафизарного дефекта составила 6,01 [4,81; 7,11] %, фрактальность в данной зоне составляла 1,05 [0,97; 1,15], а лакуарность 1,51 [1,21; 1,72].

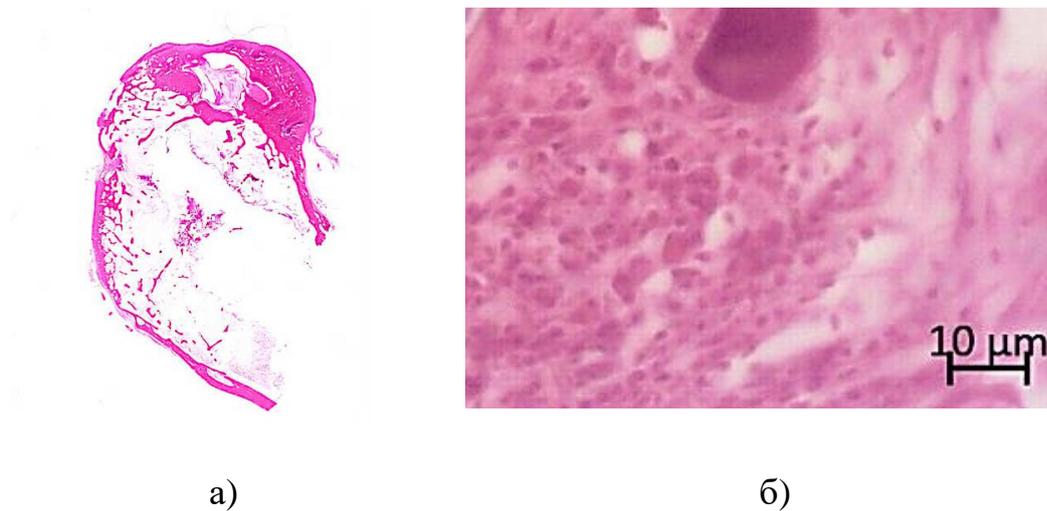


Рисунок 31 – Гистологические препараты зоны метафизарного дефекта. а - гистотопограмма метафизарного отдела бедренной кости (окраска по Массону, увеличение $\times 1,5$); б - участки волокнистой соединительной ткани в зоне сформированного дефекта (окраска гематоксилином и эозином, увеличение $\times 400$)

4.3.2 Результаты исследований в группе № 2

В группе №2 в сформированный дефект костной ткани в зоне дистального метаэпифиза имплантировался материал с соотношением фосфатов и силикатов кальция 60/40 масс. %

По данным МСКТ на 30-е сутки в структуре сформированного костного дефекта определялась новообразованная ткань, занимающая практически весь объем, но при этом не обладающая гомогенностью и не имеющая четких границ. Признаки слияния с окружающей костной тканью не были выражены. Кортикальная пластинка срослась с окружающей костью практически на всем протяжении (рис. 32).

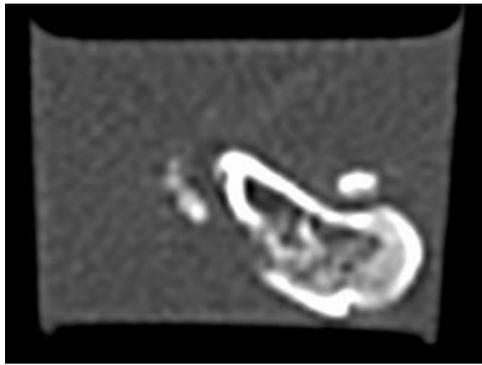


Рисунок 32 – МСКТ- скан зоны дефекта в группе № 2 (30 суток)

На срок в 60 суток весь объем образованной полости замещен сформированной костной тканью. По своей структура образованная ткань - однородная, без включений, соответствующая границам полости. Остеотомированный фрагмент кортикального слоя сращен с окружающей костью в проксимальном и дистальном отрезке. В дистальном отделе сформированного дефекта также отмечалось сращение новообразованной костной ткани с окружающей костью (рис. 33).

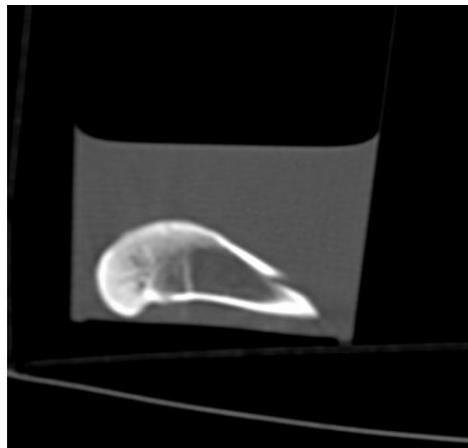


Рисунок 33 – МСКТ- скан зоны дефекта в группе № 2 (60 суток)

Через 90 суток вся область дефекта замещена новообразованной костной тканью с однородной костной структурой, без видимых полостей, визуально не отличающаяся от окружающей кости. Зона резекции фрагмента кортикальной пластинки также не отличима (рис. 34).

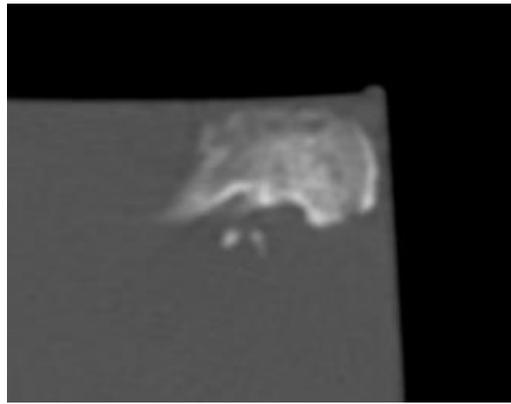


Рисунок 34 – МСКТ- скан зоны дефекта в группе № 2 (90 суток)

Через 30 суток после имплантации гранул оценивалась рентгенологическая плотность новообразованной ткани. В зоне имплантации медиана её плотности составляла 295,0 [287,0; 307,0] HU, при равномерности показателей во всех отделах дефекта. На 60-е сутки плотность составляла 355,5 [336,0; 368,5] HU, что согласно 3 типу по классификации С. Misch соответствовало сформированной костной ткани. При этом эта костная ткань отличалась однородностью, отсутствием зон остеосклероза и костных полостей. Через 90 суток новообразованный регенерат приобретал более плотную структуру, что свидетельствовало о дальнейшей интенсификации процессов реорганизации и ремоделирования при медианном значении плотности 421,0 [411,0; 430,0] HU, соответствующей кости с пористой компактной пластинкой и рыхлым губчатым веществом. Костный регенерат отличался своей однородностью, отсутствием видимого дефекта кортикальной пластинки, губчатая ткань не имела видимой границы между новообразованной и окружающей костной тканью.

Как и в других группах оценка распределения микроэлементов в ткани выполнялась при помощи растровой электронной микроскопии с энергодисперсионным анализом с установлением процентного содержания Са, Р и Si. Новообразованная ткань обладала значительным количеством кальция в своем составе, которое нарастало с 20,61 [19,75; 21,55] масс.% на 30-е сутки, до 36,02 [30,93; 38,25] масс.% к окончанию 90-х суток исследования (рис. 35).

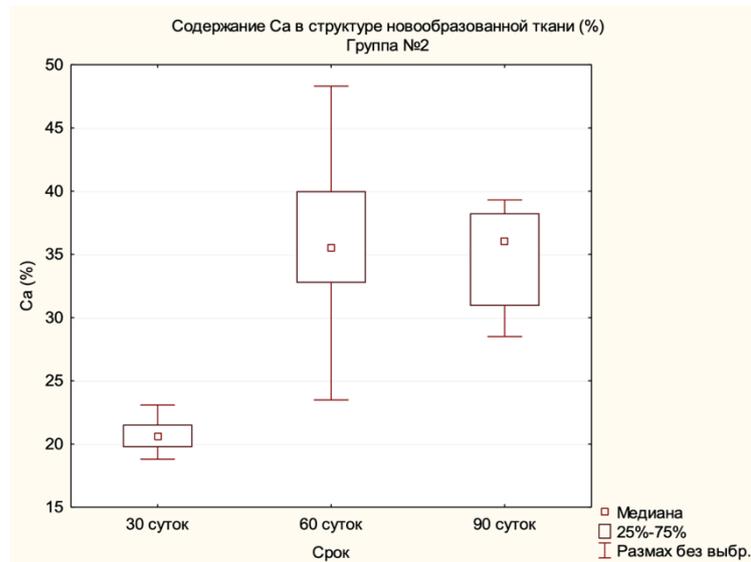


Рисунок 35 – Изменение количества кальция в структуре новообразованной ткани в группе № 2

Также, как и в группе №1 у количественного показателя уровня фосфора наблюдалась стойкая восходящая тенденция в течение всего срока наблюдения с уровня 15,58 [13,67; 17,41] масс. % на 30-е сутки исследования, до 18,56 [17,94; 19,17] масс. % к окончанию 90-х суток. (рис. 36)

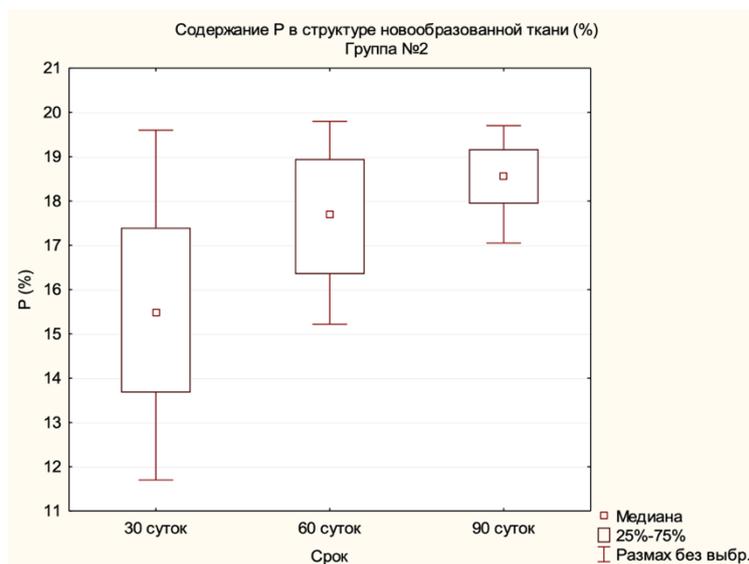


Рисунок 36 – Изменение количества фосфора в структуре новообразованной ткани в группе № 2

Отмечалось, что в данной группе, по сравнению с группой №1 в течение всех сроков содержание кремния были выше, что могло свидетельствовать об активизации остеорегенераторных процессов. На 30-е сутки количество кремния

составляло 1,95 [1,79; 2,15] масс. % и, с течением времени, имело нисходящую тенденцию: 0,51 [0,25; 0,81] масс.% на 60-е сутки и 0,17 [0,08; 0,23] масс.% на 90-е сутки исследования (рис. 37).

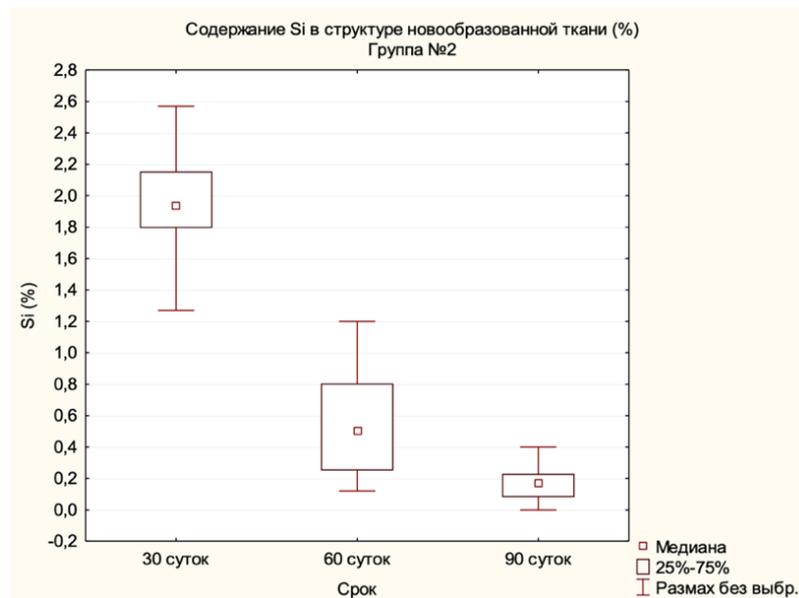


Рисунок 37 – Изменение количества кремния в структуре новообразованной ткани в группе № 2

По результатам гистологического исследования, проведенного в срок 30 суток в зоне имплантации материала, отмечалось формирование костной ткани, наиболее приближенной к органотипическому строению эпиметафиза кости (рис. 38 а). С наружной поверхности кортикального слоя отмечали непрерывное костное сращение, в дистальной части – за счет формирования непрерывной компактной пластинки, объединяющей дистальную часть костного ложа и интегрированного костного фрагмента, в проксимальной – за счет формирования непрерывной губчатой кости мелкоячеистого и среднеячеистого строения. Новообразованная костная ткань имела в своем составе гранулы имплантируемого материала размером от 15 до 35 мкм, которые были внедрены в трабекулярную костную структуру и окружены новообразованными сосудами. (рис. 38 б, в). Площадь новообразованной ткани составила в зоне сформированного метафизарного

дефекта составила 8,51 [6,25; 9,97] %, фрактальность в данной зоне составляла 0,85 [0,71; 1,02], а лакунарность 0,68 [0,47; 0,82].

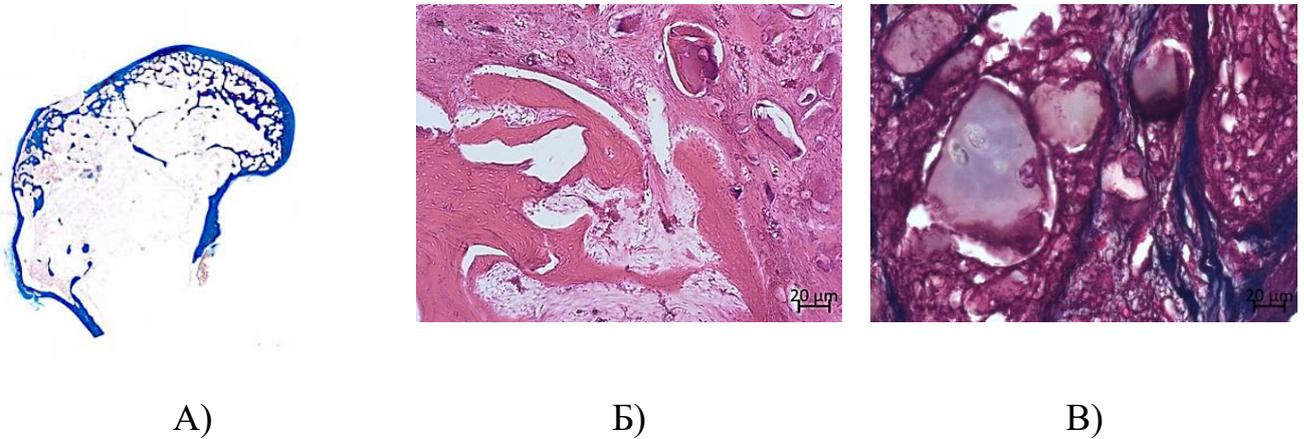


Рисунок 38 – Гистологические препараты зоны метафизарного дефекта. А - гистотопограмма метафизарного отдела бедренной кости (окраска по Массону, увеличение 1,5х); Б - новообразованная ткань в зоне дефекта с фрагментами имплантированного материала (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 200х); В - фрагменты имплантационного материала, окруженные микрососудами (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 400х)

На 90-е сутки в микропрепарате не определялось дефекта костной ткани, наблюдалось полное сращение кортикальных пластинок в проксимальном и дистальном отделе. Весь объем сформированного метафизарного дефекта заполнен губчатой тканью мелко- и среднеячеистого строения (рис. 39 а). Отличительной особенностью являлось образование большего объема костной ткани в области дефекта за счет увеличения толщины костных трабекул. Остатки гранул имплантированного материала плотно «включены» в трабекулярную структуру новообразованной ткани и составляли 7,9 [4,9; 11,7] % (рис. 39 б). Новообразованные сосуды имели достаточно разветвленную сеть с нормальным кровенаполнением (рис. 39 в). Площадь новообразованной ткани в зоне сформированного метафизарного дефекта составила 24,52 [21,51; 28,42] %, фрактальность – 1,68 [1,34; 2,18], а лакунарность – 0,47 [0,35; 0,55].

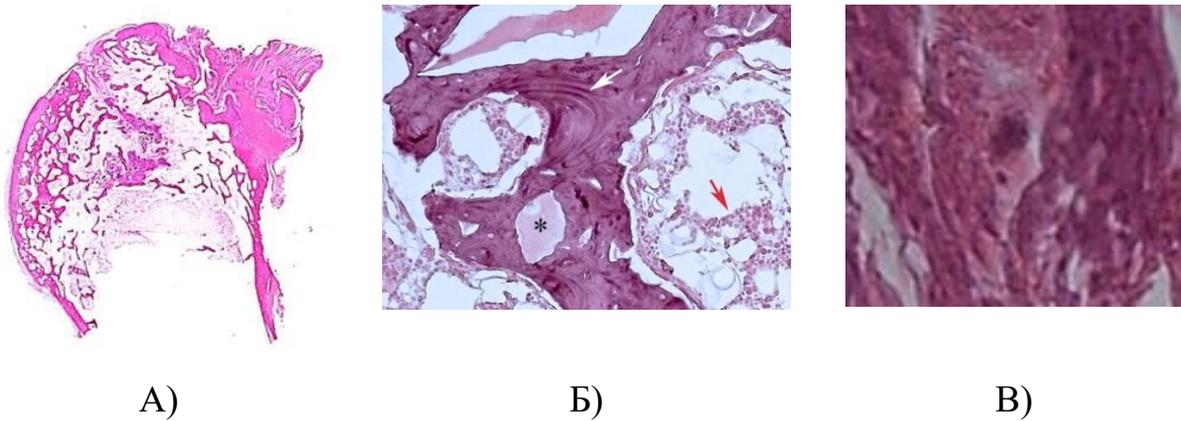


Рисунок 39 – Гистологические препараты зоны метафизарного дефекта. А - гистотопограмма метафизарного отдела бедренной кости (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 1,5х); Б - фрагменты имплантированного материала, встроенные в трабекулярную структуру (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 10х); В - кровеносный сосуд умеренного наполнения (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 400х)

4.3.3 Результаты исследований в группе № 3

В группе №3 в сформированный дефект костной ткани имплантировали гранулы с соотношением фосфатов и силикатов кальция 50/50 масс.%

По данным МСКТ исследования, проведенного на 30-е сутки, отмечалось, что дефект кортикальной пластинки в проксимальном отделе не определялся, в дистальном же отделе он визуализировался и проходил на всю глубину кортикальной кости. В зоне имплантации гранул отмечалось нечеткое формирование ткани, без ровных краев и неоднородной по плотности. Признаков слияния с окружающей костью четко не определялось (рис. 40).

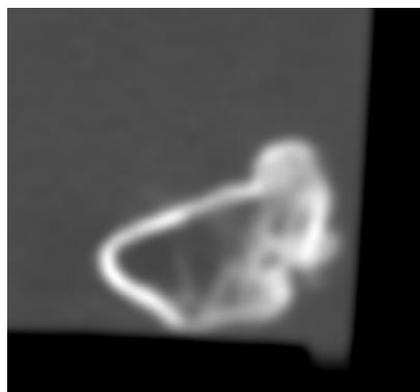


Рисунок 40 – МСКТ-скан зоны дефекта в группе № 3 (30 суток)

На срок в 60 суток в зоне формирования дефекта отмечалось сращение кортикальной пластинки с материнской костью в проксимальном и дистальном отделах. В зоне имплантации гранул определялась новообразованная ткань, однородная по структуре с полостями, локализирующимися преимущественно в области контрлатеральной кортикальной пластинки (рис. 41).



Рисунок 41 – МСКТ-скан зоны дефекта в группе № 3 (60 суток)

На 90-е сутки в зоне имплантации гранул кортикальная пластинка выглядела однородной на всем протяжении. В метафизарном отделе определялась новообразованная ткань, по структуре схожая с окружающей ее костью, но имеющая в своем составе небольшое количество полостей (рис. 42)

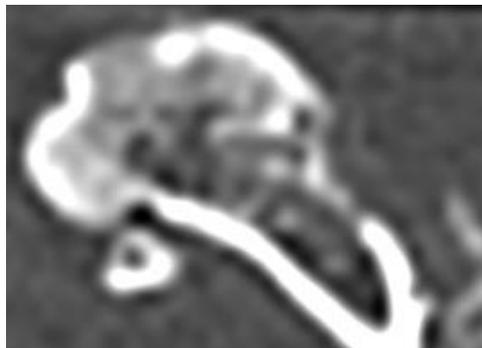


Рисунок 42 – МСКТ-скан зоны дефекта в группе № 3 (90 суток)

К концу первых 30-ти суток медиана плотности новообразованной ткани составляла 202,0 [195,5; 222,0] HU. К исходу 60-х суток показатель плотности увеличился практически на 50% и составил 301,0 [286,0; 309,0] HU. Плотность, определяющая сформированную кость, не достигалась в дефекте и к 90-м суткам исследования – 322,5 [311,0; 335,1] HU, при некритичном разбросе максимальных

и минимальных показателей. Таким образом новообразованная ткань в зоне дефекта по показателям лишь приблизилась к 4 типу по классификации С. Misch.

