

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

«ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

Пензенский педагогический институт им. В. Г. Белинского

Факультет

Кафедра

физико-математических и естественных наук

«Зоология и экология»

Направление подготовки

06.04.01 «Биология»

Магистерская программа

«Молекулярная биология и генетика»

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

на тему:

**«МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ КОСТНОЙ РЕГЕНЕРАЦИИ
И ИССЛЕДОВАНИЕ БИОСОВМЕСТИМОСТИ КОСТНОЗАМЕЩАЮЩЕГО
МАТЕРИАЛА»**

Студент _____ Гультияева Вера Вячеславовна

Научный руководитель _____ Кручинина А.Д.

Нормоконтролёр _____ Быстракова Н.В.

Рецензент Директор ООО «Кардиоплант» _____ Венедиктов А.А.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от _____ № ____)

Заведующий кафедрой _____ Титов С.В.

Работа защищена с отметкой ____ (протокол заседания ГЭК от _____ № ____)

Секретарь ГЭК _____ Быстракова Н.В.

Пенза 2021

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	6
1.1 Состав костной ткани.....	6
1.2 Механизмы образования костной ткани.....	7
1.3 Молекулярные аспекты регенерации костной ткани.....	8
1.3.1 Физиологическая регенерация.....	9
1.3.2 Репаративная регенерация.....	10
1.4 Сигнальные молекулы восстановления костной ткани.....	11
1.4.1 Противовоспалительные цитокины.....	11
1.4.2 Суперсемейство трансформирующего фактора роста- β	13
1.4.3 Костные морфогенетические белки.....	14
1.4.4 Тромбоцитарные факторы роста.....	17
1.4.5 Факторы роста фибробластов.....	18
1.4.6 Инсулиноподобные факторы роста.....	20
1.4.7 Металлопротеиназы и ангиогенные факторы.....	21
1.5 Биохимические показатели ремоделирования костной ткани...	24
1.6 Виды костных материалов для регенерации кости.....	26
1.7 Перспективы создания и проблемы биосовместимости имплантатов с костной тканью.....	28
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	31
2.1 Материалы исследований.....	31
2.2 Методы исследований.....	32
2.2.1 Оценка антибактериального действия лекарственного покрытия.....	32
2.2.2 Исследование цитотоксического действия лекарственного покрытия	33
2.2.3 Определение биохимических и гематологических параметров крови	35

2.2.4 Методы статистической обработки результатов	38
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ	
ОБСУЖДЕНИЕ.....	39
3.1 Результаты исследования антибактериального действия лекарственного покрытия костных блоков.....	39
3.2 Результаты исследования цитотоксичности лекарственного покрытия	44
3.3 Результаты исследования биохимических и гематологических параметров крови.....	47
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	59
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	61
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	62

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы. Реконструкция дефектов костной ткани с помощью новых технологий и биоматериалов считается многообещающим направлением в медицине. Обусловлено это высоким уровнем травм опорно-двигательного аппарата, обширностью стоматологических заболеваний, а также вероятностью инфекционных осложнений после протезирования костей и суставов. Понимание общих закономерностей регенерации костной ткани и вопросов патогенеза замедленной консолидации является одним из важных аспектов в формировании клинических стратегий. Регенерация костной ткани происходит по неизменному многоступенчатому пути. Она регулируется большим количеством биологически активных молекул, а множественные факторы влияют на обилие молекулярных событий.

Быстрый прогресс в клеточной и молекулярной биологии костной ткани привел к идентификации многих сигнальных молекул, связанных с формированием. Появляется всё больше свидетельств того, что сигнальные молекулы являются критическими регуляторами клеточной пролиферации, дифференцировки, биосинтеза внеклеточного матрикса и минерализации костей. Чёткое понимание клеточных и молекулярных путей, участвующих в регенерации костной ткани критически важно и может расширить наши знания о механизмах, участвующих в росте и восстановлении. Это говорит о том, что в будущем эти молекулярные факторы могут играть важную роль в лечении заболеваний костей и восстановлении переломов.

Регенерация невозможна без синтетических или природных биodeградируемых субстанций. Используемые в хирургии ксеногенные имплантируемые биоматериалы обязательно должны быть безопасны для организма. Открытым остается вопрос возможности модификации материалов и изделий различными лекарственными веществами и биологически активными препаратами с целью придания необходимых свойств. Например, с целью снижения риска развития постимплантационных инфекционных осложнений на поверхность имплантируемых медицинских изделий может

быть нанесено композиционное лекарственное покрытие с антибактериальным действием.

Целью работы является изучение молекулярных механизмов костной регенерации и исследование биосовместимости костнозамещающего материала с антибактериальным лекарственным покрытием.

В соответствии с целью были поставлены следующие **задачи**:

- 1) Изучить особенности состава костной ткани, виды регенерации, сигнальные молекулы костного восстановления и особенности биосовместимости костного материала;
- 2) Подготовить экспериментальные образцы костных блоков с лекарственным покрытием, оценить антибактериальное действие этих образцов;
- 3) Провести тест на цитотоксичность костнозамещающего материала с антибактериальным лекарственным покрытием;
- 4) Изучить влияние модифицированного ксеногенного материала на биохимические и гематологические параметры крови после имплантации;
- 5) Оценить морфологические изменения в месте имплантации экспериментальных образцов на разных сроках после хирургического вмешательства.

Магистерская диссертация написана на 68 листах, содержит 12 рисунков, 15 таблиц и список литературы на русском и английском языках из 63 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Состав костной ткани

Костная ткань – это чрезвычайно плотная, специализированная форма соединительной ткани. Как и все соединительные ткани, костная ткань состоит из внеклеточного матрикса и клеток. Внеклеточный матрикс состоит из органического и неорганических веществ: содержит воду, белки (коллагеновые и неколлагеновые), небольшое количество растворенных низкомолекулярных органических соединений и протеогликанов [6].

Клетки занимают от 1-5% общего объёма кости. Различают 4 вида клеток скелетной костной ткани [22].

Недифференцированные мезенхимальные клетки кости располагаются в основном в составе внутреннего слоя надкостницы. Также находятся внутри всех внутренних полостей кости. Из клеток внутренней полости способны образовываться новые клетки костной ткани [20].

Остеобласты являются клетками, которые находятся в местах костеобразования. Они содержат большое количество сахаров, таких как гликоген и глюкоза. С возрастом количество сахаров уменьшается в 2-3 раза. Синтез АТФ на 60% связан с реакциями бескислородного обмена. По мере старения клеток реакции гликолиза становятся активнее. Также в остеобластах протекают реакции цикла трикарбоновых кислот. Синтезируемый в реакции цитрат в дальнейшем используется на связывание ионов кальция, которые необходимы для процессов минерализации костной ткани. Остеобласты способны сообщаться между собой через межклеточные контакты. Эти клетки также синтезируют и выделяют в окружающую среду многие белковые соединения, такие как фибриллы коллагена. По мере старения остеобласты постепенно превращаются в другие костные клетки – остециты [54].

Остециты – древовидные костные клетки. Они входят в состав органического межклеточного матрикса. Остециты способны контактировать друг с другом за счёт специальных длинных отростков, а

также способны взаимодействовать с другими клетками костной ткани: остеобластами, с недифференцированными мезенхимальными клетками кости и с остеокластами [22].

Остеокласты – костные клетки, выполняющие функцию разрушения кости. Они образуются из макрофагов – специальных клеток иммунной системы. Остеокласты осуществляют непрерывный запрограммированный процесс реконструкции и обновления скелетной ткани. Помимо этого, способны обеспечивать необходимый рост и развитие скелета, структуру, прочность и упругость костей [20,22].

1.2 Механизмы образования костной ткани

Костный матрикс непрерывно подвергается регулярному обновлению, так как образование кости – сложный процесс, в котором принимают участие многие компоненты [22].

Все минеральные вещества костной ткани приходят из окружающей жидкости, которая «переполнена» этими компонентами. Сначала происходит нуклеация, т.е. процесс образования поверхности с ядрами кристаллизации, на которой уже может происходить формирование кристаллической решётки. После этого формирование кристаллов минерального остова скелетной ткани запускает коллаген. Первые кристаллы становятся центрами нуклеации для базового отложения гидроксиапатита между коллагеновыми волокнами. Активные остеобласты синтезируют остеокальцин, который является особым специфическим маркером костного ремоделирования. Остеокальцин связывается с гидроксиапатитом с помощью иона кальция. Это происходит в костях и зубах. Попад в кровь, остеокальцин подвергается активному ферментативному расщеплению на фрагменты, имеющие разную длину. Фрагменты можно обнаружить методом ИФА [20,44].

Формирование костной ткани происходит только в непосредственной близости от остеобластов. Интересно, что сначала минерализация начинается

в хряще, который состоит из коллагена. Протеогликаны, в свою очередь, повышают растяжимость коллагеновой сети, а также увеличивают степень её набухания. По мере роста кристаллы вытесняют воду и протеогликаны, которые подвергаются деградации с помощью лизосомальных гидролаз. Плотная, полностью минерализованная кость становится практически обезвоженной, а коллаген составляет около 15-20 % [37].

1.3 Молекулярные аспекты регенерации костной ткани

Обилие сложных биологических событий, которые включают внутриклеточную и внеклеточную передачу молекулярных сигналов для регулирования процессов разрастания новой костной ткани остается в большей степени не до конца изученным. В самом деле, это многоступенчатый процесс восстановления костной ткани, который нуждается в определенной временной и пространственной последовательности [19].

Регенерация костной ткани – это биологический процесс, который заключается в образовании новой костной ткани, восстановлении после повреждения или в перестройке старой [37].

Выделяют 2 вида регенерации: физиологическую и репаративную. Физиологическая регенерация – это процесс, который характеризуется последовательным увеличением объема кости (в результате роста и обновлением скелетной ткани) в процессе жизнедеятельности организма. Обновление кости – это процессы резорбции (рассасывания) и синтеза нового костного вещества, сбалансированные между собой. Регенерация, которая происходит в случае повреждения, утраты какого-нибудь органа или части тела называется репаративной [20,45].

1.3.1 Физиологическая регенерация

Для физиологической регенерации характерна генетическая запрограммированность составляющих её процессов - пролиферации клеток, роста, их дифференцировки, функциональной адаптации и интеграции [19].

Данные исследований свидетельствуют о том, что мезенхимальные клетки пролиферируют и дифференцируются в другие костные клетки в зависимости от окружающих их биологических и механических условий. Например, в каждом месте трещины в костной ткани, мезенхимные клетки превращаются в остеобласты, образующие внутримембранную тканую кость[22].

Костная ткань от начала эмбриогенеза до гибели организма постоянно подвергается изменению. Сначала это связано с активным развитием и ростом всего организма. Внутренняя перестройка продолжается и после окончания роста. Она заключается в постепенной резорбции части костного вещества и замене его новыми компонентами. Эти процессы объясняются тем, что многие структуры костной ткани не сохраняются на протяжении жизненного цикла [40].

Ежегодно меняется от 3 до 5 % костной ткани. В молодом возрасте костная ткань активно накапливается. В средние годы наступает период равновесия между процессами разрушением и восстановления кости. После 50 лет минеральная плотность кости постепенно снижается [20,32].

Существенную роль в физиологической регенерации играют межклеточные внутри тканевые взаимодействия, которые индуцируют ингибирующие факторы (интегрины, гормоны, оксигинация, межклеточные адгезивные факторы, функциональные нагрузки, наличие малодифференцированных клеток). Однако всё равно регенерирующая способность всех тканей понижается с увеличением возраста. Этот процесс детерминирован нашей физиологией [21].

1.3.2 Репаративная регенерация

Нарушение и изменение целостности костной ткани является каталитическим моментом для запуска репаративной регенерации, итогом которой является формирование костной мозоли. Чем тяжелее повреждение

костной ткани, тем больше в этом месте погибшего костного вещества и клеток кости, тем дольше протекает процесс репаративной регенерации [22].

Репаративная регенерация протекает в 4 стадии:

1. Первичная бластома. Образование в очаге повреждения и окружающих тканях запаса необходимых веществ за счет диссимиляции тканевых структур. Происходит использование ресурсов близлежащих тканей и включение всех звеньев регуляции репаративного процесса (первые 4–5 дней после повреждения).

2. Формирование и дифференцирование тканевых структур. К концу третьих суток клетки постепенно начинают прорастать. Полибласты, являющиеся недифференцированными клетками первичной бластомы, в зависимости от условий, способны превращаться в другие клетки: в остеобласты, фибробласты, хондробласты. Одновременно с пролиферацией клеток происходит вращание кровеносных капилляров в регенерат.

3. Формирование ангиогенных структур кости. Происходит восстановление сосудистой сети формирующегося костного регенерата, а также минерализация его белковой части. Стадия длится от 3 недель до 3–4 месяцев. Процессы можно легко выявить с помощью рентгена через 5 недель.

4. Перестройка первичного регенерата и реституции кости. Эта стадия идёт от 6 месяцев до года и более того. Клинически, диагностически и рентгенологически выявляются и изучаются признаки сращения отломков зрелой кости [20,21,32].

1.4 Сигнальные молекулы восстановления

Регенерация костной ткани – это сложный физиологический механизм, регулируемый большим количеством биологически активных молекул. Современные достижения в понимании клеточных и молекулярных механизмов снабжают врачей надежными инструментами для регулирования процессов регенерации костной ткани. Однако характер фазы регенерации

зависит от молекулярных условий в зоне заживления и анатомического расположения костной ткани [20].

Скорый прогресс клеточной и молекулярной биологии костной ткани привел к распознаванию многих сигнальных молекул, которые связаны с формированием костей и скелета в целом. Различные типы сигнальных молекул оказывают большое влияние на регенерацию костной ткани и изучение этих факторов может привести к внедрению новых методов лечения [24,31].

Доставка сигнальных молекул для восстановления костной ткани до настоящего момента была основана на многих факторах. В приоритете те, которые интенсивно участвуют в механизмах образования кости или увеличивают число клеток-предшественников [19].

1.4.1 Противовоспалительные цитокины

Цитокины – биологически активные вещества пептидной природы, которые регулируют объемный спектр процессов, протекающих в организме. Противовоспалительные цитокины, в частности интерлейкин-1 (IL-1), интерлейкин-6 (IL-6), интерлейкин-11(IL-11), интерлейкин-18 (IL-18) и фактор некроза опухоли- α (tumor necrosis factor - α (TNF- α)) и другие, имеют наиважнейшее значение при запуске процесса регенерации скелетной ткани [49].

