

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и
ароматических растений»

На правах рукописи

Литвинов Юрий Юрьевич

**Биотехнологические основы получения костных
имплантатов и имплантационных препаратов**

03.01.06 – Биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии)

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель
доктор биологических наук, профессор
Матвейчук Игорь Васильевич

Москва - 2019

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	11
1.1. Медицинская статистика и нозология заболеваний костной ткани	11
1.2. Строение костной ткани	13
1.3. Пористость компактного вещества кости	16
1.4. Методы изучения биологических минерализованных тканей	17
1.5. Способы деминерализации и деорганификации костной ткани	19
1.6. Клинические аспекты и механизмы восстановления костной ткани	21
1.7. Материалы, используемые при замене костных фрагментов	24
1.8. Основные требования к костным имплантатам и способы их изготовления	28
1.9. Современные технологии стерилизации	30
1.10. Сангвиритрин и его фармакологические свойства	31
1.11. Изучение безопасности сангвиритрина	36
1.12. Сангвиритрин в хирургии	37
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	40
2.1. Объект исследования	40
2.2. Методы исследования	41
ГЛАВА 3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И МЕТОДИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ	56
3.1. План эксперимента	56
3.2. Методология и экспериментальная апробация методов изготовления, контроля качества и оценки безопасности костных имплантатов	58
3.3. Оценка сорбционных свойств имплантатов и времени высвобождения лекарственного средства	100
3.4. Основы технологии получения костных имплантатов, деминерализованных костных имплантатов и деминерализованных костных имплантатов с	

антимикробными, противовирусными и антимикотическими свойствами	120
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ	124
4.1. Показатели контроля качества и безопасности костных имплантатов и имплантационных препаратов	126
ВЫВОДЫ.....	129
БЛАГОДАРНОСТИ	131
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	132

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность работы

Последние десятилетия характеризуются возрастанием объема реконструктивно-восстановительных операций в биопротезировании, а также широким внедрением биотехнологии в репродукцию клеток и тканей. Это объясняется увеличением числа пострадавших в авариях на транспорте, локальных военных конфликтах, техногенных катастрофах, ухудшением экологии, увеличением продолжительности жизни и, как следствие, повышением травматизма в пожилом возрасте ввиду постуральной неустойчивости и различных патологических состояний [28]. Это обусловило рост количества оперативных вмешательств на костно-суставном аппарате, увеличение потребности в пластическом материале, оптимальный выбор которого для каждого конкретного случая оказывает существенное влияние на остеоиндуктивные свойства имплантата и эффективность лечебного процесса. Для восстановления утраченной функции и органоспецифичной структуры кости используют костные имплантаты, которые помещают в область дефекта при реконструктивно-восстановительной операции. Следовательно, они должны соответствовать требованиям, предъявляемым к лекарственным средствам. Несмотря на разнообразие материалов, используемых при изготовлении имплантатов (металлы, полимерные композиции, керамика, кораллы), костная ткань остается предпочтительной и является объектом многих исследований. Материал для изготовления имплантатов должен быть биологически совместимым, не отторгаться организмом и быть биологически активным. Это в наибольшей степени обеспечивается уникальными свойствами костной ткани, как природного композитного биополимера на основе гидроксиапатита кальция $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ и коллагена, участвующих в построении костей как элементов биомеханической системы. Они выполняют в организме человека и животных различные функции – опорную, локомоторную, защитную, а также служат депо минеральных компонентов [124, 125, 126, 131, 133]. «Золотым стандартом»

материала в биоимплантологии считается аутогенная кость. Однако её необходимое количество в большинстве случаев превосходит объем материала, который может быть взят у пациента. Другой подход - использование аллогенных костей, но их количество, отвечающее требованиям биоимплантологии, не обеспечено в полной мере [44, 63]. В этой связи требуются современные наукоемкие инновационные биотехнологии получения имплантатов, позволяющие удовлетворить спрос на пластический материал, включая альтернативные источники получения костных имплантатов. **Биотехнология** в биоимплантологии – интеграция естественных и инженерных наук, позволяющая наиболее полно реализовать возможности живых организмов, биологических объектов или их производные для создания и модификации продуктов или процессов различного назначения.

Существуют различные пути решения задач в рамках рассматриваемой проблемы. Один из них - создание новых, а также совершенствование существующих технологий на основе биотехнологических приемов изготовления костных имплантатов с учётом экспериментальных данных комплексного исследования природного биополимера – костной ткани, закономерностей её структурно-функциональных взаимосвязей, включая изучение дифференциальных и интегральных характеристик основных компонентов – органического и минерального [28]. Результаты таких исследований являются базисными при установлении критериев и выработке требований к созданию современных имплантатов, оценке их качества и безопасности.

Особенно актуально на современном этапе создание новых адсорбционных биоимплантологических форм препаратов с использованием деминерализованной или деорганифицированной кости в качестве основы для иммобилизации биологически активных соединений с антимикробными свойствами, обеспечивающих их адресную доставку в область оперативного вмешательства. Такой подход позволит уменьшить риск гнойных осложнений после радикального удаления патологического очага поражения при лечении гнойно-некротических

очагов в кости с замещением костной ткани имплантатом с выраженными антимикробными свойствами.

Ввиду того, что в гнойной остеологии чаще всего необходимо большое количество материала для репарации инфицированных костных ран, а также невозможности у больных с общим костным заболеванием использования аутогенных имплантатов [44], применение ксеноимплантатов становится все более актуальным. Кроме того, ксеноимплантаты имеют ряд преимуществ:

- однородность костной ткани;
- возможность контролировать получение ткани по количеству и времени;
- существует возможность выбора;
- практически не угрожает перенос опухоли;
- отсутствует группа специфических человеческих инфекций.

Целью настоящей работы является теоретическое обоснование и усовершенствование биотехнологических приемов получения костных имплантатов и создание на их основе имплантационных препаратов для биоимплантологии.

Для достижения поставленной цели необходимо решить следующие **задачи:**

1. усовершенствовать методологию, включающую современные методы изготовления, контроля качества и оценки безопасности костных имплантатов;
2. провести экспериментальную апробацию предложенных методов;
3. осуществить оптимизацию технологии стерилизации костных имплантатов с использованием озонного метода;
4. исследовать сорбционную способность деминерализованного костного имплантата, динамику высвобождения адсорбированного лекарственного средства;
5. усовершенствовать биотехнологические приемы изготовления костных имплантационных препаратов с использованием антимикробного лекарственного средства для целей биоимплантологии;

б. предложить и обосновать показатели контроля качества, оценки безопасности костных имплантатов и имплантационных препаратов для биоимплантологии.

Научная новизна исследования

Исследование выполнено в рамках программы фундаментальных научных исследований РАН на 2013 – 2020 г. г. по направлению: «Исследование биологических структур на стадиях их формирования, функционирования и сохранения»; плана научно-исследовательской работы ФГБНУ ВИЛАР по пункту: «Репродукция клеток, тканей и органов для имплантации и эффективного биопротезирования», а также соответствует приоритетным направлениям фундаментальных научных исследований РАН на 2020 – 2030 г.г. по направлению: «Физиология опорного каркаса двигательных систем, репродукция и биопротезирование».

Разработаны показатели контроля качества и оценки безопасности костных имплантатов, усовершенствована методология контроля качества и оценки безопасности костных имплантатов, включая деминерализованные.

Предложено научно-методическое обеспечение, позволяющее осуществить технологический цикл изготовления костных и деминерализованных имплантатов с иммобилизацией антимикробного лекарственного средства с целью ускорения процесса репаративной регенерации в гнойной остеологии.

Отработаны биотехнологические приемы получения имплантационного препарата на основе стерильного деминерализованного костного матрикса, обладающего в сочетании с иммобилизованным лекарственным средством, выраженными антимикробными, противовирусными и антимикотическими свойствами.

Научная новизна подтверждается патентами Российской Федерации на изобретение: «Способ изготовления костных имплантатов» № 2526429 от 11 апреля 2013 г., «Комбинированный способ стерилизации костных имплантатов» № 2630464 от 29 июля 2017 г., «Способ получения костного имплантата на

основе стерильного деминерализованного костного матрикса» № 2679121 от 06 февраля 2019 г.

Теоретическая и практическая значимость работы

На основании проведенных исследований разработаны и экспериментально апробированы:

- усовершенствованные биотехнологические приемы получения костных имплантатов;
- современная методология, включающая комплекс методов оценки качества и контроля безопасности имплантатов;
- предложены высокотехнологичные методы изготовления костных имплантационных препаратов с антимикробными свойствами;
- способ получения имплантационного препарата для снижения риска инфицирования в операционный и постоперационный периоды, обеспечения репаративной регенерации в инфицированных костных ранах.

Личный вклад автора

Автором сформулированы цели, задачи, основные положения, выносимые на защиту и выводы по работе. Экспериментально установлены и научно обоснованы оптимальные режимы биотехнологических приемов обработки костных фрагментов для получения имплантатов, предложена современная методология контроля качества и оценки безопасности имплантатов. Автор принимал непосредственное участие в экспериментах по усовершенствованию способа получения имплантатов с применением метода стерилизации озон-кислородной смесью. Автором исследованы сорбционные свойства деминерализованных имплантатов для иммобилизации на их основе лекарственного средства. Проведен анализ и обобщение результатов, подготовлены материалы для заявок на получение трех патентов на изготовление костных имплантатов на основе стерильного деминерализованного костного матрикса с антимикробными свойствами.

Положения, выносимые на защиту

1. Биотехнологические основы получения нативных и деминерализованных костных имплантатов, методы их стерилизации.
2. Полученный имплантационный препарат на основе стерильного деминерализованного костного матрикса и субстанции алкалоидов сангвинарина и хелеритрина.
3. Разработанные показатели оценки качества и контроля безопасности на стадиях получения костных имплантатов и имплантационных препаратов.

Апробация результатов

Основные положения работы доложены:

1. VII Всероссийский симпозиум с международным участием: «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии». – Астрахань, 2017.
2. Научно-техническая конференция «Медико-технические технологии на страже здоровья».- Москва, МГТУ им. Н.Э. Баумана, 2017 г.
3. Международная научная конференция «Радиобиология: вызовы XXI века».- Гомель, ГНУ «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси», 2017 г.
4. XIII Международная научная конференция «Физика и радиоэлектроника в медицине и экологии – ФРЭМЭ 2018».- Владимир-Суздаль, 2018 г.
5. Международная научная конференция «Радиобиология: актуальные проблемы». - Гомель, ГНУ «Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси», 2018 г.
6. Заседание секции по поиску биологически активных веществ и разработке лекарственных растительных препаратов Ученого совета ФГБНУ ВИЛАР от 21.11.2018 г.
7. Заседание Ученого совета ФГБНУ ВИЛАР 28.11.2018 г.

Соответствие паспорту специальности

По тематике, методам исследования, предложенным новым научным положениям диссертация соответствует паспорту специальности научных работников 03.01.06 – Биотехнология (в т.ч. бионанотехнологии) в части:

- п. 2 – «Исследование и разработка требований к сырью»;
- п.3. – «Создание эффективных композиций биопрепаратов и разработка способов их применения»;
- п. 4. – «Изучение и разработка процессов ... очистки, контроля и хранения конечных целевых продуктов»;
- п. 8 – «Разработка научно-методических основ контроля качества и оценки безопасности использования медицинских, ветеринарных биопрепаратов»;
- п. 11. – «Биотехнология препаратов для животноводства и ветеринарии».

Структура и объем работы

Диссертационная работа состоит из следующих разделов: введение, 4 глав - обзор литературы, материалы и методы исследования, экспериментальная часть и методические разработки, обсуждение полученных результатов, выводы, список литературы (139 источников). Работа изложена на 149 страницах текста, включая 64 рисунка и 16 таблиц.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Медицинская статистика и нозология заболеваний костной ткани

Переломы костей отмечаются практически в любом возрасте. Кривая распределения частоты переломов костей конечностей в зависимости от возраста носит бимодальный характер: первый пик в возрасте до 15 лет (спортивные или транспортные травмы), появление второго пика переломов в возрасте после 50 лет связывают с остеопорозом и остеоартрозом [90].

Исходя из того, какая разновидность заболеваний имеет место в конкретном случае, патологии костной ткани подразделяют на группы:

- дистрофические поражения, такие как остеопороз у взрослых или рахит в детском возрасте;
- дегенеративные (диспластические) патологии. К ним относят остеоартроз, болезнь Бехтерева;
- воспалительные поражения, такие как остеомиелит, который характеризуется воспалительным процессом костной ткани и основным методом его лечения является хирургический;
- опухолевые поражения опорно-двигательного аппарата;
- генетические синдромы; к редким генетическим синдромам относят несовершенный остеогенез, болезнь Педжета;
- травматические поражения опорно-двигательного аппарата – трещины и переломы костей [90].

Однако не все перечисленные патологии излечиваются репаративной регенерацией. Большинство патологий являются системными болезнями и лечатся медикаментозными способами [3, 90].

Остеопороз одна из патологий, которая, часто требует оперативного вмешательства. По данным Института ревматологии РАН, остеопорозом в России страдают 28% мужчин и женщин старше 50 лет. В связи с увеличением продолжительности жизни населения планеты и, как следствие, ухудшения с возрастом соединительных тканей, ожидается значительный рост частоты

остеопоротических переломов. Частота переломов шейки бедра в различных городах России находится на уровне стран Европы, в то время как частота переломов дистального отдела предплечья достигает высоких величин, зарегистрированных лишь в странах Северной Европы. Микроповреждения костей ткани позвонков, накапливающиеся с возрастом, становятся причиной болей, появления деформаций, функциональных нарушений [3].

По данным Центра демографии и экологии человека в России, люди старше 60 лет – самая быстрорастущая группа населения. С увеличением возраста частота переломов повышается. Оценка мировой тенденции показала, что только за счет постарения популяции частота переломов бедренной кости должна увеличиться между 2005 – 2050 гг. в 2 раза [90].

Другая патология костной ткани - остеоартроз поражает различные суставы и является наиболее распространенным дегенеративно-дистрофическим поражением суставов. Болезни суставов имеют широкое распространение во всем мире. 1-2 % населения до 45 лет и 15-18% людей более старшего возраста страдают от различных форм заболеваний суставов. Заболевание встречается в возрасте от 16 до 87 лет и старше, обычно возникает в период от 50 до 59 лет. Наблюдается как у женщин, так и у мужчин. Лица женского пола страдают деформирующим артрозом чаще, чем мужчины. Наиболее часто артроз поражает тазобедренный, коленный, шейный и поясничный отделы позвоночника [28].

Хирургические методы лечения остеоартроза насчитывают более 100 лет. Наиболее радикальным методом борьбы с остеоартрозом в диапазоне его III-IV стадий является тотальное эндопротезирование с применением металлополимерных эндопротезов, конструкции которых учитывают биомеханику, реакцию тканей и т.д. [28].

Имплантаты и протезы часто используются в качестве синонимов. Количество имплантатов, ежегодно используемых в США для восстановления костей и суставов значительное. Например: замена сустава (500 тыс.), устройства временной фиксации (1 млн.), хирургия позвоночника (400 тыс.). Годовое

количество имплантатов в Европе приблизительно равно количеству имплантатов в США [114].

1.2. Строение костной ткани

Костная ткань является сложным композитным материалом, формирующим скелет человека, который в свою очередь, является биомеханической системой, выполняющей опорную функцию, а также активно участвующей в обмене веществ и служащей «депо минеральных веществ» [28]. Ее характеристики меняются в зависимости от типа кости, характера нагрузок и возраста человека [10, 82, 136].

При гистологическом анализе выделяют несколько уровней организации костной ткани. На тканевом уровне выделяют компактное и губчатое вещество [112]. Компактное вещество костной ткани человека достигает 70-80%, губчатого вещества – 20-30% всего объема скелета [28].

Губчатое вещество кости как органа, является одним из его компонентов, который, наряду с компактным веществом обеспечивает его прочностные характеристики. По структуре губчатого вещества выделяют три основных типа: костные балки цилиндрической формы без преимущественной ориентации, трабекулы как цилиндрической, так и пластинчатой формы и костные трабекулы различных размеров, форм и ориентации [28].

Компактное вещество преимущественно формирует диафизарные отделы трубчатых костей, на наружных поверхностях которых сформирована надкостница - периост, а на внутренних поверхностях, со стороны костномозговой полости - эндост [47, 104]. Надкостница покрывает кость снаружи и представляет собой волокнистую соединительнотканную пластинку, прочно прикрепленную к кости пучками коллагеновых волокон, которые вплетаются в слой наружных пластинок кости [75, 76]. Средняя толщина периоста варьирует в пределах (0,1 – 0,8) мм. С надкостницей связывают ее защитную роль, но не опорную функцию [28]. Стенки костных полостей выстилает эндост, который представляет собой тонкий слой, состоящий из соединительной ткани и костных

клеток [28]. Пространство между периостом и эндостом заполнено компактным веществом, которое представляет собой систему взаимосвязанных костных пластинок [4]. Костные пластинки построены из параллельно или спирально расположенных пучков минерализованных коллагеновых волокон [28].