После вывода животных из исследования и забора материала для микроскопии выполнялся анализ количественного состава микроэлементов кости. На 30-е сутки исследования уровень кальция составлял 14,75 [12,11; 16,11] масс. %, к 60-м суткам было зафиксировано резкое увеличение количества кальция в структуре костной ткани до 24,71 [22,45; 27,65] масс. %, а к 90-м суткам наблюдалось небольшое, статистически не значимое, снижение до уровня 24,08 [21,95; 26,95] масс. % (рис. 43).

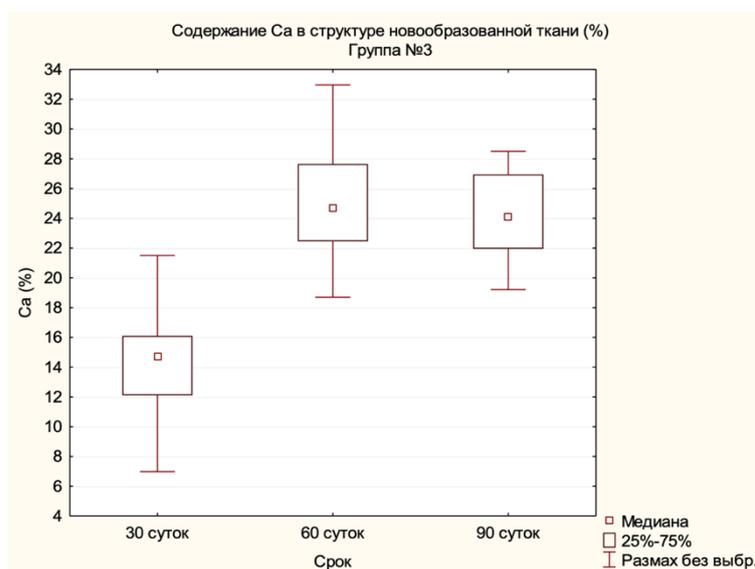


Рисунок 43 – Изменение количества кальция в структуре новообразованной ткани в группе № 3

В течение всего срока наблюдения фиксировалась восходящая тенденция по уровню насыщенности костной ткани фосфором: на 30-е сутки показатель составлял 12,55 [10,76; 14,65] масс. %, к 60-м суткам – 13,53 [11,41; 16,65] масс. % и к окончанию 90-х суток – 14,11 [12,18; 15,35] масс. % (рис. 44).

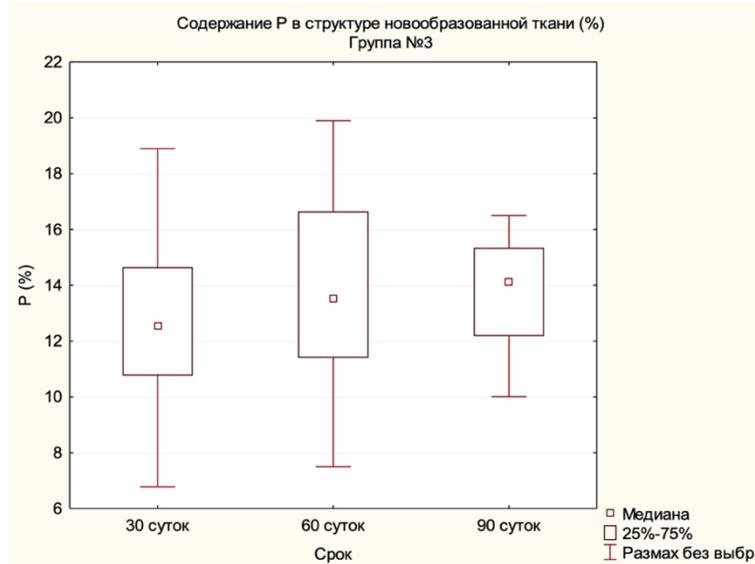


Рисунок 44 – Изменение количества фосфора в структуре новообразованной ткани в группе № 3

Количественные показатели насыщенности кремнием с течением времени, напротив, имели нисходящую тенденцию с уровня 1,45 [1,15; 1,74] масс.% на 30-е сутки, с последующим наиболее существенным, более чем 7-ми кратным падением, к 60-м суткам – 0,17 [0,11; 0,33] масс.%, и более плавным снижением до 0,11 [0,05; 0,19] масс.% на 90-е сутки (рис. 45).

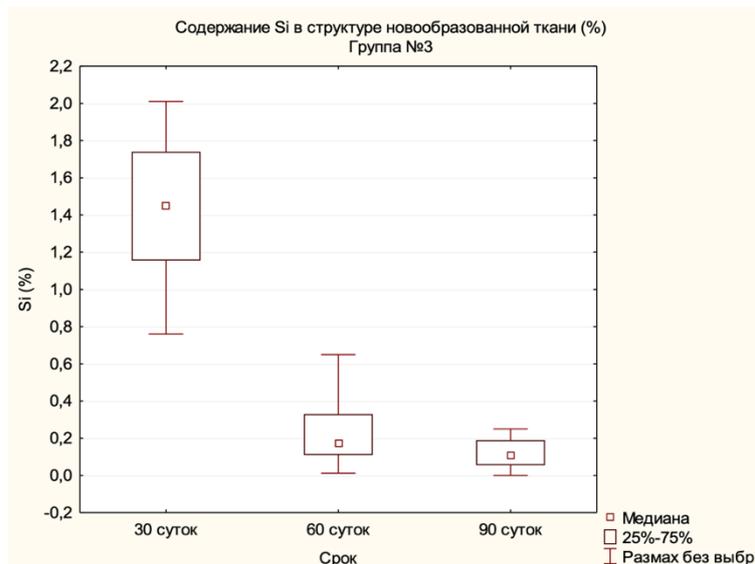


Рисунок 45 – Изменение количества кремния в структуре новообразованной ткани в группе № 3

По результатам гистологического исследования, проведенного на 30-е сутки, отмечалось, что в дистальном отрезке сформированного кортикального дефекта сращения не произошло (рис. 46 а). В структурах новообразованной ткани определялись фрагменты имплантационного материала разнообразной формы и размера (от 7 до 60 мкм) (рис. 46 б), окруженные новообразованной костной тканью, пронизанной сосудами капиллярного типа с умеренным наполнением (рис. 46 в). Площадь новообразованной ткани составила в зоне сформированного метафизарного дефекта 6,11% [4,75; 8,21], фрактальность в данной зоне составляла 0,87 [0,65; 0,97], а лакунарность 0,75 [0,65; 0,89].

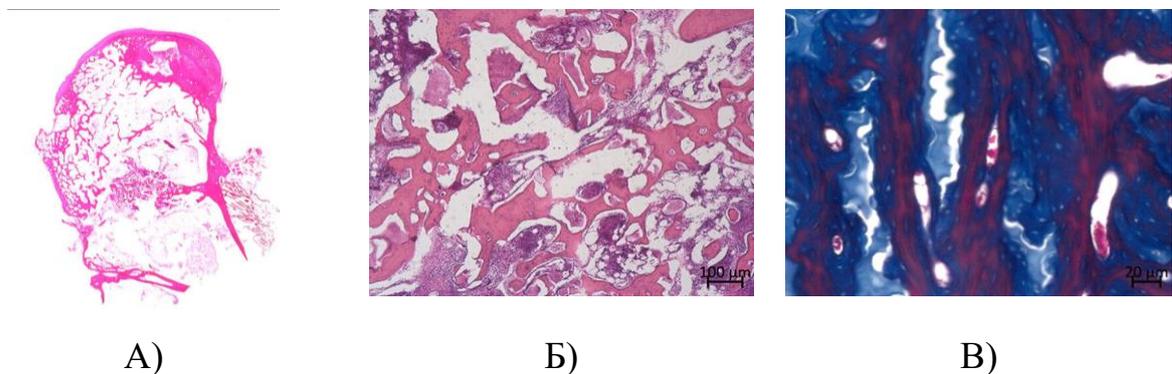


Рисунок 46 – Гистологические препараты зоны метафизарного дефекта. А - гистотопограмма метафизарного отдела бедренной кости (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 1,5х); Б- фрагменты имплантированного материала, расположенные в трабекулярной структуре и межбалочном пространстве (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 50х); В- кровеносный сосуд умеренного наполнения (окраска по Массону, увеличение 200х)

На 90-е сутки диастаза между фрагментами кортикальной пластинки не визуализировалось (рис. 47 а). Зона дефекта была заполнена среднеячеистой губчатой костью пластинчатого строения, но встречались и небольшие участки, образованные ретикулофиброзной костной тканью с незначительными включениями грануляционной и волокнистой соединительной ткани (преимущественно в межтрабекулярных промежутках) (рис. 47 б). Среди новообразованной остеоидной ткани не обнаруживались кисты или очаги порозности. Остатки гранул имплантированного материала плотно «включены» в трабекулярную структуру новообразованной ткани и составляли 17,4 [15,5; 24,1] %.

Кровеносные сосуды в области дефекта были полнокровными, слегка расширенными (рис. 47 в). Площадь новообразованной ткани в зоне сформированного метафизарного дефекта составила 16,51 [13,52; 17,63] %, фрактальность – 1,70 [1,41; 2,08], а лакунарность – 0,63 [0,52; 0,73].

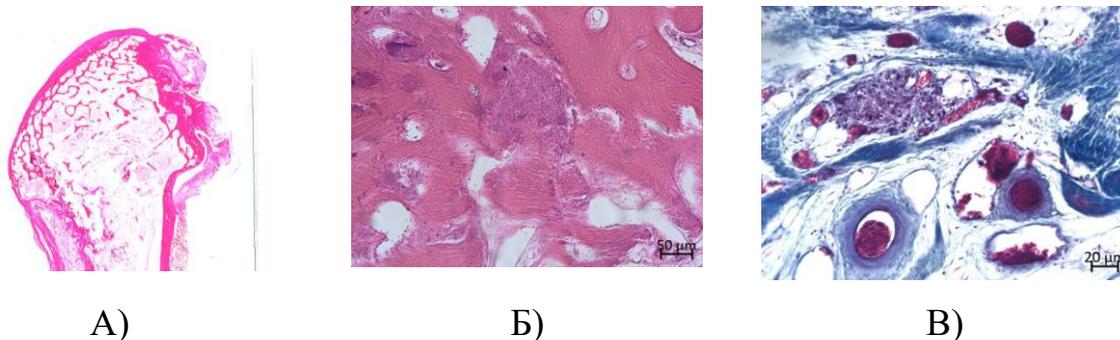


Рисунок 47 – Гистологические препараты зоны метафизарного дефекта. А - гистотопограмма метафизарного отдела бедренной кости (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 1,5х); Б – участок новообразованной костной ткани (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 50х); В - кровеносный сосуд в зоне замещенного дефекта (окраска по Массону, увеличение 400х)

4.3.4 Результаты исследований в группе № 4

В группе №4 в зону сформированного дефекта дистального метаэпифиза имплантировали гранулы с соотношением фосфатов и силикатов кальция 40/60 масс.% соответственно.

В области эктомированной кортикальной пластики, образованная ткань не отличалась однородностью. Признаков сращения кортикальной пластинки в зоне доступа не определялось (рис. 48).

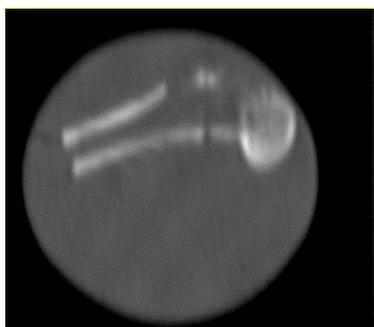


Рисунок 48 – МСКТ скан зоны дефекта в группе № 4 (30 суток)

На 60-е сутки кортикальная пластинка была частично сращена только в проксимальном отделе. В зоне сформированного метафизарного дефекта визуализировалась новообразованная ткань, по структуре более схожая с окружающей ее костной тканью с признаками сохраняющейся неоднородности (рис. 49).



Рисунок 49 – МСКТ скан зоны дефекта в группе № 4 (60 суток)

К окончанию 90-х суток исследования полноценного сращения резецированной кортикальной пластинки не наблюдалось. Зона сформированного дефекта была частично заполнена неоднородной тканью, которая располагалась преимущественно под эктомированным фрагментом кортикального слоя (рис. 50).

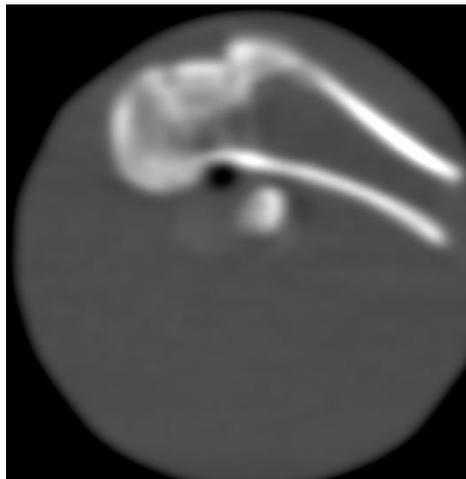


Рисунок 50 – МСКТ скан зоны дефекта в группе № 4 (90 суток)

На 30-е сутки МСКТ исследования медиана плотности новообразованной ткани составляла 184,0 [175,5; 195,5] НУ. На 60-е сутки рентгенологическая

плотность новообразованной ткани увеличилась на 32% и достигла значения 234,5 [220,0; 245,1] НУ. К 90-м суток было зафиксировано незначительное увеличение плотности новообразованной ткани, она составила 254,0 [240,0; 281;0] НУ и лишь приблизилась по плотности к губчатой костной ткани, но при этом по-прежнему не соответствовала 4 типу по классификации С. Misch.

При исследовании полученных образцов методом РЭМ-ЭДА отмечалось, что количество кальция постепенно увеличивалось, с уровня 11,31 [10,29; 12,72] масс.% на 30-е сутки, до 19,95 [17,26; 21,55] масс. % к 60-ым суткам, а к 90-м суткам практически вдвое превысило первоначальные показатели 21,75 [19,55; 23,51] масс. % (рис. 51).

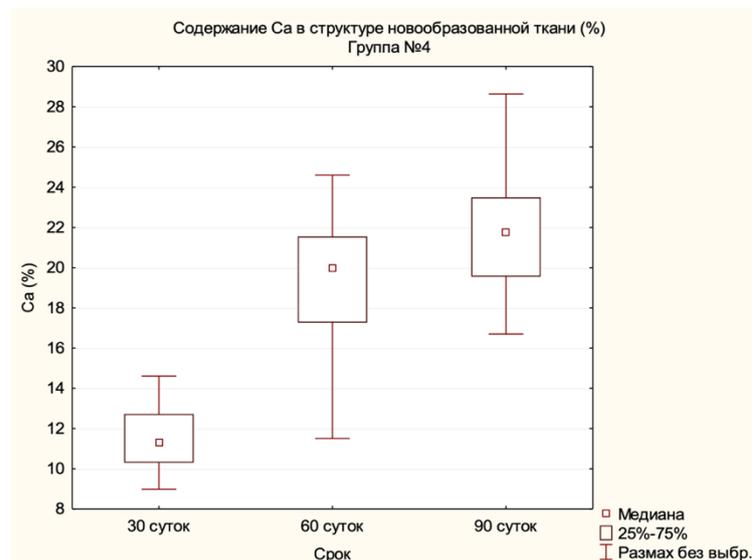


Рисунок 51 – Изменение количества кальция в структуре новообразованной ткани в группе № 4

У показателей массового количества фосфора динамика была менее выраженная и максимальные цифры были достигнуты по итогам 60-ти суток наблюдения (12,02 [9,63; 13,11] масс. %), а к 90-м суткам было зафиксировано снижение практически на 4% до 11,61 [10,58; 12,44] масс. % (рис. 52)

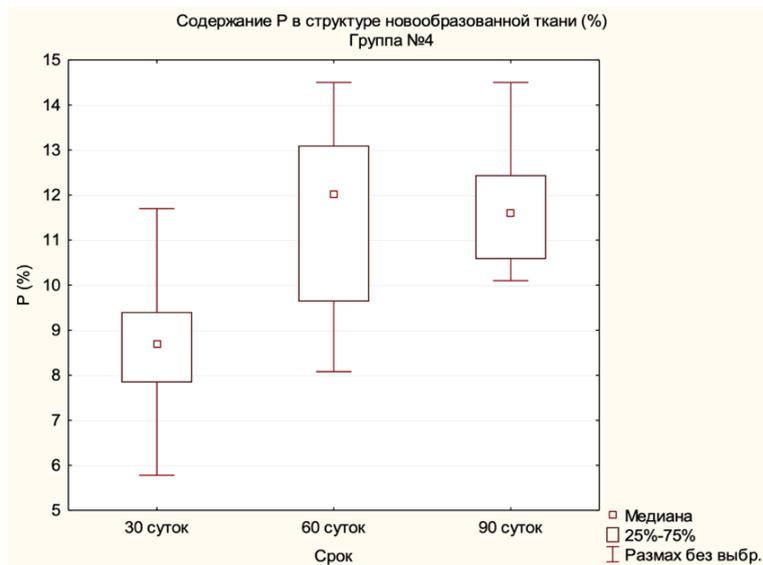


Рисунок 52 – Изменение количества фосфора в структуре новообразованной ткани в группе № 4

Наибольшая разница показателей наблюдалась в количественном соотношении кремния. Сравнивая уровень 30-ти и 90 суток, была зафиксирована разница практически в 20 раз (0,98 [0,91; 1,15] масс. % на 30-е сутки и 0,05 [0,02; 0,07] масс. % к окончанию 90-х суток) (рис. 53).

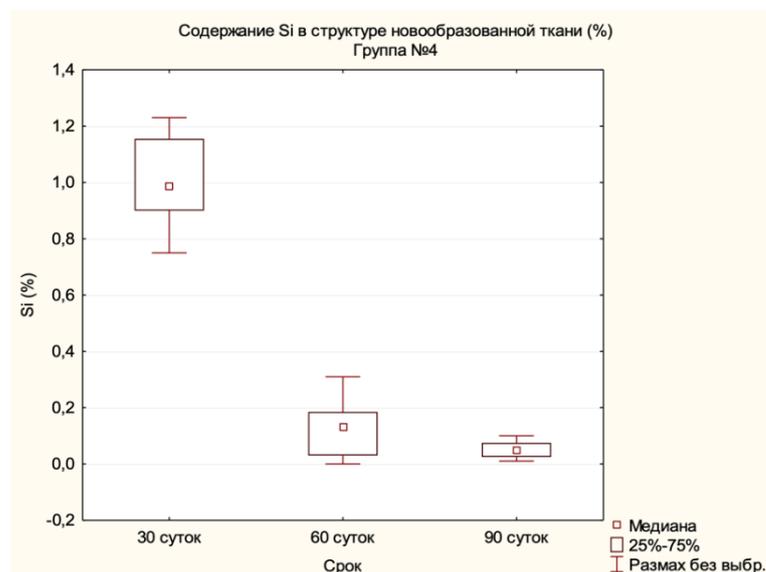


Рисунок 53 – Изменение количества кремния в структуре новообразованной ткани в группе № 4

Согласно данным гистологического исследования, на 30-е сутки в данной группе не наблюдали сращения резецированной кортикальной пластинки. В проекции задней и нижней стенок костного ложа отмечались небольшие участки

рыхлой волокнистой соединительной ткани с осколками трабекул, поврежденными в результате компрессии при формировании дефекта (рис. 54 а). Зона дефекта частично заполнялась костной тканью средне- и мелкопетлистого строения. В новообразованной ткани визуализировались частицы имплантационного материала, их размер варьировался от 10 до 55 мкм (рис. 54 б). Новообразованные сосуды в структуре дефекта имели умеренное наполнение (рис. 54 в). Площадь новообразованной ткани составила в зоне сформированного метафизарного дефекта составила 3,68 [2,87; 4,88], фрактальность в данной зоне составляла 0,79 [0,58; 0,87], а лакунарность 1,22 [1,05; 1,41].