Секретировать противовоспалительные цитокины способны 80-90% лимфоцитов (разновидность лейкоцитов из группы агранулоцитов), 50-60% макрофагов тканей (клеток, способных захватывать и переваривать бактерии), воспалительные клетки и недифференцированные клетки мезенхимного происхождения, присутствующие в надкостнице. Противовоспалительные цитокины играют важную роль в привлечении медиаторов к участку регенерации, оказывая хемотаксическое действие на другие воспалительные клетки, а также они способны регулировать привлечение эндогенных фиброгенных клеток к повреждённому участку [43,49].

Самый первый противовоспалительный ответ обеспечивают цитокины TNF- α , IL-1 и IL-6. Эти цитокины привлекают воспалительные клетки и способствуют ангиогенезу (формированию новой кровеносной сети). Фактор TNF- α активирует остеогенную дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток. Данный процесс характеризуется возбуждением рецепторов TNFR1 и TNFR2. Они экспрессируются как на остеобластах, так и на остеокластах. Рецептор TNFR1 постоянно образуется в костях, а TNFR2 экспрессируется только после травмы. Этот факт указывает на более специфическую его роль второго рецептора в регенерации кости [57].

В ходе исследований выявлено, что среди разнообразных интерлейкинов наибольшее значение для регенерации скелетной ткани имеют IL-1 и IL-6. Экспрессия IL-1 имеет сходство с экспрессией TNF- α . Интерлейкин-1 образуется макрофагами в острой фазе воспаления. Он активирует выработку IL-6 в остеобластах, а также способствует образованию первичного хрящевого каллуса (недифференцированной массы клеток). Помимо этого, отмечена роль IL-1 в процессах ангиогенеза в поврежденном месте, так как активируется один из двух его рецепторов - IL-1R1 или IL-1R2. Кроме того, интерлейкин IL-1 вырабатывается остеобластами. Из-за этого он упрощает ремоделирование кости, регулирует протеазы для разрушения каллусной (потерявшей организацию) ткани. Также отсутствие молекулярного фактора - TNF- α приводит к задержке создания минерализованного хряща. Отмечена его роль в торможении образования костной ткани на несколько недель и нарушении заживления поврежденного участка[45].

Изучения этих факторов показали, что передача сигналов многих противовоспалительных цитокинов в процессе регенерации костной ткани с биологической точки зрения является уникальной [57].

1.4.2 Суперсемейство трансформирующего фактора роста- β

Суперсемейство трансформирующего фактора роста- β (Transforming growth factor- β (TGF- β)) – это обширная группа регуляторных полипептидов.

Все члены суперсемейства TGF- β синтезируются в виде больших предшественников, которые расщепляются протеазами с образованием димеров зрелого белка. Молекулы TGF- β образуются многими типами клеток и тканей. Например, в этом принимают участие активированные Т-лимфоциты и макрофаги, тромбоциты, почки, плацента. Эти эволюционно консервативные молекулы играют одну из главных ролей роль в дифференцировке и пролиферации клеток во время развития. Исследования говорят, что TGF- β также играют различные регуляторные роли в костной регенерации [25,26].

Семейство трансформирующего фактора роста- β состоит из многих элементов. В настоящее время, факторы TGF- β 1 и TGF- β 2 привлекли наибольшее внимание в отношении регенерации костной ткани. Для легкости обсуждения они могут вместе обозначаться как TGF- β . Передача сигналов TGF- β включает рецепторы TGF- β I и TGF- β II [31].

Большинство клеток в месте повреждения кости, а также в других частях тела экспрессируют на своей поверхности рецепторы TGF- β . Генерируются специфические нижестоящие сигналы, и их связывание с различными рецепторами типа I связано с образованием комплекса рецептор-лиганд. TGF- β -лиганд первоначально связывается с формой рецептора типа II. Далее в комплекс привлекается и рецептор типа I. Эти действия приводят к формированию гетеротетрамерного рецепторного образования, связанного с лигандом. Так как рецептор типа II обладает присущей серин-треонинкиназной активностью, фосфорилирующей рецептор типа I в доменах, активируется серин-треонинкиназа самого рецептора I типа. Эта серин-треонинкиназа рецептора TGF- β I регулирует передачу сигнала через специальное суперсемейство SMAD (сигнальное семейство эффекторных молекул (Smad and mad related proteins)). Передача молекулярных сигналов через семейство SMAD характерна для рецепторов суперсемейства TGF- β [20,31,34].

SMAD являются необходимыми компонентами в каскаде сигналов TGF- β . SMAD2 и SMAD3 связаны с цитоплазматическим SARA (SMAD-якорь для активации рецептора). SARA пододвигает SMAD2 и SMAD3 активированному рецепторному комплексу TGF- β . После рецептор TGF- β I фосфорилирует карбокси-конец SMAD2 и SMAD3. Это приводит к снижению сродства к SARA и гетеротримеризации SMAD2 и SMAD3 с помощью SMAD4. Впоследствии весь комплекс перемещается в ядро через нуклеопорины внутри комплекса ядерных пор и транскрипционно регулирует множество эффекторных генов [25].

Таким образом, передача сигналов с помощью молекулярных факторов семейства TGF- β осуществляется за счёт контроля дифференцировки и регулирования функции остеобластов. В свою очередь остеобласты откладывают костный матрикс, а остеокласты резорбируют костный матрикс. Данное взаимодействие между двумя типами клеток позволяет контролировать ремоделирование кости и гомеостаз [31].

В настоящее время сложно определить молекулярную роль многих членов этого большого суперсемейства из-за их функциональной избыточности [24,26].

1.4.3 Костные морфогенетические белки

Костные морфогенетические белки (Bone morphogenetic proteins - BMP) являются подсемейством суперсемейства полипептидов TGF- β . Они играют важную роль в регулировании роста и дифференцировки клеток. Замечена их роль и в процессе апоптоза (программируемая гибель клеток) клеток, а также они действуют как мощные регуляторы во время эмбриогенеза, формирования и регенерации костной ткани и хряща [27].

В скелетной ткани BMP синтезируются различными видами клеток, например, остеопрогениторными, мезенхимальными клетками и остеобластами. Костные морфогенетические белки способны контролировать последовательные реакции событий для остеогенеза. Сюда входят

пролиферация и дифференцировка мезенхимальных и остеопрогениторных клеток, хемотаксис, ангиогенез, а также контролируемый синтез внеклеточного матрикса [39].

Регуляторный эффект BMP зависит от самой клетки-мишени, а именно: стадии её дифференцировки, локальной концентрации BMP-лиганда и взаимодействия с другими молекулярными факторами [26,27].

Все морфогенетические белки тесно связаны между собой структурно и функционально. Однако, каждый из них играет универсальную роль. Возникают отличия и во времени экспрессии при регенерации кости. По сравнению с TGF- β , BMP обладают более избирательным действием. По меньшей мере, BMP-лиганды делятся на четыре отдельных подсемейства в зависимости от структурного и функционального сходства [25].

Передача сигнала BMP происходит по похожему механизму членов суперсемейства TGF- β . BMP-лиганд может связываться с определенными рецепторами серин-треонинкиназы. В этот список входят: рецептор BMP типа II, рецептор типа IA и рецептор типа IB, с рецепторами активина (ActR-II, ActR-I).

Таким образом BMP-лиганд соединяется с рецептором типа II, и эта связанность рецептора приводит к ассоциации комплекса с необходимым рецептором типа I. Образуется активный комплекс рецептор-лиганд. Это взаимодействие может быть заблокировано BMP-антагонистами, которые могут соединять и блокировать активность данных факторов, предотвращая связывание рецептора. В остеогенных клетках надкостницы в ранний период после повреждения костной ткани экспрессия рецепторов морфогенетических белков в разы увеличивается [31,39].

Как и TGF- β , передача сигналов рецептора BMP передается с помощью семейства сигнальных эффекторов SMAD. В результате снова обеспечивается высокую степень перекрестной связи между сигналами, которые генерируются множеством членов суперсемейства полипептидов TGF- β [24,26].

Во время формирования внутримембранозной кости клетки-остеопрогениторы в камбиевом слое надкостницы могут реагировать на этот начальный низкий уровень высвобождения из внеклеточного матрикса и начать дифференцироваться [39].

Современное мнение о роли BMP в регенерации скелетной ткани проявляется в том, что эти молекулы являются первичными активаторами дифференцировки. Это происходит в остеопрогениторных и мезенхимальных клетках, которым суждено стать остеобластами и хондроцитами. Данная активация BMP, в частности BMP-2, ингибируется антагонистами, которые тормозят взаимодействие BMP-2 с его рецептором. По мере созревания этих первичных клеток экспрессия морфогенетических белков резко снижается. Экспрессия BMP временно возникает в хондроцитах и остеобластах во время периода образования матрикса. Однако отмечено, что потом возвращается к низким уровням во время ремоделирования костной мозоли. Интересно отметить, что хотя зрелые остеобласты и хондроциты не экспрессируют значительных уровней BMP в здоровой кости, они оба весьма увеличивают экспрессию BMP позже при восстановлении костной ткани [20,27,41].

Кроме того, морфогенетические белки способны стимулировать образование и секрецию других костных и ангиогенных факторов роста. Следовательно, они могут стимулировать образование скелетной ткани путем прямой активации эндотелиальных клеток для ангиогенеза [26].

1.4.4 Тромбоцитарные факторы роста

Фактор роста тромбоцитов (Platelet-derived growth factor - PDGF) представляет собой димерную молекулу. Она состоит из А- и В-полипептидных цепей с дисульфидными связями. Эти молекулярные факторы могут существовать либо в гомодимерной (PDGF-AA, PDGF-BB), либо в гетеродимерной форме (PDGF-AB). В соответствии с относительными уровнями каждой субъединицы данный фактор создает величину сложности лиганда в клетках, где экспрессируются оба белка [35].

PDGF образуются многими клетками, например, такими как тромбоциты, моноциты, макрофаги, остеобласты и эндотелиальные клетки. Исследования показывают, что PDGF являются митогенами (молекулой, индуцирующей деление) для клеток мезенхимального происхождения, таких как остеобласты, фибробласты, глиальные клетки и клетки гладких мышц.

Факторы роста тромбоцитов высвобождается из бесформенных форменных элементов крови при активации во время ранней фазы образования костной мозоли (структуры, образующийся в ходе регенерации костной ткани после её нарушения). PDGF действует как мощный хемотаксический фактор для воспалительных клеток, а также пролиферативный стимул для мезенхимальных стволовых клеток и клеток-остеобластов [50,53].

PDGF обладает усиленным хемотаксическим и пролиферативным эффектами. Он может запустить дифференцировку клеток остеопрогениторов в направлении остеобластного происхождения. Фактор роста тромбоцитов функционирует в петле обратной связи макрофагов. В результате стимулирует выработку и высвобождение цитокинов или других факторов. PDGF изначально высвобождается путем дегрануляции тромбоцитов в гематоме, которая связана с повреждением скелетной ткани, поэтому может играть важную роль в стимулировании хемотаксиса[50].

Также PDGF экспрессируется макрофагами, мигрирующими к месту повреждения кости в ответ на травму и на первоначальное высвобождение PDGF тромбоцитами.

Разные изоформы PDGF (AA, AB, BB) влияют на определенные клетки-мишени. Это происходит в результате связывания с двумя структурно родственными рецепторами протеинтирозинкиназы с разной специфичностью. Рецепторы PDGF включаются связыванием лиганда и последующей димеризацией рецептора. Пока каждая субъединица молекулы PDGF содержит рецептор-связывающий сайт, одновременно одна целая молекула PDGF связывается с двумя молекулами рецептора. Также рецепторы

демонстрируют предпочтение белков в том смысле, что α -рецептор связывается либо с А-цепью, либо с В-цепью, но β -рецептор связывается только с В-цепью. Следовательно, PDGF-AA побуждает димеры рецептора $\alpha\alpha$, PDGF-AB индуцирует димеры рецептора $\alpha\alpha$ или $\alpha\beta$, а PDGF-BB побуждает все три возможные комбинации [44,54].

Соединение рецепторов приводит к аутофосфорилированию, которое регулирует активность тирозинкиназы. Молекулы, которые передают сигнал ниже по течению, образуют единицы с активированными комплексами рецептора PDGF через их гомологичные домены Grb (SH2).

В некоторых исследованиях продемонстрировано, что лечение PDGF увеличивает плотность и объем костной мозоли при остеотомии большеберцовой кости у мелких животных. Однако его терапевтический потенциал в травматологии и ортопедии все еще остается не до конца изученным.

1.4.5 Факторы роста фибробластов

Факторы роста фибробластов (Fibroblast growth factors - FGF) и их рецепторы (FGFR) играют одну из ролей во время развития костной ткани. Передача сигналов FGF важна для поддержания гомеостаза кости и в момент её восстановления. Факторы роста фибробластов образуются моноцитами, макрофагами, остеобластами, мезенхимными клетками в момент регенерации скелетной ткани. FGF способны контролировать рост и дифференцировку различных клеток, таких как фибробласты, остеобласты, миоциты и хондроциты [42].

В настоящее время семейство FGF включает более 25 структурно членов, которые связываются с рецепторами трансмембранных тирозинкиназ (белков, которые могут переносить фосфатную группу от АТФ к остаткам тирозина других белков внутри клетки). При соединении FGFR с его лиганд-связывающим доменом, фактор роста фибробластов вызывает связывание

мономеров рецептора с последующим аутофосфорилированием остатков тирозина во внутриклеточном домене передачи сигнала [53].

Семейство FGFR состоит из четырех отдельных, но высокоомологичных трансмембранных белков (FGFR1 - FGFR4), которые взаимодействуют как рецепторы с FGF-лигандами. Каждый целый FGFR содержит специальный сигнальный пептид, три внеклеточных иммуноглобулин подобных домена, кислотный бокс-домен, непрерывный бокс из кислотных остатков в линкерном домене между иммуноглобулином 1 (Ig-1) и иммуноглобулином 2 (Ig-2), трансмембранный домен, внутриклеточный юкта-мембранный домен и внутриклеточный расщепленный тирозинкиназный домен. Третий домен иммуноглобулина придает специфичность FGF-лиганду, в то время как кислотный бокс делает гликозаминогликан способным модулировать рецептор по остатку серина непосредственно рядом с N-концом этого домена. Наличие первого домена иммуноглобулина (Ig-1) может предотвращать модификацию гликозаминогликанов рецептора через стерические препятствия и ингибировать сигнализацию. Передача сигналов с участием экзонов, кодирующих первый домен иммуноглобулина и кислотный бокс, имеет решающее значение для присутствия этих доменов в зрелом белке FGFR. FGF представляют собой секретируемые гликопротеины, которые обычно секвестрируются во внеклеточном матриксе протеогликанами сульфата гепарина. Гепариназа или раздробленный протеазой FGF активирует широкий спектр молекулярных ответов путем соединения и активации FGFR на клеточной поверхности. Основной FGF связывается с высоким с FGFR, стимулируя последующую передачу молекулярных сигналов только в присутствии гепарина или гепариноподобных фрагментов [42,43,53].