Параллельно расположенные костные пластинки образуют цилиндрические пластинчатые комплексы – остеоны. Остеоны – цилиндрические структуры компактного вещества, являются структурно-функциональной единицей костной ткани и образуются вокруг кровеносных сосудов и нервов [5, 15, 28]. Он состоит из нескольких концентрически расположенных вокруг его центрального канала ламелл толщиной (4-5) мкм [53]. Стенки центральных каналов остеонов образованы костными пластинками. Поверхностный рельеф стенок образован минерализованными коллагеновыми фибриллами, входящими в состав костных пластинок [54, 76].

Центральные каналы остеонов ориентированы преимущественно вдоль продольной оси кости, а соединяющие (прободающие) каналы расположены преимущественно тангенциально к направлению продольной оси кости [65, 76, 102, 105, 108].

Центральные, прободающие каналы, каналы и лакуны, межфибрилярные и межкристаллические пространства представляют собой объемно ориентированную систему внутрикостных пространств или единую систему микроканалов, объем которых может достигать 10-13% [28]. Лакуны, сообщающиеся друг с другом многочисленными каналцами, располагаются вокруг центрального канала, между пластинками остеонов [54,77].

Костная ткань состоит из клеток и межклеточного вещества [42, 87] и является специфической формой соединительной ткани [102]. В костной ткани существует следующие виды клеток: остеобласты, остециты, остеокласты, плоские клетки, покрывающие кость.

Остеобласты – костеобразующие клетки пирамидальной и кубической формы, синтезирующие и секретирующие компоненты костного матрикса. Участвуют в поддержании структуры костной ткани в нормальном

функциональном состоянии. Имеют в своем составе все необходимые компоненты: развитый гладкий эндоплазматический ретикулум (ГЭР), аппарат Гольджи, митохондрии. В зрелой кости образуются только в участках разрушения или восстановления костной ткани.

Остеоциты – клетки, образующиеся из остеобластов, утративших способность к делению, они располагаются в лакунах, повторяющих уплощенную полигональную форму остеоцитов. Составляют 90% клеточной популяции зрелой костной ткани. В их цитоплазме присутствуют органеллы общего назначения: в небольших количествах гладкий эндоплазматический ретикулум, комплекс Гольджи, митохондрии, лизосомы.

Остеокласты – многоядерные клетки, имеющие округлую, шаровидную, сфероидную или эллипсоидную форму. Основная их функция – костерезорбирующая. В центральной части клетки находятся ядра в количестве от одного до нескольких десятков. В цитоплазме присутствует комплекс Гольджи, хорошо развит гладкий эндоплазматический ретикулум, большое количество митохондрий [75, 76].

Плоские клетки, покрывающие кость – выстилают большую часть периостальной и эндостальной поверхностей зрелой кости. Участвуют в регуляции костного метаболизма и поддержании минерального гомеостаза [28].

Межклеточное вещество костной ткани состоит из минеральной, органической фаз кости и воды. В сухой кости минеральная фаза достигает до 60% от всего объема ткани, органическая фаза - до 30%, а на долю воды приходится около 10 %. Однако, количественное соотношение фаз индивидуально и может изменяться [4, 52].

Двухфазный минеральный компонент имеет сложный состав и представлен в основном кальций-фосфорными солями [81]. Аморфную фазу образует фосфат кальция, а кристаллическую - кристаллы гидроксиапатита, химический состав которого описывается формулой $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2 \cdot 10H_2O$ [59, 99].

Органическая фаза костной ткани на (88-90) % состоит из коллагеновых белков [47, 103]. Первый уровень составляют молекулы коллагена, скрученные в

общую спираль из 3 полипептидных α -цепей [40]. Микрофибриллы образуют следующий надмолекулярный уровень, который образован из пяти спирально расположенных микрофибрилл [42, 47]. Это элемент нитевидной формы толщиной (3,5-6,0) нм с повторяемостью структурной организации в 64 нм вдоль длинной оси [28]. Микрофибриллы группируются в фибриллы, которые образуют следующий волокнистый элемент коллагена. Диаметр фибрилл имеет относительно большой диапазон - от 20 до 400 нм [28]. По ходу коллагеновой фибриллы вся структура скручена приблизительно под углом 10^0 к ее оси [36, 37].

Приведенные данные, а также наличие в костной ткани, таких компонентов как органический, минеральный, воды, связующего вещества и их пространственная взаимосвязь свидетельствуют о принадлежности ее к природным композитным материалам [28]. До настоящего времени не удалось на основе природного аналога создать искусственную кость, сочетающую прочностные и биологические характеристики как у костной ткани [118, 119], что имеет значение для медицины и развития таких перспективных направлений, как биопротезирование и репродукция тканей.

1.3. Пористость компактного вещества кости

Несмотря на кажущуюся плотность структур, в костной ткани имеются межмолекулярные, внутрифибриллярные, внутриволоконные и тканевые промежутки. Высокий уровень обменных процессов в веществе кости обеспечивается пористостью костного матрикса, благодаря которой создается большая площадь контактов микроциркуляторного русла с межклеточной жидкостью [77]. Кроме того, в единую систему микроканалов объединены система центральных, прободающих каналов и канальцев, образующих интерстициальное пространство [64, 75, 76]. Объем его, образуемый системой сосудистых каналов, лакунарно-канальцевой системой и совокупностью межфибриллярных пор и щелей, может достигать 11-13%; для сравнения – органическая фаза занимает 39% объема костной ткани, а минеральная фаза – 35% [28, 47]. При селективном выделении из костных образцов органической и

минеральных фаз они не являются дискретными, а сохраняют пространственную организацию и непрерывность [23, 24, 54]. Тесная взаимосвязь органического и минерального компонентов костной субстанции обеспечивается физическими и физико-химическими уровнями взаимодействия, а пространственная организация костного вещества не является хаотичной. Формирующаяся на разных этапах остеогенеза системы каналов, лакун, канальцев, пор представляют собой объемную ориентированную систему внутрикостных пространств [64]. Именно наличие ориентированной системы внутрикостных пространств и пористость деминерализованного костного матрикса, в сочетании с остеоиндуктивными свойствами позволяют рассматривать его как депо лекарственных препаратов или биологически активных факторов для обеспечения стимуляции репаративных процессов, для подавления экзогенной микробной флоры, как перспективный природный материал для изготовления имплантатов и, в перспективе, для разработки на его основе биофармацевтической технологии получения адсорбционной биоимплантологической лекарственной формы, обладающей антимикробными свойствами за счет адсорбции и иммобилизации лекарственного средства.

1.4. Методы изучения биологических минерализованных тканей

С целью анализа механических свойств костной ткани применяются разрушающие и неразрушающие методы испытаний. Среди разрушающих методов – испытания на сжатие, растяжение, изгиб, кручение, сдвиг, а также методы определения твердости [19, 41, 45, 46, 47, 48, 70, 107]. Эти виды испытаний представляют интерес ввиду того, что напряжения при растяжении наиболее опасны с точки зрения разрушения, а напряжения при сжатии относятся к физиологическим, которые испытывает скелет под действием силы тяжести. Кроме того, клинические наблюдения показывают, что около 45% всех переломов большеберцовых костей происходит под воздействием крутящего момента. Поэтому, значительный интерес представляет анализ механического поведения кости при кручении [47, 115].

Метод порометрии используется для исследования размерных параметров внутреннего объема компактной кости. В методе ртутной порометрии последовательным увеличением внешнего давления на ртуть, в которую погружают исследуемый образец, добиваются заполнения пор в порядке уменьшения их радиуса [59, 60, 61]. Однако, необходимость работы с токсичной ртутью ограничивает возможности применения этого метода.

С помощью центрифуг реализуется другой метод изучения компактного вещества костной ткани и распределения радиусов пор – метод центробежной порометрии. Как и метод ртутной порометрии, он основан на капиллярных явлениях взаимодействии твердого вещества с жидкостью, однако в этом случае используются смачивающие жидкости [59].

Из неразрушающих методов следует выделить акустические методы, основанные на определении частоты собственных колебаний длинных костных образцов, а также на измерении скорости распространения волн ультразвука в костной ткани и скорости их затухания [30, 31, 32, 33, 74, 86].

К условно неразрушающему методу возможно отнести оценку микротвердости, основанную на вдавливании при небольших нагрузках в поверхность алмазных наконечников с последующим анализом микроотпечатков (изучение микротвердости по Виккерсу, Бриннелю, Роквеллу) [82, 112, 115].

Методами светомикроскопического исследования, а также методами сканирующей электронной микроскопии проводятся гистологические исследования структурной организации компактного и губчатого вещества кости, рельефа и особенностей структуры поверхностей после механической обработки и испытаний костных образцов, а также пространственной организации лакунарно-канальцевой системы [34, 38, 80]. Известно, что свойства поверхности костных имплантатов играют решающую роль в процессах остеоинтеграции. В зависимости от химического состава имплантатов, особенностей рельефа их поверхности и размера пор изменяются процессы размножения, движения и дифференцировки клеток – предшественников костной и кроветворной тканей [83].

При помощи светомикроскопического метода проводится морфометрический анализ остеонов компактного вещества кости. Измерения выполняются на гистологических препаратах (поперечных и продольных срезах), а также на образцах различной ориентации с учетом фактора анизотропии [88].

В сканирующем электронном микроскопе, где объект исследуется с помощью сфокусированного высокоэнергетического пучка электронов, возможно использование метода энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии – аналитическая методика элементного анализа твердого вещества, где с помощью пучка электронов определенной энергии возбуждают атомы изучаемого образца, которые при этом излучают характерное для каждого химического элемента рентгеновское излучение [84].

Гравиметрический анализ костной ткани используется для оценки изменения массы костных образцов при дегидратации, деорганификации, а также для определения плотности объемной массы кости при различных физико-химических состояниях.

Метод лазерной масс-спектрометрии обладает высокими аналитическими характеристиками и позволяет одновременно анализировать пробу по всему элементному составу, а также осуществлять безэталоный элементный анализ одновременно в широком диапазоне масс от водорода до урана, не прибегая при этом к сложной пробоподготовке. Метод основан на анализе состава ионов, получаемых при взаимодействии лазерного излучения с исследуемым образцом. Вынос массы вещества при исследовании образцов составляет около 3×10^{-7} г [3, 34].

Таким образом в настоящее время существует значительное количество методов изучения костной ткани, каждый из которых, обладая определенными достоинствами и недостатками, может быть использован в зависимости от целей исследования.

1.5. Способы деминерализации и деорганификации костной ткани

Деорганификация

В ранее проведенных исследованиях установлено, что обработка образцов кости окислителями (гипохлорит натрия) позволяет полностью удалить органические компоненты, сохранив в то же время структуру и пространственную организацию минеральной фазы. Такие депротеинизированные костные образцы характеризуются пористой структурой и их прочность составляет 20-30% исходной прочности нативных костных образцов [23, 121].

Таким образом, деорганифицированная костная ткань характеризуется достаточно высокой прочностью, она лишена органических компонентов и не обладает антигенной активностью. Заживление костной раны при применении деорганифицированной костной ткани происходит быстрее, чем при применении нативных образцов гомокости [122].

Деминерализация

Деминерализованные костные имплантаты, используемые как без добавок, так и в сочетании с различными стимулирующими и бактерицидными препаратами, используют для стимуляции репаративного остеогенеза, так как обладают высокими имплантационными качествами в том числе, благодаря наличию в них так называемых костно-морфогенетических белков [23], которые чувствительны к физико-химическим воздействиям в процессе заготовки имплантатов и удаления минеральной фазы из костной ткани. Деминерализующий агент должен эффективно и быстро удалять из кости минеральные компоненты и максимально сохранять при этом полезные свойства костно-морфогенетических белков [9, 85, 91].

Из большого списка органических и неорганических кислот, использованных для этой цели – хлористоводородная и бромистоводородная кислота получили широкое распространение [91, 92]. При этом рН бромистоводородной кислоты выше, чем рН тех же разведений хлористоводородной кислоты. Учитывая, чувствительность костных морфогенетических белков к реакции среды, можно полагать, что

бромистоводородная кислота меньше повреждает белки костного матрикса, чем хлористоводородная кислота, используемая в тех же условиях и в тех же концентрациях [92].

Для удаления минеральной фазы кости применяют и другие деминерализующие агенты, такие как 1, 5, 10% растворы азотной и уксусной кислот, 10% раствор ЭДТА на боратном буфере с $\text{pH}=7,1-7,3$. Это позволяет корректировать сроки деминерализации в зависимости от типа раствора и его концентрации. Так, полная деминерализация небольших костных образцов при воздействии ЭДТА происходит в среднем за 100 суток, в 10% растворе азотной кислоты – за 25 часов, в 10% растворе уксусной кислоты – за 85 суток [27].

С целью ускорения процесса деминерализации больших костных фрагментов может быть предложен способ, основанный на использовании концентрированных 1,2-2,4-3,6 н. растворов соляной кислоты с соотношением объема костной ткани к объему раствора 1:5 или 1:7. При таком способе максимальные сроки деминерализации при температуре $(5-7)^{\circ}\text{C}$ не превышают 4-5 суток, оптимальные – (2-3) дня [91].

1.6. Клинические аспекты и механизмы восстановления костной ткани

При лечении повреждений кости необходимо обеспечить решение следующих основных задач:

- добиться быстрого заживления;
- восстановить утраченные функции;
- сохранить пространственную структуру;
- избежать осложнений, в том числе инфекционных [114, 130].

Виды лечения могут быть нехирургическими или хирургическими. Так как, каждый перелом – это сочетание всевозможных факторов, именно от выбора вида и способа лечения зависят полнота и качество выполнения вышеперечисленных задач при заживлении перелома. Фиксирование с помощью слепка из гипса или с помощью пластмассового фиксирующего устройства является нехирургическим видом лечения. Хирургические виды лечения разделяются на внешнюю фиксацию

перелома и внутреннюю фиксацию, требующую открытия участка перелома. В случае внешней фиксации перелома, фрагменты кости удерживаются посредством шпилек, установленных через кожу в скелет, которые упираются на внешние стержни фиксирующей конструкции. В случае внутренней фиксации перелома фрагменты кости крепятся при помощи проволок, винтов, пластин и т.п., которые должны отвечать требованиям: биосовместимости, достаточной прочности и коррозионной устойчивости [114, 135].

При фиксации перелома и, как следствие, изменения в виде статического и динамического напряжения, приложенного к костным фрагментам, кость может адаптироваться к новой механической среде путем изменения равновесия между остеогенезом и остеоклазисом. Для успешного заживления перелома необходимо, чтобы статическое и динамическое напряжения не превышали нормального физиологического уровня, в таком случае равновесие отклоняется в направлении образования костной ткани [114].

В зависимости от механической среды (полный или неполный перелом) окружающей перелом костной ткани, существуют различные механизмы восстановления кости. Неполные переломы или трещины допускают только микроперемещение между фрагментами перелома. При этом заживление происходит без мозолей по линии перелома или с их небольшим количеством и это называется первичным заживлением. Полные переломы генерируют макроперемещение и являются нестабильными, поэтому заживают с мозолью, выходящей по бокам кости. Этот процесс называется вторичным заживлением [137].

Ортопедические металлы и устройства для фиксации перелома

Металл, используемый в ортопедии, должен обладать необходимыми механическими и физическими свойствами для выполнения своей функции, не должен корродировать и иметь необходимый срок службы. Нержавеющая сталь, кобальтохромовые и титановые сплавы являются наиболее подходящими, имеют оптимальное сочетание прочности и жесткости, инертность, память формы и сверхупругость [123].

Нержавеющая сталь с добавлением никеля (12-14) %, хрома (17-20) % и молибдена устойчива к коррозии в богатых солью жидкостях организма. Нержавеющие стали, как правило, используют для временных имплантатов. Кобальтохромовые сплавы являются очень устойчивыми в соляных растворах организма, а кованный кобальтохромовый сплав обладает усталостной прочностью и прочностью на растяжение. Значительным преимуществом сплавов с титаном является их устойчивость к коррозии, однако плохая прочность на сдвиг и усталостная чувствительность к надрезам делают их менее предпочтительными для некоторых типов устройств фиксации [123, 127].