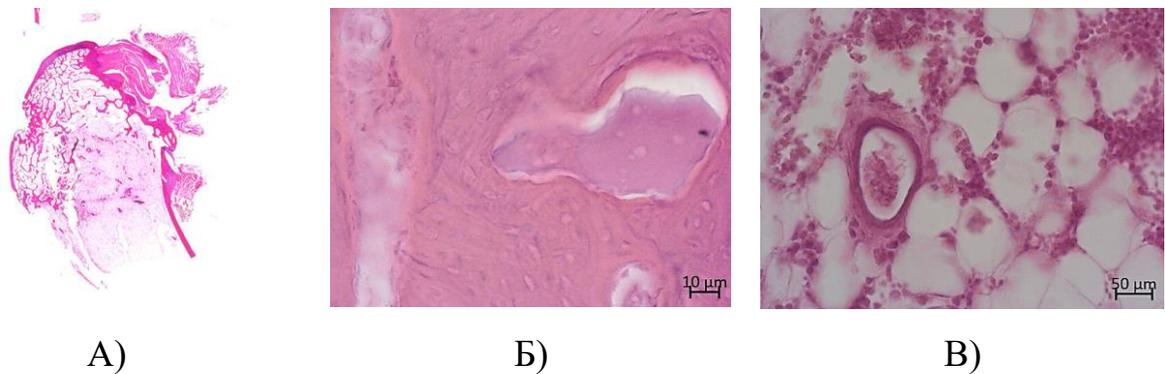
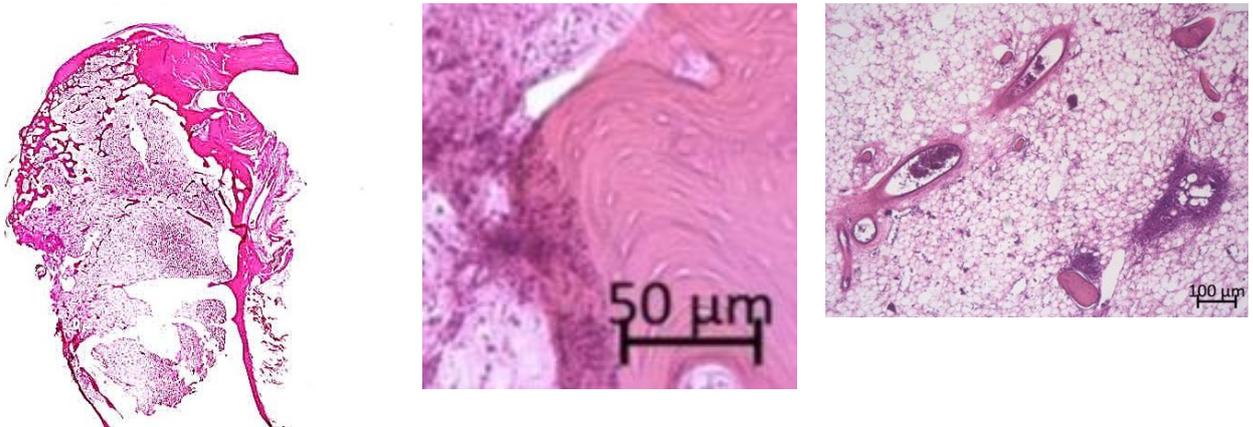


Рисунок 54 – Гистологические препараты зоны метафизарного дефекта. А – гистотопограмма метафизарного отдела бедренной кости (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 1,5х); Б – участок новообразованной костной ткани с фрагментом имплантируемого материала (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 50х); В – кровеносный сосуд в зоне сформированной ткани умеренного наполнения (окраска по Массону, увеличение 400х)

На гистотопограммах, выполненных на 90-е сутки, в проксимальной части определялось костное сращение между костным ложем и интегрированным резецированным фрагментом метадиафиза, образованное тонким слоем трабекулярной кости (рис. 55 а). В межтрабекулярных промежутках обнаруживались участки рыхлой волокнистой соединительной и грануляционной тканей. В проекции задней стенки дефекта отмечалось формирование немногочисленных кистозных полостей небольшого размера, но при этом

новообразованная трабекулярная сеть имела в этой области достаточно плотную структуру на всем протяжении (рис. 55 б). Сосуды в микропрепарате – многочисленны, различного размера, умеренного кровенаполнения (рис. 55 в). Остатки гранул имплантированного материала плотно «включены» в трабекулярную структуру новообразованной ткани и составляли 17,3 [15,4; 20,1]%. Площадь новообразованной ткани составила в зоне сформированного метафизарного дефекта 7,81 [4,71; 10,52] %, фрактальность – 1,40 [1,12; 1,52], а лакунарность – 1,11 [0,92; 1,31].



А)

Б)

В)

Рисунок 55 – Гистологические препараты зоны метафизарного дефекта. А – гистотопограмма метафизарного отдела бедренной кости (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 1,5х); Б – участок новообразованной костной ткани с фрагментом имплантируемого материала (окраска гематоксилином и эозином, увеличение 100х); В – кровеносный сосуд в зоне дефекта умеренного наполнения (окраска по гематоксилином и эозином, увеличение 100х)

Резюме

Подводя итоги проведенных рентгенологических, микроскопических и гистологических исследований обращает на себя внимание разница в полученных результатах между группами. Уже с первых 30-ти суток в группе № 2, при последовательном сравнении с другими исследуемыми группами, наблюдались повышенные результаты рентгенологической плотности, насыщенности микроэлементами и площадь сформированной костной ткани в зоне сформированного метафизарного дефекта. Стоит отметить, что в группе №1 и в

группе №4, где в зону дефекта имплантировали фосфат-силикатный материал с соотношением ГА/ВТ 40/60 на первых сроках исследования по результатам измерения рентгенологической плотности наблюдался паритет, но уже к 90-м суткам показатели плотности в группе №1 стали выше.

Несмотря на небольшую разницу в соотношении микроэлементов в имплантируемом материале были получены достаточно разрозненные результаты. Возможно, что это было связано именно с разным количеством кальция и кремния в имплантируемом материале, так, например количество кальция и кремния в группе №2 составило 37,61 масс.% и 3,71 масс.% соответственно, а в группе №4 31,41 масс.% и 17,01 масс.%. Учитывая, что кремний подвергается сравнительно более быстрой биодegradации, чем кальций, вероятно именно низкая концентрация кальция и высокая концентрация кремния не позволили создать необходимый каркас для формирования и роста костной ткани.

Глава 5 СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ РЕЗУЛЬТАТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ГРУППАХ

После окончания экспериментального исследования и обработки полученных данных проводился сравнительный анализ результатов для всех групп с целью выявления оптимального соотношения фосфатов и силикатов кальция в имплантируемом материале. Во всех исследуемых группах при сравнении оценивали показатели лабораторных данных, плотность сформированного регенерата, результаты микроэлементного анализа структуры новообразованной ткани и данные морфометрических исследований.

5.1 Сравнение данных лабораторных исследований

В процессе выполнения исследования у экспериментальных животных контролировались различные показатели крови (содержание кальция, фосфора, уровень щелочной фосфатазы, количество лейкоцитов в периферической крови и уровень С-реактивного белка). Оценивая уровень кальция, фосфора и щелочной фосфатазы в динамике можно косвенно судить о репаративных процессах костной ткани, определять её активность в зависимости от срока исследования. Показатели количества лейкоцитов и уровень СРБ в периферической крови позволяли оценить реакцию организма на имплантацию биоматериала в метафизарную зону. Полученные результаты свидетельствовали о том, что на протяжении первого месяца эксперимента значения концентраций кальция, фосфора и активности щелочной фосфатазы превышали исходные значения. В течение первых 14 суток наблюдения все показатели имели восходящую тенденцию, в последствии к 30-м суткам все показатели вернулись к исходным значениям. Статистически достоверной разницы в показателях периферической крови в исследуемых группах выявлено не было (таб.7).

Таблица 7 – Данные лабораторных показателей исследуемых групп в течение первых 30-ти суток Me [LQ; HQ]

Группа	До операции				7 суток				14 суток				30 суток			
	№1	№2	№3	№4	№1	№2	№3	№4	№1	№2	№3	№4	№1	№2	№3	№4
Кальций, mmol\l	1,61 [1,55; 1,62]	1,55 [1,51; 1,62]	1,54 [1,49; 1,57]	1,56 [1,52; 1,58]	2,61 [2,58; 2,66]	3,11 [2,98; 3,21]	2,72 [2,64; 2,95]	2,41 [2,36; 2,42]	3,81 [3,68; 3,99]	4,13 [4,01; 4,35]	3,82 [3,45; 4,02]	3,71 [3,61; 3,93]	1,54 [1,34; 1,67]	1,74 [1,54; 1,87]	1,71 [1,59; 1,76]	1,55 [1,33; 1,61]
Фосфор, mmol\l	1,51 [1,43; 1,52]	1,45 [1,39; 1,51]	1,52 [1,42; 1,61]	1,34 [1,28; 1,42]	2,05 [1,91; 2,13]	2,15 [1,95; 2,29]	2,06 [1,93; 2,18]	1,97 [1,84; 2,05]	2,41 [2,28; 2,53]	2,71 [2,59; 2,81]	2,64 [2,48; 2,73]	2,38 [2,29; 2,47]	1,45 [1,38; 1,53]	1,61 [1,49; 1,72]	1,59 [1,49; 1,68]	1,41 [1,31; 1,54]
ЩФ, u/l	7,11 [6,98; 7,23]	7,31 [7,18; 7,41]	6,88 [6,75; 6,99]	6,74 [6,62; 7,81]	11,82 [11,69; 11,96]	12,49 [12,32; 12,56]	12,42 [12,29; 12,51]	11,85 [11,73; 11,97]	18,34 [18,28; 18,41]	20,12 [20,02; 20,27]	18,86 [18,77; 18,95]	19,55 [19,45; 19,61]	4,84 [4,69; 4,97]	5,17 [5,04; 5,29]	5,63 [5,51; 5,77]	4,59 [4,45; 4,81]
WBC x10 ⁹ /l	3,55 [3,41; 3,68]	3,12 [3,01; 3,27]	3,41 [3,29; 3,53]	3,17 [3,03; 3,34]	10,22 [10,06; 10,39]	9,86 [9,71; 9,97]	9,75 [9,62; 9,87]	9,92 [9,79; 10,05]	6,45 [6,29; 6,58]	6,52 [6,43; 6,72]	6,61 [6,49; 6,73]	6,57 [6,43; 6,66]	3,35 [3,19; 3,46]	3,31 [3,16; 3,41]	3,42 [3,28; 3,52]	3,28 [3,14; 3,37]
СРБ mg/l	0,08 [0,02; 0,12]	0,09 [0,03; 0,13]	0,07 [0,02; 0,11]	0,08 [0,02; 0,12]	0,76 [0,55; 0,86]	0,81 [0,69; 0,95]	0,75 [0,62; 0,86]	0,81 [0,68; 0,97]	0,39 [0,27; 0,46]	0,41 [0,29; 0,52]	0,42 [0,31; 0,51]	0,38 [0,29; 0,47]	0,08 [0,03; 0,11]	0,07 [0,03; 0,11]	0,06 [0,02; 0,09]	0,08 [0,04; 0,12]

5.2 Сравнение рентгенологической плотности новообразованной ткани

На сроке в 30 суток было выполнено МСКТ исследование, на котором были выявлены различия по плотности новообразованной ткани между всеми исследуемыми группами. Медиана плотности в группе №1 составляла 189,1 [175,0; 198,5] HU, что было существенно ниже нижней границе плотности губчатой костной ткани по классификации С. Misch. Было выяснено, что наибольшие значения плотности определялись в зоне, располагающейся под эктомированным метафизарным фрагментом, что было связано с формированием эндостальной костной мозоли. В группе №2, средний показатель плотности составил 295,0 [287,0; 307,0] HU, что было больше на 56%, чем в группе №1 и практически соответствовал 4 типу плотности костной ткани по классификации С. Misch. При этом новообразованная ткань занимала практически весь объем исходного метафизарного дефекта и имела примерно одинаковую плотность регенерата во всех измеряемых точках. Сформированный регенерат в группе №3 не имел четких границ и был лишен однородности, при этом среднее значение плотности составило 202,0 [195,5; 222,0] HU, что было ниже стандартизированных показателей плотности костной ткани, но выше, чем показатели в группе №1. В группе №4 несмотря на наличие фрагментов имплантированного фосфат – силикатного материала к окончанию первых 30-ти суток среднее значение плотности новообразованной ткани было ниже, чем во всех остальных исследуемых группах и составило 184,0 [175,5; 195,5] HU (рис. 56).

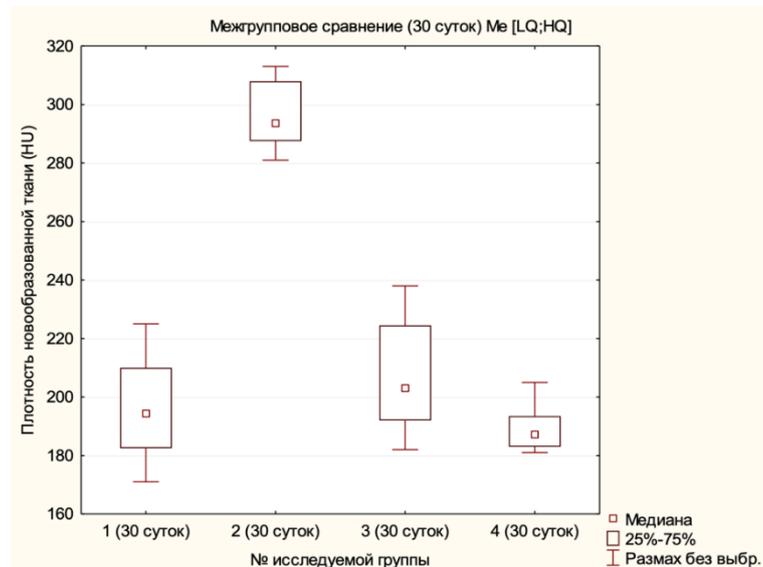


Рисунок 56 – Сравнение плотности новообразованной ткани в зоне метафизарного дефекта на 30-е сутки

На 60-е сутки исследования зоны метафизарного дефекта было зафиксировано увеличение плотности новообразованной ткани во всех исследуемых группах, при этом разница между средними показателями плотности была менее выраженная. В группе №1 медиана плотности новообразованной ткани составила 246,1 [230,5; 257,0] HU, таким образом за последующие 30 суток исследования плотность ткани увеличилась на 30%, но при этом так и не соответствовала нижней стандартизированной границе плотности губчатой ткани. Полость дефекта по-прежнему не была полностью заполнена, но при этом зона остеотомии стала менее отчетливо видна на сканах. В группе №2 плотность новообразованной ткани стала на 20% больше, чем в первый месяц исследования, по структуре регенерат выглядел более «организованно», не наблюдалось полостей внутри ткани, а эктомированный фрагмент в зоне остеотомии полностью срастался с окружающей костью, плотность новообразованной ткани составила 355,5 [336,0; 368,5] HU. Наибольший рост рентгенологической плотности был зафиксирован в группе №3, где в промежуток между 30 и 60 сутками плотность новообразованной ткани стала больше на 49% (202,0 HU – 301,0 HU) (рис. 57).

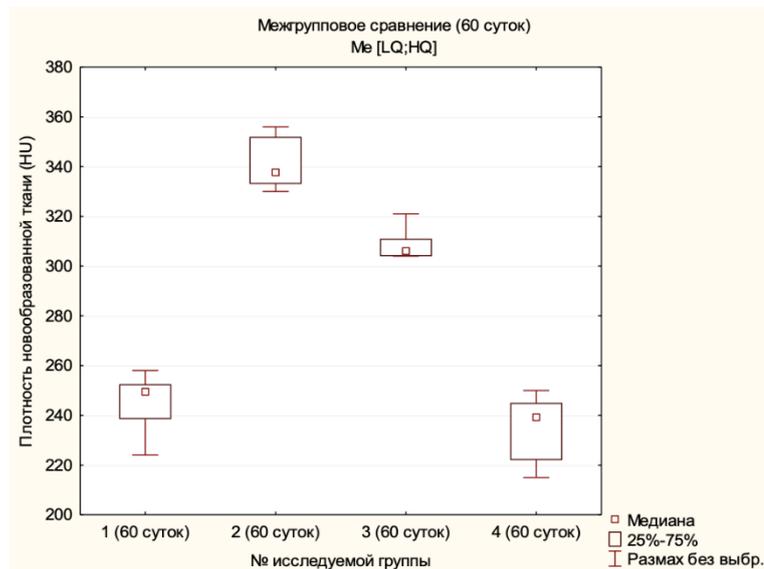


Рисунок 57 – Сравнение плотности новообразованной ткани в зоне метафизарного дефекта на 60-е сутки

Заключительное МСКТ-исследование новообразованной ткани было выполнено на срок в 90 суток экспериментального исследования. На этом сроке во всех группах плотность новообразованной ткани увеличилась. В группе №1 дисперсия показателей плотности уменьшилась, а медиана плотности составила 287,1 [276,0; 296,5] НУ, что было выше, чем в предыдущие сроки, но по-прежнему не соответствовала плотности губчатой костной ткани. В группе №2 медиана плотности новообразованной ткани достигла показателя в 421,0 [411,0; 430,0] НУ, что соответствовало плотности костной ткани, при этом отмечалась минимальная разница между максимальным и минимальным значением, что свидетельствует об однородности структуры новообразованной кости. В группе №3 показатель плотности практически приблизился к нижней границе нормы губчатой костной ткани и составил 322,5 [311,0; 335,1] НУ. В группе №4, также, как и на предыдущих сроках, отмечалась наименьшая рентгенологическая плотность регенерата в сравнении с другими основными группами. Она составила 254,0 [240,0; 281,0] НУ, что не соответствовало плотности костной ткани (рис. 58).

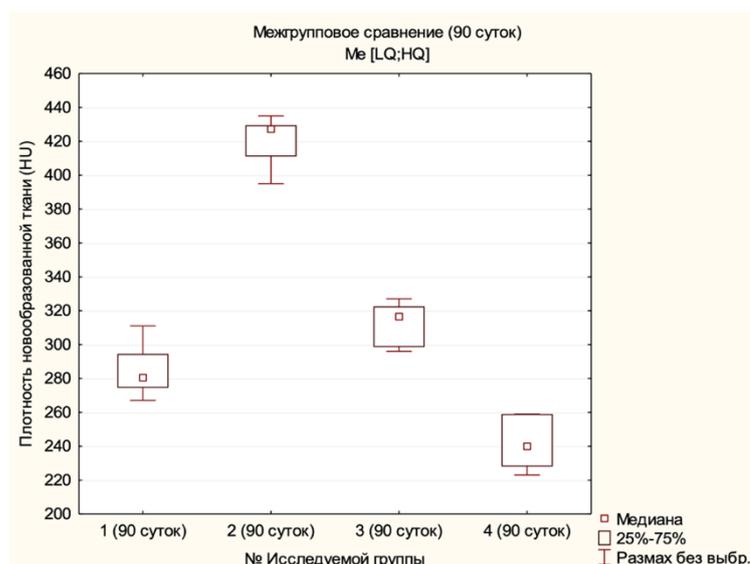


Рисунок 58 – Сравнение плотности новообразованной ткани в зоне метафизарного дефекта на 90-е сутки

Таким образом в течение всего срока экспериментального исследования наиболее активные процессы формирования костной ткани были зафиксированы в группе №2, в которой, по окончании первых 30-ти суток, новообразованная ткань по плотности была практически соизмерима с плотностью губчатой костной ткани (рис. 59).

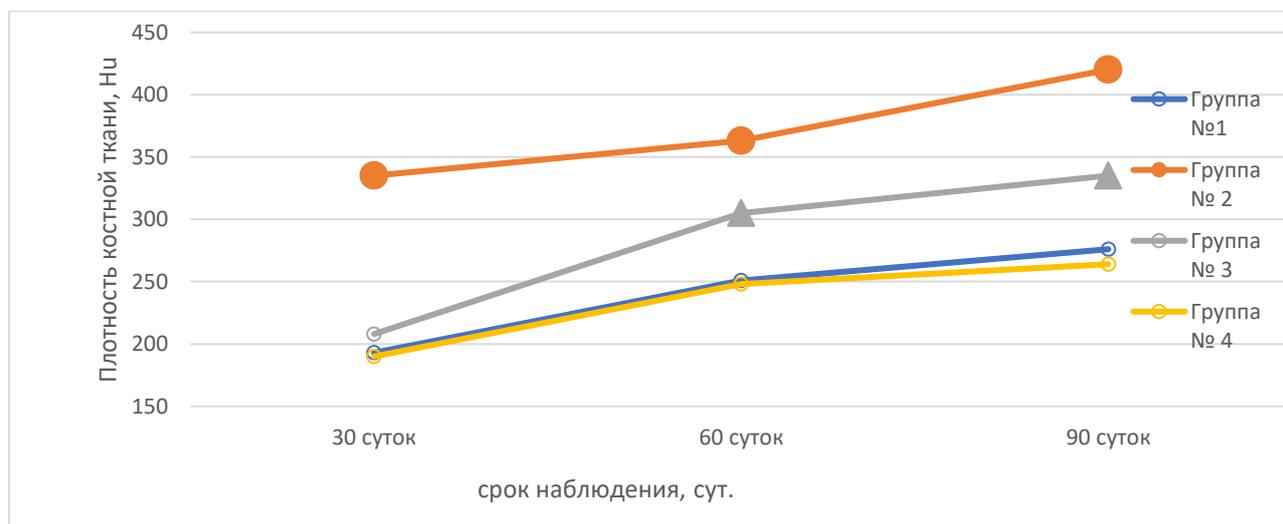


Рисунок 59 – Изменение показателей средней плотности новообразованной костной ткани в группах в течение эксперимента

● - статистически значимый показатель к группе контроля ($p < 0,01$)

▲ - статистически значимый показатель к группе контроля ($p < 0,01$)

В группе №3 процессы формирования и «уплотнения» костной ткани протекали несколько медленнее, но при этом, в течение всего срока исследования плотность новообразованной ткани превышала показатели плотности группы №1 и №4 (таб. №8).

Таблица 8 – Плотность новообразованной ткани в исследуемых группах (НУ), Ме [LQ, HQ]

Срок наблюдения	Группа №1	Группа №2	Группа №3	Группа №4
30 суток	189,1 [175,0; 198,5]	295,0 [287,0; 307,0] *	202,0 [195,5; 222,0]	184,0 [175,5; 195,5]
60 суток	246,1 [230,5; 257,0]	355,5 [336,0; 368,5]*	301,0 [286,0; 309,0]*	234,5 [220,0; 245,1]
90 суток	287,1 [276,0; 296,5]	421,0 [411,0; 430,0]*	322,5 [311,0; 335,1]*	254,0 [240,0; 281,0]

Примечание:

* - статистически значимые данные по отношению к группе №1 ($p < 0,01$)

5.3 Сравнение данных, полученных методом РЭМ – ЭДА

На следующем этапе исследования был выполнен анализ костных образцов методом РЭМ - ЭДА. При оценке количества кальция, фосфора и кремния в костной ткани области восполняемого дефекта была зафиксирована схожая динамика соотношения элементов в зоне исследования во всех группах и более того, динамика изменений абсолютных количественных величин также была одинаковой. Однако содержание Ca, P и Si статистически значимо отличались между группами в различные сроки исследования (Таб. 9).

Таблица 9 – Распределение микроэлементов в структуре новообразованной ткани, Me [LQ, HQ].