В отличие от большинства других факторов роста, возможно, существует положительная корреляция между механической прочностью и размером костной мозоли, вызванной FGF. Можно предположить, что стимуляция пролиферации фибробластов и остеобластов с помощью FGF

приведет к ускоренному образованию белков в костной мозоли и, соответственно, к увеличению ее механической стабильности. Эта возможность требует дальнейшего изучения [42].

1.4.6 Инсулиноподобные факторы роста

Инсулиноподобные факторы роста (Insulin-like growth factor-IGF) играют важную роль в развитии скелета и восстановлении костной ткани. Гормон роста участвует в регуляции роста скелета и запускает высвобождение IGF в клетках-мишенях [46].

Известны два основных IGF, а именно инсулиноподобный фактор роста-1 (IGF-I) и инсулиноподобный фактор роста-2 (IGF-II), оба они обнаруживаются в сыворотке в высокой концентрации. IGF-I контролирует формирование костного матрикса, а также коллагена I типа и неколлагенового матрикса. IGF-I полностью использует дифференцированные остеобласты и действует эффективнее, если сравнивать с IGF-II. Сам же IGF-II действует на поздней стадии формирования скелетной ткани и регулирует выработку коллагена I типа, образование клеточной пролиферации костного матрикса.

IGF-1 – сильный анаболический фактор роста. Активность IGF-I опосредуется рецептором IGF типа 1 (IGF1R), который является лиганд-зависимым рецептором тирозинкиназы. Связывание IGF-I со своим рецептором запускает аутофосфорилирование его цитоплазматического киназного домена. Этот процесс активизирует нижестоящие сигнальные пути в результате взаимодействия с различными стыковочными полипептидами, включая инсулиновый рецептор-субстрат-1 и Grb2 [35,46].

Два главных сигнальных пути, активируемых IGF1R – это пути Ras / Raf / MAPK. IGF-I стимулирует пролиферацию предшественников остеобластов и остеобластов на ранних стадиях и способствует формированию костного матрикса полностью дифференцированными остеобластами. Считается, что IGF участвует в пролиферации или дифференцировке мезенхимальных клеток, остеобластов и хондроцитов. Регуляция IGF сложна, и механизм

действия гормона роста в костных клетках в большей степени неизвестен. Все основные гормоны, контролирующие развитие скелета, оказывают значительное влияние на костный IGF, как и многие факторы роста, такие как BMP-2, TGF- β и FGF. IGF ускоряют пролиферацию и играют важную роль в стимуляции функции зрелых остеобластов. На молекулярном уровне IGF-I активирует фактор транскрипции, связанный с остеобластами. В целом, совокупные данные свидетельствуют о том, что основные эффекты IGF заключаются в содействии дифференцировке на поздних стадиях и активности остеобластов.

Результаты исследований, которые оценивают влияние IGF на регенерацию кости, показывают разные результаты, поэтому необходимы дальнейшие работы в этом направлении [35].

1.4.7 Металлопротеиназы и ангиогенные факторы

Завершающие стадии костеобразования и ремоделирования кости достигаются действием специфических матриксных факторов-металлопротеиназ, которые активно разлагают хрящевую и костную ткань, тем самым обеспечивается проникновение кровеносных сосудов внутрь. Факторы ангиопоэтин 1 и 2 считаются регуляторными морфогенетическими молекулами, которые связаны с формированием мелких и крупных сосудов [33].

На рисунке 1 представлена схема действия основных факторов роста - опосредованных сигнальных путей, которые связаны с регенерацией костной ткани.

А. Рецепторы тирозинкиназы (FGFR 1-5; PDGF R; IGFR 1) **В. Рецепторы серин / треонинкиназы** (TGF β R I и II; BMPR I и II; ACTR I и II)

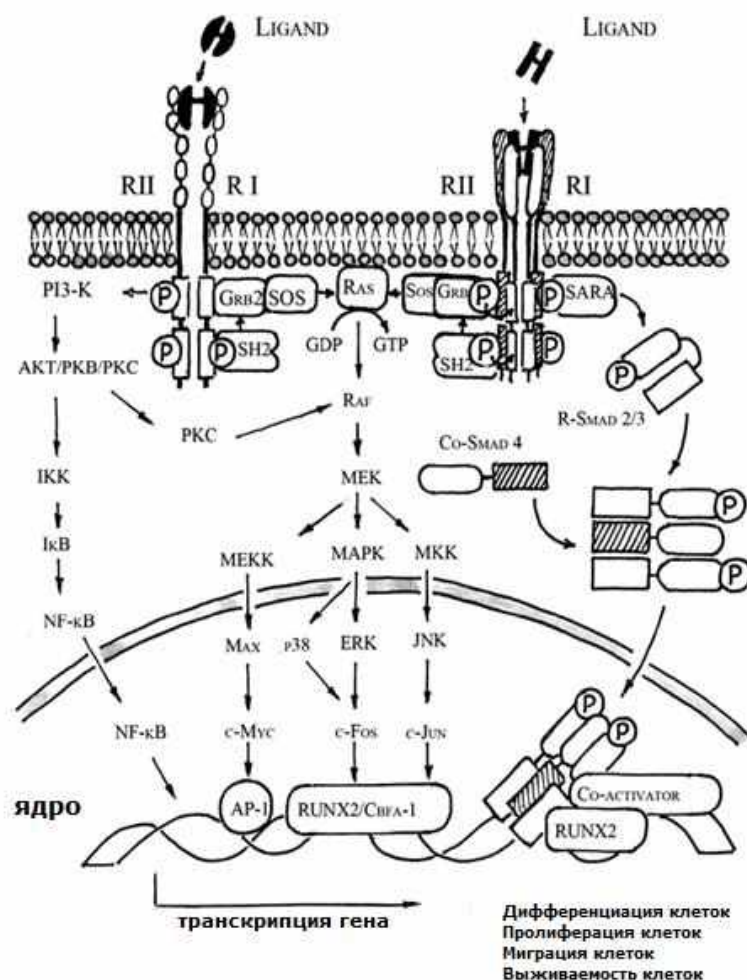


Рис.1.Схематическое изображение основных факторов роста - опосредованных сигнальных путей, связанных с регенерацией

На рисунке показаны сигнальные пути рецепторов тирозинкиназы (А) и рецепторов серин / треонинкиназы (В), которые становятся активны благодаря лиганд-индуцированной димеризации и инициирующих каскадных событий, которые ведут к фосфорилированию белка и активации белков ядер с факторами транскрипции [35].

- АСТ и АСТР – фактор активин и его рецептор;
- AP-1 - белок-активатор, 1 - фактор транскрипции;
- АКТ / PKB - серин / треониновая протеинкиназа В;

- BMP и BMPR - костный морфогенетический фактор и его рецептор;
- c-Fos - фактор транскрипции;
- c-Jun - фактор транскрипции;
- c-Мус - ген-регулятор;
- Co-Smad - посредник Smad;
- ERK - киназа, которая регулируется внеклеточными сигналами;
- FGF и FGFR - фактор роста фибробластов и его рецептор;
- Grb-2 - белок 2, который связан с рецептором фактора роста;
- IGF-1 и IGF-1R - инсулиноподобный фактор роста-1 и его рецептор;
- IκB - ингибитор ядерного фактора каппа В;
- IκK - ингибитор каппа В киназы;
- JNK - Jun N-терминальная киназа;
- MAPK - митоген-активированная серин / треониновая протеинкиназа;
- MEK - тирозин / треонинкиназа;
- MEKK - киназа MAP 3;
- NF-κB - ядерный фактор каппа В;
- p38 - митоген-активированная протеинкиназа p38;
- PDGF и PDGFR - фактор роста тромбоцитов и его рецептор;
- PI3K - фосфатидилинозитол-3-киназа;
- PKC - протеинкиназа C;
- Raf - серин / треониновая протеинкиназа;
- Ras - небольшой гуанозинотид-связывающий белок;
- R-Smad - регулируемый рецептором Smad;
- RUNX2 - фактор транскрипции 2, связанный с корнем, известный как субъединица связывания ядра альфа-1 (Cbfa-1);
- SARA - якорь Smad для активации рецепторов;
- SH-2 - гомология 2-доменного протоонкогена тирозин-протеинлиаза;
- SOS - фактор обмена гуаниновых нуклеотидов;
- TGF-β и TGF-βR - трансформирующий фактор роста и его рецептор.

1.5 Биохимические маркеры метаболизма костной ткани

В последние годы активно изучаются биомаркеры костного обмена в качестве показателей оценки скорости метаболизма кости и предикторов регенерации. Жизнедеятельность скелетной ткани характеризуется двумя взаимно направленными процессами: формированием новой кости остеобластами и разрушением старой – остеокластами [56].

Масса костной ткани напрямую зависит от соотношения между резорбцией и образованием в определенный период времени. Эта зависимость устанавливается от количества активированных участков ремоделирования кости. В норме количество новосформированной ткани эквивалентно количеству разрушенной[21].

В новых исследованиях отмечено, что ремоделированию подвергается от 4 до 12% скелетной ткани в год. При различных костных заболеваниях возникает нарушение процессов ремоделирования ткани. Если говорить другими словами, возникают изменения в нормальном соотношении между процессами резорбции и формирования кости. Это характеризуется возникновением отклонений в уровне биохимических маркеров[24].

Определение биохимических маркеров обмена веществ костной ткани помогает определить многое. Например, оценить общее состояние костной ткани, установить скорость метаболизма в кости, а также определить темпы внезапной потери скелетной массы. Видимо формирование и резорбция кости являются взаимосвязанными процессами. В большинстве случаев маркеры костного обмена отражают изменение в метаболизме скелетных тканей[21].

Биомаркеры костного обмена делятся на две категории: маркеры формирования и маркеры резорбции кости.

Маркеры формирования кости являются продуктами образования многих органических соединений, отражающих активность остеобластов, что позволяет судить о процессе образования новой костной ткани.

При синтезе одного из них - коллагена I типа высвобождается N-терминальный пропептид проколлагена типа I. Под влиянием специальных

ферментов проколлагеновые аминок- и карбокси-концевые пропептиды коллагена I типа отщепляются от соединения проколлагена. Так как пропептиды высвобождаются при синтезе коллагена, их содержание в сыворотке крови показывает начальную фазу формирования костной ткани[24].

Другое вещество – остеокальцин, высвобождается как в процессе образования кости, так и резорбции и является особым неколлагеновым белком костного матрикса. Он участвует в процессе соединения кальция и гидроксиапатита с коллагеном, а также показывает минерализацию образованного коллагена I типа. Так как остеокальцин поступает в кровь не только во время формирования скелетной ткани, но и в составе костного матрикса и выходит при повышении резорбции ткани, то он не считается однозначным маркером формирования кости[19].

Большинство маркеров резорбции кости – это разнообразные части коллагена I типа, а также неколлагеновые белки. Эти соединения попадают в кровоток из места резорбции костного матрикса. Данные маркеры без затруднений можно зафиксировать в моче или в сыворотке крови. Основными биохимическими показателями, которые используют в клинической и диагностической медицине в качестве критерия резорбции костной ткани, являются пиридиновые сшивки коллагена, продукты деградации коллагена I, гидроксипролин мочи. Так как последний присутствует также в коже и в других тканях организма, то его оценка скорее неспецифична для оценки резорбции скелетной ткани. Пиридиновые производные обеспечивают прочность и твёрдость костной ткани. Это происходит за счёт ковалентных связей между аминокислотами, входящими в состав полипептидной коллагеновой цепочки [19,21].

В качестве биохимических маркеров метаболизма кости рассматриваются также показатели качества матрикса, такие как: сшивка коллагена I типа, модификации ряда неколлагеновых полипептидов, α - и β -изомеры карбокситерминального пептида коллагена I типа, пентозид.

К молекулярным механизмам относятся молекулярные факторы роста кости, регуляторные белки и многие ферменты, система цитокинов, в частности, фактор некроза опухоли- α . Последний вносит весомый вклад в процесс резорбции костной ткани.

Кроме этого уровни биомаркеров отражают метаболизм костной ткани в целом и не позволяют точно оценить активность процесса в разных местах кости, важность которых изменяется с возрастом, а также при воспалительных процессах и в ответ на терапию. Следовательно, в связи с этим при интерпретации результатов исследований необходимо учитывать клинические данные всей картины, природу, особенность каждого биомаркера[24].

На сегодняшний момент не хватает данных, которые могут доказать важность и необходимость специфического определения биомаркеров костного обмена для установления чёткой схемы регенерации костной ткани.

1.6 Виды костных материалов для регенерации кости

Регенерация костной ткани возможна только на основе тонкого баланса между физиологией и биохимией регенеративных процессов, а также биомеханической стабильностью фиксации места восстановления, которые взаимосвязаны [7].

Среди подходов, которые предложены на настоящий момент для профилактики отсутствия регенерации и других проблемных мест, значимое место занимает использование различных трансплантатов, синтетических костных материалов и костных морфогенетических белков, хотя костнозамещающие материалы используются для восполнения объема и регенерации костной ткани, потерянной в результате какого-либо воспалительного процесса [3,4].

В соответствии с их происхождением все существующие в настоящий момент виды костных материалов и заменителей кости можно разделить на такие группы:

- аутогенные трансплантаты – собственная костная ткань пациента, которая взята из донорских мест внутри ротовой полости, либо подвздошной кости;
- аллогенные имплантаты (аллоимплантаты) – донорская, либо трупная костная ткань;
- аллопластические материалы – синтетические материалы, которые состоят в основном из фосфата кальция.
- ксеногенные имплантаты (ксеноимплантаты) – материалы животного происхождения, чаще всего из бычьей кости [5].

Обсуждая подробнее ксеногенный материал можно отметить, что кость животных почти идентична кости человека. Это позволяет часто использовать их в медицинской практике. Ксеногенный материал сначала подвергают специальной обработке и деантигенизации. Это позволяет исключить из её состава все факторы, провоцирующие развитие иммунологической и аллергической реакции. В зависимости от способа обработки различают ксеногенные материалы с низкотемпературной обработкой, ксеноматериалы с высокотемпературной обработкой и ксеногенные материалы на основе ферментных технологий. Помимо этого, выделяют два основных метода деантигенизации. Самый популярный и исследованный – термическая обработка при повышенной температуре (около 900-1300 С°), после которой вся органика испаряется. За счет синхронности процессов разрушения и регенерации костной ткани возникает физиологическое замещение «неродных» костных гранул натуральной костью, без утраты объема [4,8,38].