В хирургии используют следующие устройства для фиксации перелома: проволоки, штифты, винты, пластины, интрамедуллярные гвозди. Хирургические проволоки используются для закрепления больших фрагментов костей, а также для придания стабильности при длинных косых или спиральных переломах трубчатых костей. Штифты необходимы прежде всего для фиксации фрагментов кости для направления больших винтов во время их введения в кость. Винты – устройства, которые наиболее широко применяют для фиксации кости. Основные случаи применения костных винтов – закрепление фрагментов кости и присоединение металлической пластины к кости. Существуют пластины разных форм и размеров для облегчения фиксации фрагментов кости. Они могут быть как жесткими, так и относительно гибкими, предназначенными для уменьшения физиологической нагрузки на кость. Интрамедуллярные устройства (гвозди) используют в качестве внутренних стоек для стабилизации переломов длинных костей. По сравнению с пластинами гвозди лучше противостоят разнонаправленному сгибанию, поскольку располагаются в центре кости, однако их сопротивление воздействию скручивающих усилий меньше сопротивления пластин [114, 134].

Потребность в имплантатах из материалов, предназначенных для замены костной ткани, может возникнуть в ряде случаев, когда количества кости пациента недостаточно и невозможно применение устройства для внутренней фиксации перелома.

1.7. Материалы, используемые при замене костных фрагментов

В настоящий момент не создан материал, который сочетал бы в себе биологические и прочностные характеристики, близкие к костной ткани. Однако, частично удается решить данную проблему, подбирая в каждом конкретном случае подходящий, заменяющий костный дефект материал. Биосовместимые или нетоксичные для организма материалы делятся на три класса: биоинертные, рассасывающиеся и биоактивные [114]. Примеры биоинертных материалов – окисел алюминия медицинской марки, окисел циркония, нержавеющие стали, высокоплотный полиэтилен [122, 134, 138]. Рассасывающиеся материалы – растворяются в жидкостях организма и выводятся через почки. Это полимеры – полигликолевая и полимолочная кислоты, некоторые виды биокерамики, в частности, фосфаты кальция [114]. Биоактивные материалы стимулируют биологическую реакцию организма и бывают остеокондуктивные и остеопродуктивные. Остеокондуктивные материалы стимулируют рост костной ткани по поверхности биоактивного материала, это – синтетическая гидроксилapatическая керамика и трикальцийфосфатная керамика. Остеопродуктивные материалы стимулируют рост костной ткани на материале в направлении от стыка кость/имплантат и это могут быть – биоактивные виды стекла [114, 120, 129, 132].

Основные современные материалы для имплантации и замены костной ткани:

- синтетические полимеры – полиортоэстер, полиангидрид, полимолочная кислота;
- керамические – коралл (природный биоматериал), сульфат кальция, бета-трикальцийфосфатная керамика (синтетический биоматериал);
- искусственные биоконпозиты – смесь двух фаз (полимер и керамика, гидроксилapatит и полиэтилен, костный коллаген, насыщенный костными сульфатированными гликозаминогликанами) и более, связанных вместе так, что передача напряжения происходит по их границе;

- органические материалы – деминерализованный костный матрикс, костный матрикс с удаленной органической фазой, коллаген, фибриновый клей, фибрин-коллагеновая паста [65, 79, 81, 114, 120].

Полимеры широко используются для медицинских устройств и имплантатов. Из синтетических полимеров в настоящее время перспективными являются резорбируемые синтетические имплантаты, изготовленные из полиортоэстера, которые в минимальной степени вызывают появление воспалительных реакций окружающих тканей, не угнетают остеогенез, резорбируясь почти полностью в течение 4-х недель, однако отдаленные результаты применения этого материала неизвестны, что пока ограничивает применение полиортоэстера в клинике [79].

В настоящее время в имплантологии широко применяются следующие виды керамических биоматериалов: гидроксиапатиты, трикальцийфосфат, кальцийфосфат. Они различаются по химическому составу, пористости и размерам гранул. Керамика в биоимплантологии имеет как положительные, так и отрицательные свойства. К положительным следует отнести хорошую остеокондуктивность (проращение имплантатов соединительной тканью и сосудами) и прочную интеграцию гранул керамического материала с костной тканью. К отрицательным свойствам керамики - длительную резорбцию имплантата, что может привести как к нарушению остеогенеза, так и к переломам в области керамического имплантата [18, 119].

Среди синтетических материалов большой удельный вес приходится на биокерамические материалы на основе гидроксиапатита [121]. Так, отечественными учеными в последние годы разработаны технологии синтеза пористой кальций-фосфатной керамики. Этот материал имеет микрорельеф поверхности, который способствует хорошему прикреплению и пролиферации клеток, адгезии протеинов, эффективности прорастания сосудов и нервных окончаний, а также хорошую остеокондуктивность и биосовместимость. Однако, как и все керамические биоматериалы, обладает недостаточной скоростью резорбции и слабыми прочностными свойствами [101].

Керамический биоматериал природного происхождения – кораллы. Они на 98% состоят из карбоната кальция. Природные кораллы превосходят кальций-фосфатную керамику по пористости, наличию пор и механическим характеристикам и имеют большую скорость биорезорбции [101]. Подобные физико-химические характеристики в сочетании с биологическими свойствами природных кораллов позволяют рассматривать этот природный материал для получения имплантатов.

Обычно биокерамика сочетается с полимерами и металлами, эффективно образуя композитные материалы с усиленными механическими свойствами и упругими константами, соответствующими кости. Композитные материалы обеспечивают сочетание свойств, которые не могут быть обеспечены с помощью материалов, имеющих одну фазу [114]. Известным примером является – стекловолокно, в котором кристаллизованные волокна стекла (стеклокерамика) придают жесткость полимерному компоненту. Однако, используя в качестве имплантата стекловолокно, существует риск выхода имплантата из строя из-за биораспада полимера и потери связи между полимером и стеклокерамикой. Искусственные биокомпозиты должны соответствовать свойствам живых тканей и быть биосовместимыми – это основная проблема при разработке имплантатов из композитных материалов [138].

Идеальный материал для имплантации, по мнению некоторых авторов, должен иметь способность к биодеградации, замещению новообразованной костью в течение 6 недель [79]. Имплантат из такого материала должен полностью резорбироваться, способствовать прорастанию кровеносных сосудов и костеобразованию, быть инертным по отношению к окружающим тканям [18, 78].

Материалом для имплантатов, в наибольшей степени отвечающим вышеуказанным требованиям и сочетающим в себе остеокондуктивные и остеоиндуктивные свойства, пористость и способность к быстрой биорезорбции, является деминерализованный костный матрикс [77, 85]. Деминерализованный костный матрикс имеет значительную пористость, хорошо резорбируется при помещении в костный дефект, т.к. его волокнистая основа есть естественный

субстрат в механизмах резорбции костной ткани, существующих в организме [98]. Длительность резорбции имплантируемого деминерализованного костного матрикса можно предопределять степенью деминерализации исходной нативной кости [95, 97]. К 10-12-му дню отмечается прорастание сосудов в имплантате и дифференцировка остеобластов и, в течение 6 месяцев, костный деминерализованный трансплантат заменяется костной тканью хозяина [18, 94].

Микропористая структура деминерализованного костного матрикса действует как шаблон или матрица для роста ткани в трех измерениях и стимулирует ткань регенерировать в заданной форме. Взаимосвязанная сеть каналов и микроканалов ткани деминерализованного костного матрикса позволяет клеткам мигрировать и способствовать росту ткани на всем протяжении имплантата. При имплантации пористая структура имплантата должна быть соединена так, чтобы кровь могла проникать для обеспечения питательных веществ [21, 22, 114, 128].

Деминерализованный костный матрикс служит не только шаблоном для роста ткани и резорбируется, но также активирует клетки ткани для саморегенерации. Костный матрикс действует в качестве системы доставки и выхода веществ, активирующих клетки и гены, а также усиливающих деление клеток и синтез внеклеточного матрикса кости [97, 111].

Таким образом, деминерализованная кость является весьма перспективным костно-пластическим материалом, пригодным для внедрения в клинику [94].

Анализ данных литературы показал, что в настоящее время для пластики костных дефектов традиционно применяются имплантаты из синтетических, природных и искусственных материалов, которые имеют как ряд преимуществ, так и недостатки. Дальнейшие поиски биогенных материалов привели к идее создания имплантатов из органической фазы костной ткани с антимикробными свойствами, что дает возможность их надежного применения в инфицированных ранах с нарушением целостности соединительной ткани.

1.8. Основные требования к костным имплантатам и способы их изготовления

Общепринятые на сегодняшний день требования к костным имплантатам следующие:

- безопасность в плане передачи инфекционных заболеваний;
- низкая вероятность иммунологического конфликта;
- высокая остеоиндуктивная потенция;
- удобство хранения, транспортировки и применения;
- постоянная доступность [67, 68, 69].

В зависимости от поставленных задач существуют различные технологии изготовления костных имплантатов.

Известен способ изготовления аллотрансплантата, включающий механическую обработку полученной от донора заготовки из костной ткани, промывку ее холодной водой, деминерализацию в 1,2-3,6 н растворе соляной кислоты, промывку деминерализованной заготовки в дистилляте и физиологическом растворе, стерилизацию и консервацию заготовки путем помещения и выдерживания ее в герметичной упаковке, залитой раствором формальдегида с добавкой антибиотика [56, 97, 98].

Существует способ изготовления имплантатов из губчатой костной ткани, включающий измельчение кости, промывку водой, стерилизацию и консервацию. При этом костные фрагменты погружают в 6 %-ый раствор перекиси водорода на 48 часов при соотношении один объем костных фрагментов на четыре объема раствора перекиси водорода со сменой раствора каждые 12 часов. Далее костные фрагменты подвергают центрифугированию, затем погружают их в смесь этанола с хлороформом в соотношении 1:1 на 48 часов при соотношении один объем костных фрагментов на четыре объема раствора перекиси водорода со сменой раствора 4 раза через каждые 12 часов, повторно центрифугируют костные фрагменты, проветривают на воздухе 24 часа, после чего фрагменты замораживают при температуре – 70°C в течение 24 часов, по истечении этого времени их подвергают лиофилизации в течение 48 часов с достижением

остаточной влажности 5%, а после этого упаковывают в стандартный двойной пакет и стерилизуют потоком быстрых электронов дозой (18 ± 5) кГр на ускорителе ЛУЭ-8-5М [56].

Также известен способ изготовления костного имплантата, который заключается в последовательно проводимых механической обработке и промывке заготовки из костного вещества, выполнении в заготовке сквозных отверстий, деминерализации в растворе соляной кислоты, нейтрализации остатков кислоты, консервации деминерализованной заготовки посредством лиофилизации, стерилизации после окончания сушки, осуществляемой путем облучения заготовки, помещаемой в герметичную упаковку, пучком ускоренных электронов дозой $(15-18)$ кГр в течение $(16-20)$ секунд [57].

Следующий известный способ получения костного имплантата путем очистки и промывки костной ткани, депротеинизации фрагментов в начале в 0,01% растворе химопсина, затем в 10% растворе перекиси водорода в течение 48 часов, обработки жидким эфиром в течение 6 часов, высушивания и обработки в 10% растворе хлористого лития в течение 16 часов с последующей стерилизацией. Аллогенные или ксеногенные фрагменты длинных трубчатых костей депротеинизируют в растворе химопсина в течение 96 часов, а при обработке 10% раствором перекиси водорода их помещают в переменное магнитное поле при 45°C . Депротеинизацию костного фрагмента размером 5-6 см проводят дважды, а размером более 6 см – трижды [43].

В настоящее время широко применяется способ обработки губчатой костной ткани, включающий в себя отмывку от крови и миелоидного-жирового костного мозга водой, стерилизацию формальдегидом и консервацию замораживанием [40].

Известен способ получения деминерализованного костного матрикса в виде крошки, включающий измельчение кости, обработку фрагментов кости раствором детергента, удаление детергента, обработку смесью спирт-хлороформ (1:1), отмывку водой, лиофилизацию, стерилизацию. Кость распиливают поперечно на фрагменты, проводят обработку фрагментов кости 2% раствором Tween-80 в

течение (12-24) часов дважды, далее обрабатывают смесью изопропанол-хлороформ (1:1) в течение 24-48 часов в ультразвуковой ванне, отмывают водой, полученные фрагменты заливают этиловым спиртом, крошку высушивают и измельчают. Стерилизация проводится радиационным способом на установке ГУ-200, значение поглощающей дозы – 15 кГр [58].

Для замещения дефектов кости применяют известный способ получения биоматериала на основе натурального коралла, очищенного от коралловой пыли и микроорганизмов проточной водой с последующей стерилизацией. Коралл, дополнительно очищенный 3% раствором гипохлорита натрия и ультразвуковым воздействием частотой 40 кГц в течение 3-5 минут, высушивают и стерилизуют гамма-облучением при суммарной дозе 25 кГр [99].

1.9. Современные технологии стерилизации

В настоящее время для целей дезинфекции и стерилизации медицинских инструментов, лабораторного оборудования, сред и биологических объектов используют высокотемпературные технологии, химически активные препараты, ионизирующее, ультрафиолетовое излучения, а также электромагнитное излучение в среде перекиси водорода [96].

Высокотемпературные технологии – дезинфекция и стерилизация осуществляется с помощью паровых, воздушных и газовых стерилизаторов. Стерилизующими агентами газовых стерилизаторов являются: смесь окиси этилена и бромида метила, формальдегид, этиленоксид в смеси с инертными газами. Высокотемпературные технологии характеризуются процессом нагрева и охлаждения и не позволяют провести дезинфекцию температурно-чувствительных (биологических) материалов [72].

Химические реагенты. Степень эффективности обеззараживания химически активными веществами различна и зависит от химической активности дезинфектантов, так и от свойств обрабатываемых материалов. Спектр

обеззараживаемых химическими реагентами биологических материалов значительно уже, к тому же многие дезинфицирующие вещества токсичны.

Излучения. Достаточно эффективным обеззараживающим действием характеризуется радиационное воздействие. Однако, крупным недостатком способа является значительное влияние радиации на остеоиндуктивные свойства имплантатов, а также высокая стоимость используемого оборудования, наличие специально оборудованных радиационно-безопасных помещений. Данные установки требуют высококвалифицированного обслуживающего персонала [117].

Однако при изготовлении и стерилизации костных имплантатов, для достижения наилучшего клинического результата, необходимо одновременно решать несколько задач: сохранить активность костных морфогенетических белков, не разрушить при механическом воздействии поверхность образца и в то же время добиться его стерильности, которая влияет на продолжительность его хранения. Это обусловило необходимость разработки комбинированного способа стерилизации озоно-воздушной смесью с последующим окончательным радиационным облучением герметично упакованных изделий потоком быстрых электронов с относительно небольшой величиной поглощенной дозы (11-15) кГр.

1.10. Сангвиритрин® и его фармакологические свойства

Алкалоиды сангвинарина и хелеритрина (далее – **сангвиритрин**) – оригинальное отечественное лекарственное антимикробное средство растительного происхождения [2, 14, 15]. Лекарственное средство разработано в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений», где с 1968 года проведен комплекс научно-исследовательских работ по интродукции маклей. Разработаны и внедрены современные технологии ее возделывания для получения качественного лекарственного растительного сырья [2, 11, 14, 16]. Сангвиритрин представляет собой препарат, состоящий из двух

трудноразделимых и близких по структуре и по химическому строению алкалоидов – сангвинарина и хелеритрина, и относится к противомикробным средствам растительного происхождения, который применяют в этом качестве с профилактической и лечебной целью у детей и взрослых. Получают это лекарственное средство из надземной части многолетнего травянистого растения маклейи сердцевидной и маклейи мелкоплодной семейства маковых – Papaveraceae [11, 16, 55, 104]. Это многолетние травянистые растения, близкие по морфологической характеристике, химическому составу, биологическим особенностям и накапливающимся в них алкалоидам. В надземной части маклейи накапливается до 2% алкалоидов, основными из которых являются сангвинарин ($C_{20}H_{14}NO_4$), хелеритрин ($C_{21}H_{18}NO_4$), протопин ($C_{20}H_{19}NO_5$), и аллокриптопин ($C_{21}H_{23}NO_5$). В подземной части растения сумма алкалоидов достигает 4% [2].

Сангвиритрин разрешен к применению в качестве антимикробного лекарственного средства в нескольких лекарственных формах для наружного, местного и системного применения [2, 14, 20].

При различных инфекционных осложнениях, острых кишечных инфекциях, заболеваниях, связанных с нарушением нормальной микрофлоры принимают таблетки с кишечнорастворимым покрытием, содержащие 5 мг сангвиритрина для приема внутрь, 0,2% водно-спиртовой раствор; 1% линимент; комплексное, на биodeградируемом полимере, ранозаживляющее средство Санглирен на основе коллагена; лечебно-профилактическая зубная паста; зубной эликсир для ухода за полостью рта; гигиенический лосьон для ухода за кожей лица; антимикробные материалы, пропитанные раствором сангвиритрина, разрешены для наружного и местного применения с профилактической и лечебной целью в хирургии, стоматологии, дерматологии, гинекологии, неонатологии и оториноларингологии [2, 11, 14, 25, 26, 55].

В основе механизма действия препарата лежит свойство алкалоидов, выделяемых из маклейи, подавлять активность бактериальной нуклеазы, нарушать проницаемость клеточных стенок, изменять строение нуклеотида микроорганизмов [2].