Группы	Сроки	Кальций (Ca), масс. %	Фосфор (P), масс. %	Кремний (Si), масс. %
№1 (контроль)	30 суток	14,61 [13,95; 15,22]	6,64 [6,39; 7,18]	0,75 [0,51; 0,81]
	60 суток	26,11 [23,75; 28,45]	10,10 [9,73; 11,49]	0,23 [0,21; 0,28]
	90 суток	28,41 [26,15; 30,22]	11,75 [11,23; 12,32]	0,04 [0,02; 0,09]
№2 (60/40 масс.%)	30 суток	20,61 [19,75; 21,55]*	15,58 [13,67; 17,41]*	1,95 [1,79; 2,15]*
	60 суток	35,51 [32,75; 40,01]*	17,71 [16,35; 18,95]*	0,51 [0,25; 0,81]*
	90 суток	36,02 [30,93; 38,25]*	18,56 [17,94; 19,17]*	0,17 [0,08; 0,23]*
№3 (50/50 масс.%)	30 суток	14,75 [12,11; 16,11]	12,55 [10,76; 14,65]*	1,45 [1,15; 1,74]*
	60 суток	24,7 [22,45; 27,65]	13,53 [11,4; 16,65]*	0,17 [0,11; 0,33]
	90 суток	24,08 [21,95; 26,95]	14,11 [12,18; 15,35]*	0,11 [0,05; 0,19]*
№4 (40/60 масс.%)	30 суток	11,31 [10,29; 12,72]	8,69 [7,84; 9,41]*	0,98 [0,91; 1,15]
	60 суток	19,95 [17,26; 21,55]	12,02 [9,63; 13,11]	0,13 [0,03; 0,18]
	90 суток	21,75 [19,55; 23,51]	11,61 [10,58; 12,44]	0,05 [0,02; 0,07]

Примечание: *- статистически значимые данные по отношению к группе контроля ($p < 0,05$).

Уровни кальция и фосфора преимущественно нарастали в течение всего периода наблюдения во всех группах, уровень кремния был максимальным по окончании первых 30-ти суток и впоследствии снижался до минимальных значений к окончанию экспериментального исследования. Максимальные показатели содержания кальция на поверхности новообразованной ткани наблюдались в группе №2 в течение всего экспериментального исследования. Обращает на себя внимание тот факт, что наиболее активная динамика фиксировалась в период с 30-х по 60-е сутки, когда наблюдался наибольший прирост показателей (увеличение содержания кальция на 72% в 60-е сутки по сравнению с уровнем 30-ти суток). Аналогичная динамика прослеживалась в группе №3, когда максимальный рост был зафиксирован в промежутке между 30 и 60 сутками исследования (увеличение на 67%), а на 90 суток отмечалось небольшое снижение (2,62%). В группе №1 и №4 в течение всего срока наблюдения фиксировалась тенденция на повышение уровня кальция на поверхности исследуемой ткани (рис. 60).

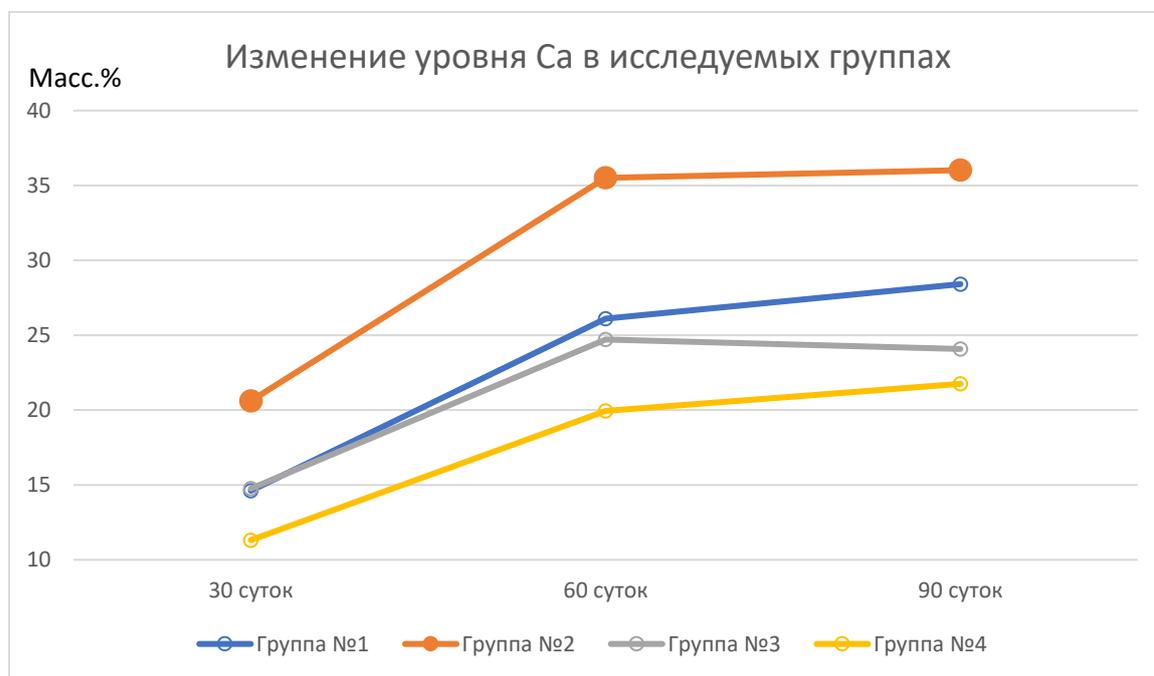


Рисунок 60 – Изменение количества Са в структуре новообразованной ткани в течение всего срока наблюдения.

● - статистически значимый показатель к группе контроля ($p < 0,05$)

Оценивая насыщенность фосфором ткани, образованной в зоне метафизарного дефекта, обращает на себя внимание, что уровни показателей фосфора по своей тенденции напоминают динамику показателей кальция. Максимальные концентрации фосфора наблюдались в группе №2, но, в отличие от кальция не был зафиксирован резкий прирост показателей между 30-ми и 60-ми сутками, уровень фосфора с течением времени возрастал постепенно. Прогрессивная тенденция наблюдалась во всех группах, за исключением группы №4, где в промежуток с 60-х по 90-е сутки несколько снизилось количество фосфора в структуре костной ткани (снижение составило 3,53%) (рис. 61).

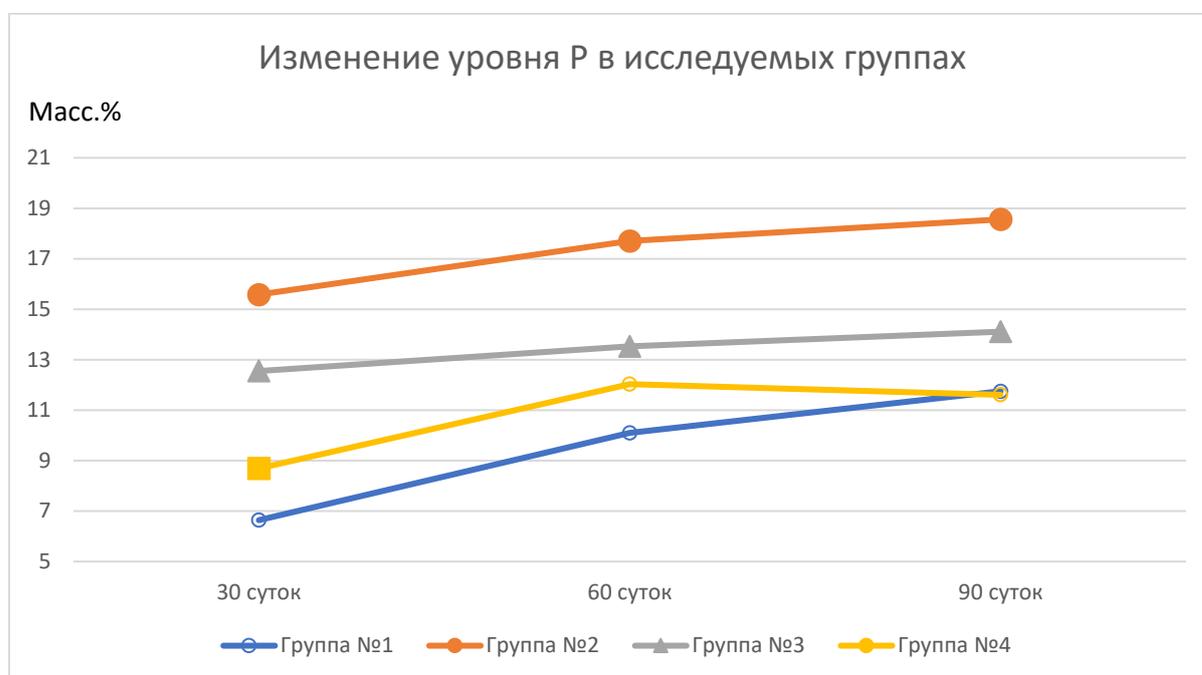


Рисунок 61 – Диаграмма уровня Р на поверхности новообразованной ткани в течение всего срока наблюдения

● - статистически значимый показатель к группе контроля ($p < 0,05$)

▲ - статистически значимый показатель к группе контроля ($p < 0,05$)

■ - статистически значимый показатель к группе контроля ($p < 0,05$)

Наибольшие изменения в динамике показателей были зарегистрированы при изучении распределения кремния в структуре новообразованной ткани (рис. 62).

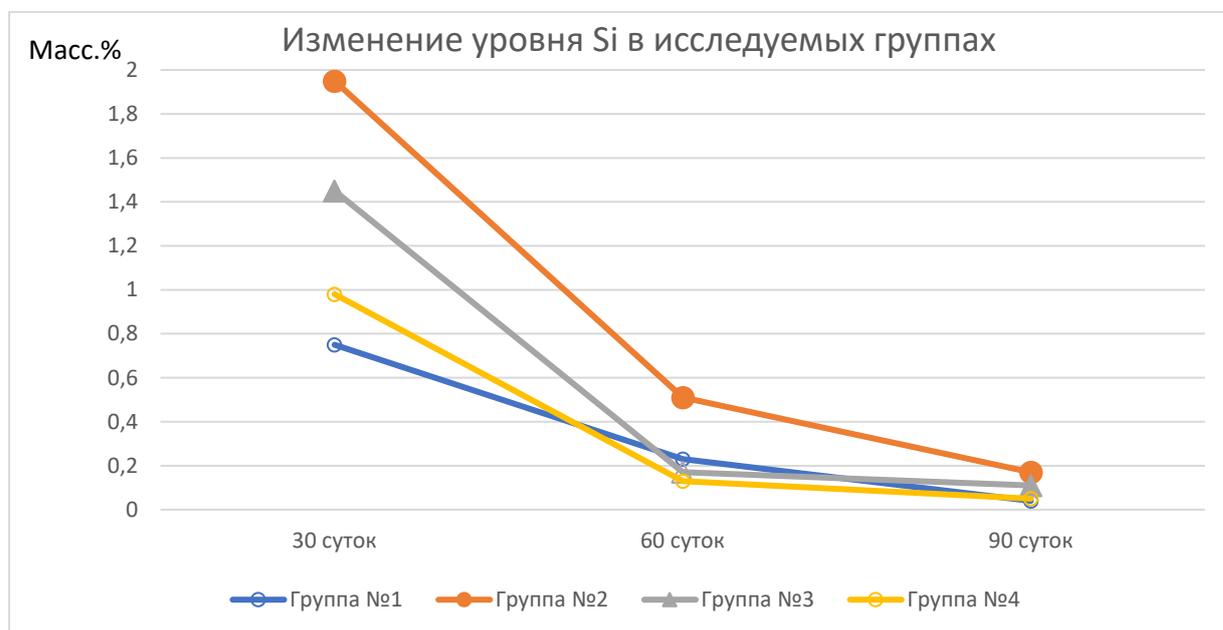


Рисунок 62 – Диаграмма уровня Si на поверхности новообразованной ткани в течение всего срока наблюдения

● - статистически значимый показатель к группе контроля ($p < 0,05$)

▲ - статистически значимый показатель к группе контроля ($p < 0,05$)

Во всех исследуемых группах максимальная концентрация была зафиксирована по окончании первых 30-ти суток исследования и с течением времени имела регрессивную тенденцию. С 30-х по 60-е сутки насыщенность кремнием снизилась в несколько раз во всех исследуемых группах, но при этом снижение уровня кремния в изученных макропрепаратах группы №2 во всех сроках наблюдения происходило менее стремительно, при схожей положительной динамике показателей кальция и фосфора. Максимальная концентрация кремния в течение всего срока экспериментального исследования наблюдалась в группе №2, что могло свидетельствовать о продолжающихся активных регенераторных процессах (рис. 62).

5.4 Корреляция количества микроэлементов и плотности новообразованной ткани

По окончании исследования для оценки сопоставимости величин рентгенологической плотности новообразованной ткани и количественных данных ионного состава кости, полученных методом РЭМ – ЭДА, был выполнен поиск корреляционных связей между полученными показателями.

При проведении корреляционного анализа методом Спирмена обнаружены достоверные корреляции средней и высокой силы между уровнем микроэлементов в структуре новообразованной ткани и плотностью кости во всех группах, за исключением фосфора в группе № 3 (в данном случае корреляции не наблюдалось) (табл. 10).

Таблица 10 – Коэффициент корреляции Спирмена для уровня микроэлементов и плотности новообразованной ткани.

Группы	Микроэлемент/ Плотность (HU)	R	P	T (N-2)
№1 (контроль)	Ca/HU	0,691	<0,001	6,526
	P/HU	0,733	<0,001	7,319
	Si/HU	-0,848	<0,001	-9,673
№2 (60/40 масс.%)	Ca/HU	0,681	<0,001	6,298
	P/HU	0,458	0,001	3,503
	Si/HU	-0,775	<0,001	-8,34
№3 (50/50 масс.%)	Ca/HU	0,573	0,0002	4,74
	P/HU	0,158	0,27	1,08
	Si/HU	-0,696	<0,001	-6,58
№4 (40/60 масс.%)	Ca/HU	0,573	<0,001	4,74
	P/HU	0,559	0,00003	4,58
	Si/HU	-0,694	<0,001	-6,54

Наиболее сильная корреляция наблюдалась в отношении количества кремния (Si) и плотности новообразованной ткани в группах № 1 и № 2 ($r = -0,848$; $r = -0,775$) соответственно (рис. 63).

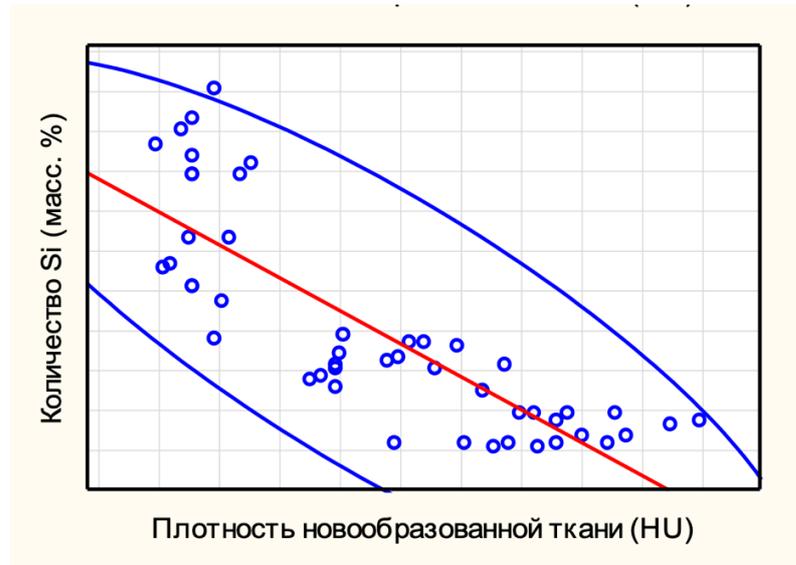


Рисунок 63 – Корреляция количества кремния (Si) в структуре новообразованной ткани и рентгенологической плотности новообразованной ткани (HU) в группе №1 ($r = -0,848$, $p < 0,001$)

Прямая корреляция между содержанием кальция и плотностью ткани наблюдалась во всех исследуемых группах и оценивалась нами, как корреляция средней степени выраженности (рис. 64).

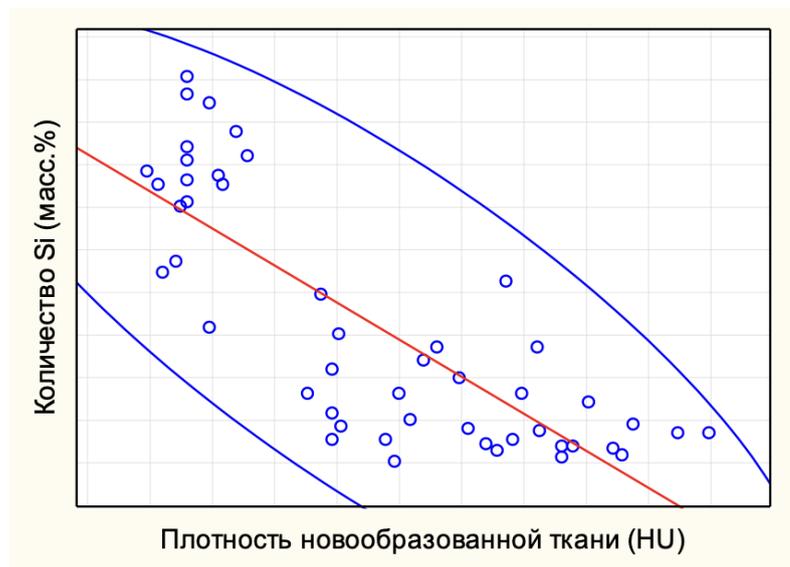


Рисунок 64 – Корреляция количества кальция (Ca) в структуре новообразованной ткани и рентгенологической плотности (HU) в группе №2 ($r = -0,775$, $p < 0,001$)

Изменение количества фосфора в структуре костной ткани не всегда соответствовало увеличению плотности новообразованной ткани: так в группе №2 мы наблюдали умеренную корреляцию ($r=0,458$), а в группе №3 корреляции и вовсе не прослеживалась ($r=0,158$).

5.4 Данные морфометрических исследований

Анализируя данные гистологических исследований, отмечалось, что кроме площади сформированной ткани также были различия между пространственной организацией новообразованных трабекул. Для количественной оценки применялся подход фрактального анализа. При помощи программного обеспечения производилась оценка фрактальности, лакунарности и площади. Первый показатель – оценивал степень заполнения пространства структурой, второй – наличие лакун (пустых зон) в исследуемой области, третий показатель – площадь новообразованной ткани в зоне сформированного дефекта. Определение данных показателей выполнялось по box-count (BC) методу (ImageJ 1.53), при котором изображение разбивалось сеткой на ячейки заданных размеров. В группе №1 на 90-е сутки фрактальность составила 1,05 [0,97; 1,15], показатель лакунарности 1,51 [1,21; 1,72], площадь новообразованной кости в зоне дефекта была минимальной и составляла только 6,01 [4,81; 7,11] % от общего объема. В группе №2 на 90-е сутки фрактальность трабекулярной структуры составила 1,68 [1,34; 2,18], лакунарность в этой группе составила 0,47 [0,35; 0,55] и была минимальной среди исследуемых групп, среди всего объема тканей в зоне дефекта костная ткань составляла 24,52 [21,51; 28,42] % в полях зрения. В группе №3 на 90-е сутки показатель фрактальности был приближен к группе №2 и составлял 1,70 [1,41; 2,08], новообразованная ткань была более разрозненная и лакунарность составила 0,63 [0,52; 0,73], площадь новообразованной кости составляла 16,51 [13,52; 17,63] %. В группе №4 на 90-е сутки уровень фрактальности был ниже, чем в группах 2,3 и был приближен к показателям первой группы 1,40 [1,12; 1,52], лакунарность же была максимальной среди групп сравнения и

составляла 1,11 [0,92; 1,31]. Площадь новообразованной костной ткани в зоне имплантации составила 7,81 [4,71; 10,52] % (таб. 11).

Таблица 11 – Сравнительные данные морфометрических исследований Me [LQ; HQ] на 90-е сутки исследования.

Группа	S ²	Фрактальность	Лакунарность	S ² гранул
№1 (контроль)	6,01 [4,81; 7,11] %*	1,05 [0,97; 1,15] *	1,51 [1,21; 1,72]*	–
№2 (60/40 масс.%)	24,52 [21,51; 28,42] %	1,68 [1,34; 2,18]	0,47 [0,35; 0,55]	7,90 [4,90; 11,7]%
№3 (50/50 масс.%)	16,51 [13,52; 17,63] %**	1,70 [1,41; 2,08]	0,63 [0,52; 0,73]**	17,40 [15,50; 24,10]%
№4 (40/60 масс.%)	7,81 [4,71; 10,52] %*	1,40 [1,12; 1,52] **	1,11 [0,92; 1,31]*	17,30 [15,40; 20,10]%

Примечание: S²- площадь новообразованной ткани; символ «*» - данные статистически значимые по сравнению с группой №2 (p=0,01); символ «**» - данные статистически значимые по сравнению с группой №2 (p=0,04).