Существуют главные характеристики, которые должен проявлять любой костнозамещающий материал, чтобы считаться работоспособным:

1. **Остеоинтеграция** – способность к химическому соединению с костной стенкой дефекта или с поверхностью имплантата без вмешательства соединительной ткани;

2. **Остеокондуктивность** – способность вызывать формирование и рост костной ткани на своей поверхности (на поверхности имплантата);
3. **Остеоиндуктивность** – способность осуществлять дифференцирование мезенхимных клеток из окружающих тканей для образования молодых клеток костной ткани;
4. **Остеогенез** – способность образования молодыми костными клетками новой костной матрицы в присутствии внедренного материала [5].

На сегодняшний день благодаря прогрессирующему развитию костнозамещающих материалов доступна надежная и безопасная альтернатива использованию разных трансплантатов. У врачей существует возможность выбора разных костнозамещающих материалов и техник их применения. Способность имплантатов способствовать заживлению зависит от всех вышеперечисленных свойств. Помимо них, выделяют синтетические остеокондуктивные материалы, которые широко используются в ортопедической практике. Эта группа включает гидроксиапатит, коралловый гидроксиапатит, цементы состава CaSO_4 или $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, коллагеновые материалы и другие [3,7].

1.7 Перспективы создания и проблема биосовместимости имплантатов с костной тканью

При создании идеальных биосовместимых имплантатов важное значение имеет организация материала. Всё новые и новые горизонты открываются при использовании материалов последних достижений генной и клеточной инженерии. Уже не считается фантастичным «заселять» клеточными культурами имплантируемый биоматериал (например, при замене костной ткани, являющийся довольно пористой структурой). Важно создавать такие композиции, чтобы биоматериал в среде организма постепенно растворялся (деградировал), а клетки строили бы на его основе естественную биологическую костную ткань [5,8,52].

Стволовым клеткам в этом процессе отводят особую роль, так как они могут потенциально восстановить любые поврежденные клетки и ткани. В этом случае также чрезвычайно важна организация биоматериала, позволяющая искусственному объекту, с одной стороны, быть достаточно «дружественным» к стволовой клетке, а с другой стороны, быстро деградировать в организме и не задерживаться в нём [3,38].

Удача и успех именно в области создания биоматериалов открывает дорогу к увеличению продолжительности жизни человека. Грамотность медицинских изделий заключается в необходимости обеспечения сохранности здоровья человека при их применении, поэтому к безопасности внедряемых объектов предъявляются особые требования. Безопасность изделия определяется на стадии доклинических исследований. Под ней понимают отсутствие отрицательного воздействия имплантируемого материала на контактирующие с ним ткани и органы. Также важно представлять факторы потенциального риска от применения медицинского изделия [2,7].

С биохимической точки зрения возможны несколько вариантов степени биосовместимости имплантата и костной ткани. В любых случаях имплантация, как хирургическое вмешательство, сопровождается определенными морфологическими изменениями. Помимо реакции на сами имплантаты, проблему можно заметить на стадии реакции организма на биоматериалы, используемые при выполнении дополнительных костно-пластических операций. Искусственные изделия применяют в виде порошков, гранул, трансплантатов или мембран. Во всех случаях главным условием успеха лечения является приживание имплантируемого и трансплантируемого материала. Самое главное: материал не должен вызывать общей или местной реакции организма и быть токсичным, канцерогенным, аллергенным и радиоактивным. При создании изделия для имплантации или дополнительных операций следует основываться на глубоком понимании того, как он будет действовать в биологической среде организма [6,29,47].

Имплантат для замещения костной ткани обладает биосовместимостью по своей сущности, но не обладает антимикробной активностью, не препятствует размножению патологических микроорганизмов в месте имплантации. Патогенные микроорганизмы проникают в место имплантации через кровоток, могут быть занесены извне или могут находиться в очаге воспаления. Бактерии могут приводить к осложнениям, например, таким как остеомиелит. Обеспечение специальных условий для остеоинтеграции биоимплантатов во многом предсказывает их стабильность и успешность при лечении костных заболеваний. Остеоинтеграция зависит от множества различных факторов, таких как: возраст пациента, анатомическое место, вид скелетной ткани, в которую имплантируется материал, площадь контакта имплантата с прилежащей костью и мягкими тканями, выраженность молекулярных реакций организма на чужеродный объект, хирургическая техника установки имплантата и многое другое. Таким образом решающее значение имеет выбор оптимального имплантата для успеха процесса остеоинтеграции. Размер биоматериала, его форма, состав, особенности конструктивного решения во многом предсказывают характер остеоинтегративных процессов в зоне имплантации [9,30,48].

Таким образом, проблема разработки имплантатов структурно-идентичных естественной кости, обладающих остеогенными характеристиками, позволяющих одномоментно заместить дефект кости, способствовать росту костной ткани и препятствовать развитию инфекционных процессов является актуальной для современной медицинской науки [2].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Материалы исследования

Ксеногенные костные блоки относятся к биосовместимым материалам и используются в роли остеозамещающих средств для заполнения дефектов костной ткани, так как повышают остеоинтеграцию и стимулируют восстановительные процессы костеобразования [14].

Объектом данного исследования являлись модифицированные костные блоки с антибактериальным лекарственным покрытием.

Для изготовления блоков (ООО «Кардиоплант») использовали костную ткань крупного рогатого скота, возрастом 6 месяцев, с соблюдением указаний ГОСТ Р ИСО 22442-1-2011. Обработку материала проводили по запатентованной технологии (ТУ 9391-006-99509105-2014; РУ №РЗН 2015/3086). Из губчатой кости вырезали блоки размером 20 x 15 x 5 мм, очищенные от сухожилий и мягких тканей с помощью ножа. Полученные фрагменты промывали проточной водой на протяжении 2-3 мин., обрабатывали в растворе хлорида натрия в течение 12 часов, ультразвуковой ванне в растворе 0,1% перекиси водорода в течение 2-х суток. После каждого этапа блоки промывали водой, подсушивали на фильтровальной бумаге в течение 3-4 часов в специальной таре. Костные блоки взвешивали, а далее подвергали глубинной очистке путем сверхкритической флюидной экстракции с использованием CO₂. Подобная технология очистки сырья позволила удалить из костного материала антигены. Механические свойства нативной костной ткани не нарушились [58,59].

Далее костные блоки модифицировали путем нанесения АБП на поверхность с целью снижения риска развития инфекционных осложнений после имплантации. В качестве лекарственных веществ были выбраны препараты широкого спектра действия. Одно ЛП представляло собой комбинацию АБП ванкомицина с полимером PLA, другое ЛП - комбинацию меропенема с полимером PLA. Полимеры в составе ЛП позволяют

дозированно вводить АБП и контролировать, с какой скоростью и в какое место доставляются лекарственные средства [9,13,23].

Для проведения исследований были изготовлены три группы образцов:

Группа 1 - ксеногенные костные блоки 20 x 15 x 5 (контроль).

Группа 2 – ксеногенные костные блоки 20 x 15 x 5 мм с ванкомицином в PLA. Для получения экспериментальных образцов группы 2 раствор ванкомицина (10 мг/мл) в 1% PLA наносили на каждый блок с помощью дозатора [23].

Группа 3 – ксеногенные костные блоки 20 x 15 x 5 мм с меропенемом в PLA. Для получения экспериментальных образцов группы 3 раствор меропенема (10 мг/мл) в 1% PLA наносили на каждый костный блок с помощью дозатора.

2.2 Методы исследования

2.2.1 Оценка антибактериального действия лекарственного покрытия

Метод определения антибактериального действия ЛП костных блоков базируется на исследовании способности подавлять рост микроорганизмов. В качестве тестовой культуры бактерий выбрали клинический штамм *Staphylococcus aureus*. Частота встречаемости *Staphylococcus aureus* у пациентов с инфекционными осложнениями после оперативного лечения костных патологий достаточно высока. В Российских учреждениях, где активно используют разные АБП, частота выделения *S. aureus* составляет 81% среди всех грамположительных возбудителей инфекционных осложнений.

В исследовании выбранный штамм культивировали на мясопептонном агаре при температуре 37°C в течение 19-20 часов. Перед использованием культуры убеждались в её чистоте, то есть отсутствии посторонних штаммов микроорганизмов. Для этого выросшие на чашке Петри колонии рассматривали, оценивали однородность и морфологию клеток, проводили микроскопию мазков, окрашенных по Граму, убеждались, что вырос только нужный штамм. Рабочую клеточную суспензию готовили смывая биомассу

стерильным 0,9% раствором хлорида натрия. Полученную микробную взвесь стандартизировали с помощью денситометра «Densimat» («bioMerieux», Франция). В опытах использовали взвеси бактерий двух концентраций: 1×10^8 кл/мл и 1×10^5 кл/мл.

Для проведения исследования образцы костной ткани помещали в контейнер с рабочей клеточной суспензией так, чтобы каждый блок был максимально погружён в жидкость (5 мл). Далее оставляли в термостате при температуре 37 °C на 15 мин (первая серия опытов) или на 60 мин (вторая серия опытов). Затем удаляли лишнюю жидкость стерильной фильтровальной бумагой и перемещали костные блоки на поверхность кровяного агара (КА) и делали мазки-отпечатки с двух сторон каждого блока. В это же время проводили высев на питательную среду (КА) рабочей клеточной суспензии из контейнера, в котором находился блок.

Посевы инкубировали в термостате при температуре 37°C в течение 18-24 часов. Результаты оценивали по наличию или отсутствию роста бактериальной культуры на поверхности КА в чашке Петри [11,59].

2.2.2 Исследование цитотоксического действия лекарственного покрытия

Цель исследования – сравнение цитосовместимости исследуемых ксеногенных костных материалов с антибактериальным лекарственным покрытием с человеческими мезенхимальными стромальными клетками (МСК) костного мозга [9].

Аспират человеческого костного мозга разводили в одинаковых концентрациях с раствором Хенкса и проводили центрифугирование при 900 об/мин., в течение 25 минут. Подобные действия повторяли несколько раз. Осадок, содержащий моноциты и макрофаги, ресуспендировали в питательной среде эмбриональной телячьей сыворотки и переносили в специальную посуду. Далее клетки инкубировали в течении 2 суток при 37°C в условиях содержания CO₂. Смену среды осуществляли в течение 2-3 дней.

Клетки культивировали до достижения 75-85% клеточной конфлюэнтности, распределяли в чашки Петри. Для прямого воздействия исследуемые костные образцы погружали в полученную клеточную суспензию. Равномерно распределяли костные блоки в клеточной суспензии, осторожно вращая чашку Петри [10,60].

Определение количества живых и погибших клеток вокруг костных блоков проводили с помощью окрашивания клеток флуоресцентными красителями. Клетки открепляли от поверхности костных образцов, затем проводили их окрашивание в среде с эмбриональной телячьей сывороткой, содержащей флуоресцентные красители, в течение 30 минут при 37°C. Анализ живых и погибших клеток осуществляли с помощью проточного прибора - цитометра EPICS XL (Beckman Coulter, USA) [60].

Число митотических клеток определяли с помощью флуоресцентной микроскопии. Использовали прижизненное окрашивание флуоресцентным ядерным красителем. Клетки выявляли по распределению хроматина, характерному для фаз митоза с помощью флуоресцентного микроскопа DM 6000 (Leica, Германия). Для анализа подсчитывали не менее 400-500 клеток. Митотический индекс вычисляли по формуле [60,63].

Динамику численности клеток, культивируемых биоматериалах, определяли по прямому подсчету числа открепленных клеток с поверхности костных образцов. Далее ресуспендировали в питательной среде с эмбриональной телячьей сывороткой. Далее клетки окрашивали и проводили подсчёт количества клеток с помощью автоматического счетчика клеток Countess (Invitrogen, США) [11,60].

Опыты проводили в трех повторах ($n \geq 3$). В исследовании участвовали экспериментальные группы костных блоков (группа 2 и группа 3). В качестве контроля использовались костные блоки без химического носителя производителя ООО «Кардиоплант».

2.2.3 Определение биохимических и гематологических параметров крови

Исследование биохимических и гематологических параметров крови лабораторных животных на разных сроках после имплантации образцов проводили с целью определения возможного токсического эффекта антибактериального покрытия на организм животного [16].

Животных в эксперименте содержали, руководствуясь ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009 «Положения об охране животных». Имплантация проводилась мелким лабораторным животным в соответствии с положениями ГОСТ Р ИСО 10993-2-2015. Учитывались размеры имплантируемых ксеногенных образцов, длительность проведения эксперимента, а также потенциально возможные различия биологической реакции тканей на имплантацию костного материала.

Экспериментальная часть работы выполнена на белых беспородных крысах-самцах, массой 300 ± 10 г, которые были разделены на три группы: контрольная, экспериментальная и интактная. В каждой серии эксперимента принимало участие не менее шести животных. В интактной группе крысы не подвергались хирургическому вмешательству, в экспериментальной группе крысы подверглась оперативному вмешательству с имплантацией костного образца с АБП покрытием, в контрольной группе крысы подверглись операции без имплантации ксеногенного материала.

Для исследования воздействия костных имплантатов на близлежащие ткани и организм животного в целом, были изучены имплантационные периоды: 1-4 недели после операции.

Перед началом операции у крыс удаляли шерсть с необходимого участка. Имплантацию проводили под ингаляционным наркозом с использованием «Золетила» и «Рометара» в стерильных условиях. Перед внедрением в организм животных образца, зону кожи в месте будущего разреза обеззараживали 0,05 % раствором хлоргексидина и проводили антисептическую обработку стерильными салфетками. Оперативные доступы каждому животному создавали в области лопаточной кости с установкой ксеногенного костного материала. Делали разрезы кожи длиной 1,5-2 см в

нижней части подостной ямки лопаточной кости. Скелетировали мышцы, прикрепляющиеся к подостной ямке лопаточной кости в направлении ости. Образовывали костное ложе в области ости под углом 30° к поверхности подостной ямки. В костное ложе имплантировали раздробленный ксеногенный образец и послойно ушивали послеоперационную рану. Данный способ обеспечил минимальную травматичность при создании раны, не нарушал целостности мышц, прикрепляющихся к лопатке, обеспечил достаточное внедрение имплантата. Это обеспечило анатомическую целостность, при этом создавались подходящие условия для последующей оценки остеоинтеграции имплантируемых ксеногенных материалов. Послеоперационный хирургический разрез зашивали биоразлагаемой нитью кетгута, накладывали простые узелковые хирургические швы. Рану обрабатывали антисептическим средством и закрывали медицинским клеем. После пробуждения крысы не проявляли признаков дискомфорта. На этапе остеоинтеграции животных выводили из эксперимента [11,17,18].