Противовирусная активность сангвиритрина выражена незначительно [16, 17].

Антибактериальная и противогрибковая активность сангвиритрина

Ввиду нецелесообразности разделения компонентов препарата сангвиритрина и с целью его стандартизации, в опытах *in vitro* проведено сравнительное изучение противомикробной активности входящих в него алкалоидов. Исследование показало, что алкалоид сангвиритрин не отличается от хелеритрина по своей антимикробной активности. Также при изучении специально приготовленных смесей сангвиритрина и хелеритрина, не выявлено заметных отклонений в их активности [1, 15, 16].

Широкий спектр антибактериальной активности сангвиритрина был неоднократно выявлен и доказан, в том числе проверкой на лабораторных тест-микроорганизмах и клинических штаммах, которые были выделены от больных с разными формами заболеваний и для которых показана моно- и полирезистентность к широко используемым антибиотикам [11, 14, 15].

Фунгистатическая активность сангвиритрина изучена в опытах *in vitro*, где в качестве тест-объектов использовали штаммы патогенных грибов и актиномицетов, а именно: вызывающие поверхностные поражения кожи мицелиальные грибы (*Achorion, Microsporum*), дрожжеподобные грибы рода *Candida* и возбудители микозов (*Cryptococcus, Actynomyces*) [2, 11, 12, 14, 15].

Доклинические исследования также выявили антимикробное действие сангвиритрина как на грамположительные, так и на грамотрицательные бактерии (*Staphylococcus, Streptococcus, Proteus, Pseudomonas, Salmonella, Shigella, Enterobacter, Acinotobacter, Citrobacter, Serratia*), дрожжеподобные и мицелиальные грибы, а так же паразитические простейших [2, 11, 12, 14, 15, 16, 17, 55].

Изучение влияния рН среды со значениями от 4 до 10 на антимикробную активность сангвиритрина показало, что наиболее оптимальной средой для проявления его ингибирующих свойств является слабощелочная и нейтральная среда [14, 15].

В основе противомикробного механизма действия сангвиритрина лежит процесс нарушения проницаемости клеточных стенок, перегородок деления, строения нуклеотида, подавление бактериальной нуклеазы [15].

В опытах *in vivo* установлен высокий терапевтический эффект линимента (0,5 и 1%) и раствора сангвиритрина (0,2% водно-спиртовой раствор) при их местном применении на экспериментальных моделях (инфицированные и ожоговые раны, гнойные язвы, подкожные абсцессы, дерматомикозы, вагинит и др.), при заражении лабораторных животных (белые мыши и крысы, кролики, морские свинки) патогенными микроорганизмами. Результаты оценивали в зависимости от процента выживаемости животных, а также срока заживления инфицированных очагов поражения. Терапевтический эффект превышал действие ряда известных синтетических противомикробных средств и антибиотиков [14, 15, 16].

Клиническое изучение сангвиритрина как противомикробного и противогрибкового средства, как при его наружном применении, так и при приеме внутрь, проведено в 15 лечебных учреждениях. Препарат получали более 1000 больных с хирургическими, стоматологическими, кожными, гинекологическими и оториноларингологическими заболеваниями. Большинство клиницистов отметили хорошую переносимость сангвиритрина в разных лекарственных формах и отсутствие раздражающего действия при длительном нанесении на кожу и слизистые оболочки [14, 15, 16].

Таким образом, клиническое применение сангвиритрина в разных лекарственных формах, как при наружном применении, так и при приеме внутрь, свидетельствует о хорошей переносимости и высокой терапевтической эффективности [15, 17].

Иммуномоделирующие и противовоспалительные свойства сангвиритрина

Наряду с антимикробной активностью сангвиритрина были выявлены и такие его фармакологические свойства, как иммуностимулирующие и противовоспалительные. Доклинические исследования по изучению влияния сангвиритрина на показатели гуморального и клеточного звеньев иммунитета

проведено на лабораторных животных. Препарат вводили внутривентриально и внутривентриально пятикратно в дозах 0,2 и 2,0 мг/кг, 0,5 и 5,0 мг/кг. Проведенные исследования выявили выраженное иммуностимулирующее действие сангвиритрина в диапазоне доз (0,2 – 5,0) мг/кг на гуморальные и клеточные звенья системы иммунитета экспериментальных животных. По степени выраженности иммуностимулирующего действия сангвиритрин не уступает иммуномодулятору левамизолу и превосходит его по широте терапевтического действия [11, 15, 49].

Препарат оказывает противовоспалительное и иммуностимулирующее действие, не проявляет аллергизирующих, мутагенных и тератогенных свойств [11, 14, 49, 50, 116].

Доклиническое изучение противовоспалительного действия сангвиритрина и линимента 1%, а также влияния препарата на динамику процесса заживления ожоговой раны, проводили на модели термического повреждения кожи у мышей самцов с массой тела 22-24 г. У предварительно наркотизированных животных формировали дозированные ожоги, площадь которых составляла 2% поверхности тела мышей. Влияние препарата на регенерацию ожоговых ран у мышей исследовали в 3 сериях опытов: однократное внутривентриальное введение за 60 минут до термического воздействия, внутривентриальное введение препарата начиная с первых суток нанесения ожога и до полного ее заживления, наружное применение линимента сангвиритрина 1% ежедневно, один раз в сутки, начиная со вторых суток после нанесения ожога и до полного ее заживления. Результаты исследования свидетельствуют о том, что при профилактическом однократном применении препарат ослабляет выраженность ожоговой раны, а при лечебном применении ускоряет заживление ожоговых ран, как при внутривентриальном введении, так и при использовании в виде местных аппликаций линимента сангвиритрина 1% [11, 49].

1.11. Изучение безопасности сангвиритрина

В изученных лекарственных формах препарат не оказывает общетоксического и раздражающего действия [14, 50, 116].

Результаты токсикологических исследований выявили у сангвиритрина отсутствие специфических видов токсичности: канцерогенного, мутагенного, иммунотоксического, тератогенного, а также эмбриотоксического действия [14, 16, 50, 51]. В различных лекарственных формах (кишечнорастворимые таблетки, линимент, раствор для наружного применения) сангвиритрин не обладает общетоксическим и местнораздражающим действием [15].

При исследовании хронической токсичности сангвиритрина, в условиях 90-дневного эксперимента, при введении препарата в различных дозах в желудок крысам, не выявлено кардиотоксического и повреждающего действия препарата на функциональное состояние центральной нервной системы по всем исследованным тестам [11].

Изучение токсичности готовых лекарственных форма сангвиритрина (спиртовой раствор 0,2% и линимент 1%) проводили на крысятах 3-недельного возраста. Спиртовой раствор 0,2% и линимент 1% в течение восьми недель наносили на депилированный участок кожи. Исследования показали, что аппликации не изменяли основные интегральные показатели крысят. В течение всего срока эксперимента животные сохраняли двигательную активность, аппетит и нормально развивались. На депилированной кожи крысят в местах аппликаций не установлено признаков ее раздражения. Также не выявлено влияния изучаемых лекарственных форм на биохимические и гематологические показатели, на активность изученных ферментов сыворотки крови крысят. Длительное нанесение лекарственных форм (спиртовой раствор 0,2% и линимент 1%) на депилированную кожу не нарушало динамику мочеотделения у крысят, по сравнению с контролем, что свидетельствует об отсутствии влияния препарата на выделительную функцию почек неполовозрелых животных [11].

Экспериментальная оценка безопасности сангвиритрина в качестве асептического средства, применяемого для пропитки перевязочного материала и

белья для новорожденных также была проведена на крысятах 3-недельного возраста. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии токсического действия извлечений сангвиритрина на организм развивающихся животных как при аппликациях на кожу, так и при подкожном применении [6, 11].

Проведенные исследования потенциальной репродуктивной токсичности сангвиритрина на крысах, находящихся на 19-ом дне беременности, свидетельствуют о том, что препарат в испытанных дозах 5 и 50 мг/кг не обладает эмбриотоксическими и тератогенными свойствами [11].

Потенциальные канцерогенные свойства сангвиритрина, используемого в качестве асептического средства для пропитки перевязочного материала, изучены в рамках программы доклинического изучения безопасности препарата на белых нелинейных мышах, путем имплантирования перевязочного материала размером 0,5x0,5 см, обработанного сангвиритрином. Анализ результатов исследования свидетельствует о том, что сангвиритрин, высвобождающийся из пропитанного им перевязочного материала, имплантируемого под кожу мышей, не увеличивает количество опухолей, степень их злокачественности, не влияет на их локализацию и сроки появления, по сравнению с контролем [50].

1.12. Сангвиритрин в хирургии

В качестве наружного антимикробного средства сангвиритрин применяют в хирургии при инфицированных ожогах, длительно незаживающих ранах и язвах. Водными растворами препарата промывают раны и язвы, накладывают повязки на раневую поверхность. Линимент сангвиритрина применяют при длительно незаживающих ранах и язвах [11, 15].

Положительные результаты при использовании сангвиритрина получены у 185 хирургически прооперированных больных в возрасте от 25 до 73 лет в НИИ трансплантологии и искусственных органов МЗ РФ, а также у 22 больных с длительно незаживающими ранами и язвами при наружном применении водно-спиртового раствора 0,2% в Клинике общей хирургии педиатрического

факультета РГМУ. Еще большая эффективность препарата, ускорение заживления и регенерация ран достигалось при одновременном применении обеих лекарственных форм сангвиритрина (обработка раны раствором 0,2% с последующим наложением повязки с линиментом 1%) [11].

Фармакотерапевтическая эффективность сангвиритрина была доказана в опытах *in vivo*. При системном применении эффективность лекарственного средства изучали на экспериментальных моделях бактериального и кандидозного сепсиса, а при наружном и местном применении – с использованием экспериментальных моделей локализованных гнойно-воспалительных инфекций (гнойные язвы, инфицированные раны, ожоговые раны, подкожные абсцессы) [11, 14, 15].

ФГБНУ ВИЛАР разработал и запатентовал оригинальный препарат – Санглирен, представляющий собой раневое покрытие на биodeградируемой основе, в котором в качестве антимикробного компонента содержится сангвиритрин. Основные компоненты препарата – коллаген, сангвиритрин, вода, масло расторопши, глицерол [7, 8, 11]. Доклиническое изучение репаративных свойств Санглирена проводили в опытах *in vivo* на модели экспериментального термического ожога у 20 половозрелых белых мышей массой 18-20 г. Установлено, что полное заживление ран у животных, леченных санглиреном, наступало раньше, чем в контроле [11]. Результаты доклинического изучения Санглирена показали, что препарат обладает высоким лечебным эффектом, в том числе и при применении на инфекционный очаг, вызванный патогенными микроорганизмами с высокой степенью лекарственной резистентности [8, 11, 13, 14].

Клинические исследования Санглирена, как антимикробного ранозаживляющего средства, проводили в Ожоговом Центре и 2-ом отделении неотложной травматологии опорно-двигательного аппарата НИИСП им. Н.В. Склифософского. Пластины Санглирена накладывали на поверхность ожога или колото-резаной раны и фиксировали. Применение препарата при хирургических и

посттравматических ранах приводило к более быстрой краевой эпителизации, заживлению ран и снятию швов [8, 11].

Все вышеперечисленные свойства сангвиритрина и препаратов на его основе позволяют рассматривать это лекарственное средство в качестве перспективного активного вещества для создания имплантационных препаратов, а также биоимплантологической адсорбционной лекарственной формы на основе деминерализованного костного матрикса с необходимыми антимикробными свойствами за счет иммобилизации сангвиритрина.

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Объект исследования

Для отработки и экспериментальной апробации биотехнологических методов и приемов получения костных имплантатов, проверки качества, оценки их безопасности отобрали компактное вещество диафиза бедренной кости клинически здоровой особи (бык, возраст от 1,5 до 2 лет, посмертный период – 2,5 часа - Рисунок 1). Известно, что получение деминерализованных имплантатов с обеспечением необходимой механической прочности из губчатой кости невозможно, что вызывает необходимость использования кортикальной кости [68].



Рисунок 1 - Бедренная кость быка

В качестве лекарственного средства для его иммобилизации на естественных поверхностях деминерализованного имплантата использовали субстанцию - сумма бисульфатов двух близких по структуре и физико-химическим свойствам четвертичных бензо[с]фенантридиновых алкалоидов сангвинарина (I $2R=CH_2$) и хелеритрина (II $R=Me$) (в виде моногидратов), от которых происходит торговое название медицинского препарата – Сангвиритрин® (далее – **сангвиритрин**) - противопротозойное, противогрибковое, бактериостатическое, антибактериальное средство растительного происхождения [11, 110, 113].

Получают это лекарственное средство из надземной части многолетнего травянистого растения маклейи сердцевидной и маклейи мелкоплодной семейства маковых – Papaveraceae [2, 11]. Субстанция представляет собой кристаллический порошок от светло-желтого до темно-оранжевого цвета, без запаха, горького вкуса, хорошо растворим в воде при нагревании до 50°C [110]. Производитель: ВИЛАР (Россия), Фармакопейная статья ФС 42-2444-98 (Рисунки 2, 3).



Рисунок 2 - Субстанция алкалоидов сангвинарина и хелеритрина

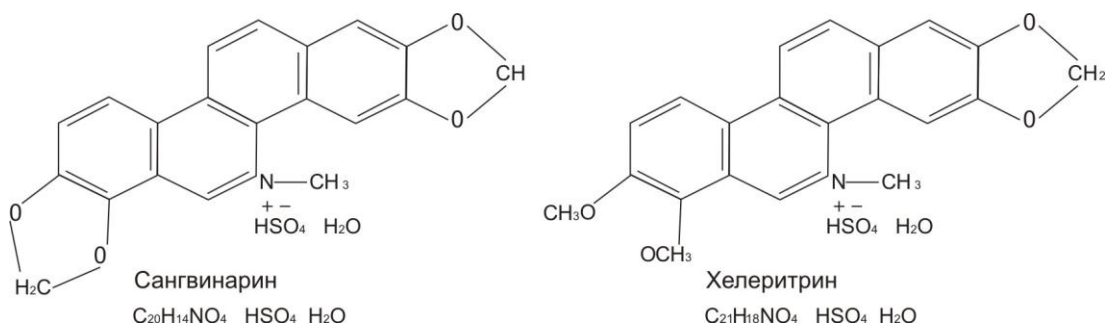


Рисунок 3 - Структура сангвинарина и хелеритрина

Фармацевтическая эффективность сангвиритрина была неоднократно доказана в опытах *in vivo* и клинических исследованиях [11, 14, 15, 16, 17].

2.2. Методы исследования

Биотехнологические методы и приемы получения костных заготовок

Костная ткань, как природный биокompозит, отличается хорошей обрабатываемостью при использовании традиционных методов механической

обработки – точения, фрезерования [39, 53, 63]. Это свойство позволило получить костные заготовки различной формы, размеров независимо от их ориентации по отношению к главным осям анизотропии. Существует возможность изготовления продольных, тангенциальных (трансверсальных) и радиальных заготовок цилиндрической формы из трубчатых костей, в частности, бедренной.



Рисунок 4 - Цилиндрические полые фрезы различных диаметров

Заготовки цилиндрической формы получали из фрагментов компактного вещества диафиза бедренной кости быка по разработанной в НИЦ БМТ ФГБНУ ВИЛАР технологии с использованием цилиндрических полых фрез (Рисунок 4).

При получении образцов необходимых размеров, а также обеспечения качества торцевых поверхностей использовали прецизионный отрезной станок IsoMet 4000 Linear Precision Saw (Buehler, Германия), оснащенный отрезными дисковыми фрезами толщиной 0,3 мм с режущей частью, выполненной с использованием алмазного напыления (Рисунки 5, 6). При этом механическая обработка костного фрагмента осуществляли в охлаждающей рабочей жидкости, в качестве которой использовали охлажденный до температуры $+(4 - 6)^{\circ}\text{C}$ раствор 0,9% натрия хлорида.



Рисунок 5 - Прецизионный отрезной станок IsoMet 4000 Linea Precision Saw



Рисунок 6 - Дисковая фреза с алмазным напылением на режущей части

Продолжительные механические воздействия, трение обрабатывающего инструмента с поверхностью костного образца, могут приводить к заметному повышению температуры в зоне контакта. Непродолжительное действие повышенной температуры может оказывать отрицательное термическое воздействие на костную ткань [39, 53]. С целью исключения нагрева кости в процессе обработки экспериментальным путем установлена оптимальная скорость резания (количество оборотов фрезы и скорость подачи). Резание выполняли за один проход с погружением фрезы в охлаждающую среду.

Данный метод разделения минерализованной ткани позволил получить качественную поверхность костных образцов на срезах, не требующую

дополнительной обработки и полировки для последующего морфологического анализа с использованием световой и сканирующей электронной микроскопии.