РЕЗЮМЕ

По итогам межгруппового сравнения наибольший регенераторный потенциал прослеживался у материала с соотношением фосфатов и силикатов кальция 60/40 масс.%. Полученные результаты свидетельствовали об ощутимых преимуществах данного вида имплантатов над материалами с иным составом. Согласно данным измерения рентгенологической плотности в группе №2 зона дефекта уже к 30-м суткам была заполнена тканью, по плотности максимально приближенной к характеристикам костной ткани. Результаты, полученные благодаря РЭМ-ЭДА свидетельствовали, что в структуре новообразованной ткани во 2-ой группе были выявлены наибольшие показатели кальция и фосфора, которые являются основными

элементами структуры костной ткани. Более высокий уровень содержания кремния в течение всех сроков исследования также был зафиксирован во 2-ой группе, что вероятно свидетельствовало о продолжающихся остеорегенеративных процессах костной ткани. При анализе связей между рентгенологической плотностью и количеством микроэлементов в структуре новообразованной костной ткани были выявлены прямые корреляции высокой и средней силы между количеством ионов кальция и фосфора и обратные корреляционные связи между количеством ионов кремния и рентгенологической плотностью, что объясняло продолжающиеся процессы формирования и органотипической перестройки новообразованной костной ткани. Данные, полученные благодаря гистологическому исследованию с морфометрическим анализом, дополнительно подтверждали результаты проведенных рентгенологических и микроскопических исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Вследствие постоянно возрастающей потребности органовосполняющих операций на костной ткани, выбор оптимального материала для восполнения дефекта представляет некоторые трудности. Длительное время лучшим материалом для замещения дефектов являлась аутологичная кость, взятая из гребня подвздошной кости, обладающая как остеокондуктивными, так и остеоиндуктивными свойствами. Применение аутокости позволяет снизить риск развития инфекционных и иммунологических осложнений в после операционном периоде. Но, к сожалению, применение аутологичной костной ткани не лишено недостатков. После забора аутотрансплантата у пациентов может сформироваться хронический болевой синдром, а в зоне забора возможно формирование гематом, сером и инфекционных поражений, также возможна резорбция трансплантата в зоне имплантации, которая может достигать 40% от исходного размера аутоимплантата, кроме того небольшое количество материала не позволяет замещать значительные по объему костные дефекты [17, 19, 24, 28, 61, 115, 133].

Широкое распространение получили имплантаты, изготовленные на основе аллокости. Благодаря возможности заранее подготовить имплантат, время и травматичность выполняемых оперативных вмешательств существенно снизились. В процессах интеграции у имплантированных материалов более выражен остеокондуктивный эффект, нежели остеоиндуктивный, за счет этого процессы формирования и роста костной ткани протекают медленнее, чем при замещении дефектов аутокостью [15, 24, 48, 55].

Благодаря своему регенераторному потенциалу PRP и СВФ технологии получили широкое распространение во многих отраслях медицины, от косметологии до восстановительной травматологии и ортопедии [113, 186]. В течение последних десятилетий постепенно набирает актуальность применение клеточных технологий для оптимизации процессов

репаративного остеогенеза [4, 44, 101, 114, 137, 160]. Регенераторный потенциал PRP реализуется благодаря наличию в структуре тромбоцитов различных факторов роста (фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF) и трансформирующий фактор роста (TGF- β), активно влияющих на процессы формирования и роста тканей [26, 82, 137, 167]. Использование СВФ технологий позволяет внедрить в зону формирования костной ткани мультипотентные клетки, которые под воздействие провоспалительных факторов активируют факторы роста (EGF, FGF, IGF), стимулирующие процессы ангио- и остеогенеза [10, 14, 106, 168, 169, 172]. Применение клеточных технологий в травматологии и ортопедии весьма ограничено, так как для использования PRP и СВФ необходима продолжительная фиксация имплантированных клеток в зоне формирования костной ткани, но даже при использовании своеобразных скаффолдов зачастую этого добиться не удастся, так как клеточная составляющая достаточно быстро элиминируется из места имплантации.

Достаточно широкое применение получили имплантаты на основе фосфатов кальция. Благодаря схожести с костной тканью строением и элементным составом имплантаты данного типа обладают хорошими остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами [30, 49, 68, 135, 177]. Согласно результатам проведенных исследований [36, 45, 69, 185] имплантаты на основе ФК способны благоприятно влиять на экспрессию провоспалительных интерлейкинов и тем самым стимулировать процессы роста сосудов и кости. Благодаря развитой пространственной архитектонике с большим количеством пор размером от 300 до 500 мкм, имплантаты на основе ФК могут быть использованы как матрица для формирования и развития костной ткани [140, 173, 184].

Формирование и развитие сосудов в зоне имплантации является одной из важных задач, с которой сталкивается развитие тканевой инженерии. Достаточно выраженным ангиогенным влиянием обладают кремнийсодержащие имплантаты, которые в процессе своей постепенной

биодegradации выделяют ионы, способные вызывать усиление роста эндотелиальных клеток посредством активации (VEGF) и основного фактора роста фибробластов [66, 70, 80, 122]. Особенности молекулярного строения СК способствуют абсорбции белковых молекул на поверхности имплантируемого материала, вследствие чего служит своеобразной матрицей для дифференциации и пролиферации мультипотентных клеток [65, 67, 153].

Поиск материала для замещения дефектов продолжается и в настоящее время. Известно, что имплантат должен быть osteoconductive, а также, за счет своего элементного состава, в процессе постепенной биодegradации оказывать благоприятное микроокружение, то есть выступать в роли osteoinductora, при этом не оказывая токсического действия на окружающие ткани. Таким образом идея создания оптимального имплантируемого материала остается актуальной и перспективной.

Предложенный нами биоактивный фосфат-силикатный имплантат был апробирован в серии экспериментальных исследований для выявления оптимального соотношения фосфатов и силикатов кальция в структуре имплантируемого материала. Синтезирование материала выполнялось по суспензионной технологии, основанной на принципе несмешивающихся жидкостей. Макроскопически имплантаты представляли из себя сферы диаметром от 0,5 мм до 4 мм, что позволяло полностью заполнять смоделированный костный дефект. В ходе синтеза имплантатов было получено различные соотношения фосфатов и силикатов кальция в образцах. На этапе разработки оценивали физико-химические свойства гранул, такие как плотность, пористость и удельный вес. Полученные данные позволяли оценить возможность использования гранул *in vivo*. Плотность гранул составляла 22,2 до 26,7 единиц по Виккерсу (HV), что позволяет их использовать для замещения костных дефектов различной этиологии, не опасаясь разрушения под влиянием нагрузок. Пористость составила примерно 55% от общего объема гранул, при этом размер пор составлял 100 – 200 мкм, что благоприятно скажется на процессах формирования и роста, как сосудов,

так и костной ткани. Плотность гранул находилась в промежутке от 2,25 – 2,61 г/см³, то должно препятствовать уносу материала из зоны имплантации.

Для оценки регенераторного потенциала разработанного материала требовалась оценить эффект гранул в идентичных условиях, для этого был разработан оригинальный способ моделирования посттравматического отграниченного компрессионного костного дефекта. Влияние на процессы формирования и роста костной ткани было изучено в условиях исследования на экспериментальных животных. Материалом для работы были кролики – самцы породы «Белый великан» (n=96), массой 4000 ± 200 грамм. Во всех группах к окончанию 90-х суток исследования наблюдалось замещение сформированного дефекта новообразованной тканью, различной по плотности и микроэлементному составу

В группе №1, где не выполнялось замещение дефекта синтезированным материалом репаративные процессы протекали медленнее, чем в других группах. Изменения в клиническом статусе были купированы к окончанию первых 6-ти суток после операции. У животных восстановилась активность, аппетит и нормализовались показатели температуры тела. По данным МСКТ в течение всего срока наблюдения плотность сформированной ткани была ниже, чем в других группах и только к окончанию 90-х суток экспериментального исследования зона дефекта заполнилась новообразованной тканью, по плотности несколько ниже, чем у контрлатеральной кости на здоровой конечности (плотность новообразованной ткани составила 287,1 [276,0; 296,5] HU). Проводя энергодисперсионный анализ ткани из зоны дефекта, отмечали сравнительно низкую минеральную насыщенность структуры новообразованной ткани на всех сроках исследования, что также свидетельствовало о низких темпах формирования костной ткани в данной исследуемой группе. К 90-м суткам наблюдалось практически полное сращение резецированной кортикальной пластинки, за исключением дистального фрагмента дефекта, где в большинстве случаев обнаруживалась небольшая соединительно-тканная

перемычка на протяжении 200 – 250 мкм. Новообразованная костная ткань частично заполняла структуру дефекта и была представлена, по большей своей части, тонкими костными балочками с достаточно широкими межбалочными пространствами, заполненном соединительной тканью. В зоне метафизарного дефекта данная ткань имела повышенную лакунарность.

К окончанию наблюдения полного замещения костной тканью сформированного метафизарного дефекта в данной группе не наблюдалось.

В группе №2 в зону дефекта имплантировались фосфат-силикатные имплантаты в соотношении 60/40 масс. % соответственно. На 6-е сутки после операции животные полностью восстановились, нормализовалась температура тела, аппетит и активность вернулась к дооперационным показателям. По результатам проведенного МСКТ формирование костной ткани происходило быстрее, чем в первой группе. Уже к окончанию первых 30-ти суток экспериментального исследования зона дефекта практически полностью была заполнена новообразованной костной тканью, средняя плотность которой составила 295,0 [287,0; 307,0] HU. В дальнейшем плотность увеличилась до 355,5 [336,0; 368,5] HU и 421,0 [411,0; 430,0] HU к исходу 60-х и 90-х суток наблюдения соответственно, что также превышало плотность ткани в контрольной группе и соответствовало верхней границе нормы плотности губчатой кости. Проводя энергодисперсионный анализ структуры вновь сформированной ткани, отмечали, что показатели насыщенности кальцием и фосфором в этой группе в течение всего срока наблюдения были выше, чем в других. Количество кремния также сохранялось на относительно высоких цифрах, что свидетельствовало о продолжающихся регенераторных процессах. Согласно данным гистологического исследования, проведенного по окончанию первых 30-ти суток, кортикальная пластика была сращена по всему периметру, а в зоне исходного дефекта отмечалось формирование костной ткани, органотипически напоминающей строение метафиза кости. В структуре новообразованной ткани встречались частицы имплантационного материала размером 20 – 35 мкм, с новообразованными трабекулами по

периферии. К окончанию срока исследования наблюдалась органотипическая перестройка костной ткани с полным заполнением сформированного дефекта. Морфометрическое исследование подтверждало данные МСКТ и результаты гистологического исследования: новообразованная ткань занимала весь объем сформированного метафизарного дефекта, при этом обладала низкой лакунарностью и максимальной фрактальностью.

В группе №3 для замещения сформированного дефекта использовался биоимплантат, состоящий из фосфатов и силикатов кальция в соотношении 50/50 масс%. В течение 6-ти суток после оперативного вмешательства отмечалось полное восстановление активности экспериментального животного, потребность в пище, питье и локальная температура прооперированной конечности также вернулись в границы нормы. Результаты проведенного МСКТ исследования свидетельствовали о активных регенераторных процессах в зоне дефекта. К окончанию первых 30-ти суток плотность сформированной ткани в метафизарном отделе оперированной конечности составила 202,0 [195,5; 222,0] НУ, что пока не соответствовало нижней границе нормы плотности губчатой кости. К окончанию 90-х суток наблюдения плотность возросла до 322,5 [311,0; 335,1] НУ, что было соизмеримо с нижней границей нормы плотности губчатой кости. Анализируя данные РЭМ-ЭДА было зафиксировано, что количество кальция и фосфора с течением времени постепенно увеличилось, что свидетельствовало о постепенном процессе минерализации регенерата, концентрация кремния была максимальной к окончанию первых 30-ти суток (1,45 [1,15; 1,74] масс.%) и в последствие имела нисходящую тенденцию снизившись до 0,11 [0,05; 0,19] масс.% на 90-е сутки. К исходу первых 30-ти суток гистологически отмечалось сращение проксимального отрезка зоны дефекта кортикальной пластинки, сращение дистального отдела было зафиксировано только к исходу 90-х суток. В метафизарном дефекте к окончанию исследования отмечалось формирование костной ткани среднеячеистой губчатой кости с участками грануляционной и соединительной ткани. Данные морфометрии подкрепили

данные МСКТ и гистологического исследования. Фрактальность в данной группе была ниже, чем в группе №2, но выше, чем в первой исследуемой группе. Новообразованные костные трабекулы заполняли большую часть дефекта, но отмечалась повышенная лакунарность.

Использование имплантата с соотношением фосфатов и силикатов кальция 50/50 масс.% показало хороший регенераторный потенциал, который был выше, чем в первой группе. В сравнении с группой №2 новообразованная костная ткань обладала меньшей рентгенологической плотностью, пониженной минеральной насыщенностью и повышенной лакунарностью.

В группе №4 в зону дефекта выполнялась имплантация фосфат-силикатного материала с концентрацией 40/60 масс.% соответственно. Активность животных, локальные изменения в зоне вмешательства вернулись в исходные значения по прошествии 6-ти суток после выполнения операции. Плотность сформированной ткани по истечении первых 30-ти суток исследования составила 184,0 [175,5; 195,5] НУ, что было ниже, чем в двух других опытных группах. Даже к концу 90-х суток в зоне дефекта плотность новообразованной ткани составила 254,0 [240,0; 281,0] НУ, что было ниже, чем во всех остальных группах и не соответствовало нижней границе нормы плотности губчатой костной ткани. Распределение микроэлементов в зоне формирования новой ткани было равномерным, наблюдалась тенденция на повышение кальция и фосфора к окончанию исследования. Содержание кремния было ниже, чем в других группах с 60-х суток наблюдения. Гистологически на 30-е сутки исследования зона дефекта визуализировалась, а сращения кортикальной пластинки не определялось. Имплантационное ложе было частично заполнено новообразованной костной тканью средне- и мелкопетлистого строения. Среди костных структур определялись участки рыхлой волокнистой соединительной ткани с фрагментами имплантируемого материала. К 90-м суток определялось частичное сращение кортикальной пластинки в зоне дефекта, в дистальном отделе между костными фрагментами участок соединительной ткани. В зоне имплантации в межтрабекулярном

пространстве определялись участки соединительной ткани. В проекции задней стенки дефекта отмечались участки формирования кистозных полостей небольшого размера. По результатам морфометрического исследования, новообразованная костная ткань обладала повышенной лакунарностью. Костная ткань не занимала весь объем сформированного дефекта, а новообразованные трабекулы были тонкими и хаотично расположенными. Применение фосфат-силикатных имплантатов с соотношением ГА/ВТ 40/60 масс% по результатам проведенного исследования не оказало выраженного остеогенного эффекта.

Анализируя полученные в ходе экспериментального исследования данные, мы можем сделать вывод, что наибольшим регенераторным потенциалом обладает фосфат-силикатный имплантат с соотношением фосфатов и силикатов кальция 60/40 масс%. Это было подтверждено результатами МСКТ исследования (плотность регенерата была сопоставима по плотности с интактной костной тканью уже после 30-ти суток наблюдения), данными РЭМ – ЭДА (количество кальция и фосфора в данной группе было максимальным, а длительно сохраняющийся достаточно высокий уровень кремния свидетельствовал о продолжающихся регенераторных процесса), результатами гистологических исследований, согласно которым в группе №2 площадь новообразованной костной ткани была максимальна, при этом структура ткани обладала минимальной лакунарностью и высокой фрактальностью.

ВЫВОДЫ.

1. Разработанные оригинальные гранулированные имплантаты с различным массовым соотношением фосфатов и силикатов кальция (60/40 масс.%, 50/50 масс.%, 40/60 масс.% соответственно), обладают необходимыми физико-химическими свойствами: сферической формой и размерами 0,2 – 4 мм, плотностью 17 – 22 Нv по Виккерсу, удельным весом 1,0 – 1,9 г/см³, пористостью 49 – 65% от общего объема), определяющими перспективность их использования с целью восполнения дефицита костной ткани (патент РФ №2785143 от 05.12.2022 «Способ получения пористых сферических гранул на основе гидроксиапатита, волластонита и желатина»).
2. Разработан и апробирован в эксперименте оригинальный способ моделирования посттравматического компрессионного метафизарного костного дефекта бедренной кости объемом 400±4мм³ который позволяет сравнить процессы репаративного остеогенеза в стандартизированных условиях (патент РФ № 2802431 от 28.08.2023 «Способ моделирования посттравматического компрессионного костного дефекта»).
3. Имплантация фосфатно-кремниевых композитов вызывает воспалительных и инфекционных осложнений в течение всего срока наблюдения, при этом наблюдаемое восполнение костного дефекта характеризуется ростом рентгенологической плотности новообразованной ткани, достигающей, к 90-м суткам исследования, во второй группе 421,0 НУ, что превышает аналогичные показатели в других сравниваемых группах (254,0 НУ – 322,5 НУ) (p<0,01).
4. Наиболее высокие количества минералов в структуре новообразованной кости определяются в группе №2 (ГА/ВТ 60/40 масс.%) во все сроки наблюдения (p<0,05), а изменения элементного состава в виде роста содержания кальция, фосфора и снижения кремния, характеризуются

сильными корреляциями между уровнем микроэлементов и рентгеновской плотностью кости ($r = -0,775$).

5. Полученные рентгенологические, спектроскопические и морфологические данные, показали, что имплантат с соотношением фосфатов и силикатов кальция 60\40 масс.% соответственно, демонстрирует лучший регенераторным эффект и является оптимальным для замещения дефектов костной ткани.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ВТ	- волластонит
ГА	- гидроксиапатит
ДТГ	- дифференциальная термогравиметрия
ММСК	- мультипотентная мезенхимальная стволовая клетка
МСКТ	- мультиспиральная компьютерная томография
РЭМ	- растровая электронная микроскопия
СВФ	- стромально – васкулярная фракция
СК	- силикат кальция
ТГ	- термогравиметрия
ФК	- фосфат кальция
ЭДА	- энергодисперсионный анализ
PRP	- platelet rich plasma

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Балаев, П.И. Возможности костной пластики по Г.А. Иллизарову в восстановительном лечении пациентов с первичными опухолями костей голени / П.И. Балаев, Д.Ю. Борзунов // Сибирский онкологический журнал. – 2013. – № 1 (55). – С. 59–64.
2. Баринов, С. М. Керамические и композиционные материалы на основе фосфатов кальция для медицины / С. М. Баринов // Успехи химии. – 2010. – Т. 79. - №.1. – С. 15-32. – EDN KYIRWD.
3. Бельмер, С. В. Микроэлементы и микроэлементозы и их значение в детском возрасте / С. В. Бельмер, Т. В. Гасилина // Вопросы современной педиатрии. – 2008. – Т. 7. - № 6. – С. 91 - 96. – EDN KXFTHZ.
4. Блаженко, А. Н. Влияние А-PRP-терапии на репаративную регенерацию костной ткани при свежих переломах костей конечностей / А. Н. Блаженко, И. А. Родин, О. Н. Понкина, М. Л. Муханов, А. С. Самойлова, А. А. Веревкин, В. В. Очкась, Р. Р. Алиев // Инновационная медицина Кубани. – 2019. – № 3(15). – С. 32-38. – DOI 10.35401/2500-0268-2019-15-3-32-38. – EDN JBEQMB.
5. Бовкис, Г.Ю. Компенсация дефектов метаэпифизов бедренной и большеберцовой костей при ревизионном эндопротезировании коленного сустава – способы и результаты их применения (обзор литературы) / Г.Ю. Бовкис, Т.А. Куляба, Н.Н. Корнилов // Травматология и ортопедия России. – 2016. – Т. 22. – № 2. – С. 101–113. – DOI: 10.21823/2311-2905-2016-0-2-101-113.
6. Болдырева, О. В. Применение плазмы, обогащенной тромбоцитами, в медицинской практике / О. В. Болдырева, С. Г. Вахрушев, Л. А. Торопова // Современные проблемы науки и образования. – 2016. – № 5. – С. 56. – EDN WWVFVX.
7. Бородкина, Д.А. Периваскулярная жировая ткань и атеросклероз: фенотипические особенности и терапевтический потенциал / Д.А. Бородкина, О.В. Груздева, Е.В. Белик, Ю.А. Дылева, Е.И. Паличева //

- Атеросклероз. – 2020. – Т. 16. – № 2. – С. 63 – 72. – doi.org/10.15372/ATER20200206.
8. Брижань, Л.К. Современное комплексное лечение раненых и пострадавших с боевыми повреждениями конечностей / Л.К. Брижань, Д.В. Давыдов, В.В. Хоминец, А.А. Керимов, Ю.В. Арбузов, Ю.В. Чирва, И.В. Пыхтин // Вестник Национального медико-хирургического центра им. Н.И. Пирогова. – 2016. – Т. 11. - № 1. – С. 74-80. – EDN WMPCKD.
 9. Бурыкин, М.В. Возможности и перспективы использования обогащенной тромбоцитами плазмы в лечении переломов и дефектов костей / К. И. Бурыкин, М. В. Паршиков, Н. В. Ярыгин [и др.] // Политравма. – 2020. – № 3. – С. 108-119.
 10. Веремеев, А. В. Стромально-васкулярная фракция жировой ткани как альтернативный источник клеточного материала для регенеративной медицины / А. В. Веремеев, Р. Н. Болгарин, М. А. Петкова, Н. Кац, В. Г. Нестеренко // Гены и Клетки. – 2016. – Т. 11, № 1. – С. 35-42. – EDN WCLJAP.
 11. Гуражев, М.Б. Методы замещения костного дефицита большеберцовой кости при первичном эндопротезировании коленного сустава: систематический обзор литературы / М.Б. Гуражев, В.С. Байтов, А.Н. Гаврилов, В.В. Павлов, А.А. Корыткин // Травматология и ортопедия России. – 2021. – Т. 27. – № 3. – С. 173–188. – DOI: 10.21823/2311-2905-2021-27-3-173-188.
 12. Давиров, Ш. М. Исторические аспекты и современные тенденции в лечении дефектов длинных трубчатых костей / Ш. М. Давиров, П. У. Уринбаев, К. И. Новиков, О. В. Климов, К. С. Сергеев. // Доктор ахборотномаси. – 2023. – Т. 1. - №109. – С.114-122. DOI: 10.38095/2181-466X-20231091-114-122
 13. Дворниченко, М. В. Клеточные и молекулярные механизмы ремоделирования костной ткани в норме и при патологии: специальность 14.03.03 "Патологическая физиология" : диссертация на

- соискание ученой степени доктора медицинских наук / Дворниченко Марина Владимировна. – Томск, 2018. – 285 с. – EDN ZNFXIO.
14. Демьяненко, И.А. Функциональная морфология жировой ткани и ее роль в формировании метаболического синдрома / И.А. Демьяненко, А.В. Ткач // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2021. – Т. 11. – № 1. – С. 51–60.
15. Деревцова, А. А. Анализ различных видов костно-пластических материалов для остеопластики / А. А. Деревцова, С. А. Махкамов, А. А. Кавыев // Медицина. Социология. Философия. Прикладные исследования. – 2019. – № 5. – С. 3-5. – EDN EKCXSH.
16. Зайдман, А.М. Особенности регенерации костной ткани тел позвонков на основе остеотрансплантата в эксперименте / А.М. Зайдман, Ю.А. Предеин, А.В. Корель, Е.И. Щелкунова, Е.И. Строкова, А.Д. Ластевский, В.В. Рерих, А.И. Шевченко // Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний. – 2017. – Т. 6. – № 4. – С. 95–102. – EDN ZTNHBT.
17. Кавалерский, Г. Классификация дефектов костной ткани при эндопротезировании коленного сустава / Г. Кавалерский, С. Сметанин, А. Лычагин // Врач. – 2017. – № 4. – С. 70-71. – EDN YPVNCT.
18. Кирилова, И.А. Анатомо-функциональные свойства кости как основа создания костно-пластических материалов для травматологии и ортопедии / И.А. Кирилова. – М.: ООО Издательская фирма "Физико-математическая литература", 2019. – 256 с. – EDN OERRFZ.
19. Кирилова, И. А. Вопросы репаративной регенерации в вертебрологии: исторический обзор работ учеников профессора Я.Л. Цивьяна / И. А. Кирилова, Н. Г. Фомичев // Хирургия позвоночника. – 2020. – Т. 17, № 4. – С. 102-112. – DOI 10.14531/ss2020.4.102-112. – EDN JHPLVN.
20. Кирилова, И. А. Физико-химические свойства внеклеточного матрикса как сигналы для управления пролиферацией, дифференцировкой, подвижностью и таксисом клеток / под ред. И. А. Кириловой. – М.