С 1 по 4 неделю у крыс проводили забор крови в одно и то же время, натошак. В эксперименте использовали венозную кровь, которую отбирали из хвостовой вены в чистую пробирку. Для приготовления плазмы крови предварительно в пробирку добавлялся антикоагулянт, затем центрифугировали около 10-15 мин. при 3000 об/мин. Полученная плазма переносилась в новые пробирки, которые загружали в анализатор. Плазму использовали для определения биохимических показателей [10,63].

Оценивали следующие показатели:

1. Общий белок;
2. Альбумин;
3. Аминотрансферазы (АСТ и АЛТ);
4. Лактатдегидрогеназа;
6. Креатинкиназа;
5. Щелочная фосфатаза.

Местное действие материала после имплантации исследовали, руководствуясь ГОСТ Р ИСО 10993-6-2009 «Исследование местного действия после имплантации» [61].

Макроскопическое исследование экспериментальных животных включало в себя визуальный осмотр и прослеживание динамики клинических изменений на протяжении всего периода эксперимента. У животных визуально оценивали степень воспаления, выявляли признаки некроза и отторжения [62].

Определение активности ферментов, а также концентрации общего белка и альбумина в плазме венозной крови крыс исследовали с помощью биохимических наборов «Ольвекс-Диагностикум» [18].

Определение ферментативной активности АСТ и АЛТ основано на измерении произведения разности оптических плотностей опытной и калибровочной проб на коэффициент, рассчитанный по калибровочному графику. Оптическую плотность проб измеряли фотометрически при длине волны 500-560 нм [15,65].

Определение фермента ЛДГ заключается в окислении ПВК до молочной кислоты. В случае повреждения клетки происходит его активное высвобождение в кровь. Активность ЛДГ определяется фотометрически на длине волны 340 нм (с учётом произведения среднего значения ослабления света) [51].

Определение ферментативной активности ЩФ основано на образовании р-нитрофенола в щелочной среде. Активность фермента повышается при целом ряде осложнений, сопровождающихся повреждением многих тканей. Определяется ЩФ фотометрически при длине волны 405 нм [55].

Измерение концентрации общего белка проводилось с помощью биуретового метода в сыворотке венозной крови крыс. Отклонение уровня общего белка крови от нормы может быть вызвано патологическими процессами и рядом физиологических состояний. Таким образом общий белок фотометрически измеряется на длине волны 540 нм [10].

Измерение концентрации альбумина проводили колориметрическим методом с использованием бромкрезолового зелёного. Количество альбумина в крови позволяет определить, наступает ли улучшение после операции или возникают осложнения. Оптические плотности определяли фотометрически при длине волны 630 нм [15].

Креатинкиназа катализирует процесс фосфорилирования в присутствии креатинфосфата. Поступление фермента в кровоток в больших количествах происходит при повреждении содержащих её клеток. Ферментативная активность определяется по скорости образования НАДН. Его оптическую плотность измеряют при 340 нм [55].

Гематологическое исследование осуществляли с помощью анализатора BC-2800 Vet Auto Hematology Analyzer (Mindray, Китай). Плазму крови получали центрифугированием крови в течение 10-15 мин при 3000 об/мин.

При расчёте лейкоцитарной формулы учитывали соотношения в крови разных типов лейкоцитов и полученные цифры сверяли с данными, приведенными в таблице [1].

Таблица 1

Лейкоцитарная формула белых беспородных крыс, %

Базофилы	Эозинофилы	Нейтрофилы	Лимфоциты	Моноциты
0-2	1-4	30-35	55-75	3-8

2.2.4 Методы статистической обработки результатов

Для оценки полученных исследовательских данных были применены методы проверки статистических гипотез, методы статистического описания, использующиеся в стандартных пакетах программы Statistica 6.0.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

3.1 Результаты исследования антибактериального действия лекарственного покрытия костных блоков

В таблицах 2-7 представлены результаты исследований первой серии опытов экспериментальных образцов ксеногенных костных блоках, в которых блоки А, В, Д – содержат меропенем, блоки Б, Г, Е – не содержат меропенем, Ж, К, М – содержат ванкомицин, З, Л, Н – не содержат ванкомицин.

Таблица 2

Бактерицидная активность образца группы 1, импрегнированного меропенемом, при погружении в суспензию *S. aureus* 20 минут

Концентрация	Бактерицидное действие блоков группы 1			
	Блок А		Блок Б	
<i>S. aureus</i>	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
$1 \cdot 10^5$ кл/мл	Роста нет	Роста нет	Рост есть	Рост есть

Таблица 3

Бактерицидная активность образца группы 2, импрегнированного меропенемом, при погружении в суспензию *S. aureus* 20 минут

Концентрация	Бактерицидное действие блоков группы 2			
	Блок В		Блок Г	
<i>S. aureus</i>	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
$1 \cdot 10^5$ кл/мл	Роста нет	Роста нет	Рост есть	Рост есть

Таблица 4

Бактерицидная активность образца группы 3, импрегнированного меропенемом, при погружении в суспензию *S. aureus* 20 минут

Концентрация	Бактерицидное действие блоков группы 3			
	Блок Д		Блок Е	
<i>S. aureus</i>	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
$1 \cdot 10^5$ кл/мл	Роста нет	Роста нет	Рост есть	Рост есть

Таблица 5

Бактерицидная активность образца группы 4, импрегнированного ванкомицином, при погружении в суспензию *S. aureus* 20 минут

Концентрация	Бактерицидное действие блоков группы 4			
	Блок Ж		Блок Е	
<i>S. aureus</i>	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
$1 \cdot 10^5$ кл/мл	Роста нет	Роста нет	Рост есть	Рост есть

Таблица 6

Бактерицидная активность образца группы 5, импрегнированного ванкомицином, при погружении в суспензию *S. aureus* 20 минут

Концентрация	Бактерицидное действие блоков группы 5			
	Блок К		Блок Л	
<i>S. aureus</i>	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
$1 \cdot 10^5$ кл/мл	Роста нет	Роста нет	Рост есть	Рост есть

Таблица 7

Бактерицидная активность образца группы 6, импрегнированного ванкомицином, при погружении в суспензию *S. aureus* 20 минут

Концентрация	Бактерицидное действие блоков группы 6			
	Блок М		Блок Н	
<i>S. aureus</i>	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
$1 \cdot 10^5$ кл/мл	Роста нет	Роста нет	Рост есть	Рост есть

В первой серии опытов в бактериологических посевах с ксеногенных костных блоков, пропитанных исследуемыми антибиотиками, рост бактерий отсутствовал. В аналогичных посевах с блоков без антимикробного покрытия под микроскопом наблюдали сплошной бактериальный рост – грамположительные кокки с характерной морфологией стафилококков (окрашивали по Грамму).

В таблице 8-13 представлены результаты исследований второй серии опытов экспериментальных образцов ксеногенных костных блоков, в которых блоки А, В, Д – покрыты меропенемом, а блоки Б, Г, Е – не содержат меропенем.

Таблица 8

Бактерицидная активность образца группы 1, импрегнированного меропенемом, при смешении с суспензией *S. aureus* 60 минут

Концентрация	Бактерицидное действие блоков группы 1			
	Блок А		Блок Б	
<i>S. aureus</i>	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
$1 \cdot 10^5$ кл/мл	Роста нет	Роста есть	Рост есть	Рост есть
$1 \cdot 10^8$ кл/мл	Рост есть	Рост есть	Рост есть	Рост есть

Таблица 9

Бактерицидная активность образца группы 2, импрегнированного меропенемом, при смешении с суспензией *S. aureus* 60 минут

Концентрация	Бактерицидное действие блоков группы 2			
	Блок В		Блок Г	
<i>S. aureus</i>	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
$1 \cdot 10^5$ кл/мл	Роста нет	Роста есть	Рост есть	Рост есть
$1 \cdot 10^8$ кл/мл	Рост есть	Рост есть	Рост есть	Рост есть

Таблица 10

Бактерицидная активность образца группы 3, импрегнированного меропенемом, при смешении с суспензией *S. aureus* 60 минут

Концентрация	Бактерицидное действие блоков группы 3			
	Блок Д		Блок Е	
<i>S. aureus</i>	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
$1 \cdot 10^5$ кл/мл	Роста нет	Роста есть	Рост есть	Рост есть
$1 \cdot 10^8$ кл/мл	Рост есть	Рост есть	Рост есть	Рост есть

Таблица 11

Бактерицидная активность образца группы 4, импрегнированного ванкомицином, при смешении с суспензией *S. aureus* 60 минут

Концентрация	Бактерицидное действие блоков группы 4			
	Блок Ж		Блок З	
<i>S. aureus</i>	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
$1 \cdot 10^5$ кл/мл	Роста нет	Роста есть	Рост есть	Рост есть
$1 \cdot 10^8$ кл/мл	Рост есть	Рост есть	Рост есть	Рост есть

Таблица 12

Бактерицидная активность образца группы 5, импрегнированного ванкомицином, при смешении с суспензией *S. aureus* 60 минут

Концентрация	Бактерицидное действие блоков группы 5			
	Блок К		Блок Л	
<i>S. aureus</i>	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
$1 \cdot 10^5$ кл/мл	Роста нет	Роста есть	Рост есть	Рост есть
$1 \cdot 10^8$ кл/мл	Рост есть	Рост есть	Рост есть	Рост есть

Таблица 13

Бактерицидная активность образца группы 6, импрегнированного ванкомицином, при смешении с суспензией *S. aureus* 60 минут

Концентрация	Бактерицидное действие блоков группы 6			
	Блок М		Блок Н	
<i>S. aureus</i>	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА	Мазок-отпечаток на КА	Высев суспензии на КА
$1 \cdot 10^5$ кл/мл	Роста нет	Роста есть	Рост есть	Рост есть
$1 \cdot 10^8$ кл/мл	Рост есть	Рост есть	Рост есть	Рост есть

Во второй серии опыта во всех группах в результате помещения костных образцов в суспензию, содержащую 10^5 микробных клеток в 1 мл раствора, рост микроорганизмов на чашках Петри с мазками-отпечатками не наблюдался. На чашках с питательной средой, в которые был сделан высев из рабочей суспензии после обработки в ней материала, содержащего разные антибиотики, наблюдался активный рост колоний. После размещения образцов в суспензию, содержащую 10^8 микробных клеток в 1 мл, наблюдали рост *Staphylococcus aureus* как на мазках-отпечатках, так и на чашках с высеvom из рабочей суспензии. Окраска по Граму выросших бактерий и

последующее микроскопическое исследование показали, что во всех случаях это были используемые в эксперименте кокки исследуемого микроорганизма. На мазках-отпечатках костных блоков без АБП и на чашках Петри с питательной средой, на которые был произведен высеv из рабочих суспензий (10^5 и 10^8 кл/мл) наблюдали сплошной рост микроорганизмов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что антибактериальный эффект покрытия протестированных костных блоков, содержащих, в одном случае меропенем, в другом - ванкомицин, присутствует во всех группах образцов костных блоков.

Помимо этого, показана возможность подавления роста *S.aureus* в эксперименте *in vitro*, однако видно, что антибактериальная активность лекарственного покрытия отсутствует при высокой контаминации блоков. Это говорит о том, что бактерицидная активность изделия зависит от окружающей материал концентрации бактерий и от длительности контакта с бактериальной суспензией.

Полученные результаты дают надежды на перспективность дальнейших исследований и возможность внедрения результатов в технологический процесс производства медицинских изделий.

3.2 Результаты исследования цитотоксичности лекарственного покрытия

Изучение цитотоксичности проводили через сутки и 3-е суток после начала культивирования клеток на контрольных и экспериментальных биоматериалах.

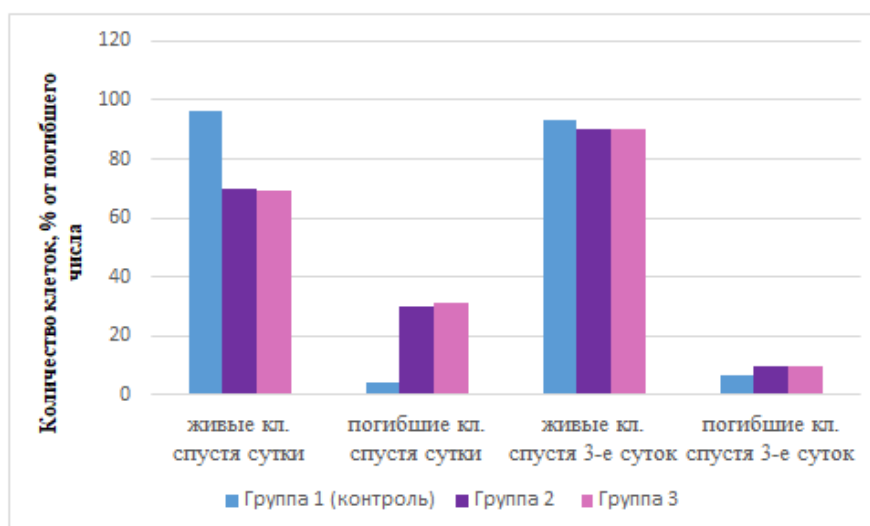


Рис. 2. Цитотоксическое действие экспериментальных костных образцов спустя сутки и 3-е суток культивирования на их поверхности мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека

Представленные на рисунке 2 результаты показывают, что в первые сутки на экспериментальных образцах обеих групп количество погибших клеток было примерно на 20% больше по сравнению с контролем. По-видимому, полученный результат связан с выходом АБП препаратов из лекарственного покрытия. Спустя 3-е суток количество погибших клеток в экспериментальных группах достоверно не отличалось от контрольной группы.

Оценку митотической активности проводили спустя и 3-е суток после начала культивирования клеток на экспериментальных образцах.