Деминерализация

Удаление минеральной фазы костных имплантатов производили с целью улучшения их остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств, а также увеличения объема системы внутрикостных пространств для последующей иммобилизации на естественных поверхностях деминерализованного костного матрикса лекарственного средства. Это позволяет получать имплантаты с различными свойствами, в т.ч. антимикробными, что дает возможность их использования в реконструктивно-восстановительной хирургии с целью восстановления соединительной ткани при наличии гнойных ран.

Для удаления минеральной фазы и получения деминерализованного костного матрикса проводили деминерализацию образцов путем их инкубации в растворе соляной кислоты $0,8 \text{ моль/дм}^3$, $t = 20^\circ\text{C}$ при объемном соотношении образец/раствор - 1/100.

Стерилизация и проверка обсемененности (контаминации)

Микробы, перенесенные имплантатом, могут вызвать заболевания реципиента, изменить приживление имплантата и часто приводят к его элиминации [44].

В использованы оригинальные методики стерилизации костных имплантатов:

- озono-кислородной смесью;
- стерилизация на основе сочетанного воздействия озono-кислородной смеси и радиации.

Пористость и система внутрикостных пространств костной ткани позволили использовать стерилизацию имплантатов с использованием газовой среды.

Перед механической обработкой кости проводили стерилизацию костных образцов методом озоновой стерилизации - обработкой в проточном режиме озono-кислородной смесью с концентрацией 6-8 мг/л в течение 7-10 минут. Достоинства данного метода стерилизации: имеет низкотемпературный режим,

короткую экспозицию, глубокое проникновение в материал, возможность стерилизации термо-неустойчивых изделий (бумажных изделий и белья, оптических деталей, изделий из полимера и стекла), большой объем стерилизационной камеры, не обладает токсичностью, безопасен для окружающей среды. Такие возможности озонной стерилизации экспериментально подтверждены ранее, запатентована технология изготовления костных имплантатов, составной частью которой является осуществление стерилизации костных фрагментов озono-кислородной смесью [100] (Патент Российской Федерации на изобретение №2526429 от 30.06.2014 г Способ изготовления костных имплантатов / Быков В.А., Розанов В.В., Матвейчук И.В., Пантелеев В.И., Шутеев С.А., Литвинов Ю.Ю., Воротников А.И.; заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»).

Следует подчеркнуть, что необходимость первичной стерилизации костных заготовок до начала их механической обработки диктуется стремлением обеспечить безопасность персонала, непосредственно контактирующего с костным материалом, на протяжении всего процесса изготовления имплантата до финишной стерилизации.

Для получения озono-кислородной смеси использовали промышленный генератор медицинского озона типа А-с-ГОКСф-5-02-ОЗОН (ОАО «Электромашиностроительный завод «Лепсе», г. Киров, Россия), а также концентратор кислорода Vision Aire (США). Для контроля реального текущего значения концентрации озono-кислородной смеси во время обработки костных образцов применяли Измеритель концентрации озона ИКО – 50 (ОАО «Электромашиностроительный завод «Лепсе», г. Киров, Россия) (Рисунок 7.)

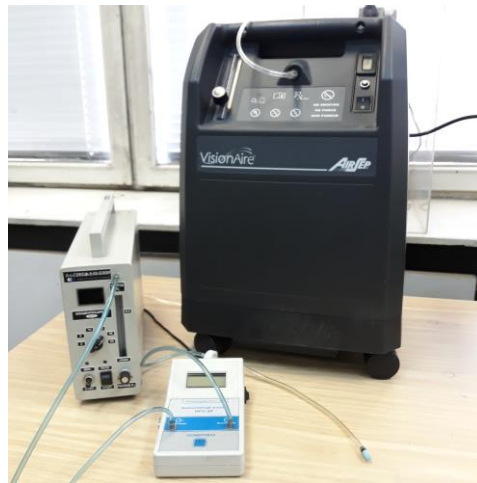


Рисунок 7 - Генератор озона, концентратор кислорода и измеритель концентрации озона

Стерилизацию костных имплантатов на завершающем технологическом этапе осуществляли комбинированным методом – стерилизация имплантатов и упаковки озono-кислородной смесью с последующим радиационным облучением с величинами поглощенной дозы 10 и 15 кГр. При указанных дозах не происходит негативного воздействия на морфологию образцов, функциональный потенциал морфогенетических белков и остеиндуктивные свойства костного материала [73, 100].

Облучение образцов проводили в Научно-исследовательском институте ядерной физики МГУ имени М.В. Ломоносова (НИИЯФ МГУ) на линейном ускорителе электронов непрерывного действия с энергией 1 МэВ с мощностью пучка до 25 кВт [73, 100].

Дозиметрический контроль поглощенной дозы ионизирующего излучения осуществляли с помощью пленочного детектора-дозиметра СО ПД(Ф)Р-5/50 (ГСО 7865-2000) по методике, приведенной в инструкции по использованию детектора.

Для герметичной упаковки образцов использовали термоаппарат F70-400 (Нидерланды), позволяющий осуществлять герметизацию двухслойной термопленкой DGM Steriguard (Рисунок 8.)

Полученные данные с учетом данных проведенного патентного поиска подтвердили новизну и патентоспособность данного способа и явились

основанием для оформления Патента Российской Федерации на изобретение (патент № 2630464 от 08 сентября 2017 г. Комбинированный способ стерилизации костных имплантатов / Матвейчук И.В., Розанов В.В., Гордонова И.К., Никитина З.К., Сидельников Н.И., Литвинов Ю.Ю., Николаева А.А., Черняев А.П., Пантелеев И.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»).

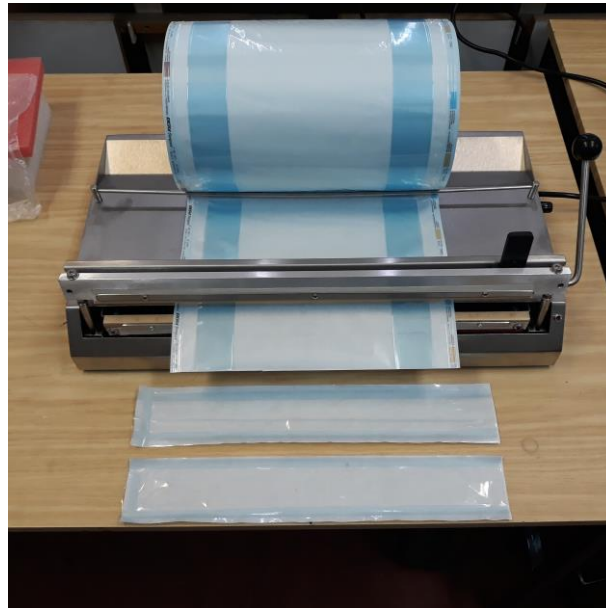


Рисунок 8 - Термоаппарат для герметичной упаковки

Проверка микробной контаминации имплантатов после из стерилизации:

- озono-кислородной смесью;
- радиацией с дозами поглощения 10, 15, 20, 25 кГр;
- комбинированным способом стерилизации (озono-кислородная смесь + радиация с дозами поглощения 10, 15 кГр).

Для проверки микробной контаминации имплантатов аэробными, анаэробными бактериями и микроскопическими грибами проводили микробиологическое исследование с использованием питательных сред: тиогликолевая среда и среда Сабуро.

Морфологические исследования

Исследования проводили с использованием оборудования:

1. Электронный медицинский универсальный световой микроскоп Nikon Eclipse 80i (Nikon, Япония) с объективами для светлого и темного полей 4x, 10xDIC, 20xDIC, 40xDIC, 60xDIC, 100xDIC, окуляры 10x/25 с независимой диоптрийной настройкой.



Рисунок 9 - Микроскоп Nikon Eclipse 80i

2. Микровизор mVizo-103 (ОАО Ломо, Россия) с цифровым дисплеем и объективами 4x/0,10; 10x/0,25; 40x/0,65.



Рисунок 10 - Микровизор mVizo-103

3. Сканирующий электронный микроскоп Phenom XL (Phenom-World, Нидерланды), позволяющий осуществлять неразрушающий контроль качества обработки и микроструктуру образцов непосредственно после пробоподготовки, в нативном состоянии. Данная модель микроскопа (настольный вариант) обеспечивает исследование образцов с высокой скоростью – 30 секунд с момента загрузки образца до получения изображения с высоким разрешением. Достоинством его является возможность анализа как с токопроводящими, так и с токонепроводящими образцами, чувствительными к нагреву и электронному пучку, без необходимости дополнительной пробоподготовки (напыление).

Разрешающая способность модели Phenom XL: 10 нм, диапазон увеличения: 20 – 150000х, ускоряющее напряжение с возможностью регулирования диапазона от 4,8 до 15 кВольт. В исследовании использовали ускоряющее напряжение 15 кВольт.

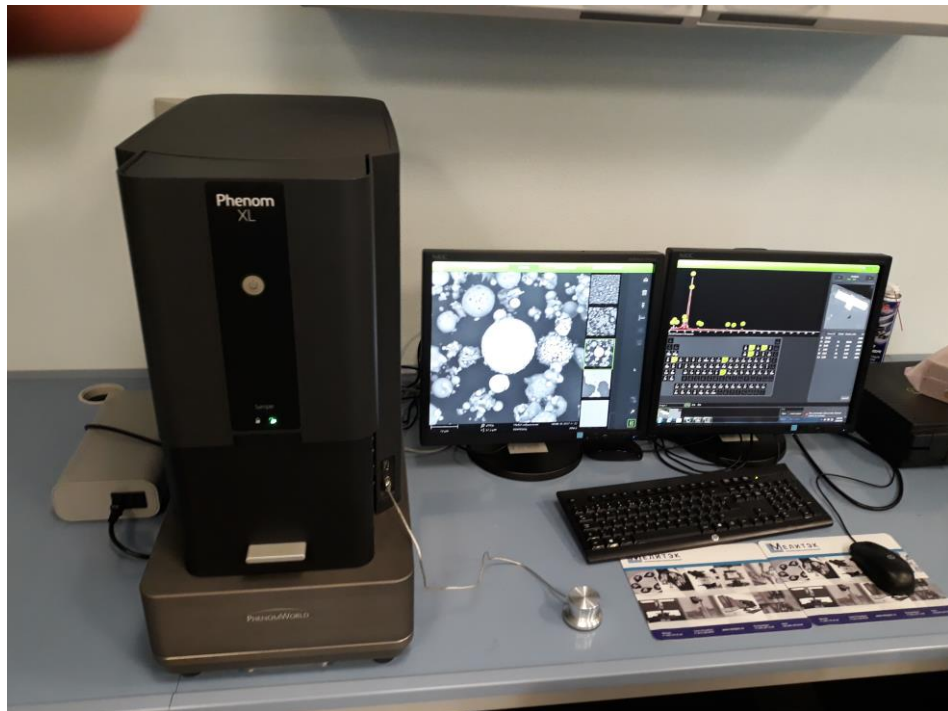


Рисунок 11 - Настольный сканирующий электронный микроскоп Phenom XL

Модель сканирующего электронного микроскопа Phenom XL укомплектована детектором интегрированной энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии (ЭДС), что позволили одновременно определять

элементный состав образцов, концентрацию элементов и их распределение в разных точках образца.

4. Профессиональный 3D-сканер StereoSCAN 5M (Breuckmann, Германия) применили для фрактографического анализа кости. С помощью бесконтактного неразрушающего 3D-контроля (стереосканирование) оценивали макро- и микрорельеф эндостальной и периостальной поверхностей фрагментов диафиза бедренной кости быка, контролировали нарушение сплошности кости (наличие разрушений, трещин), используемой для получения имплантатов. Данный метод прецизионного 3D-сканирования применен в подобных исследованиях впервые. Он позволил без предварительной физико-химической пробоподготовки провести первичную оценку и контроль внешнего состояния кости, проанализировать особенности структуры поверхностного слоя эндостальной и периостальной поверхностей диафиза. При этом сохраняются исходные свойства и исключаются повреждения структуры поверхностного слоя исследуемого материала.

3D-сканирование – процесс определения координат точек, принадлежащих поверхностям физических объектов, с целью последующего получения их высокоточных детализированных объемных моделей. Их возможно анализировать в специализированных CAD-системах для автоматизированного проектирования. Принцип действия системы основан на проецировании структурного света на сканируемый объект. Контрастное изображение, спроецированное на объект, искривляется, что дает возможность воссоздать его объемную форму.

3D-сканер stereoSCAN 5M имеет две ассиметрично расположенные цифровые камеры и проецирующее устройство. Это дает возможность сканирования труднодоступных областей. 3D-StereoSCAN позволяет сканировать область по диагонали от 750 до 60 мм. При использовании оптических линз, позволяющих сканировать область по диагонали 60 мм, точность сканирования составляет $\pm 0,017$ мм, детализация 0,025 мм. Система работает с использованием управляющего программного обеспечения - ОРТОСАТ 2007.



Рисунок 12 - Прецизионный 3D-Stereoscan 5МП

Полученные 3D-модели анализировали с помощью программного обеспечения GOM Inspect V8. Данное программное обеспечение позволило проводить дальнейший анализ и метрологические измерения детализированных объектов. Пакеты программ GOM Inspect были протестированы и сертифицированы Федеральным физико-техническим институтом (ФТИ) и Национальным институтом стандартов и технологий США (NIST).

Биомеханические испытания образцов на сжатие

Прочностные характеристики контрольных костных образцов определяли при проведении испытаний на сжатие с использованием модернизированного испытательного комплекса INSTRON 6022 (INSTRON, Англия) (Рисунок 12).

Предел прочности образцов на сжатие до момента разрушения вычисляли по формуле:

$$\sigma = F/P \text{ /МПа/} \quad (1)$$

где σ - предельное разрушающее напряжение, МПа;
 F – величина нагрузки, Н;
 P – площадь поперечного сечения образца, мм.



Рисунок 13 - Испытательный комплекс «Инстрон», модель 6022

Измерения микротвердости по Виккерсу

Упруго-пластические свойства образцов в микрообъемах определяли посредством показателя микротвердости по Виккерсу с использованием цифрового микротвердомера DM 8 (AFFRI, Италия) - объектив - M40/0,65; окуляр – W10X-15.5 мм. (Рисунок 13). Данный метод относится к неразрушающим видам механических испытаний и позволяет изучать механические свойства компактной костной ткани в малых объемах.

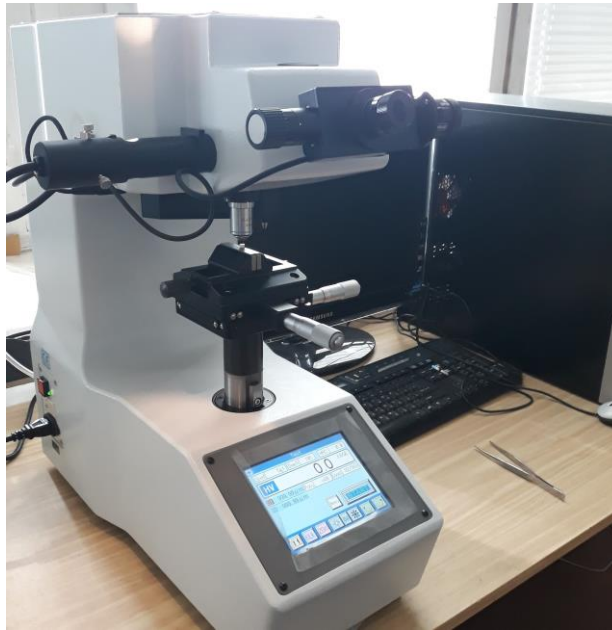


Рисунок 14 - Цифровой микротвердомер DM 8

Измерения микротвердости вдавливанием по методу восстановленного отпечатка заключается в нанесении на испытуемую поверхность образца отпечатка под действием статической нагрузки, приложенной к алмазному четырехгранному наконечнику (индентору) в течение заданного времени. После снятия нагрузки и измерения параметров полученного отпечатка (четырёхгранная пирамида с квадратным основанием) число микротвердости (HV) можно определить по формуле, если F выражена в ньютонах:

$$HV = \frac{F}{S} = \frac{0,102 \cdot 2F \cdot \sin \frac{\alpha}{2}}{d^2} = 0,189 \frac{F}{d^2} / \text{МПа} / \quad (2)$$

где F - заданная нагрузка, приложенная к алмазному наконечнику, Н;

S – условная площадь боковой поверхности полученного отпечатка, мм²;

d – среднее арифметическое длин обеих диагоналей квадратного отпечатка, мм.

Число микротвердости определяется делением приложенной к алмазному наконечнику нагрузки на условную площадь боковой поверхности полученного отпечатка.

Элементный анализ

Контроль удаления минеральной фазы из образцов проводили с помощью световой микроскопии, а также микроэлементного анализа.