ФИЗМАТЛИТ. 2021. – 244 с. – ISBN 987-5-9221-1918-4.

21. Комарова, Е. Г. Закономерности формирования структуры и свойств микродуговых покрытий на основе замещенных гидроксипатитов на сплавах титана и ниобия: специальность 01.04.07 "Физика конденсированного состояния": диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук / Комарова Екатерина Геннадьевна, 2017. – 190 с. – EDN HPJXHI.
22. Корель, А.В. Тканеинженерные стратегии для восстановления дефектов костной ткани. Современное состояние вопроса / А.В. Корель, С.Б. Кузнецов // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2019. – № 4. – С. 228–234.
23. Корыткин, А. А. Применение обогащенной тромбоцитами плазмы при замещении очага аваскулярного некроза головки бедренной кости аллотрансплантатами / А. А. Корыткин, А. А. Зыкин, Д. В. Захарова, Я. С. Новикова // Травматология и ортопедия России. – 2018. – Т. 24, № 1. – С. 115-122. – DOI 10.21823/2311-2905-2018-24-1-115-122. – EDN YVGNQU.
24. Косулин, А.В. Болезни донорской зоны как проблема хирургической вертебрологии: систематический обзор / Косулин А.В., Елякин Д.В // Хирургия позвоночника. - 2016. - №13(2). - С. 45-51.
25. Котельников, Г. П. Анализ использования различных донорских зон при хирургическом лечении пациентов с опухолями опорно-двигательной системы / Г. П. Котельников, В. В. Иванов, О. Ф. Иванова, А. Н. Николаенко, С. О. Дороганов, П. В. Платонов // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. – 2019. – Т. 22. - № 4(71). – С. 9 - 16. – DOI 10.17223/1814147/71/02. – EDN ABRKYR.
26. Котельников, Г. П. Проблемы классификации продуктов на основе обогащенной тромбоцитами плазмы, применяемых в травматологии и ортопедии (обзор литературы) / Г. П. Котельников, Д. А. Долгушкин, В. А. Лазарев, А. Н. Братийчук, К. М. Богданов // Аспирантский вестник

- Поволжья. – 2020. – № 5 - 6. – С. 106 - 113. – DOI 10.17816/2072-2354.2020.20.3.106-113. – EDN AEDAGB.
27. Леонова, О.Н. Плотность костной ткани позвонков в единицах Хаунсфилда как предиктор несостоятельности межтелового блока и проседания имплантата при круговом поясничном спондилодезе / О.Н. Леонова, Е.С. Байков, А.В. Пелеганчук, А.В. Крутько // Хирургия позвоночника. – 2022. – Т. 19. – № 3. – С. 57–65. – DOI: 10.14531/ss2022.3.57-65. – EDN GZQCAУ.
28. Макеев, А. В. Использование различных видов аутотрансплантатов при костной пластике расщелины альвеолярного отростка / А. В. Макеев, О. З. Топольницкий, Р. Н. Федотов // Вестник Российского университета дружбы народов. Серия: Медицина. – 2020. – Т. 24. - № 1. – С. 69-74. – DOI 10.22363/2313-0245-2020-24-1-69-74. – EDN NNXWSC.
29. Масгутов, Р. Ф. Применение клеток стромальной васкулярной фракции жировой ткани при ложном суставе бедренной кости: клинический случай / Р. Ф. Масгутов, Р. З. Салихов, Ю. А. Плаксейчук, И. И. Салафутдинов, А. А. Ризванов, А. А. Богов // Клеточная трансплантология и тканевая инженерия. – 2013. – Т. 8. - № 3. – С. 116-118. – EDN YUPDWZ.
30. Мелешко, А.А. Перспективы применения наноматериалов на основе гидроксиапатита, созданных в условиях послойной химической сборки, в травматологии и ортопедии детского возраста / А.А. Мелешко, В.П. Толстой, Г.Е. Афиногенов, А.С. Левшакова, А.Г. Афиногенова, В.П. Мульдияров, С.В. Виссарионов, С.А. Линник // Ортопедия, травматология и восстановительная хирургия детского возраста. – 2020. – Т. 8. – № 2. – С. 217–230. – doi.org/10.17816/PTORS33824.
31. Михайлюта, А.Г. Кальций-фосфатные материалы как биоматериалы для имплантации костных тканей / А. Г. Михайлюта, Ю. А. Сергеев, Е. А. Стерлева, И. Г. Субботин // Аллея науки. – 2020. – Т. 1. - № 8 (47). – С. 74-79. – EDN MGURAG.

32. Павлов, В.Н. Современные возможности клинического применения стромально-васкулярной фракции жировой ткани / В.Н. Павлов, А.А. Казихинуров, Р.А. Казихинуров, А.М. Пушкарев, М.А. Агавердиев, С.Ю. Максимова, И.Ф. Гареев, О.А. Бейлерли // Медицинский вестник Башкортостана. – 2020. – Т. 15. – №6. – С. 142–153.
33. Патшина, М. В. Анализ мирового рынка биоматериалов с целью определения потенциальных возможностей сырья животного происхождения / М. В. Патшина, Р. А. Ворошилин, А. М. Осинцев // Техника и технология пищевых производств. – 2021. – Т. 51. - № 2. – С. 270-289. – DOI 10.21603/2074-9414-2021-2-270-289. – EDN PKOIZF.
34. Петракова, Н. В. Влияние условий синтеза и спекания нанопорошков гидроксиапатита на формирование микроструктуры и свойств керамики : специальность 05.17.11 "Технология силикатных и тугоплавких неметаллических материалов" : диссертация на соискание ученой степени кандидата технических наук / Петракова Наталия Валерьевна. – Москва, 2014. – 143 с. – EDN SVAZQJ.
35. Подорожная, В.Т. Аллогенные костные материалы: структура, свойства, применение / В.Т. Подорожная, М.А. Садовой, И.А. Кирилова, Ю.П. Шаркеев, Е.В. Легостаева // Известия высших учебных заведений. Физика. – 2013. – Т. 56. – № 12–3. – С. 14-20.
36. Попов, В. П. Экспериментальное обоснование *in vitro* остеогенных свойств кальций-фосфатных покрытий с различным фазовым составом / В. П. Попов, И. А. Хлусов, Ю. П. Шаркеев, Е. В. Легостаева, С. В. Гнеденков // Политравма. – 2012. – № 3. – С. 72-76. – EDN PDYXSB.
37. Попов, Н. В. Роль аллогенных костно-замещающих материалов в репаративном остеогенезе атрофированной альвеолярной кости / Н. В. Попов // Вестник медицинского института "РЕАВИЗ": реабилитация, врач и здоровье. – 2018. – № 2(32). – С. 87-92. – EDN XRSNTV.
38. Рождественский, А. А. Первые результаты экспериментального применения синтетического материала на основе смеси фосфата и

- силиката кальция с целью замещения костных дефектов / А. А. Рождественский, Г. Г. Дзюба, С. А. Ерофеев, А. П. Солоненко, А.Е. Шевченко, А. Н. Кузовкин, Д.И. Ештокин, С. В. Чернигова, Е. С. Дочилова, А. С. Рождественский // Современные проблемы науки и образования. – 2022. – № 3. – С. 137. – DOI 10.17513/spno.31828. – EDN QGICNI.
- 39.Свентская, Н. В. Кремний-структурированные гидроксипатитовые цементы для костно-пластической хирургии / Н. В. Свентская, Ю. С. Лукина, А. С. Зайцев // Техника и технология силикатов. – 2018. – Т. 25. - №. 4. – С. 99 - 106. – EDN YUCLRB.
- 40.Скрипникова, И. А. Микроэлементы в профилактике остеопороза: фокус на кремний / И. А. Скрипникова, А. В. Гурьев // Остеопороз и остеопатии. – 2014. – Т. 17. - № 2. – С. 36-40. – EDN TCVTGR.
- 41.Соломин, Л. Н. Классификация дефектов костей, образующих коленный сустав, у пациентов с противопоказаниями к эндопротезированию / Л. Н. Соломин, К. Л. Корчагин, Р. С. Розбрух // Травматология и ортопедия России. – 2018. – Т. 24. - № 1. – С. 36-43. – DOI 10.21823/2311-2905-2018-24-1-36-43. – EDN YVGNNI.
- 42.Стогов, М. В. Оценка биосовместимости новых костнопластических ксеноматериалов, содержащих золедроновую кислоту и ранелат стронция / М. В. Стогов, О. В. Дюрягина, Т. А. Силантьева, И. В. Шипицына, Е. А. Киреева, М.А. Степанов // Травматология и ортопедия России. – 2023. – Т. 29. - № 2. – С. 57-73. – DOI 10.17816/2311-2905-2035. – EDN DGKYPY.
- 43.Ступко М. Гидроксилпатит – самый главный из фосфатов кальция: сайт. – URL: <https://biomolecula.ru/articles/gidroksilapatit-samyi-glavnyi-iz-fosfatov-kaltsiia> (дата обращения: 16.11.2021 г.).
- 44.Третьяк, Д. С. Опыт применения плазмы, обогащенной тромбоцитами при лечении пациентов с обширными раневыми дефектами / Д. С. Третьяк, А. П. Трухан, Д. В. Васильев, К. А. Федоров, А. Д. Васильева //

- Медицинский журнал. – 2023. – № 2(84). – С. 108-112. – DOI 10.51922/1818-426X.2023.2.108. – EDN GKGASZ.
- 45.Фадеева, И.В. Пористые матриксы на основе поливинилпирролидона, содержащие фосфаты кальция, для медицинских применений / И.В. Фадеева, А.А. Форысенкова, Е.С. Трофимчук, М.Р. Гафуров, И.А. Ахмед, Г.А. Давыдова, О.С. Антонова, С.М. Баринов // Известия Академии наук. Серия химическая. – 2022. – Т. 71. - № 3. – С. 543-548. – EDN LLCNGD.
- 46.Файн, А. М. Доступные способы повышения регенераторного потенциала пластического материала неотложной травматологии. Часть 1. Использование аутологичной богатой тромбоцитами плазмы крови / А. М. Файн, А. Ю. Ваза, С. Ф. Гнетецкий, К. И. Скуратовская, В. Б. Бондарев, Ю. А. Боголюбский, Р. С. Титов, А. Ю. Сергеев // Трансплантология. – 2022. – Т. 14. - № 1. – С. 79 - 97. – DOI 10.23873/2074-0506-2022-14-1-79-97. – EDN AVSCWK.
- 47.Хоминец, В.В. Аллогенные остеопластические материалы для реконструктивной хирургии боевых травм / В.В. Хоминец, К.А. Воробьев, М.О. Соколова, А.К. Иванова, А.В. Комаров // Известия Российской военно- медицинской академии. – 2022. – Т. 41. – № 3. – С. 309–314. – DOI: 10.17816/rmmar109090. – EDN ZJLNQX.
- 48.Черданцева, Л.А. Оценка *in vitro* влияния аллогенной костной матрицы на характеристики мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани при создании комбинированных тканеинженерных конструкций / Л. А. Черданцева, Е. А. Анастасиева, Д. Я. Алейник, М.Н. Егорихина, И. А. Кириллова // Травматология и ортопедия России. – 2021. – Т. 27. - № 1. – С. 53-65. – DOI 10.21823/2311-2905-2021-27-1-53-65. – EDN EXRKQW.s
- 49.Almulhim, K. S. Bioactive Inorganic Materials for Dental Applications: A Narrative Review / K. S. Almulhim, M. R. Syed, N. Alqahtani, M. Alamoudi, M. Khan, S. Z. Ahmed, A. S. Khan // Materials (Basel, Switzerland). - 2022.

- Vol.15. - N 19. - P. 6864. doi:10.3390/ma15196864

50. Amini, Z. A systematic review of decellularized allograft and xenograft-derived scaffolds in bone tissue regeneration / Z. Amini, R. Lari // *Tissue and Cell*. – 2021. – Vol. 69. – P. 101494. doi.org/10.1016/j.tice.2021.101494.
51. Anastasieva, E. A. “Analysis of the results of replacement of large bone defects in the patients who underwent segmental bone resection for tumor”. / E. A. Anastasieva, A. A. Voropaeva, M. A. Sadovoy, I. A. Kirilova // *Physics of Cancer: Interdisciplinary Problems and Clinical Applications*. - 2017. - Vol. 1882. - N 1. doi:10.1063/1.5001581.
52. Armaghani, S. J. The Evaluation of Donor Site Pain After Harvest of Tricortical Anterior Iliac Crest Bone Graft for Spinal Surgery: A Prospective Study. / S. J. Armaghani, K. L. Even, E. K. Zern, B. A. Braly, J. D. Kang, C. J. Devin // *Spine*. - 2016. - Vol. 41. - N 4. - P. 191-196. doi:10.1097/BRS.0000000000001201
53. Bora, P. Adipose tissue-derived stromal vascular fraction in regenerative medicine: a brief review on biology and translation / P. Bora, A.S. Majumdar // *Stem cell research & therapy*. – 2017. – Vol. 8. – N 1. – P. 1–10.
54. Baron, M. Mesenchymal Stem/Stromal Cells: Immunomodulatory and Bone Regeneration Potential after Tumor Excision in Osteosarcoma Patients / M. Baron, P. Drohat, B. Crawford, F. J. Hornicek, T. M. Best, D. Kouroupis // *Bioengineering (Basel, Switzerland)*. - 2023. - Vol.10. - N 10.- P. 1187. doi:10.3390/bioengineering10101187
55. Bokov, A. E. Current Trends in the Development of Materials for Bone Grafting and Spinal Fusion (Review) / A. E. Bokov, S. G. Mlyavykh, N. Y. Shirokova, D. V. Davydenko, N. Y. Orlinskaya // *Modern Technologies in Medicine*. – 2018. – Vol. 10, N 4. – P. 203 - 219. – DOI 10.17691/stm2018.10.4.24. – EDN YUVDWP.
56. Bracey, D. N. Bone xenotransplantation: A review of the history, orthopedic clinical literature, and a single-center case series / D. N. Bracey, N. E. Cignetti, A. H. Jinnah, A. V. Stone, B. M. Gyr, P. W. Whitlock, A. T. Scott //

- Xenotransplantation. – 2020. – Vol. 27. – N 5. – P. e12600. – doi.org/10.1111/xen.12600.
57. Buser, Z. Bone Grafting and Spinal Fusion Options. / Z. Buser, A. Jakoi, B. Katbamna, R. Basho, J. C. Wang // *Essentials of Spinal Stabilization*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-59713-3_34
58. Cavadas, P. C. Vascularized Ribs in the Treatment of Posterior Instrumentation Infection after Thoracic Vertebrectomy. Case Report / P.C. Cavadas, M. Baklinska, D. Téllez // *Indian journal of plastic surgery: official publication of the Association of Plastic Surgeons of India*. - 2022. - Vol. 55. - N 1. - P. 107-110. doi:10.1055/s-0041-1740526
59. Chang, X. New perspective into mesenchymal stem cells: Molecular mechanisms regulating osteosarcoma / X. Chang, Z. Ma, G. Zhu, Y. Lu, J. Yang // *Journal of Bone Oncology*. – 2021. – Vol. 29. – P. 100372.
60. Chen, Z. Nanotopography-based strategy for the precise manipulation of osteoimmunomodulation in bone regeneration / Z. Chen, A. Bachhuka, F. Wei, X. Wang, G. Liu, K. Vasilev, Y. Xiao // *Nanoscale*. - 2017. - Vol. 9. - N 46. P. 18129-18152. doi:10.1039/c7nr05913b
61. Chen, Z. Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials / Z. Chen, T. Klein, R. Murray, R. Crawford, J. Chang, C. Wu, Y. Xiao. (2015). // *Materials Today*. - 2015. – Vol. 19. – N 6. – P. 304-321. 10.1016/j.mattod.2015.11.004.
62. Chung, C. G. Human perivascular stem cell-based bone graft substitute induces rat spinal fusion/ C. G. Chung, A. W. James, G. Asatrian, L. Chang, A. Nguyen, K. Le, G. Bayani, R. Lee, D. Stoker, X. Zhang, K. Ting, B. Péault, C. Soo // *Stem cells translational medicine*. - 2014. - Vol. 3. -N 10.- P. 1231-1241. doi:10.5966/sctm.2014-0027
63. Cieza, A. Global estimates of the need for rehabilitation based on the Global Burden of Disease study 2019: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 / A. Cieza, K. Causey, K. Kamenov, S.W. Hanson, S. Chatterji, T. Vos. // *Lancet*. Vol.19. – N 396. - 2006-2017. doi:

- 10.1016/S0140-6736(20)32340-0.
64. Ciołek, L. Bioactive Glasses Enriched with Strontium or Zinc with Different Degrees of Structural Order as Components of Chitosan-Based Composite Scaffolds for Bone Tissue Engineering / L. Ciołek, M. Krok-Borkowicz, A. Gaśniński, M. Biernat, A. Antosik, E. Pamuła // *Polymers (Basel)*. - 2023. - Vol. 15. - N 19. - P. 3994. doi:10.3390/polym15193994
65. Cormack, A. N. Structure and biological activity of glasses and ceramics / A. N. Cormack, A. Tilocca // *Philosophical transactions. Series A, Mathematical, physical, and engineering sciences*. - 2012. - Vol. 370. - N 1963. P. 1271 - 1280. doi:10.1098/rsta.2011.0371
66. Dashnyam, K. Angiogenesis-promoted bone repair with silicate-shelled hydrogel fiber scaffolds / K. Dashnyam, J. O. Buitrago, T. Bold, N. Mandakhbayar, R. A. Perez, J. C. Knowles, J. H. Lee, H. W. Kim // *Biomaterials science*. - 2019. - Vol. 7. - N 12. - P. 5221 - 5231. doi:10.1039/c9bm01103j
67. Dawood, A. E. Calcium silicate-based cements: composition, properties, and clinical applications / A. E. Dawood, P. Parashos, R. H. K. Wong, E. C. Reynolds, D. J. Manton // *Journal of investigative and clinical dentistry*. - 2017. - Vol. 8. - N 2.
68. De Pieri, A. Scaffold-free cell-based tissue engineering therapies: Advances, shortfalls and forecast / A. De Pieri, Y. Rochev, D. I. Zeugolis // *NPJ Regenerative medicine*. - 2021. - Vol. 6. - P. 18. doi: 10.1038/s41536-021-00133-3.
69. Denry, I. Design and characterization of calcium phosphate ceramic scaffolds for bone tissue engineering / I. Denry, L. T. Kuhn // *Dental Materials*. - 2016. - Vol. 32. - N 1. - P. 43-53.
70. Deschaseaux, F. Bone regeneration: the stem/progenitor cells point of view / F. Deschaseaux, C. Pontikoglou, L. Sensébé // *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. - 2010. - Vol. 14. - P. 103 - 115
71. Dominici, M. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal

- cells / M. Dominici, K. Le Blanc, I. Mueller, I. Slaper-Cortenbach, F. Marini, D. Krause, R. Deans, A. Keating, Dj. Prockop, E. Horwitz // *The International Society for Cellular Therapy position statement // Cytotherapy.* – 2006. – Vol. 8. – N 4. – P. 315–317.
72. Dong, X. *Bioceramics in Endodontics: Updates and Future Perspectives / X. Dong, X. Xu // Bioengineering (Basel, Switzerland).* - 2023. - Vol. 10. - N 3. - P. 354. doi:10.3390/bioengineering10030354
73. Drăghici, M. A. *Osseointegration evaluation of an experimental bone graft material based on hydroxyapatite, reinforced with titanium-based particles. / M. A. Drăghici, I. Mitruț, A. I. Sălan, P. C. Mărășescu, R. E. Caracaș, A. Camen, L. T. Ciocan, O. Gîngu, H. O. Manolea. // Romanian journal of morphology and embryology.* – 2023. – Vol. 64. – N 1.- P. 49-55. doi:10.47162/RJME.64.1.06
74. Drago, L. *Bioactive glass BAG-S53P4 for the adjunctive treatment of chronic osteomyelitis of the long bones: an in vitro and prospective clinical study / L. Drago, D. Romanò, E. De Vecchi, C. Vassena, N. Logoluso, R. Mattina, C. L. Romanò // BMC infectious diseases.* - 2013. - Vol. 13. - P. 584. doi:10.1186/1471-2334-13-584
75. Dragosloveanu, Ș. *Tricalcium phosphate and hydroxyapatite treatment for benign cavitory bone lesions: A prospective clinical trial. / S. Dragosloveanu, C. D. M. Dragosloveanu, H. T. Stanca, D. C. Cotor, A. C. Andrei, C. I. Dragosloveanu, C. I. Stoica // Experimental and therapeutic medicine.* – 2020.- Vol. 20.- N 6.- P. 215. doi: 10.3892/etm.2020.9345.
76. Du, W. J. *Mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and adipose tissue maintain their immunosuppressive properties after chondrogenic differentiation: role of HLA-G / W. J. Du, L. Reppel, L. Leger, C. Schenowitz, C. Huselstein, D. Bensoussan, E. D. Carosella, Z. C. Han, N. Rouas-Freiss // Stem Cells and Development.* – 2016. – Vol. 25. - N 19. – P. 1454–1469.
77. Duan, R. *Variation of the bone forming ability with the physicochemical*

- properties of calcium phosphate bone substitutes / R. Duan, D. Barbieri, X. Luo, J. Weng, C. Bao, J. D. de Bruijn, H. Yuan // *Biomaterials science*. - 2017. - Vol.6. - N 1. - P. 136 - 145. doi:10.1039/c7bm00717e
- 78.Duan, R. Coupling between macrophage phenotype, angiogenesis and bone formation by calcium phosphates / R. Duan, Y. Zhang, L. van Dijk, D. Barbieri, J. van den Beucken, H. Yuan, J. de Bruijn // *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. - 2021. - Vol. 122. - P. 111948 doi: 10.1016/j.msec.2021.111948.
- 79.El-Rashidy, A. A. Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: A review of in vivo studies in bone defect models / A. A. El-Rashidy, J. A. Roether, L. Harhaus, U. Kneser, A. R. Boccaccini // *Acta biomaterialia*. - 2017. - Vol. 62 (2017). - P. 1-28. doi:10.1016/j.actbio.2017.08.030
- 80.Edranov, S. S. Osteogenic and Regenerative Potential of Free Gingival Graft / S. S. Edranov, N. Y. Matveeva, S. G. Kalinichenko // *Bulletin of experimental biology and medicine*. - 2021. - Vol. 171. - N 3.
- 81.Elgali, I. Guided bone regeneration: materials and biological mechanisms revisited / I. Elgali, O. Omar, C. Dahlin, P. Thomsen // *European journal of oral sciences*. – 2017. – Vol. 125. – N 5. – P. 315–337.
- 82.Feng, L. Bone regeneration combining platelet rich plasma with engineered bone tissue / L. Feng, W. Chang, B. Tian, W. Zeng // *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. – 2017. – Vol. 7. - N 9. – P. 841–847.
- 83.Fernandes, H. R. Bioactive Glasses and Glass-Ceramics for Healthcare Applications in Bone Regeneration and Tissue Engineering / H. R. Fernandes, A. Gaddam, A. Rebelo, D. Brazete, G. E. Stan, J. M. F. Ferreira // *Materials (Basel, Switzerland)*. - 2018. - Vol. 11. - N 12. - P. 2530. doi:10.3390/ma11122530
- 84.Gagala, J. Minimum 10 years clinical and radiological outcomes of acetabular revisions of total hip arthroplasties with tricalcium phosphate/hydroxyapatite bone graft substitute / J. Gagala // *BMC musculoskeletal disorders*. - 2021. Vol. 22. - N 1. - P. 835. doi:10.1186/s12891-021-04694-8

85. Gaharwar A. K. Engineered biomaterials for in situ tissue regeneration / A. K. Gaharwar, I. Singh, A. Khademhosseini // *Nat Rev Mater.* - 2020. - Vol. 5. - P. 686 – 705.
86. García-Gareta, E. Osteoinduction of bone grafting materials for bone repair and regeneration / E. García-Gareta, M. J. Coathup, G. W. Blunn // *Bone.* – 2015. – Vol. 81. – P. 112–121
87. Gentile, P. Systematic review: allogenic use of stromal vascular fraction (SVF) and decellularized extracellular matrices (ECM) as advanced therapy medicinal products (ATMP) in tissue regeneration / P. Gentile, A. Sterodimas, J. Pizzicannella, L. Dionisi, D. De Fazio, C. Calabrese, S. Garcovich // *International journal of molecular sciences.* – 2020. – Vol. 21. – N 14. – P. 4982
88. Gioia, G, Histological assessment of new bone formation with biomimetic scaffold in posterolateral lumbar spine fusion. / G. Gioia, M. Agnoletto, A. Di Giancamillo, M. Domenicucci, L. Mangiavini, M. D. M. Lombardo, L. Brambilla, G. M. Peretti // *Journal of biological regulators and homeostatic agents.* - 2020. - Vol. 34 .- N (4 Suppl. 3). -P. 99-103. PMID: 33261262.
89. Grayson, W. L. Stromal cells and stem cells in clinical bone regeneration / W. L. Grayson, B. A. Bunnell, E. Martin, T. Frazier, B. P. Hung, J. M. Gimble // *Nature Reviews. Endocrinology.* – 2015. – Vol. 11. - N 3. – P. 140–150
90. Griffin, K.S. Evolution of bone grafting: bone grafts and tissue engineering strategies for vascularized bone regeneration / K. S. Griffin, K. M. Davis, T. O. McKinley [et al.] // *Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism.* – 2015. – Vol. 13. – N 4. – P. 232-244.
91. Guerado, E. Challenges of bone tissue engineering in orthopaedic patients / E. Guerado, E. Caso // *World journal of orthopedics.* - 2017. - Vol. 8. - N 2.- P. 87-98. doi:10.5312/wjo.v8.i2.87
92. Gupta, A. Bone graft substitutes for spine fusion: a brief review / A. Gupta, N. Kukkar, K. Sharif, B. J. Main, C. E. Albers, S. F. El-Amin Iii // *World Journal of Orthopedics.* – 2015. – Vol. 6. - N 6. – P. 449.

93. Hannink, G. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: what is optimal for bone regeneration? / G. Hannink, J. J. C. Arts // *Injury*. – 2011. – Vol. 42. – P. S22–S25
94. Hankenson K. D. Angiogenesis in bone regeneration / K. D. Hankenson, M. Dishowitz, C. Gray, M. Schenker // *Injury*. - 2011. - Vol. 42. P. 556 – 561. doi: 10.1016/j.injury.2011.03.035.
95. He, Y. Strategies for insitutissue engineering of vascularized bone regeneration (Review). / Y. He, L. Liang, C. Luo, Z. Y. Zhang, J. Huang // *Biomedical reports*. - 2023. - Vol. 18. - N 6. - P. 42. doi:10.3892/br.2023.1625
96. Heo, J. S. Comparison of molecular profiles of human mesenchymal stem cells derived from bone marrow, umbilical cord blood, placenta and adipose tissue / J. S. Heo, Y. H.-S. Choi, K. Hyun, O. Kim // *International Journal of Molecular Medicine*. – 2016. – Vol. 37. - N 1. – P. 115–125.
97. Hernandez-Fernandez, A. Effect of administration of platelet-rich plasma in early phases of distraction osteogenesis: an experimental study in an ovine femur model. / A. Hernandez-Fernandez, R. Vélez, F. Soldado, J. C. Saenz-Ríos, I. Barber, M. Aguirre-Canyadell // *Injury*. - 2013. - Vol. 44. - N 7. - P. 901-907. doi:10.1016/j.injury.2012.10.018
98. Hoppe, A. Biological Impact of Bioactive Glasses and Their Dissolution Products / A. Hoppe, A. R. Boccaccini // *Frontiers of oral biology*. - 2015. - Vol. 17. - P. 22 - 32. doi:10.1159/000381690
99. Hoppe, A. A review of the biological response to ionic dissolution products from bioactive glasses and glass-ceramics / A. Hoppe, N. S. Güldal, A. R. Boccaccini // *Biomaterials*. - 2011. - Vol. 32. - N 11. P. 2757 - 2774. doi:10.1016/j.biomaterials.2011.01.004
100. Hu, C. C. Lipoteichoic Acid Accelerates Bone Healing by Enhancing Osteoblast Differentiation and Inhibiting Osteoclast Activation in a Mouse Model of Femoral Defects / C. C. Hu, C. H. Chang, Y. M. Hsiao, Y. Chang, Y. Y. Wu, S. W. N. Ueng, M. F. Chen // *International journal of molecular sciences*. - 2020. - Vol.21. - N 15. - P. 5550. doi:10.3390/ijms21155550

101. Huang, L. Evaluation of bone regeneration following combination therapy with platelet-rich plasma and chitosan/hydroxyapatite / L. Huang, T. Lei, H. Hu, C. Teng // *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*. – 2017. – Vol. 7. - N 8. – P. 642– 649.
102. Huang, S. New insights on the reparative cells in bone regeneration and repair / S. Huang, M. Jin, N. Su, L. Chen // *Biological Reviews*. – 2021. – Vol. 96. – N 2. – P. 357 - 375.
103. Huang, S. J. Adipose-derived stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential / S. J. Huang, R. H. Fu, W. C. Shyu, S. P. Liu, G. P. Jong, Y. W. Chiu, H. S. Wu, Y. A. Tsou, C. W. Cheng, S. Z. Lin // *Cell transplantation*. - 2013. - Vol.22. - N 4.- P. 701 - 709. doi:10.3727/096368912X655127
104. Jagadale, P.N. Synthesis and characterization of nanostructured CaSiO₃biomaterial. / P.N. Jagadale, S.R. Kulal, M.G. Joshi, P.P. Jagtap, S.M. Khetre, S. R. Baname // *Mater Sci-Pol*. – 2013. Vol. 31.- P. 269–275.
105. Jeon, Y. R. Scaffold free bone regeneration using platelet-rich fibrin in calvarial defect model / Y. R. Jeon, M. J. Kim, Y.O. Kim, T. S. Roh, W. J. Lee, E. H. Kang, I. S. Yun // *Journal of Craniofacial Surgery*. – 2018. – Vol. 29. - N 1. – P. 251 - 254.
106. Johal, K. S. Adipose-derived stem cells: selecting for translational success / K. S. Johal, V. C. Lees, A. J. Reid // *Regenerative medicine*. - 2015. - Vol. 10. - N 1. P. 79-96. doi: 10.2217/rme.14.72.
107. Jones, Julian R. Reprint of: Review of bioactive glass: From Hench to hybrids./ R. J. Jones// *Acta biomaterialia*. - 2015. - Vol. 23 Suppl (2015). - P. 53 - 82. doi:10.1016/j.actbio.2015.07.019
108. Kamitakahara, M. Effect of silicate incorporation on in vivo responses of α -tricalcium phosphate ceramics. / M. Kamitakahara, E. Tatsukawa, Y. Shibata, S. Umemoto, T. Yokoi, K. Ioku, T. Ikeda // *Journal of materials science. Materials in medicine*. - 2016. - Vol. 27. - N 5. - P. 97. doi:10.1007/s10856-016-5706-5

109. Kapur, S. K. Review of the adipose derived stem cell secretome. / S. K. Kapur, A. J. Katz // *Biochimie*. - 2013. - Vol. 95. - N 12. - P. 2222 - 2228. doi:10.1016/j.biochi.2013.06.001
110. Karadjian, M. Biological Properties of Calcium Phosphate Bioactive Glass Composite Bone Substitutes: Current Experimental Evidence / M. Karadjian, C. Essers, S. Tsitlakidis, B. Reible, A. Moghaddam, A. R. Boccaccini, F. Westhauser // *International journal of molecular sciences*. - 2019. - Vol. 20. - N 2. - P. 305. doi:10.3390/ijms20020305
111. Keramaris, N. C. Endothelial progenitor cells (EPCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) in bone healing / N. C. Keramaris, S. Kaptanis, H. L. Moss, M. Loppini, S. Pneumaticos, N. Maffulli // *Current Stem Cell Research & Therapy*. - 2012. - Vol. 7. - N 4. - P. 293 - 301
112. Khan, M. The role of mesenchymal stem cells in oncology and regenerative medicine / M. Khan, S.E.R. Adil, A.L. Olson // *Future Oncology*. - 2017. - Vol. 13. - N 9. - P. 821 - 831.
113. Kim, T. H. Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing / T. H. Kim, S.-H. Kim, G. K. Sandor, Y.-D. Kim // *Archives of Oral Biology*. - 2014. - Vol. 59. - N 5. - P. 550 - 558.
114. Kubota, G. Platelet-rich plasma enhances bone union in posterolateral lumbar fusion: A prospective randomized controlled trial. / G. Kubota, H. Kamoda, S. Orita, K. Yamauchi, Y. Sakuma, Y. Oikawa, K. Inage, T. Sainoh, J. Sato, M. Ito, M. Yamashita, J. Nakamura, T. Suzuki, K. Takahashi, S. Ohtori // *The spine journal : official journal of the North American Spine Society*. - 2019. - Vol. 19. - N 2. - P. e34 - e40. doi:10.1016/j.spinee.2017.07.167
115. Kühn, K.D. Knochenersatzwerkstoffe als lokale Wirkstoffträger : Aktueller Stand bei Ersatzstoffen verschiedenen Ursprungs [Bone substitute materials as local drug carriers : Current status of substitutes of various origins] / K.D. Kühn, C. Berberich, H. Bösebeck // *Der Orthopäde*. - 2018.-

116. Laubach, M. Clinical translation of a patient-specific scaffold-guided bone regeneration concept in four cases with large long bone defects. / S. Suresh, B. Herath, M.L. Wille, H. Delbrück, H. Alabdulrahman, D.W. Hutmacher, F. Hildebrand/ *Journal of orthopaedic translation.* – 2022. – Vol. 34. - P. 73 - 84. doi:10.1016/j.jot.2022.04.004
117. Lee, B. N. Anti-inflammatory and Osteogenic Effects of Calcium Silicate-based Root Canal Sealers / B. N. Lee, J. U. Hong, S. M. Kim, J. H. Jang, H. S. Chang, Y. C. Hwang, I. N. Hwang, W. M. Oh // *Journal of endodontics.* - 2019. - Vol. 45. N 1. - P. 73 - 78. doi:10.1016/j.joen.2018.09.006
118. Lee, J. H. Negative effect of rapidly resorbing properties of bioactive glass-ceramics as bone graft substitute in a rabbit lumbar fusion model / J. H. Lee, H. S. Ryu, J. H. Seo, D. Y. Lee, B. S. Chang, C. K. Lee // *Clinics in orthopedic surgery.* - 2014. - Vol. 6. - N 1. - P. 87 - 95. doi:10.4055/cios.2014.6.1.87
119. Lendeckel, S. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report / S. Lendeckel, A. Jödicke, P. Christophis, K. Heidinger, J. Wolff, J. K. Fraser, M. H. Hedrick, L. Berthold, H. P. Howaldt // *Journal of cranio-maxillo-facial surgery : official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery.* - 2004. - Vol. 32. - N 6. - P. 370 - 373. doi:10.1016/j.jcms.2004.06.002
120. Liao, H.T. Osteogenic potential: Comparison between bone marrow and adipose-derived mesenchymal stem cells / H.T. Liao, C.T. Chen // *World journal of stem cells.* – 2014. – Vol. 6. – N 3. – P. 288 - 295.
121. Li, C. Mesenchymal stem/stromal cells: developmental origin, tumorigenesis and translational cancer therapeutics / C. Li, H. Zhao, B. Wang // *Translational Oncology.* – 2021. – Vol. 14. – N 1. – P. 10094
122. Li, H. Stimulation of proangiogenesis by calcium silicate bioactive ceramic / H. Li, J. Chang // *Acta Biomaterial.* - 2019. - Vol. 94. - P. 644 - 645

doi:10.1016/j.actbio.2012.10.019

123. Li, H. Calcium silicate enhances immunosuppressive function of MSCs to indirectly modulate the polarization of macrophages / H. Li, W. Wang, J. Chang // *Regenerative biomaterials*. - 2021. - Vol. 8. - N 6. doi:10.1093/rb/rbab056
124. Li, W. Emerging advances in hydrogel-based therapeutic strategies for tissue regeneration / W. Li, J. Hu, C. Chen, X. Li, H. Zhang, Y. Xin, Q. Tian, S. Wang // *Regen Ther*. - 2023. - Vol. 24. - P. 459 - 471. doi:10.1016/j.reth.2023.09.007
125. Linero, I. Paracrine effect of mesenchymal stem cells derived from human adipose tissue in bone regeneration / I. Linero, O. Chaparro // *PloS One*. - 2014. - Vol. 9. - N 9. - P. e107001.
126. Liu, Z. Biomaterial scaffolds regulate macrophage activity to accelerate bone regeneration/ Z. Liu, J. Zhu, Z. Li, H. Liu, C. Fu // *Frontiers in bioengineering and biotechnology*. - 2023. - Vol. 11. P. 1140393. doi:10.3389/fbioe.2023.1140393
127. Luck, J. A Systematic Review of Autologous Platelet-Rich Plasma and Fat Graft Preparation Methods / J. Luck, O.J. Smith, A. Mosahebi // *Plastic and reconstructive surgery. Global open*. - 2017. - Vol. 5. - N 12. - P. e1596.
128. Manini, D. R. Role of Platelet-Rich Plasma in Spinal Fusion Surgery: Systematic Review and Meta-Analysis. / D. R. Manini, F. D. Shega, C. Guo, Y. Wang // *Advances in orthopedics*. - 2020. - Vol. 2020. - P. 8361798. doi:10.1155/2020/8361798
129. Marques, L. F. Platelet-rich plasma (PRP): methodological aspects and clinical applications / L. F. Marques, T. Stessuk, I. C. C. Camargo, N. Sabeh Junior, L. dos Santos, J. T. Ribeiro-Paes // *Platelets*. - 2015. - Vol. 26. - N 2. - P. 101 - 113.
130. Miron, R. J. Osteoinductive potential of a novel biphasic calcium phosphate bone graft in comparison with autographs, xenografts, and DFDBA / R. J. Miron, A. Sculean, Y. Shuang, D. D. Bosshardt, R. Gruber, D. Buser,

- F. Chandad, Y. Zhang // *Clinical Oral Implants Research*. – 2016. – Vol. 27. – N 6. – P. 668 - 675.
131. Mofakhmi, S. Biphasic calcium phosphate microspheres in biomedical applications / S. Mofakhmi, E. Salahinejad // *Journal of controlled release: official journal of the Controlled Release Society*. - 2021. - Vol. 338. - P. 527 - 536. doi:10.1016/j.jconrel.2021.09.004
132. Mohamed-Ahmed, S. “Adipose-derived and bone marrow mesenchymal stem cells: a donor-matched comparison / S. Mohamed-Ahmed, I. Fristad, S . A. Lie, S. Suliman, K. Mustafa, H. Vindenes, S. B. Idris // *Stem cell research & therapy*. - 2018. - Vol. 9. N 1. - P. 168. doi:10.1186/s13287-018-0914-1
133. Moura, L. B. Autogenous non-vascularized bone graft in segmental mandibular reconstruction: a systematic review / L. B. Moura, A. de Carvalho, C. B. Xavier, L. K. Post, M. A. Torriani, M. Santagata, O. L. Chagas Júnior // *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. – 2016. – Vol. 45. – N 11. – P. 1388 - 1394.
134. Ohta, K. Adsorption characteristics of proteins on calcium phosphates using liquid chromatography / K. Ohta, H. Monma, S. Takahashi // *Journal of biomedical materials research*. - 2001. - Vol. 55. - N 3. - P. 409 - 414. doi:10.1002/1097-4636(20010605)55:3<409::aid-jbm1030>3.0.co;2-z 60
135. Olszta, M.J. Bone Structure and Formation: A new Perspective. / J. Olszta Matthew, C. Xingguo, S. J. Sang, K. Rajendra, K. Yi-Yeoun, M. J. Kaufman, E. P. Douglas, B. Laurie // *Materials Science and Engineering: Reports*. - 2007. - Vol. 58. - P. 77 - 116.
136. Oryan, A. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions / A. Oryan, S. Alidadi, A. Moshiri, N. Maffulli // *Journal of orthopaedic surgery and research*. - 2014. - Vol. 9. - N 1. - P. 18. doi:10.1186/1749-799X-9-18
137. Pairuchvej, S. Efficacy of platelet-rich plasma in posterior lumbar interbody fusion: systematic review and meta-analysis. / S. Pairuchvej, J. A.