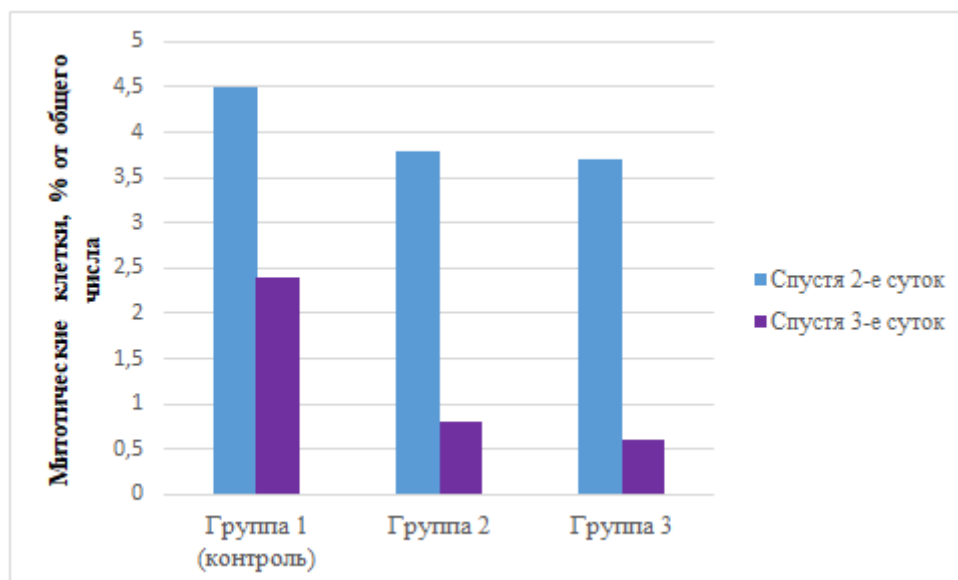


Рис. 3. Митотическая активность мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека спустя 2 и 3 суток культивирования на поверхности экспериментальных костных образцов

Представленные на рисунке 3 данные показывают, что митотическая активность МСК костного мозга человека, культивированных на образцах экспериментальных групп, отличаются от показателей митотической активности тех же типов клеток, культивируемых на образцах контрольной группы из-за нанесения на поверхность антибактериальных препаратов, которые замедляют митотическое деление клеток, но не нарушают клеточный цикл.

Оценку динамики численности популяций МСК проводили путем регистрации количества клеток, выросших на поверхности экспериментальных костных образцов, на протяжении каждых 24 часов в течение 7 суток культивирования.

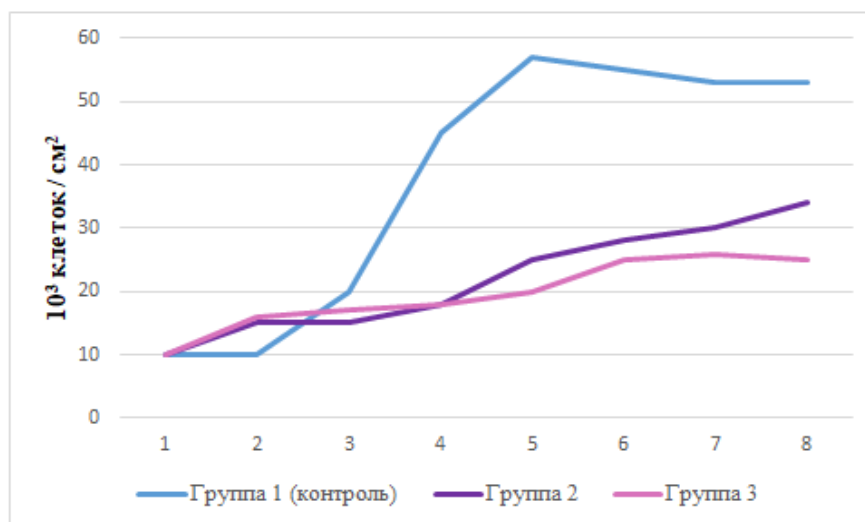


Рис. 4. Кривые роста мезенхимальных стромальных клеток костного мозга человека культивируемых на поверхности экспериментальных костных образцов

Представленные на рисунке 4 данные свидетельствуют о том, что при культивировании МСК на контрольных и экспериментальных образцах наблюдается прирост клеток. Для культуры, культивируемой на контрольных образцах прирост выше по сравнению с экспериментальными группами.

Таким образом, экспериментальные образцы не обладают выраженной цитотоксичностью, митотическая активность и прирост количества МСК человека при культивировании на поверхности экспериментальных образцов снижены в сравнении с контролем. Представленные результаты дают основание рекомендовать ксеногенные костные блоки экспериментальных групп для дальнейших испытаний на биологических объектах, в частности на животных.

3.3 Результаты исследования биохимических и гематологических параметров крови

Признаки инфицирования, асептического или гнойного воспаления, некроза и отторжения ксеногенных костных имплантатов на протяжении всего времени эксперимента в исследуемых группах не обнаружены. В обеих

группах животных (экспериментальной и контрольной) на протяжении всего периода наблюдения при оценке макроскопической картины области послеоперационной раны не наблюдали проявления хронического воспаления и других местных осложнений.

В ходе исследования были изучены биохимические показатели сыворотки венозной крови крыс, полученной из хвостовой вены, после хирургического вмешательства. Исследовалось влияние ЛП на организм крыс и темп восстановления показателей крови до дооперационных значений. Физиологические значения биохимических параметров плазмы крови крыс представлены в таблице 14.

Таблица 14

Физиологические значения исследуемых биохимических показателей
плазмы крови беспородных белых крыс

Биохимия крови	Единицы измерения	Норма
Общий белок	г/л	69-71
Альбумин	г/л	32-38
АЛП	ЕД/л	67-69
АСТ	ЕД/л	69-74
ЛДГ	ЕД/л	349-357
Креатинкиназа	ЕД/л	162-220
ЩФ	ЕД/л	322-342

Состояние крыс до хирургического вмешательства определяли визуально. Также у всех исследуемых животных изучались биохимические параметры плазмы крови, полученные значения соответствовали физиологической норме. Это свидетельствовало о нормальном состоянии животных на момент имплантации образцов с ЛП [1].

На рисунке 5 представлены результаты измерения концентрации общего белка в плазме венозной крови крыс интактной, экспериментальной и контрольной групп на протяжении 1-4 недель.

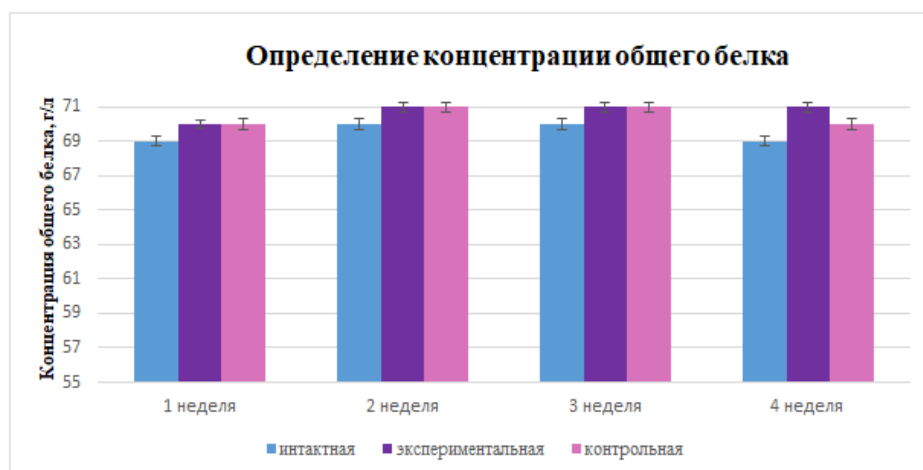


Рис. 5. Концентрация общего белка в плазме крови крыс через 1-4 недели после имплантации (г/л, $M \pm m$, $n=6$)

У интактной группы концентрация общего белка соответствует физиологическим значениям. Изменения в концентрации общего белка после 1-4 недель имплантации в экспериментальной и контрольных группах относительно интактной практически не наблюдаются и находятся в пределах физиологической нормы.

Общий белок плазмы крови объединяет в себя большую группу белков, функционирующих в костной ткани. Основными причинами незначительной разницы общего белка, возможно, являются изменения объема воды в плазме. Это, вероятно, вызвано недостаточным потреблением воды (результат является следствием хирургического вмешательства и обезвоживания после наркоза).

На рисунке 6 представлены результаты измерения концентрации альбумина в плазме крови крыс интактной, экспериментальной и контрольной групп по истечении 1-4 недель.

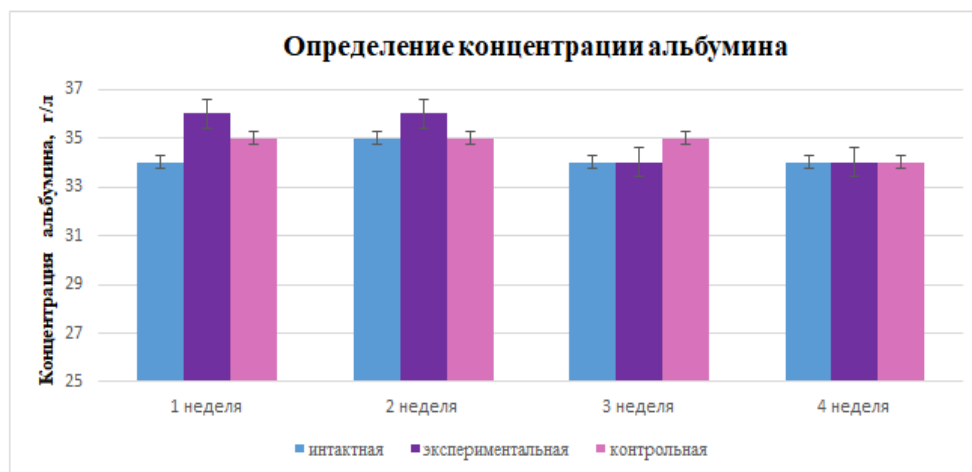


Рис. 6. Концентрация альбумина в плазме крови крыс через 1-4 недели после имплантации (г/л, $M \pm m$, $n=6$)

У интактной группы концентрация альбумина соответствует физиологическим значениям. Изменения в концентрации альбумина после 1-4 недель имплантации в экспериментальной и контрольных группах относительно интактной практически не наблюдаются и находятся в пределах физиологической нормы.

Незначительная разница, вероятно, является результатом оперативного повреждения кожных и скелетных тканей, и может свидетельствовать о ускорении катаболизма в результате воспаления в ответ на оперативное вмешательство, что является нормальным в ранний послеоперационный период.

На рисунке 7 представлены результаты измерения активности АЛТ в плазме крови крыс интактной, экспериментальной и контрольной групп по истечении 1-4 недель.

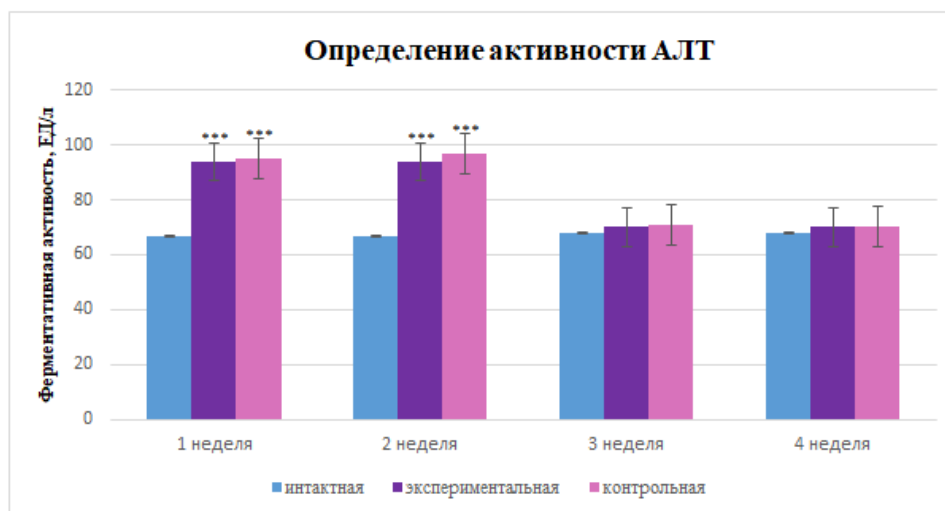


Рис.7. Определение активности АЛТ в плазме крови крыс через 1-4 недели после имплантации (ЕД/л, $M \pm m$, $n=6$. Здесь*** - $p<0,005$ относительно интактной группы)

У интактной группы параметры активности АЛТ соответствуют физиологическим значениям. На первой и второй неделе после операции обнаружено повышение активности АЛТ в экспериментальной группе относительно интактной на 40%, увеличение активности в контрольной группе относительно интактной на 44-45%. К третьей неделе значения ферментативной активности экспериментальной и контрольной группы уже практически не отличаются от интактной.

Фермент АЛТ преимущественно локализован во многих тканях, но в наивысшей концентрации определяется в печени и почках. Их повреждение приводит к увеличению концентрации АЛТ в сыворотке крови. Полученные данные могут свидетельствовать о стрессовом для организма оперативном воздействии и при травмах мышц, а причинами изменений биохимических параметров – ускоренный катаболизм глюкокортикоидов, оказывающих влияние на морфологию и функциональную активность клеток печени – гепатоцитов [28].

На рисунке 8 представлены результаты определения активности АСТ в плазме крови крыс интактной, экспериментальной и контрольной групп по истечении 1-4 недель.

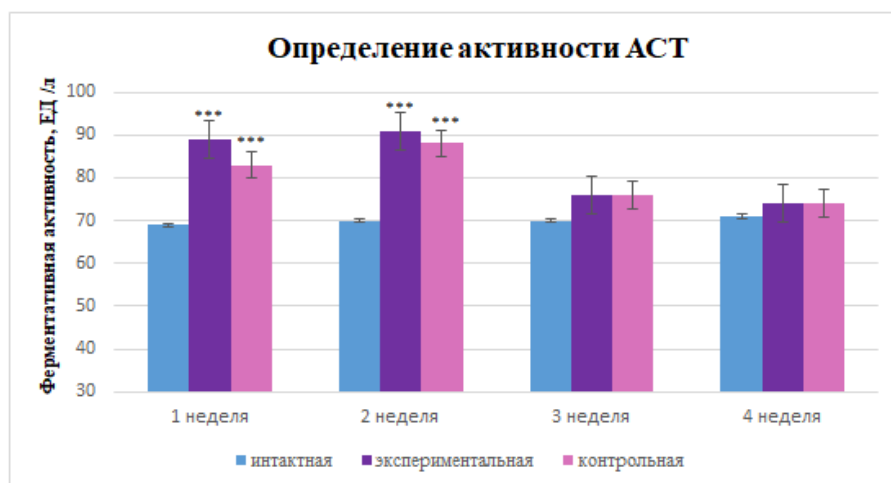


Рис. 8. Определение активности АСТ в плазме крови крыс через 1-4 недели после имплантации (ЕД/л, $M \pm m$, $n=6$. Здесь*** - $p<0,005$ относительно интактной группы)

У интактной группы показатели активности АСТ соответствуют нормальным значениям. Через неделю и 2 недели после хирургического вмешательства наблюдается увеличение активности фермента на 25-27 % в контрольной группе относительно интактной и на 30 % в экспериментальной группе относительно интактной. Значительных отличий в ферментативной активности экспериментальной и контрольной групп не обнаружено. Через 3 недели после операции активность фермента в контрольной и экспериментальной группах соответствовало физиологическим значениям.