Анализ провели с использованием сканирующего электронного микроскопа Phenom XL (Phenom-World, Нидерланды), оснащенного детектором энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. На разных этапах деминерализации контролировали уменьшение относительного процентного содержания в костной ткани основных химических элементов, образующих минеральную фазу кости – Ca, Na, Mg, K, P.

Необходимость контроля степени деминерализации обусловлено тем, что остеоиндуктивные свойства имплантатов находятся в прямой зависимости от степени их деминерализации [66].

Контроль высвобождения лекарственного средства фотометрическим способом

С фармацевтической точки зрения терапевтическая эффективность лекарственного средства определяется рядом факторов и, в первую очередь, степенью и скоростью высвобождения лекарства из лекарственной формы [89].

Сорбционную способность деминерализованных имплантатов, количество и время высвобождения адсорбированного лекарственного средства из имплантата в раствор 0,9% натрия хлорида оценивали с использованием метода абсорбционной фотометрии. Известно, что раствор сангвиритрина при спектрофотометрии имеет максимум поглощения при длине волны - 321 нм [13, 88, 110]. Поэтому, оценку количественного выхода и времени перехода сангвиритрина в раствор 0,9% натрия хлорида из деминерализованных образцов проводили фотометрическим способом. Для этого мерили оптическую плотность растворов в зависимости от концентрации сангвиритрина в растворе 0,9% натрия хлорида. По полученным показателям оптической плотности растворов с различной концентрацией сангвиритрина, построили калибровочную кривую в оптимальном интервале измерения при длине волны - 321 нм.

Фотометрические измерения проводили с использованием спектрофотометра UV-1800 (Shimadzu, Япония), который позволяет выполнять количественный анализ в спектральном диапазоне волн 190 – 1100 нм.



Рисунок 15 - Спектрофотометр UV-1800 SHIMADZU

Статистическая обработка результатов исследования

Полученные результаты исследования обработали общепринятым методом вычисления средней арифметической и стандартного отклонения. Достоверность результатов оценивали с использованием критериев Стьюдента, с принятием вероятности $p < 0,5$ [106]. Для статистической обработки материала использовали программу «Microsoft Office Excel 2013». Число повторностей измерений при проведении каждого опыта указано в экспериментальной части исследования.

3. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ И МЕТОДИЧЕСКИЕ РАЗРАБОТКИ

3.1. План эксперимента

В соответствии с поставленной целью и задачами исследования составлен план эксперимента – совокупность данных, определяющих число, условия и порядок проведения опытов (Таблица 1).

Таблица 1 - План эксперимента

Место проведения эксперимента - лаборатория биомедицинских технологий НИЦ БМТ ФГБНУ ВИЛАР				
Определение оптимальных режимов резания минерализованных биологических тканей				
1.	Подготовка к эксперименту	Выбор методов разделения кости и инструментария		
1.1.	Выбор режимов резания	Кол-во оборотов фрезы в мин: 3000 об/мин; 2500 об/мин; 2000 об/мин	Скорость подачи фрезы: 5 мм/мин; 10 мм/мин; 15 мм/мин	Вид охлаждающей среды: -дисциллированная вода; - 0,9% натрия хлорида
1.2.	Анализ качества заготовок и обрабатываемой поверхности полученных контрольных образцов	18 шт. контрольных образцов (12,5x5 мм)		
		Световая микроскопии, СЭМ, 3D-фрактографический анализ		
1.3.	Получение экспериментальных образцов	Цилиндрическая форма 12,5x5 мм – 140 шт.	Цилиндрическая форма 7,5x5 мм – 100 шт.	
Оптимизация стерилизации озоновым методом				
2.	Количество образцов (7,5x5 мм)	Обработка	Микробиологический контроль/сутки	
2.1.	10 шт.	Без обработки (контроль)	3 суток/6 суток/	
2.2.	10 шт.	Стерилизация озоно-кислородной смесью	3 суток/6 суток/	
Оптимизация стерилизации комбинированным способом (озоно-кислородная смесь + радиация)				
3.	Количество образцов (7,5x5 мм)	Обработка	Микробиологический контроль/сутки	
3.1.	10 шт.	Без обработки (контроль)	3 суток/6 суток	
3.2.	10 шт.	Радиация, 10 кГр	3 суток/6 суток/14 суток	
3.3.	10 шт.	Радиация, 15 кГр	3 суток/6 суток/14 суток	
3.4.	10 шт.	Радиация, 20 кГр	3 суток/6 суток/14 суток	

Оптимизация стерилизации комбинированным способом (озоно-кислородная смесь + радиация)			
3.5.	10 шт.	Радиация, 25 кГр	3 суток/6 суток/14 суток
3.6.	10 шт.	Озоно-кислородная смесь – 8 мг/л + радиация - 10 кГр	3 суток/6 суток/14 суток
3.7.	10 шт.	Озоно-кислородная смесь – 6 мг/л + радиация 15 кГр	3 суток/6 суток/14 суток
Биомеханические испытания костных образцов			
4.	Испытания костных образцов на прочность при сжатии		
	Количество образцов (12,5x5 мм)	Характеристика образцов, режим испытаний	
		Нативные сухие	Нативные влажные
4.1.	10	Вдоль оси остеонов, Скорость деформирования – 1,0 мм/мин.	Вдоль оси остеонов, Скорость деформирования – 1,0 мм/мин.
4.2.	10	Вдоль оси остеонов, Скорость деформирования – 1,0 мм/мин.	Вдоль оси остеонов, Скорость деформирования – 1,0 мм/мин.
5.	Измерение микротвердости костных образцов после стерилизующего воздействия		
	Кол-во образцов	Кол-во измерений вдоль оси остеонов	Характеристика образцов, метод и режим стерилизации
5.1.	3	36	Нативная влажная кость (исходный контроль)
5.2.	3	36	Нативная сухая кость (условный контроль)
5.3.	3	36	Нативная сухая кость – стерилизация озоно-кислородной смесью
5.4.	3	36	Нативная сухая кость – стерилизация радиацией (10 кГр)
5.5.	3	36	Нативная сухая кость – стерилизация озоно-кислородной смесью + радиацией (10 кГр)
5.6.	3	36	Нативная сухая кость – стерилизация радиацией (15 кГр)
5.7.	3	36	Нативная сухая кость – стерилизация озоно-кислородной смесью + радиацией (15 кГр)
5.8.	3	36	Нативная сухая кость – стерилизация радиацией (20 кГр)
5.9.	3	36	Нативная сухая кость – стерилизация озоно-кислородной смесью + радиацией (20 кГр)
5.10	3	36	Нативная сухая кость – стерилизация радиацией (25 кГр)
5.11	3	36	Нативная сухая кость – стерилизация озоно-кислородной смесью + радиацией (25 кГр)
Выбор оптимальных параметров (нормальность/время) деминерализации образцов с использованием раствора HCl			
6.	Количество образцов 12,5x5 мм		Нормальность раствора
	3		1,2 н
	3		0,8 н
	3		0,6 н

7.	Контроль степени деминерализации/элементный анализ			
7.1.	Время инкубации образцов	24 часа	48 часов	72 часа
	Световая микроскопия/ количество образцов 12,5x5 мм	9	9	9
	Спектроскопия/ количество образцов 12,5x5 мм	5	5	5
Построение калибровочной кривой для фотометрического определения количества лекарственного средства в растворе				
8.	Подбор оптимальной концентрации экспериментального раствора			
Иммобилизация лекарственного средства на деминерализованных костных образцах				
9.	Определение оптимальных параметров (концентрация раствора, время инкубации)			
	Количество образцов	3 суток		6 суток
	12 шт. (12,5x5 мм)	3 шт.		8 шт.
Проверка и фотометрический контроль пролонгированного высвобождения лекарственного средства, проверка его на подлинность				
10.	Опыт № 1			
	Образцы № 1 – 3 (раздельная инкубация)	Измерение оптической плотности раствора, получение количественных данных в соответствии с калибровочной кривой		
11.	Опыт № 2			
	Образцы – 8 шт. (совместная инкубация)	Измерение оптической плотности раствора, получение количественных данных в соответствии с калибровочной кривой		

3.2. Методология и экспериментальная апробация методов изготовления, контроля качества и оценки безопасности костных имплантатов

Настоящая методология включила методы получения костных имплантатов, лабораторного контроля качества, оценки безопасности костных имплантатов.

Методы и биотехнологические приемы разделили на три группы:

Обработка кости

1. Механическая обработка кости диафиза бедренной кости быка, получение заготовок с учетом направления остеонных структур кости.

Определение биомеханических характеристик кости:

1. Определение микротвердости контрольных образцов.
2. Механические испытания контрольных образцов на сжатие (определение прочности).

Биологические характеристики и элементный анализ контрольных образцов:

1. Стерилизация образцов и упаковки озоновым методом и комбинированным способом с проверкой их обсемененности.
2. Морфологическое исследование образцов после их механической обработки, до и после воздействия комбинированным способом стерилизации, в том числе - фрактографический анализ (3D-контроль).
3. Удаление минеральной фазы из костной ткани и контроль деминерализации с использованием световой микроскопии.
4. Элементный анализ. Контроль деминерализации с использованием рентгеновской спектроскопии.
5. Сорбционные свойства имплантата и время высвобождения лекарственного средства (иммобилизация, проверка пролонгированного действия и проверка на подлинность лекарственного средства).

Лабораторное помещение для получения костных образцов, имплантатов и имплантационных препаратов должны соответствовать санитарным нормам и правилам. Получение имплантатов и лабораторный контроль проводили согласно разработанной методологии в асептических условиях.

Обработка кости

1. Механическая обработка компактного вещества кортикальной пластины диафиза бедренной кости быка с учетом направления остеонных структур.

Диафиз бедренной кости разделяли с помощью ручной хирургической пилы на фрагменты - каждый по 35-38 мм.



Рисунок 16 - Фрагменты диафиза бедренной кости быка

Перед проведением механической обработки с эндостальной и периостальной поверхности диафиза удаляли мягкие ткани и миелоидный-жировой костный мозг. Затем заготовки помещали в 3% раствор перекиси водорода на 1 час для удаления компонентов крови и проводили стерилизацию костных образцов методом озонной стерилизации - обдувом озono-кислородной смесью с концентрацией 6-8 мг/л в течение 7-10 минут.

На вертикальном сверлильном станке, оснащённом полыми цилиндрическими фрезами из фрагментов диафиза высверливали заготовки цилиндрической формы с использованием в качестве охлаждающей среды охлажденный до $t = 4^{\circ}\text{C}$ раствор 0,9% натрия хлорида (Рисунки 17, 18).

Полую цилиндрическую фрезу закрепляли в патроне станка с возможностью вертикального перемещения. Кольцевую заготовку кости фиксировали на платформе, центровка которой на шаровой опоре обеспечивала возможность выставить стенку кольцевой заготовки кости в месте сверления вертикально под полую фрезу и таким образом скомпенсировать исходную конусность трубчатой кости. Это дало возможность оптимально использовать костный материал и получить из одного фрагмента диафиза кости порядка 15 заготовок цилиндрической формы.



Рисунок 17 - Получение заготовок имплантатов с анизотропией продольной ориентации с использованием полый цилиндрической фрезы



Рисунок 18 - Фрагмент диафиза бедренной кости быка с высверленными заготовками цилиндрической формы



Рисунок 19 - Заготовки цилиндрической формы

Цилиндрические заготовки длиной 35-38 мм. и диаметром 5 мм разделяли на образцы размерами 12,5 и 7,5 мм. Обработку заготовок проводили в охлаждающем растворе 0,9% натрия хлорида с помощью прецизионного отрезного станка IsoMet 4000, оснащенного дисковой фрезой с алмазным напылением при следующих экспериментально установленных оптимальных параметрах: количество оборотов фрезы – 2000 в минуту, скорость подачи фрезы – 5 мм. в минуту. Данный метод разделения позволил получить качественную поверхность торцевых срезов на образцах без их дополнительной обработки для дальнейших исследований.

На Рисунке 20 показана обработка торцевой части образца цилиндрической формы дисковой фрезой с алмазным напылением в охлаждающей среде.

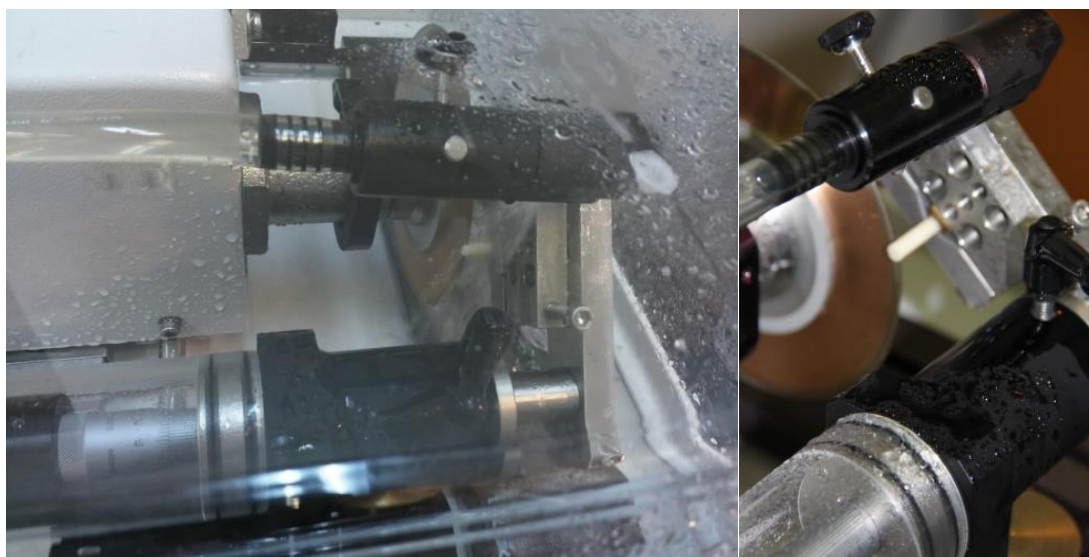


Рисунок 20 - Обработка костного образца с использованием IsoMet 4000

Полученные образцы костных имплантатов 12,5x5 мм (140 шт.) и 7,5x5 мм (100 шт.) использовали в дальнейших исследованиях.



Рисунок 21 - Цилиндрические образцы костных имплантатов 12,5x5 мм и 7,5x5 мм с обработанными торцами

Апробированный метод обработки кости позволил соблюсти основные требования при получении костных имплантатов:

- отсутствие нагрева и минимальная продолжительность обработки;
- сохранение состояния и микроструктуры костной ткани;
- обеспечение заданных размеров и допусков;
- сохранение остеопластических свойств имплантатов.

Использованная в работе методическая база позволяет проводить обработку и получение костных имплантатов различной конфигурации с учетом структуры и прочностных характеристик кости, исключается ее избыточная травматизация.

Определение биомеханических характеристик кости

Биомеханические испытания полученных костных имплантатов проводили с целью проверки качества отобранного сырья (кость), а также для разработки критериев и рекомендаций при отборе фрагментов кости для получения имплантатов, отвечающих требованиям безопасности.

1. Определение микротвердости контрольных образцов

Измерения микротвердости осуществляли в продольном направлении к ориентации остенных структур. Нагрузки, подаваемые на индентер микротвердомера при проведении замеров – 50 гс или 0,490 Ньютона. Время подачи нагрузки – 10 секунд.

Необходимым условием при измерении микротвердости является обеспечение перпендикулярности оси алмазной пирамиды к поверхности образца,

что обеспечивает симметричный отпечаток четырехгранной пирамиды индентора и достоверность полученных измерений.

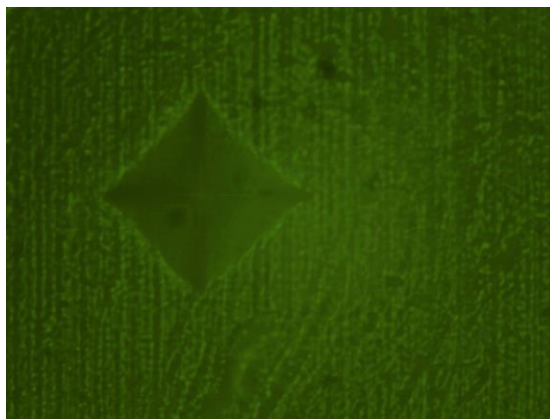


Рисунок 22 - Симметричный отпечаток четырехгранной пирамиды индентора микротвердомера на исследуемом образце

Измерения микротвердости проводили в рамках двух экспериментов:

Эксперимент №1: проводили измерения микротвердости нативных влажных и высушенных образцов с неизменным композитным составом кости. Для получения высушенных образцов, влажные образцы оставляли в лабораторном помещении в асептических условиях при $t = 20^{\circ}\text{C}$ в течение 10 суток с момента их получения из цельной кости.