- Muljadi, A. Arirachakaran, J. Kongtharvonskul // *European journal of orthopaedic surgery & traumatology: orthopedie traumatologie*. - 2020. - Vol. 30. - N 4.- P. 583 - 593. doi:10.1007/s00590-019-02603-3
138. Pantulap, U. Bioactive glasses incorporating less-common ions to improve biological and physical properties / U. Pantulap, M. Arango-Ospina, A. R. Boccaccini // *Journal of materials science. Materials in medicine*. - 2021. - Vol. 33. - N 1. - P. 3. doi:10.1007/s10856-021-06626-3
139. Park, H.Y. Simple curettage and allogeneic cancellous bone chip impaction grafting in solitary enchondroma of the short tubular bones of the hand / H. Y. Park, M. W. Joo, Y. H. Choi, Y. G. Chung, C. J. Park // *Scientific reports*. - 2023. - Vol. 13. - N 1. - P.2081. doi:10.1038/s41598-023-29130-w
140. Perez, R. A. Role of pore size and morphology in musculo-skeletal tissue regeneration / R. A. Perez, G. Mestres // *Materials Science and Engineering: C*. – 2016. – Vol. 61. – P. 922 - 939
141. Pirris, S. M. A retrospective study of iliac crest bone grafting techniques with allograft reconstruction: do patients even know which iliac crest was harvested? Clinical article / S. M. Pirris, E. W. Nottmeier, S. Kimes, M. O'Brien // *Journal of Neurosurgery: Spine*. – 2014. – Vol. 21. - N 4. – P. 595 - 600.
142. Qi, Y. Combining mesenchymal stem cell sheets with platelet-rich plasma gel/calcium phosphate particles: a novel strategy to promote bone regeneration / Y. Qi, L. Niu, T. Zhao, Z. Shi, T. Di, G. Feng, J. Li, Z. Huang // *Stem Cell Research & Therapy*. – 2015. – Vol. 6. - N 1. – P. 256.
143. Rahaman, M. N. Bioactive ceramics and glasses for tissue engineering / M. N. Rahaman // *Tissue Engineering Using Ceramics and Polymers*. (Second Edition). – [S. l.], 2014. – P. 67 - 1
144. Rao, P. N. Structural and Functional Characterization of Deceased Donor Stem Cells: A Viable Alternative to Living Donor Stem Cells. / P. N. Rao, D. D. Deo, M. A. Marchioni, R. R. Taghizadeh, K. Cetrulo, S. Sawczak, J. Myrick // *Stem cells international*. - 2019. - Vol. 2019. - P. 5841587.

doi:10.1155/2019/5841587

145. Rasouli, J. Anterior Cervical Discectomy and Fusion With "Kissing" Allograft Interbodies. / J. Rasouli, B. Fiani, J. Belding, T. A. Moore // *Cureus*. - 2021. - Vol. 13.- N 11. - P. 19499. doi:10.7759/cureus.19499
146. Reece, E.M. Vascularized Bone Grafts for Spinal Fusion – Part 1: The Iliac Crest / E.M. Reece, M.J. Davis, R.D. Wagner, A. Abu-Ghname, A. Cruz, G. Kaung, T. Verla, S. Winocour, A.E. Ropper // *Operative Neurosurgery*. – 2021. – Vol. 20. – N 5. – P. 493- 496.
147. Ros-Tárraga, P. High temperature $\text{CaSiO}_3\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ceramic promotes osteogenic differentiation in adult human mesenchymal stem cells / P. Ros-Tárraga, P. Mazón, B. Revilla-Nuin, R. Rabadán-Ros, P. N. de Aza, L. Meseguer-Olmo // *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*. - 2020. - Vol. 107. - P. 110355. doi:10.1016/j.msec.2019.110355
148. Rustom, L. E. Mineralization in micropores of calcium phosphate scaffolds / L. E. Rustom, M. J. Poellmann, A. J. Wagoner Johnson // *Acta Biomater*. - 2019. - Vol. 83. - P. 435 - 455. doi:10.1016/j.actbio.2018.11.003
149. Sakata, M. Bone regeneration of osteoporotic vertebral body defects using PRP and gelatin β -TCP sponges / M. Sakata, H. Tonomura, T. Itsuji, H. Ishibashi, R. Takatori, Y. Mikami, M. Nagae, K. I. Matsuda, Y. Tabata, M. Tanaka, T. Kubo // *Tissue Engineering. Part A*. – 2017. Doi: 10.1089/ten.TEA.2017.0358.
150. Sándor, G.K. Adipose stem cell tissue-engineered construct used to treat large anterior mandibular defect: a case report and review of the clinical application of good manufacturing practice-level adipose stem cells for bone regeneration / G. K. Sándor, V. J. Tuovinen, J. Wolff, M. Patrikoski, J. Jokinen, E. Nieminen, B. Mannerström, O.P. Lappalainen, R. Seppänen, S. Miettinen // *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. – 2013. – Vol. 71. – N 5. – P. 938 - 950.
151. Santos, P. S. Osteoinductive porous biphasic calcium phosphate

- ceramic as an alternative to autogenous bone grafting in the treatment of mandibular bone critical-size defects / P. S. Santos, T. M. Cestari, J. B. Paulin, R. Martins, C. A. Rocha, R. V. N. Arantes, B. C. Costa, C. M. Dos Santos, G. F. Assis, R. Taga // *Journal of biomedical materials research. Part B, Applied biomaterials.* - 2018. - Vol. 106. - N 4. - P. 1546 - 1557. doi:10.1002/jbm.b.33963
152. Schlund, M. Rabbit calvarial and mandibular critical-sized bone defects as an experimental model for the evaluation of craniofacial bone tissue regeneration / M. Schlund, A. Depeyre, S. Kotagudda Ranganath, P. Marchandise, J. Ferri, F. Chai // *Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery.* – 2022. – Vol. 123. – N 6. – P. 601 - 609.
153. Sethu S. N. Nanoceramics on osteoblast proliferation and differentiation in bone tissue engineering / S. N. Sethu, S. Namashivayam, S. Devendran, S. Nagarajan, W. B. Tsai, S. Narashiman, M. Ramachandran, M. Ambigapathi // *International journal of biological macromolecules.* - 2017. - Vol. 98. - P. 67 - 74. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.01.089
154. Shah, M. Comparative evaluation of platelet-rich fibrin with demineralized freeze-dried bone allograft in periodontal infrabony defects: a randomized controlled clinical study / M. Shah, J. Patel, D. Dave, S. Shah // *Journal of Indian Society of Periodontology.* – 2015. – Vol. 19. - N 1. – P. 56-60.
155. Sharma R. R. et al. Mesenchymal stem or stromal cells: a review of clinical applications and manufacturing practices // *Transfusion.* – 2014. – T. 54. – N. 5. – P. 1418 - 1437.
156. Sharun, K. Standardization and characterization of adipose-derived stromal vascular fraction from New Zealand white rabbits for bone tissue engineering / K. Sharun, A.M. Pawde, R. Kumar, E. Kalaiselvan, P. Kinjavdekar, Dhama K., A. Pal // *Veterinary world.* – 2021. – Vol. 14. – N 2. – P. 508 - 514.
157. Shi, L. Differentiation potential and application of stem cells from

- adipose tissue / L. Shi, X. Yang // Chinese journal of reparative and reconstructive surgery. 2012. - Vol. 26. - N 8. - P. 1007 - 11.
158. Shi, Y. Adipose-derived stem cells combined with a demineralized cancellous bone substrate for bone regeneration / Y. Shi, J. R. Niedzinski, A. Samaniego, S. Bogdansky, B. L. Atkinson // Tissue engineering. Part A. - 2012. - Vol. 18. - N 13 - 14. - P. 1313 - 1321. doi:10.1089/ten.TEA.2011.0357
159. Shin, S. R. Donor Site Morbidity After Anterior Iliac Bone Graft Harvesting. / S. R. Shin, P. 3rd. Tornetta // Journal of orthopaedic trauma. - 2016. - Vol. 30. - N 6. - P. 340 - 343. doi:10.1097/BOT.0000000000000551
160. Son, S.-R. Platelet-rich plasma encapsulation in hyaluronic acid/gelatin-BCP hydrogel for growth factor delivery in BCP sponge scaffold for bone regeneration / S. R. Son, S. K. Sarkar, N. T. Ba Linh, A. R. Padalhin, B. R. Kim, H. I. Jung, B. Lee // Journal of Biomaterials Applications. – 2015. – Vol. 29. - N 7. – P. 988 - 1002.
161. Stanovici, J. Bone regeneration strategies with bone marrow stromal cells in orthopaedic surgery / J. Stanovici, L. R. Le Nail, M. A. Brennan, L. Vidal, V. Trichet, P. Rosset, P. Layrolle. // Current research in translational medicine. – 2016. -Vol. 64. – N 2.- P.83 - 90. doi:10.1016/j.retram.2016.04.006
162. Squillaro, T. Clinical trials with mesenchymal stem cells: an update / T. Squillaro, G. Peluso, U. Galderisi // Cell Transplantation. – 2016. – Vol. 25. - N 5. – P. 829 - 848.
163. Steijvers, E. Manufacturing artificial bone allografts: a perspective / E. Steijvers, A. Ghei, Z. Xia // Biomaterials Translational. – 2022. – Vol. 3. – N 1. – P. 65. – doi.org/10.12336%2Fbiomatertransl.2022.01.007.
164. Tatullo, M. The regenerative medicine in oral and maxillofacial surgery: the most important innovations in the clinical application of mesenchymal stem cells / M. Tatullo, M. Marrelli, F. Paduano // International Journal of Medical Sciences. – 2015. – Vol. 12. - N 1. – P. 72 - 77.
165. Tetsworth, K.D. Classification of bone defects: an extension of the

- Orthopaedic Trauma Association open fracture classification / K.D. Tetsworth, H.G. Burnand, E. Hohmann, V. Glatt // *Journal of orthopaedic trauma*. – 2021. – Vol. 35. – N 2. – P. 71 - 76.
166. Titsinides, S. Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review / S. Titsinides, G. Agrogiannis, T. Karatzas // *Japanese dental science review*. – 2019. – Vol. 55. – N 1. – P. 26 - 32
167. Toosi, S. Osteogenesis and bone remodeling: A focus on growth factors and bioactive peptides / S. Toosi, J. Behravan // *Biofactors*. – 2020. – Vol. 46. – N 3. – P. 326 - 340. – doi.org/10.1002/biof.1598.
168. Torres-Guzman, R. A. Bone Morphogenic Protein and Mesenchymal Stem Cells to Regenerate Bone in Calvarial Defects: A Systematic Review. / R. A. Torres-Guzman, F. R. Avila, K. C. Maita, J. P. Garcia, G. D. De Sario, S. Borna, A. S. Eldaly, A. Quinones-Hinojosa, A. C. Zubair, O. A. Ho, A. J. Forte // *Journal of clinical medicine*. - 2023. - Vol. 12. - N 12. - P. 4064. doi:10.3390/jcm12124064
169. Trounson, A. Stem cell therapies in clinical trials: progress and challenges / A. Trounson, C. McDonald // *Cell Stem Cell*. – 2015. – Vol. 17. - N 1. – P. 11 - 22.
170. Tuchman, A. Iliac Crest Bone Graft versus Local Autograft or Allograft for Lumbar Spinal Fusion: A Systematic Review. / A. Tuchman, D. S. Brodke, J. A. Youssef, H. J. Meisel, J. R. Dettori, J. B. Park, S. T. Yoon, J. C. Wang // *Global spine journal*. - 2016. - Vol. 6. - N 6. - P. 592 - 606. doi:10.1055/s-0035-1570749
171. Ullah, I. Human mesenchymal stem cells-current trends and future prospective / I. Ullah, R. B. Subbarao, G. J. Rho // *Bioscience Reports*. – 2015. – Vol. 35. - N 2. – P. e00191.
172. Uzbas, F. Molecular physiognomies and applications of adipose-derived stem cells. / F. Uzbas, I. D. May, A. M. Parisi, S. K. Thompson, A. Kaya, A. D. Perkins, E. Memili // *Stem cell reviews and reports*. - 2015. - Vol. 11. - N 2. P. 298 - 308. doi:10.1007/s12015-014-9578-0

173. Wang, H. Comparative studies on ectopic bone formation in porous hydroxyapatite scaffolds with complementary pore structures / H. Wang, W. Zhi, X. Lu, X. Li, K. Duan, R. Duan, Y. Mu, J. Weng // *Acta biomaterialia*. - 2013. - Vol. 9. - N 9. - P. 8413 - 8421. doi:10.1016/j.actbio.2013.05.026
174. Wang, H. Application of platelet-rich plasma in spinal surgery. / H. Wang, J. Zhu, Y. Xia, Y. Li, C. Fu. // *Frontiers in endocrinology*. - 2023. - Vol. 15. - N 14. P. 1138255. <https://doi.org/10.3389/fendo.2023.1138255>
175. Wang, J. Role of biphasic calcium phosphate ceramic-mediated secretion of signaling molecules by macrophages in migration and osteoblastic differentiation of MSCs. / J. Wang, D. Liu, B. Guo, X. Yang, X. Chen, X. Zhu, Y. Fan, X. Zhang // *Acta biomaterialia*. - 2017. - Vol. 51. - P. 447 - 460. doi:10.1016/j.actbio.2017.01.059
176. Wang, J. Positive role of calcium phosphate ceramics regulated inflammation in the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells / J. Wang, X. Chen, X. Yang, B. Guo, D. Li, X. Zhu, X. Zhang // *Journal of biomedical materials research*. - 2020. - Vol. 108. - P. 1305 - 1320. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36903>
177. Wang, L. Effect of particle size on osteoinductive potential of microstructured biphasic calcium phosphate ceramic / L. Wang, D. Barbieri, H. Zhou, J. D. de Bruijn, C. Bao, H. Yuan // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A*. - 2015. - Vol. 103. - N 6. - P. 1919 - 1929.
178. Wang, L. Healing of acute alveolar bone dehiscence following treatment with porous biphasic calcium phosphate in beagle dogs / L. Wang, H. Shi, Y. Chen, J. Xue, Y. Chen, Y. Liao // *Clinical oral investigations*. - 2011. - Vol. 15. - N 6. - P. 983 - 991. doi:10.1007/s00784-010-0454-2
179. Weber, M. H. Graft Subsidence and Revision Rates Following Anterior Cervical Corpectomy: A Clinical Study Comparing Different Interbody Cages. / M. H. Weber, M. Fortin, J. Shen, B. Tay, S. S. Hu, S. Berven, S. Burch, D. Chou, C. Ames, V. Deviren // *Clinical spine surgery*. - 2017. - Vol. 30. - N 9. - P. E1239 - E1245. doi:10.1097/BSD.0000000000000428

180. Wei, S. Biodegradable materials for bone defect repair / S. Wei, J. X. Ma, L. Xu, X. S. Gu, X. L. Ma // *Military Medical Research*. – 2020. – Vol. 7. – N 1. – P. 1– 25.
181. Wei, X. Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy / X. Wei, X. Yang, Zhi-peng Han, F. F. Qu, L. Shao, Y. F. Shi // *Acta Pharmacologica Sinica*. – 2013. – Vol. 34. - N 6. – P. 747 - 754.
182. Wilden, J. A. Results of vascularized rib grafts in complex spinal reconstruction/ J. A. Wilden, S. L. Moran, M. B. Dekutoski, A. T. Bishop, A. Y. Shin// *The Journal of bone and joint surgery. American volume*. - 2006. - Vol. 88. - N 4. - P. 832 - 839. doi:10.2106/JBJS.E.00409
183. Wu, J. X. Stem Cell Therapies for Human Infertility: Advantages and Challenges. / Xia, T., She, L. P., Lin, S., & Luo, X. M // *Cell transplantation*. – 2022. – Vol. 31. – P. 9636897221083252.
184. Xiao, D. The role of calcium phosphate surface structure in osteogenesis and the mechanisms involved / D. Xiao, J. Zhang, C. Zhang, D. Barbieri, H. Yuan, L. Moroni, G. Feng // *Acta biomaterialia*. - 2020. - Vol. 106. P. 22 - 33. doi:10.1016/j.actbio.2019.12.034
185. Ye, X. Adipose-derived stem cells alleviate osteoporosis by enhancing osteogenesis and inhibiting adipogenesis in a rabbit model / X. Ye, P. Zhang, S. Xue, Y. Xu, J. Tan, G. Liu // *Cytherapy*. - 2014. - Vol. 16. - N 12. - P. 1643 - 55. doi:10.1016/j.jcyt.2014.07.009
186. Yin, N. Platelet-rich plasma enhances the repair capacity of muscle-derived mesenchymal stem cells to large humeral bone defect in rabbits / N. Yin, Y. Wang, L. Ding, J. Yuan, L. Du, Z. Zhu, M. Pan, F. Xue, H. Xiao // *Scientific reports*. – 2020. – Vol. 10. – N 1. – P. 1 - 13.
187. Yin, X. Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials / X. Yin, C. Zetao, C. Jiang, W. Chengtie // *In Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. -2016. - Vol. 19. - N 6. – P. 304 - 321. <https://doi.org/10.3389/CONF.FBIOE.2016.01.00215>
188. Zadpoor, A. A. Bone tissue regeneration: the role of scaffold geometry

- / A. A. Zadpoor // *Biomaterials Science*. – 2015. – Vol. 3. - N 2. – P. 231 - 245.
189. Zafar, K. Bio-active cements-Mineral Trioxide Aggregate based calcium silicate materials: a narrative review / K. Zafar, S. Jamal, R. Ghafoor // *JPMA. The Journal of the Pakistan Medical Association*. - 2020. - Vol.70. - N 3. - P. 497 - 504. doi:10.5455/JPMA.16942
190. Zhang, L. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair / L. Zhang, G. Yang, B. N. Johnson, X. Jia // *Acta biomaterialia*. – 2019. – Vol. 84. – P. 16 - 33.
191. Zhang, P. FOXC1 Promotes Osteoblastic Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells via the Dnmt3b/CXCL12 Axis. / P. Zhang, B. Feng, G. Dai, K. Niu, L. Zhang // *Biochemical genetics*. - Published online June 12, 2023. doi:10.1007/s10528-023-10403-y
192. Zhou, P. Calcium silicate bioactive ceramics induce osteogenesis through oncostatin M / P. Zhou, D. Xia, Z. Ni, T. Ou, Y. Wang, H. Zhang, L. Mao, K. Lin, S. Xu, J. Liu // *Bioactive materials*. - 2020. - Vol. 6. - N 3. - P. 810 - 822. doi:10.1016/j.bioactmat.2020.09.018
193. Zhou, W. The performance of bone marrow mesenchymal stem cell-implant complexes prepared by cell sheet engineering techniques / W. Zhou, C. Han, Y. Song, X. Yan, D. Li, Z. Chai, Z. Feng, Y. Dong, L. Li, X. Xie, F. Chen, Y. Zhao // *Biomaterials*. – 2010. – T. 31. – N. 12. – P. 3212 - 3221
194. Zuk, P. A. Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. / P. A. Zuk, M. Zhu, P. Ashjian, D. A. De Ugarte, J. I. Huang, H. Mizuno, Z. C. Alfonso, J. K. Fraser, P. Benhaim, M. H. Hedrick // *Molecular biology of the cell*. - 2002. - Vol. 13. - N 12. - P. 4279 - 4295. doi:10.1091/mbc.e02-02-0105

ПРИЛОЖЕНИЕ А

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**

НА ИЗОБРЕТЕНИЕ

№ 2785143**Способ получения пористых сферических гранул на основе гидроксипатита, волластонита и желатина**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Омский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России) (RU)*

Авторы: *Солоненко Анна Петровна (RU), Шевченко Алиса Евгеньевна (RU), Чиканова Екатерина Сергеевна (RU), Бердинская Мария Владимировна (RU), Рождественский Андрей Александрович (RU)*

Заявка № 2022107260

Приоритет изобретения 21 марта 2022 г.

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации 05 декабря 2022 г.

Срок действия исключительного права
на изобретение истекает 21 марта 2042 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



ПРИЛОЖЕНИЕ Б

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ

**ПАТЕНТ**НА ИЗОБРЕТЕНИЕ
№ 2802431**СПОСОБ МОДЕЛИРОВАНИЯ
ПОСТТРАВМАТИЧЕСКОГО КОМПРЕССИОННОГО
КОСТНОГО ДЕФЕКТА**

Патентообладатель: *Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Омский государственный медицинский университет" Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБОУ ВО ОмГМУ Минздрава России) (RU)*

Авторы: *Дзюба Герман Григорьевич (RU), Рождественский Андрей Александрович (RU), Ерофеев Сергей Александрович (RU), Чернигова Светлана Владимировна (RU), Солоненко Анна Петровна (RU), Рождественский Александр Сергеевич (RU), Одарченко Дмитрий Игоревич (RU)*

Заявка № **2022131854**

Приоритет изобретения **07 декабря 2022 г.**

Дата государственной регистрации
в Государственном реестре изобретений

Российской Федерации **28 августа 2023 г.**

Срок действия исключительного права

на изобретение истекает **07 декабря 2042 г.**

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности

Ю.С. Зубов



ПРИЛОЖЕНИЕ В

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№. 2023624160

**Средние показатели рентгенологической плотности
новообразованной костной ткани в зоне метафизарного
дефекта**

Правообладатель: *федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования «Омский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Дзюба Герман Григорьевич (RU), Рожественский
Андрей Александрович (RU), Ерофеев Сергей Александрович
(RU)*

Заявка № 2023624056

Дата поступления 21 ноября 2023 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных 24 ноября 2023 г.

*Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности*



Документ подписан электронной подписью
Сертификат: 429b6a0fe3853164ba796185b73b4aa7
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 10.05.2023 по 02.08.2024

Ю.С. Зубов

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

РОССИЙСКАЯ ФЕДЕРАЦИЯ



СВИДЕТЕЛЬСТВО

о государственной регистрации базы данных

№. 2023624793

**Количественный анализ Ca, P, Si в структуре
новообразованной костной ткани при имплантации
фосфат-силикатных гранул в зону метафизарного
дефекта**

Правообладатель: *федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования «Омский
государственный медицинский университет»
Министерства здравоохранения Российской Федерации (RU)*

Авторы: *Дзюба Герман Григорьевич (RU), Рожественский
Андрей Александрович (RU), Ерофеев Сергей Александрович
(RU)*

Заявка № 2023624063

Дата поступления 21 ноября 2023 г.

Дата государственной регистрации

в Реестре баз данных 20 декабря 2023 г.

Руководитель Федеральной службы
по интеллектуальной собственности



ДОКУМЕНТ ПОДПИСАН ЭЛЕКТРОННОЙ ПОДПИСЬЮ
Сертификат 429b6a0fe3853164ba96183b73b4aa7
Владелец: **Зубов Юрий Сергеевич**
Действителен с 10.05.2023 по 02.08.2024

Ю. С. Зубов