АСТ в большой концентрации находится в сердечной мышце, но также присутствует в высоких концентрациях в печени, скелетной мускулатуре, почках и поджелудочной железе. В операционных исследованиях, приводящих к легкой травме мышц, может отмечаться повышение активности АСТ (как в данном случае). Возможно, это является следствием применения наркоза и проведения операции, о чем также свидетельствует возвращение к норме значений параметра [28].

На рисунке 9 представлены результаты определения активности ЛДГ в плазме крови крыс интактной, экспериментальной и контрольной групп по истечении 1-4 недель.

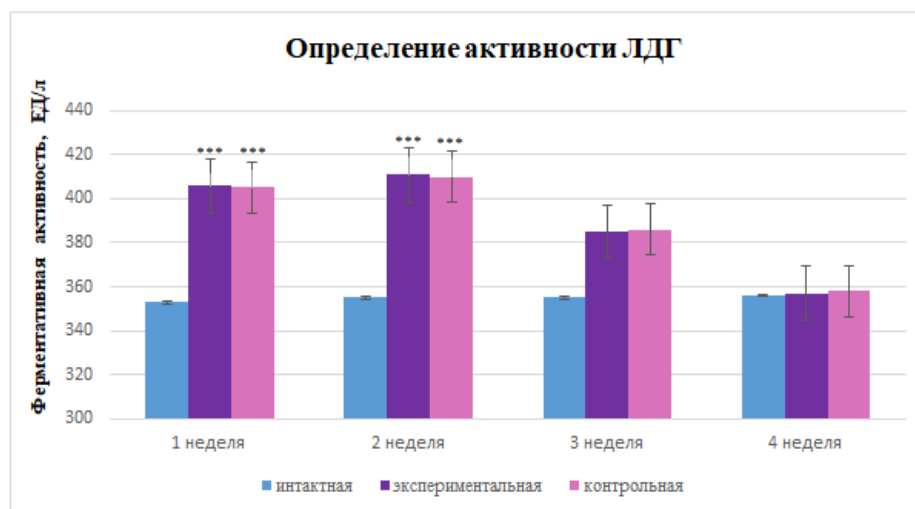


Рис. 9. Определение активности ЛДГ в плазме крови крыс через 1-4 недели после имплантации (ЕД/л, $M \pm m$, $n=6$. Здесь*** - $p<0,005$ относительно интактной группы)

Через 1-2 недели после имплантации отмечено увеличение активности ЛДГ в экспериментальной группе относительно интактной и в контрольной группе относительно интактной на 31%. К 3 неделе после имплантации значительных отличий между группами не обнаружено.

Фермент ЛДГ присутствует почти во всех клетках тела, но в наиболее высоких концентрациях находится в печени, сердце, почках, скелетной мышце и эритроцитах, следовательно, не имеет большого значения для дифференциальной диагностики заболеваний внутренних органов. Активность ЛДГ значительно повышается при различных хирургических вмешательствах, сопровождающихся шоковым и стрессовым состоянием для организма животного.

На рисунке 10 представлены результаты определения активности КК в плазме крови крыс интактной, экспериментальной и контрольной групп по истечении 1-4 недель.

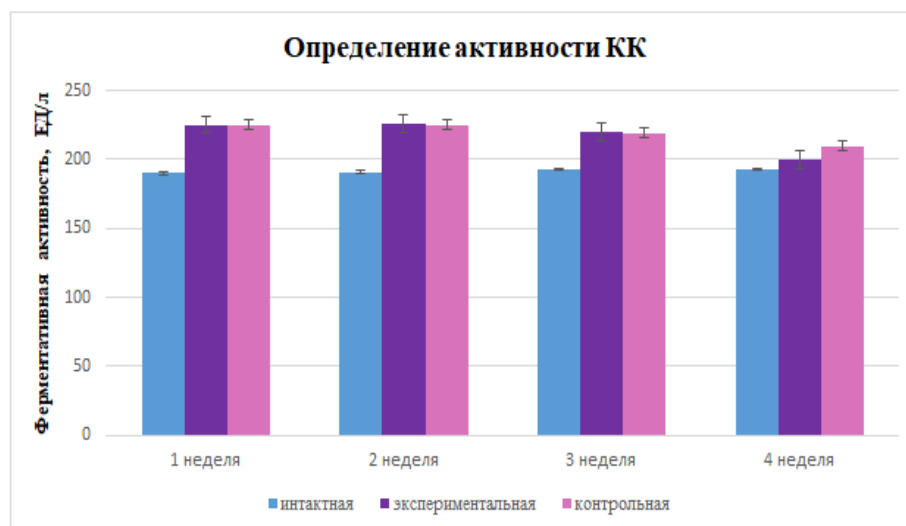


Рис.10. Определение активности КК в плазме крови крыс через 1-4 недели после имплантации (ЕД/л, $M \pm m$, $n=6$)

У интактной группы показатели активности КК соответствуют физиологическим значениям. Активность фермента в экспериментальной и контрольной групп находятся в пределах физиологической нормы. Незначительное повышение активности в крови КК через 1-2 недели после имплантации ксеноматериала может быть следствием хирургического вмешательства в лопатку, а также действия АБП, импрегнированного в раздробленный костный материал.

На рисунке 11 представлены результаты определения активности ЩФ в плазме крови крыс интактной, экспериментальной и контрольной групп по истечении 1-4 недель.

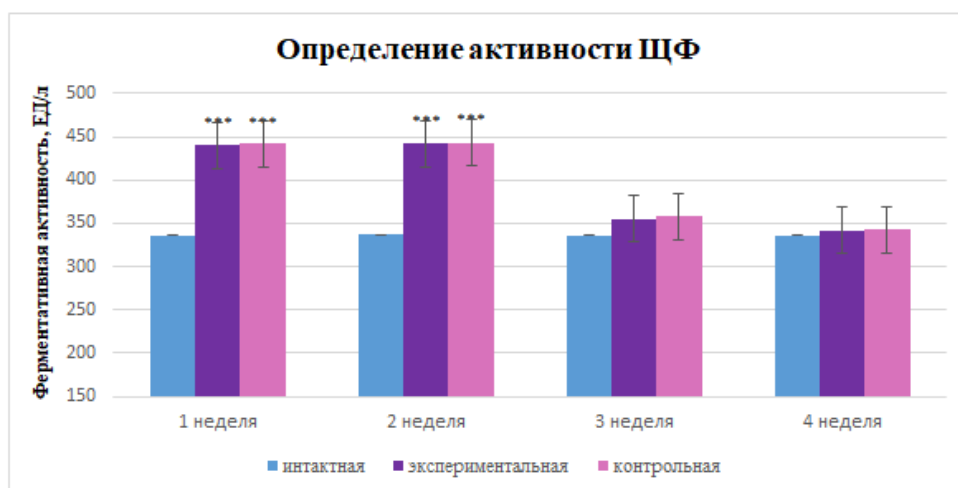


Рис.11. Определение активности ЩФ в плазме крови крыс через 1-4 недели после имплантации (ЕД/л, $M \pm m$, $n=6$. Здесь*** - $p<0,005$ относительно интактной группы)

У интактной группы параметры активности ЩФ соответствуют физиологическим значениям. На 1 и 2 неделе после имплантации отмечено повышение активности фермента в экспериментальной группе относительно интактной на 31% и в контрольной относительно интактной на 32%. К 3 неделе значения активности ЩФ в экспериментальной и контрольной группах относительно интактной возвращаются к дооперационным значениям.

ЩФ содержится практически во всех тканях организма с преимущественной локализацией, поэтому повышение ферментативной активности ЩФ в сыворотке венозной крови не является абсолютным показателем органоспецифичности поражения. Статистические изменения могут быть следствием применения наркоза, изменения характера питания и количества фосфата в корме, а также повышенной активностью остеобластов при регенерации костной ткани [11].

Исследование концентрации общего белка и альбумина, а также активности вышеперечисленных ферментов показало однообразную тенденцию изменения данных биохимических показателей на разных сроках после оперативного вмешательства. При этом не выявлены значимые отличия между экспериментальной и контрольной группами. На изменение данных

оказывает влияние применение наркоза и проведения хирургического вмешательства. Результаты эксперимента согласуются с литературными данными о повышении концентрации и активности исследуемых биохимических показателей после оперативного вмешательства [1].

Полученные данные, включающие определение вышеперечисленных биохимических показателей в различные сроки после имплантации позволяют сделать вывод, что ЛП, импрегнированное в раздробленные костные блоки, не оказывает токсического действия на животный организм. Напротив, наблюдается положительная динамика восстановления организма: полное отсутствие токсического действия имплантируемого материала подчеркивается небольшим увеличением содержания биохимических параметров в первые недели и постепенное возвращение в норму спустя месяц [17].

В ходе работы были исследованы гематологические показатели крыс до имплантации, а также на протяжении 1-4 недели после имплантации ксеногенных костных блоков с лекарственным покрытием. В ходе исследования статистически значимые отличия между значениями гематологических показателей не выявлены. Гематологические параметры до имплантации, через 1-4 недели после имплантации костных блоков с антибактериальным покрытием находятся в пределах физиологической нормы.

Таблица 15

Гематологические показатели белых беспородных крыс
до и после имплантации костных блоков с лекарственным покрытием, ($M \pm m$)

Показатель, единицы измерения	До имплантации	Срок после имплантации, недели			
		1-2 недели (конт-я группа)	1-2 недели (экспер-я группа)	3-4 недели (контр-я группа)	3-4 недели (экспер-я группа)
Гемоглобин, г/л	118 $\pm$ 4	122 $\pm$ 3,8	117 $\pm$ 2,5	125 $\pm$ 3,2	118 $\pm$ 4,8
Гематокрит, %	40 $\pm$ 2	41 $\pm$ 2	40 $\pm$ 3	40 $\pm$ 2	40 $\pm$ 3
АЧТВ, сек	19 $\pm$ 1	20 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1	19 $\pm$ 1	18 $\pm$ 1
Протромбиновое время, сек	22 $\pm$ 1	21 $\pm$ 2	20 $\pm$ 2	20 $\pm$ 1	21 $\pm$ 2
Тромбоциты, *10 ⁹ /л	562 $\pm$ 18	523 $\pm$ 17	541 $\pm$ 23	535 $\pm$ 15	528 $\pm$ 11
Эритроциты, *10 ¹² /л	8,3 $\pm$ 0,4	8,2 $\pm$ 0,5	8,4 $\pm$ 0,3	8,1 $\pm$ 0,7	8,0 $\pm$ 0,4
Лейкоциты, *10 ⁹ /л	7,1 $\pm$ 0,1	12,4 $\pm$ 0,8	13,4 $\pm$ 0,7	7,8 $\pm$ 0,6	7,5 $\pm$ 0,7
Лимфоциты, %	65 $\pm$ 0,5	53 $\pm$ 1,9	54,4 $\pm$ 2	65 $\pm$ 0,5	65 $\pm$ 0,7
Моноциты, %	6,5 $\pm$ 0,3	4,1 $\pm$ 0,4	4,0 $\pm$ 0,2	4,6 $\pm$ 0,4	4,8 $\pm$ 0,3
Базофилы, %	0,7 $\pm$ 0,1	0,8 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,7 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,1
Эозинофилы, %	2,0 $\pm$ 0,1	2,0 $\pm$ 0,3	2,2 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,1	2,1 $\pm$ 0,3
Нейтрофилы, %	25,8 $\pm$ 0,4	39,8 $\pm$ 0,9	38,7 $\pm$ 1,2	25 $\pm$ 0,7	27 $\pm$ 0,4

Результаты исследования, представленные в таблице 15, говорят об отсутствии достоверных различий между экспериментальной и контрольной группами спустя 1-4 недели после имплантации образцов.

В ходе работы были зафиксированы небольшие сдвиги значений гематологических показателей на разных сроках после хирургического вмешательства. Через 1 неделю после имплантации костных блоков с АБП отмечено повышение уровня лейкоцитов приблизительно на 80%, через 2 недели - уровня нейтрофилов на 60%, а также снижение уровня лимфоцитов на 20 % по сравнению со значениями показателей до имплантации. Спустя 3-4 недели значения возвращались к доимплантационным. Колебания уровней остальных гематологических показателей были незначительными.

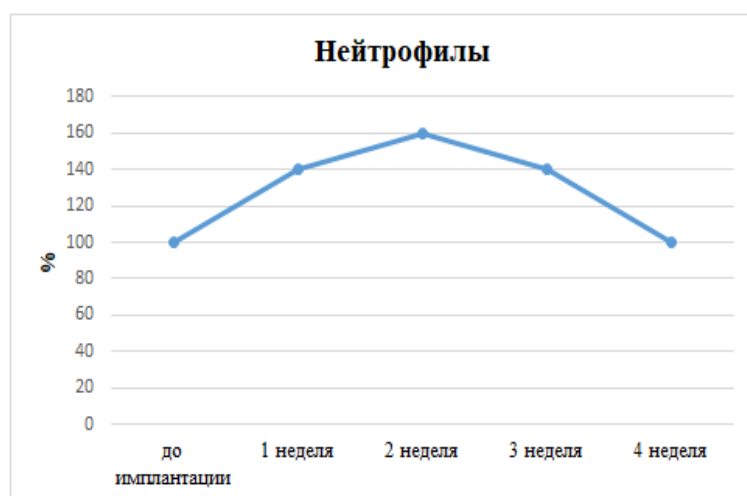
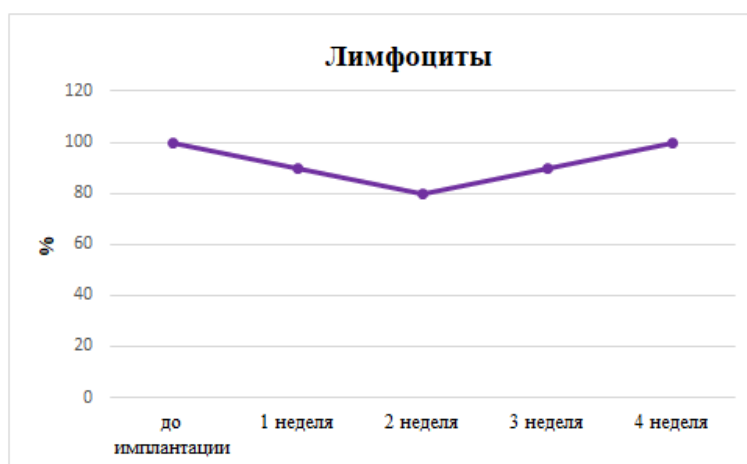


Рис. 12. Динамика изменения гематологических показателей после имплантации костных блоков с лекарственным покрытием белым беспородным крысам

Умеренный лейкоцитоз свидетельствует о развитии воспалительного ответа после имплантации костных образцов. Снижение уровня лимфоцитов также могут быть говорить о возникновении воспалительного процесса в организме. К 4 неделе наблюдается возвращение уровней лейкоцитов, нейтрофилов и лимфоцитов к первоначальным значениям. Это говорит о снижении интенсивности воспалительной реакции и может сигнализировать о завершении регенеративных процессов после хирургического вмешательства.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения магистерской диссертации была изучена информация о молекулярных механизмах регенерации костной ткани и роли различных сигнальных молекул в процессах. В ходе выполнения практической части были подготовлены образцы костнозамещающих материалов с антибактериальным покрытием, проведена оценка антибактериального и цитотоксического действия лекарственного покрытия, проведена имплантация материалов с целью исследования биосовместимости.