Результаты измерений представлены в Таблице 2. Полученные данные показывают зависимость значения микротвердости образцов от их состояния (влажная/сухая). Значения микротвердости сухой нативной кости в 1,5 раза выше значений микротвердости нативной влажной кости. С момента получения образцов из кости, микротвердость образцов возрастает уже через 20-30 минут пребывания образцов при $t = 20^{\circ}\text{C}$ в сухих комнатных условиях, что следует учитывать при проведении измерений микротвердости влажной и сухой кости.

Таблица 2 - Микротвердость нативных влажных и высушенных образцов

№	Характер-ка образцов	Кол-во измер-ий	Микротвердость, МПа
1	Нативная влажная кость	36	351,41±14,7
2	Нативная сухая кость	36	553,48±8,1

Полученные значения микротвердости соответствуют ранее опубликованным научным данным [115], что свидетельствует о качестве взятых для получения имплантатов костной ткани, а также служить критерием при выборе костных фрагментов для изготовления имплантатов.

Эксперимент №2: проводили измерения микротвердости образцов 9 партий: партии после стерилизации озono-кислородной смесью с концентрацией 6-8 мг/л в течение 10-20 мин, четырех партий образцов (нативная сухая кость), подвергшихся стерилизации потоком быстрых электронов с дозой поглощения 10, 15, 20 и 25 кГр и четырех партий, подвергшихся комбинированному способу стерилизации озono-кислородной смесью с обработкой потоком быстрых электронов с дозой поглощения 10, 15, 20 и 25 кГр. Исследование показало, что воздействие озono-кислородной смесью, радиационной обработкой потоком быстрых электронов с дозой поглощения 10, 15 и 20 кГр, а также их комбинированное воздействие не оказывает влияние на показатели микротвердости костных образцов. Воздействие на образцы радиацией с дозой поглощения 25 кГр и комбинированным способом стерилизации - озono-кислородная смесь + радиация с дозой поглощения 25 кГр оказывает незначительное влияние на показатели микротвердости образцов в сторону ее уменьшения о чем свидетельствуют данные, полученные при измерениях,

Таблица 3 - Данные о микротвердости сухих нативных образцов до и после стерилизующего воздействия.

№	Характеристика образцов	Кол-во измерений	Микротвердость, МПа
	Нативная влажная кость (исходный контроль)	36	351,41±14,7
1	Нативная сухая кость (условный контроль)	36	553,48±8,1
2	После стерилизации (озон)	36	537,19±3,4
3	После стерилизации (радиация - 10 кГр)	36	538,80±4,5
4	После стерилизации (озон + радиация - 10 кГр)	36	543,57±5,1
5	После стерилизации (радиация - 15 кГр)	36	538,29±5,3
6	После стерилизации (озон + радиация - 15 кГр)	36	557,41±5,3

№	Характеристика образцов	Кол-во измерений	Микротвердость, МПа
7	После стерилизации (радиация - 20 кГР)	36	547,03±5,2
8	После стерилизации (озон + радиация - 20 кГР)	36	557,98±5,3
9	После стерилизации (радиация - 25 кГР)	36	529,73±5,2
10	После стерилизации (озон + радиация - 25 кГР)	36	517,72±6,8

Это может свидетельствовать о том, что усовершенствованный комбинированный способ стерилизации: обработка озono-кислородной смесью с обработкой потоком быстрых электронов с дозами поглощения 10 и 15 кГр не оказывает влияния на упруго-пластические характеристики поверхностного слоя имплантатов.

2. Механические испытания контрольных образцов на сжатие (определение прочности)

Механические испытания контрольных образцов цилиндрической формы 12,5 x 5 мм на сжатие проводили для нативных влажных и высушенных при $t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 10 дней образцов. Испытания проводили со скоростью деформирования - 1,0 мм./мин. в продольном направлении к ориентации остеонных структур.

Данные испытаний показывают, что средняя нагрузка до момента разрушения для нативных сухих образцов (Таблица 4.) в 11,3 раза выше, чем для нативных влажных образцов (Таблица 5.).

Таблица 4 - Нагрузка до момента разрушения высушенных образцов

№ п/п	Нагрузка при разрушении (Ньютона)	Деформация при разрушении, мм
1	44302	0,5
2	37116	0,52
3	45060	0,42
4	42430	0,53
5	40561	0,52
6	37687	0,47
7	45091	0,51
8	41008	0,5
9	43606	0,45
10	42306	0,51
M±m	41916,7±897,62	0,49±0,01

Таблица 5 - Нагрузка до момента разрушения нативных влажных образцов

№ п/п	Нагрузка при разрушении (Ньютона)	Деформация при разрушении, мм
1	4520	0,32
2	5580	0,7
3	4645	0,47
4	3776	0,36
5	4234	0,74
6	3907	0,53
7	3979	0,49
8	4101	0,51
9	4191	0,39
10	4760	0,55
M±m	4369±168,56	0,50±0,04

Спад нагрузки при испытании высушенных образцов происходит резко и разрушение ткани происходит мгновенно, что видно на графике испытания одного из контрольных образцов (Рисунок 23).

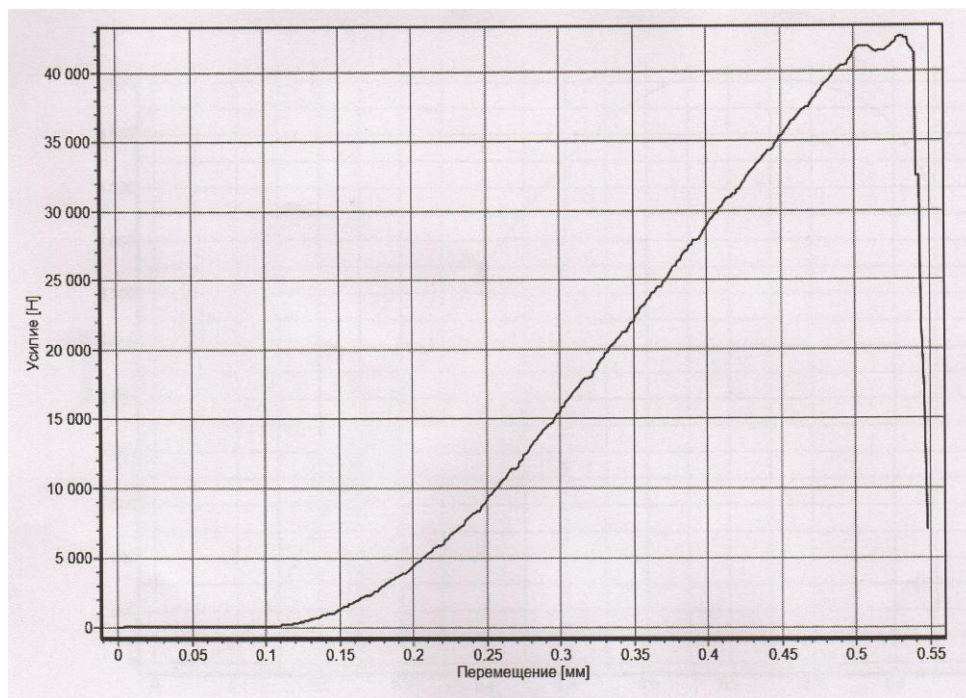


Рисунок 23 - График испытания высушенного образца

Падение нагрузки при испытании влажных образцов - плавное, разрушение кости происходит путем крошения, что видно на графике испытания одного из контрольных образцов (Рисунок 24).

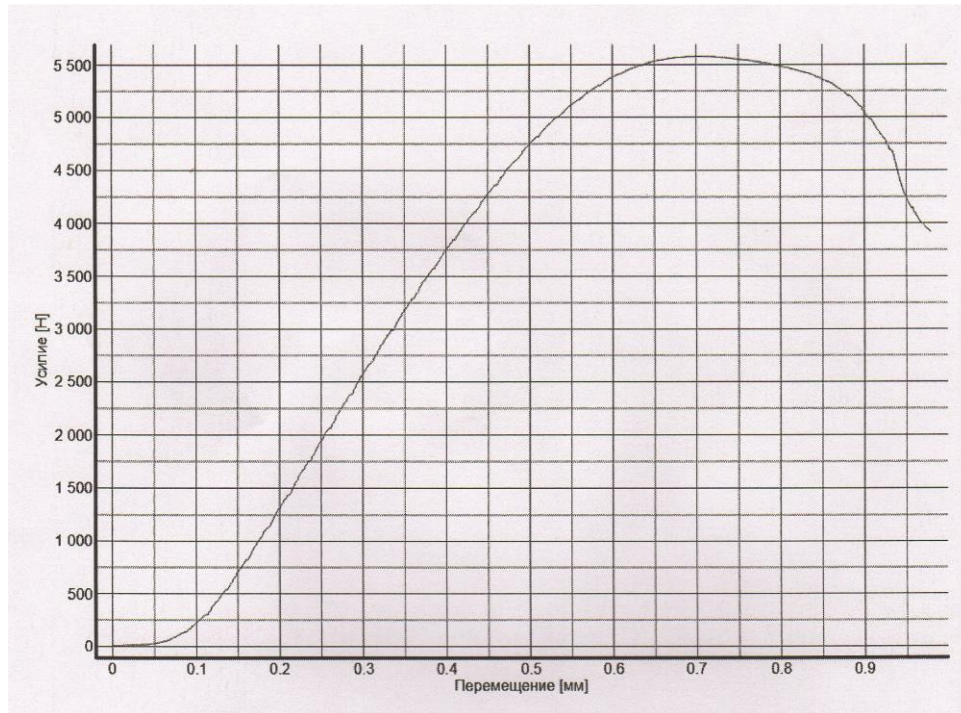


Рисунок 24 - График испытания влажного образца

Полученные данные позволили рассчитать предел прочности в МПа (Таблица 6) при сжатии вдоль оси остеонов высушенных и нативных влажных образцов 12,5x5 мм., по формуле:

$$\sigma = F/P$$

(3)

Где F – величина нагрузки при разрушении, Н;

P – площадь поперечного сечения образца – 19,63 мм.

Таблица 6 - Предел прочности образцов

Кол-во измерений	Нативные влажные образцы	Высушенные образцы
	Условный предел прочности образцов, МПа (M ± m)	
10	222,56 ± 8,6	2135,33 ± 45,7

Рассчитанный условный предел прочности для испытуемых образцов соответствует ранее опубликованным научным данным [25, 27, 62], что также

может свидетельствовать о качественных характеристиках сырья, а также служить критерием при выборе костных фрагментов для получения имплантатов.

Биологические характеристики и элементный анализ контрольных образцов

1. Стерилизация образцов озоновым и комбинированным методами с проверкой их обсемененности.

В качестве экспериментального материала в исследовании использовали образцы 7,5 x 5 мм. (Рисунок 25).



Рисунок 25 - Экспериментальные образцы в герметичной упаковке

На первом этапе осуществляли обработку костных образцов в проточном режиме озоно-кислородной смесью с концентрацией озона (6 – 8) мг/л и продолжительностью 15 - 20 минут, что позволило снизить исходный уровень обсемененности костных образцов [100] (патент Российской Федерации на изобретение № 2526429 от 11.04.2013 г. Способ изготовления костных имплантатов / Быков В.А., Розанов В.В., Матвейчук И.В., Пантелеев В.И., Шутеев С.А., Литвинов Ю.Ю., Воротников А.И.; заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»).

Микробиологическое исследование осуществляли для контроля наличия на образцах аэробных и анаэробных бактерий с использованием питательной среды - тиогликолевой и микроскопических грибов с использованием питательной среды - Сабуро. Приготовление питательных сред осуществлялось в соответствии с инструкциями от производителей.

Результаты микробиологического исследования стерильности контрольных и экспериментальных образцов после стерилизации озоно-кислородной смесью представлены в Таблице 6.

Контрольные образцы K_1 и упаковочную термопленку не подвергали стерилизации.

Экспериментальные образцы \mathcal{E}_1 подвергали обработке озоно-кислородной смесью с концентрацией (6-8) мг/л в течение 10-20 минут с последующей герметичной упаковкой в стерилизованную той же озоно-кислородной смесью термопленку [100].

Таблица 7 - Результаты микробиологического исследования

№	Маркировка образцов	Концентрация озоно-воздушной смеси, мг/л	Наличие патогенов по результатам микробиологических исследований	
			3 сутки	
1	K_1 . Без обработки озоно-кислородной смесью		+	
2	\mathcal{E}_1 . Стерилизация озоно-кислородной смесью	6	+	

В ходе микробиологического исследования установили, что контрольные образцы K_1 и экспериментальные \mathcal{E}_1 показали наличие обсеменения уже на 3 сутки культивирования на выбранных культуральных средах [100].

С целью усовершенствования метода стерилизации при сохранении остеоиндуктивных свойств имплантатов, в работе применена новая технология комбинированной стерилизации костных имплантатов, основанная на совместном воздействии на костный имплантат физико-химических стерилизующих факторов различной природы в два этапа (первый этап - химическое воздействие озоно-кислородной смеси; второй этап - радиационная обработка потоком быстрых

№	Маркировка образцов	Концентрация озono-воздушной смеси, мг/л	Величина поглощенной дозы при радиационной стерилизации, кГр				Наличие патогенов по результатам микробиологических исследований		
4	Э ₄ - Только радиационная стерилизация (без озоновой обработки)				√		—	+	+
5	Э ₅ - Только радиационная стерилизация (без озоновой обработки)					√	—	—	±
6	Э ₆ - Стерилизация озоном + радиационная стерилизация	8	√				—	—	—
7	Э ₇ - Стерилизация озоном + радиационная стерилизация	6		√			—	—	—
							— полное отсутствие патогенов по обеим средам ± частичное проявление патогенов по одной из сред + проявление патогенов в обеих культуральных средах		

Экспериментальные образцы, которые не обрабатывали озono-кислородной смесью, показали наличие обсемененности на 6-14 сутки хотя бы на одной из культуральных сред.

Стерильность на обеих культуральных средах через 14 суток эксперимента продемонстрировали только образцы, подвергавшиеся комбинированному воздействию – последовательной обработке озono-кислородной смесью с концентрацией 6-8 мг/л в течение 10-20 мин и радиационному облучению с величинами поглощенных доз – 10 и 15 кГр [100].

Проведенные исследования показали, что обработка костного образца и его упаковки озono-кислородной смесью, позволяет значительно снизить исходный уровень обсеменения костной ткани образца, что в свою очередь приводит к снижению резистентности патогенов к воздействию радиации. В результате, для обеспечения надежной стерилизации оказывается достаточным существенно меньший уровень поглощенной дозы – 10 кГр, что в свою очередь гарантирует сохранение исходной морфологии костного имплантата, функционального

потенциала морфогенетических белков костного материала и в целом остеиндуктивных свойств имплантата [100] (патент РФ на изобретение № 2630464 от 29.07.2016 г. Комбинированный способ стерилизации костных имплантатов / Матвейчук И.В., Розанов В.В., Гордонова И.К., Никитина З.К., Сидельников Н.И., Литвинов Ю.Ю., Николаева А.А., Черняев А.П., Пантелеев И.В.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»).

2. Морфологическое исследование образцов после их механической обработки, до и после воздействия комбинированным способом стерилизации, в том числе - фрактографический анализ (3D-контроль).

С помощью ранее описанного метода обработки кости, получали торцевой срез толщиной 0,25 мм от образцов цилиндрической формы 12,5 x 5 мм для морфологического исследования.

На Рисунке 26 представлен фрагмент поверхности среза толщиной 0,25 мм торцевой части контрольного образца, до проведения стерилизации комбинированным способом озоно-кислородной смесью и потоком быстрых электронов. На снимке x100 различима характерная микроструктура кортикальной костной ткани быка.



Рисунок 26 - Фрагмент поверхности среза толщиной 0,25 мм торцевой части образца после обработки. X100

На Рисунке 27 представлен фрагмент поверхности среза костного образца после механической обработки, подвергнутый комбинированному способу стерилизации озono-кислородной смесью и последующей обработкой потоком быстрых электронов с дозой поглощения 15 кГР. Различима характерная микроструктура компактной костной ткани быка - центральный (гаверсов) канал остеона, соединяющие каналы и каналыцы. Диаметр гаверсова канала в зрелой костной ткани быка – 24,3 микрона, что соответствует ранее опубликованным научным данным [23, 29, 71, 77].