Результаты морфологического исследования зоны имплантации свидетельствуют об отсутствии некроза и выраженной воспалительной реакции вокруг имплантата. Результаты биохимических и гематологических исследований показывают отсутствие отрицательного действия ксеногенного материала с АБП на организм животного.

Однако несмотря на то, что анализ полученных данных свидетельствует об относительной безопасности ксеноматериала с АБП, перед их внедрением в масштабное производство необходимо проведение дополнительных исследований на других моделях в условиях *in vitro* и *in vivo*.

Таким образом, по результатам исследования можно сделать следующие выводы:

- 1) Нанесение лекарственного покрытия, содержащего меропенем или ванкомицин, на поверхность костных блоков позволяет снизить риск возникновения постимплантационных инфекционных осложнений, вызванных *Staphylococcus aureus*. Антибактериальным эффектом обладают все группы исследуемых образцов костных блоков с лекарственным покрытием.
- 2) Выявлено, что биоматериал с лекарственным покрытием не является цитотоксичным, однако АБП, входящий в состав ЛП, тормозит митотическое деление клеток и снижает динамику роста клеточной культуры.

- 3) Установлено, что динамика изменений биохимических и гематологических параметров крови крыс на разных сроках после имплантации напрямую связана с проведением операции. Выявлено отсутствие выраженного токсического эффекта костнозамещающего материала с антибактериальным покрытием на организм животного.
- 4) Морфологическое исследование зоны имплантации показало отсутствие некротических, выраженных воспалительных процессов и реакции отторжения.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АБП- антибактериальный препарат

АЛТ-аланинаминотрансфераза

АСТ- аспартатаминотрансфераза

ЛДГ- лактатдегидрогеназа

ЛП- лекарственное покрытие

МСК- мезенхимальные стромальные клетки

КА- кровяной агар

КК- креатинкиназа

ЩФ- щелочная фосфатаза

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Абрашова Т.В., Соколова А.П., Селезнева А.И., Хуттунен О.Э., Макарова М.Н., Макаров В.Г. Вариабельность биохимических и гематологических показателей у лабораторных крыс в зависимости от линии и возраста // Международный вестник ветеринарии. –2010, С.54-59.
2. Адамян А. А. Основные направления и перспективы в создании и клиническом применении полимерных имплантатов //Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств, шовных материалов и полимерных имплантатов.1995.С.177-179.
3. Бессуднова Н.О. Материалы для биологических применений // Саратов: Саратовский государственный университет, факультет нано - и биомедицинских технологий. 2007. С.27-33.
4. Булатов А.А. Деминерализованные костные трансплантаты и индукционный остеогенез // СПб: Трансплантология и медицина России. 2005. С. 53-65.
5. Булкина Н.В., Ведяева А.П., Иванов П.В. Биологические реакции организма на биоимплантаты // Клиническая стоматология. 2016. Т.2 № 78. С. 48-46.
6. Волова, Т. Г. Материалы для медицины, клеточной и тканевой инженерии / Т. Г. Волова, Е. И. Шишацкая, П. В. Миронов. – Электрон. дан. (6 Мб). – Красноярск: ИПК СФУ, 2009 – 261 с.
7. Волотовский А.И., Макаревич Е.П., Чирак В.Э. Регенерация костной ткани в норме и при патологии: метод. рекомендации // Беларусский государственный медицинский университет. 2010. С.5-9.
8. Гуляев В.А., Хубутя М.Ш., Новрузбеков М.С., Миронов А.С., Олисов О.Д., Луцык К.Н., Журавель С.В.,Магомедов К.М., Ахметшин Р.Б., Яремин Б.И. Ксенотрансплантация: история, проблемы и перспективы развития//Трансплантология. 2019. Т. 11. No 1. С. 37-54.

9. Загорский В.А. Проблема биосовместимости имплантатов и костной ткани // Московский государственный университет имени И.М. Сеченова. 2016. С.1-4.
10. Камышников В.С. Справочник по клинико-биохимической лабораторной диагностике: в 2 т. Т.2. – Мн.: Белорусь, 2002. – 464 с.
11. Карпищенко А.И. Медицинские лабораторные технологии. Справочник// Под ред. проф. Том 1-СПб: Интермедика. 2002. – 407 с.
12. Кишкун А.А. Клиническая лабораторная диагностика: учебное пособие / А.А. Кишкун. – Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2010. – 987 с.
13. Кулаков А.А., Григорьян А.С., Филонов М.Р., Штанский Д.В., Топоркова А.К. Экспериментально-морфологическое исследование интеграции гибридного имплантационного материала в костную ткань // Стоматология, 2009. - №3. - С.8-12.
14. Литвиненко В.Н. Особенности создания биосовместимых имплантационных материалов // Московский государственный университет имени И.М. Сеченова. 2017. С.2-7.
15. Малинин М.Л. и др. Половые различия по биохимическим показателям крови у разных видов лабораторных животных // Известия Саратовского университета. 2008 – с. 51-54.
16. Медведев В.В., Волчек Ю.З. Клиническая лабораторная диагностика. Справочник для врачей. Под ред. В.А. Яковлева. Издат."Гиппократ" СПб.1995. – с. 52-57.
17. Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л. Анатомия крысы. - 2001. - С.38-70.
18. Ройтберг Г.Е. Внутренние болезни. Лабораторная и инструментальная диагностика: учеб. пособие / Г.Е. Ройтберг, А.В. Струтынский. – 2-е изд., перераб. и доп. – Москва: МЕДпресс-информ, 2011. – 800 с.
19. Ai-Aql ZS, Alagl AS, Graves DT, Gerstenfeld LC, Einhorn TA. Molecular mechanisms controlling bone formation during fracture healing and distraction osteogenesis. J Dent Res. 2008. P. 109-117.

20. Arnsdorf E., Tummala P., Castillo A., Zhang F., Jacobs C. The epigenetic mechanism of mechanically induced osteogenic differentiation. //J. Biomech. 2010. – P 2881–2883.
21. Bastian O, Pillay J, Alblas J, Leenen L, Koen- derman L, Blokhuis T. Systemic inflammation and fracture healing. J Leukoc Biol. 2011. P. 670-673.
22. Bellido T. Osteocyte-driven bone remodeling. //Calcif Tissue Int. 2014 – Vol. 94(1) – P. 25-34.
23. Dryden M.S. Novel antibiotic treatment for skin and soft tissue infection // Curr Opin Infect Dis. 2014. P.115-117.
24. Dimitriou R, Tsiridis E, Giannoudis PV. Current concepts of molecular aspects of bone heal- ing. Injury. 2005. P. 1395-1401.
25. Du X, Xie Y, Xian CJ, Chen L. Role of FGFs/FGFRs in skeletal development and bone regenera- tion. J Cell Physiol. 2012. P. 3737-3742.
26. Chen G, Deng C, Li YP. TGF- β and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone forma- tion. Int J Biol Sci. 2012. P.273-276.
27. Gazzerro E, Canalis E. Bone morphogenetic proteins and their antagonists. Rev Endocr Metab Disord. 2006. P.52-62.
28. Giannini E.G., Testa R., Savarino V. Liver enzyme alteration: aguide for clinicians //Canadian Medical Association Journal (CMAJ).–2005, Vol. 172.– P. 367-379
29. Gitelis S. The treatment of chronic osteomyelitis with a biodegradable antibiotic-impregnated implant // Journal Orthopaed Surg (Hong-Kong). 2002. P. 53-56.
30. Hanssen A.D. Local antibiotic delivery vehicles in the treatment of musculoskeletal infection // Clin. Orthopaed Relat. Res. 2005.P.92-94.
31. Huang F, Chen YG. Regulation of TGF- β recep- tor activity. Cell Biosci. 2012.P.8-9
32. Husain A, Jeffries MA. Epigenetics and Bone Remodeling. //Curr Osteoporos Rep. 2017. – Vol. 15. – P 450-458.

33. Jacobsen KA, Al-Aql ZS, Wan C, Fitch JL, Stapleton SN, Mason ZD, Cole RM, Gilbert SR, Clements TL, Morgan EF, Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Bone formation during distraction osteogenesis is dependent on both VEGFR1 and VEGFR2 signaling. *J Bone Miner Res.* 2008. P. 598-607.
34. Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W. Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev.* 2005. P. 744-746.
35. Kempen DH, Creemers LB, Alblas J, Lu L, Verbout AJ, Yaszemski MJ, Dhert WJ. Growth factor interactions in bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010. P. 554- 560.
36. Klinkmann, H. Consensus conference on biocompatibility / H. Klinkmann, A.M. Davison // *Nephrol. Dial. Transplant.*, Oxford, Oxford University. – 1994. – № 9(2). – P.33-40.
37. Kolar P, Schmidt-Bleek K, Schell H, Gaber T, Toben D, Schmidmaier G, Perka C, Buttgereit F, Duda GN. The early fracture hematoma and its potential role in fracture healing. *Tissue Eng Part B Rev.* 2010. P. 428-433.
38. Kolmas J., Szwaja M., Kolodziejski W. Solid-state NMR and IR characterization of commercial xenogeneic biomaterials used as bone substitutes // *Journal Pharm. Biomed. Anal.* 2012. № 5. P. 137-141.
39. Kugimiya F, Ohba S, Nakamura K, Kawaguchi H, Chung UI. Physiological role of bone morphogenetic proteins in osteogenesis. *J Bone Miner Metab.* 2006. P. 95-99.
40. Kwong FN, Harris MB. Recent developments in the biology of fracture repair. *J Am Acad Orthop Surg.* 2008. P.24-25.
41. Lissenberg-Thunnissen SN, de Gorter DJ, Sier CF, Schipper IB. Use and efficacy of bone morphogenetic proteins in fracture healing. *Int Orthop.* 2011. P.1273-1279.
42. Marie PJ. Fibroblast growth factor signaling controlling bone formation: an update. *Gene.* 2012. P. 2-4

43. Makhdom AM, Hamdy RC. The role of growth factors on acceleration of bone regeneration during distraction osteogenesis. *Tissue Eng Part B Rev.* 2013. P. 53-56.
44. Marsell R, Einhorn TA. The biology of fracture healing. *Injury.* 2011 P. 552-554.
45. Monroe D., McGee-Lawrence M., Oursler M., Westendorf J. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease. // *Gene.* 2012. – Vol. 492 – P. 3–17.
46. Myers TJ, Yan Y, Granero-Molto F, Weis JA, Longobardi L, Li T, Li Y, Contaldo C, Ozkan H, Spagnoli A. Systemically delivered insulin-like growth factor-I enhances mesenchymal stem cell-dependent fracture healing. *Growth Factors.* 2012. P. 40-42.
47. Ostrovskij, A. Osteoplastic materials in modern paradontology and implantology / A. Ostrovskij // *M.*, 1999. P. 45-51.
48. Ratner D. Biomaterials science: an introduction to materials in medicine // San Diego: Elsevier Academic Press. 2004. P. 852.
49. Sagalovsky S. Bone remodeling: cellular-molecular biology and role cytokine RANK-RANKL-osteoprotegerin (OPG) system and growth factors. *Crimea J Exptl Clin Med.* 2013. P.37-43.
50. Sarahrudi K, Thomas A, Mousavi M, Kaiser G, Köttstorfer J, Kecht M, Hajdu S, Aharinejad S. Elevated transforming growth factor-beta 1 (TGF- β 1) levels in human fracture healing. *In- jury.* 2011. P. 830–832.
51. Scientific Commitee. Recommandations pour la mesure de la concentration catalytique de la lactate deshydrogenase dans le serum humain a 30°C.// *Ann Biol Clin.* -1982. –Vol. 41. – P. 188-191.
52. Sevastianov V.I. Research and development of bioartificial organs and tissues by using biopolymer materials // *Journal Guangdong Non-Ferrous Metals.* 2005. V. 15. № 2-3. P. 54-59.

53. Schmid GJ, Kobayashi C, Sandell LJ, Ornitz DM. Fibroblast growth factor expression during skeletal fracture healing in mice. *Dev Dyn*. 2009. P. 769-773.
54. Schroeder T., Westendorf J. Histone deacetylase inhibitors promote osteoblast maturation. // *J. Bone Miner Res*. 2005. – Vol. 20– P. 2254–2263.
55. Tietz N.W. et al. *Clinical Guide to Laboratory Tests*, 3rd ed AACC 1995.
56. Tosounidis T, Kontakis G, Nikolaou V, Papa- thanassopoulos A, Giannoudis PV. Fracture healing and bone repair: an update. *Trauma*. 2009. P. 53-57.
57. Yang X, Ricciardi BF, Hernandez-Soria A, Shi Y, Pleshko Camacho N, Bostrom MP. Callus mineralization and maturation are delayed during fracture healing in interleukin-6 knockout mice. *Bone*. 2007. P. 930- 935.
58. Cardioplant: Имплантаты для тканевой регенерации нового поколения [Электронный ресурс]: ксеногенные костные блоки. Пенза. Официальный сайт предприятия.
59. ГОСТ ISO 10993. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 1. Оценка исследования. 2011.
60. ГОСТ ISO 10993. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 5. Оценка на цитотоксичность: методы in vitro. 2002.
61. ГОСТ ISO 10993. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследование местного действия после имплантации. 2002.
62. ГОСТ ISO 10993. Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 19. Исследование физико-химических, морфологических и топографических материалов. 2011.
63. Электронный ресурс «Биохимические показатели крови» <https://gkb5-nn.ru/>

64. Электронный ресурс «Инновационные технологии для лабораторной диагностики и научных исследований»
<https://www.biochemmack.ru/>

65. Электронный ресурс «Количественное определение аминотрансфераз» <https://edu.volgmed.ru/>