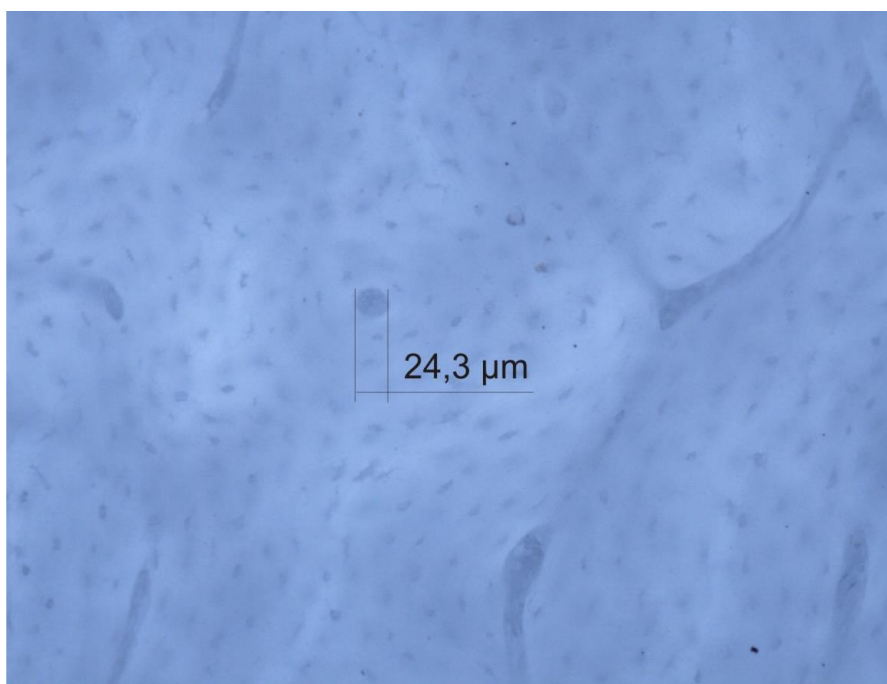


Рисунок 27 - Микроструктура образца после механической обработки и комбинированного способа стерилизации. X200

Для исследования образцов после механической обработки и комбинированного способа стерилизации с помощью сканирующей электронной микроскопии, срезы образцов фиксировали на предметном столике микроскопа с помощью углеродного скотча. Морфологическое исследование срезов образцов показало, что механическое воздействие режущего инструмента не нарушило структуру костной ткани. На Рисунках 28, 29 структура ткани, формирующая сосудистые каналы, не повреждена, а край среза образца ровный, правильной формы.

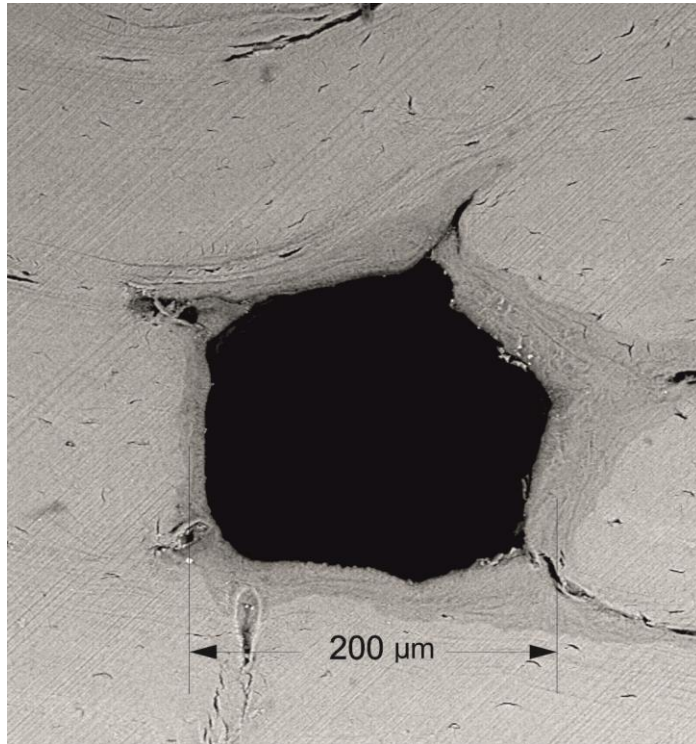


Рисунок 28 - Сосудистый канал в компактном веществе исследуемого образца.
X 370

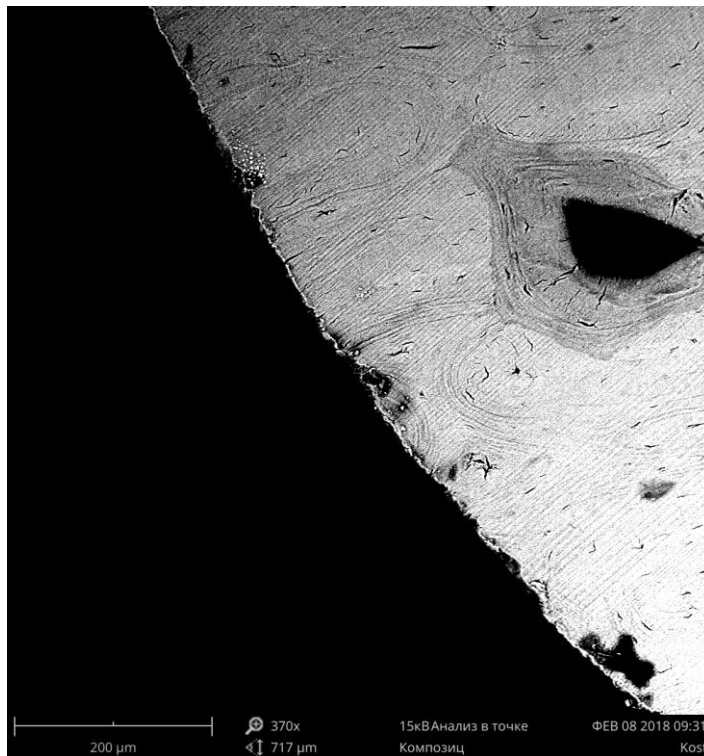


Рисунок 29 - Сосудистый канал и фрагмент края образца после механической обработки и комбинированного способа стерилизации. X 370

Исследование показало отсутствие повреждающего воздействия механической обработки и комбинированного способа стерилизации на поверхностную микроструктуру нативной костной ткани.

Отсутствие структурных изменений в поверхностном слое ткани свидетельствует о том, что метод обработки костной ткани обеспечивает надежное охлаждение и отсутствие термического влияния в зоне резания. Вместе с тем, данный способ обработки оставляет центральные каналы остеонов в «открытом» состоянии, что повышает его остеоиндуктивные свойства, т.к. микроструктура и открытые каналы имплантата позволяют клетками мигрировать и действуют в качестве матрицы для дальнейшего роста ткани [21, 22].

При проведении фрактографического анализа получены 3D-модели микрорельефа эндостальной и периостальной поверхностей средней части диафиза бедренной кости быка. На Рисунках 30, 31 представлены фрагменты микрорельефа. Исследованные поверхности целостные, не выявлено наличие трещин и микротрещин, а также других дефектов, которые могли бы ухудшить биомеханические характеристики получаемых имплантатов.

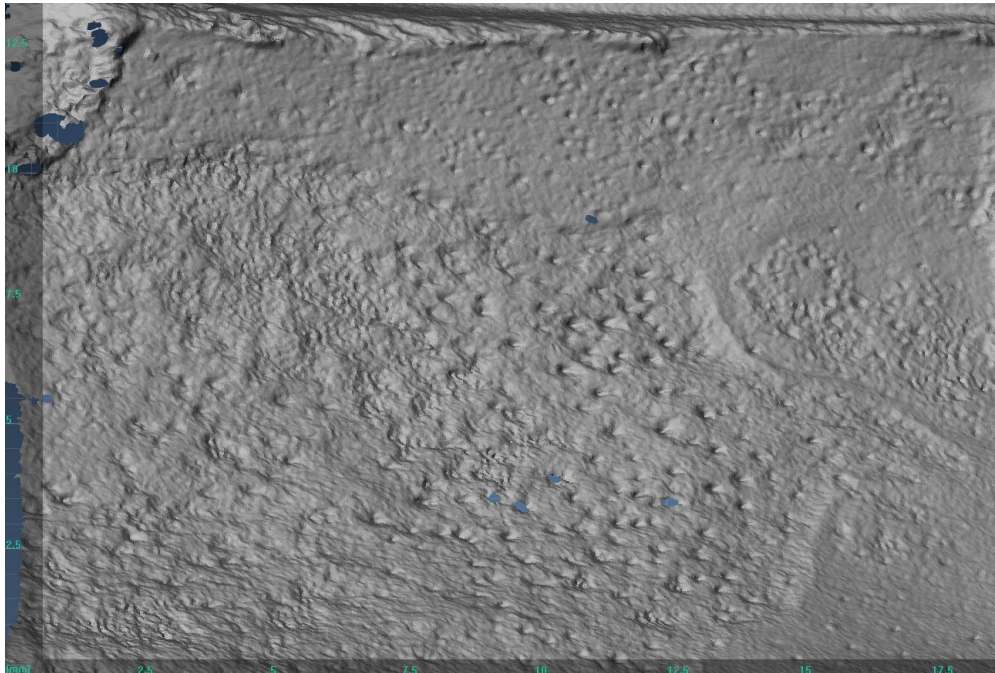


Рисунок 30 - Фрагмент эндостальной поверхности диафиза бедренной кости быка. 3D-стереограмма - X7



Рисунок 31 - Фрагмент периостальной поверхности диафиза бедренной кости быка. 3D-стереограмма - X7

3. Удаление минеральной фазы из костной ткани и контроль деминерализации с использованием световой микроскопии.

Объем образца цилиндрической формы 5x12,5 мм составил 245,31 мм³.

Расчет объема образца произвели по формуле:

$$V = \pi \times r^2 \times h \quad (4)$$

$$V = 3,14 \times 2,5^2 \times 12,5 = 245,31 \text{ мм}^3.$$

Количество раствора соляной кислоты для одного образца 5x12,5 мм. (245,31 мм³) в соотношении 1/100 составило 24531,00 мм³ или 24,531 мл.

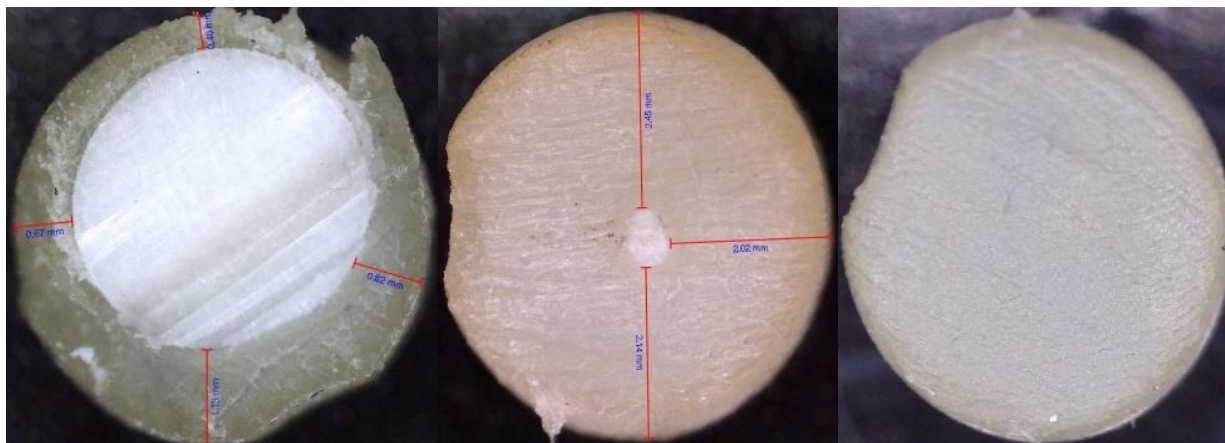
Для деминерализации 10 образцов из двух стандарт-титров подготовили титрированный раствор 0,8 моль/дм³ (0,8 н) соляной кислоты в количестве 250 мл. Для соотношения образец/раствор – 1/100, каждый образец 5x12,5 мм (245,31 мм³) инкубировали в отдельную емкость с раствором в количестве 24,531 мл.

Для контроля удаления минеральной фазы, предварительно проводили деминерализацию трех контрольных образцов в течение 24, 48 и 72 часа.

По истечении 24, 48 и 72 часов, образцы поочередно извлекали из емкости с раствором и отмывали от раствора соляной кислоты в течение 3 часов в физиологическом растворе. После промывки просушивали при $t = 20 \text{ C}^\circ$ в

асептических условиях в течение 120 минут. Удаление из образцов минеральной фазы контролировали на трех этапах деминерализации – через 24, 48 и 72 часа. Динамику изменения структуры ткани костных образцов наблюдали за счет появления фронта деминерализации.

На Рисунке 32 показана динамика изменения структуры костной ткани на поперечном срезе образцов цилиндрической формы диаметром 5 мм на различных этапах деминерализации.



24 часа

48 часов

72 часа

Рисунок 32 - Изменение структуры костной ткани на разных этапах деминерализации. X30

Через 24 часа обработки образца в растворе соляной кислоты $0,8 \text{ моль/дм}^3$ - фронт деминерализации проходит на расстоянии от 0,4 до 1,13 мм от края образца.

Через 48 часов обработки образца в соляной кислоте $0,8 \text{ моль/дм}^3$ - остаток минеральной фазы в центральной части влажного образца составил 0,45 мм в диаметре. По истечении 72 часов наблюдали удаление минеральной фазы из кости. Ткань образца сохраняет сплошность и непрерывность структуры.

4. Элементный анализ. Контроль деминерализации с использованием рентгеновской спектроскопии.

Для контроля полноты (степени) удаления минеральной фазы, провели элементный анализ образцов, подвергнутых частичной деминерализации в течение 24 и 48 часов и деминерализацию в течение 72 часов.

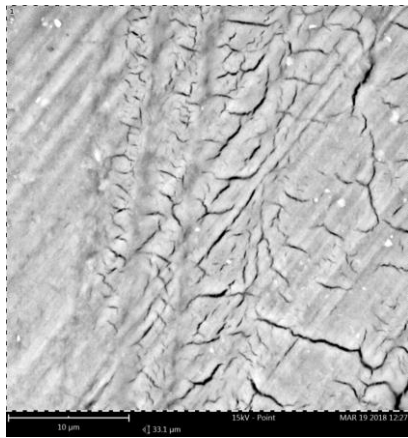
Для элементного анализа отобрали 4 группы образцов по 5 штук в каждой:

1. - пять нативных образцов с неизменным композитным составом (контрольная группа);
2. - пять образцов, после инкубации в соляную кислоту $0,8 \text{ моль/дм}^3$ в течение 24 часов (вторая группа);
3. - пять образцов, после инкубации в соляную кислоту $0,8 \text{ моль/дм}^3$ в течение 48 часов (третья группа);
4. - пять образцов, после инкубации в соляную кислоту $0,8 \text{ моль/дм}^3$ в течение 72 часов (четвертая группа).

Проводили элементный анализ костной ткани образцов каждой группы в зонах, распределенных равномерно от центра к краю образцов. Площадь зоны анализа детектором энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии составила $0,001 \text{ мм}^2$. Данные элементного анализа представлены в соотношении количества атомов каждого элемента к общему количеству атомов в % с указанием пиков, соответствующих конкретному химическому элементу в зоне проведения анализа.

Элементный анализ первой группы образцов

При анализе **первой** группы контрольных образцов № 1 - 5, получены данные о содержании основных химических элементов, которые составляют основу как органической, так минеральной фаз в компактном костном веществе диафиза бедренной кости быка: O, Ca, P, N, C, Na, Ma. На Рисунках 33 - 37 первой группы образцов, показаны зоны анализа, расположенных начиная от центра к краю образцов.



	Доля атомов в %
O	67.18
Ca	12.61
P	8.51
N	5.32
C	4.35
Na	1.45
Mg	0.59

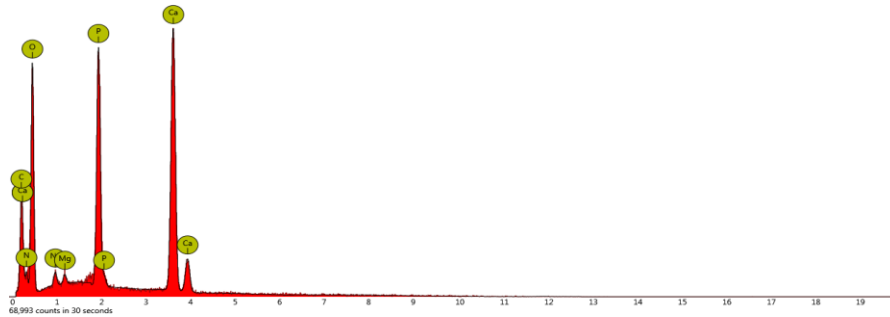
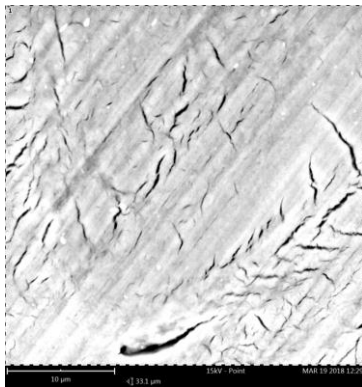


Рисунок 33 - Анализ в центральной зоне образца №1 первой группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	67.53
Ca	11.27
P	7.88
N	6.96
C	4.09
Na	1.64
Mg	0.64

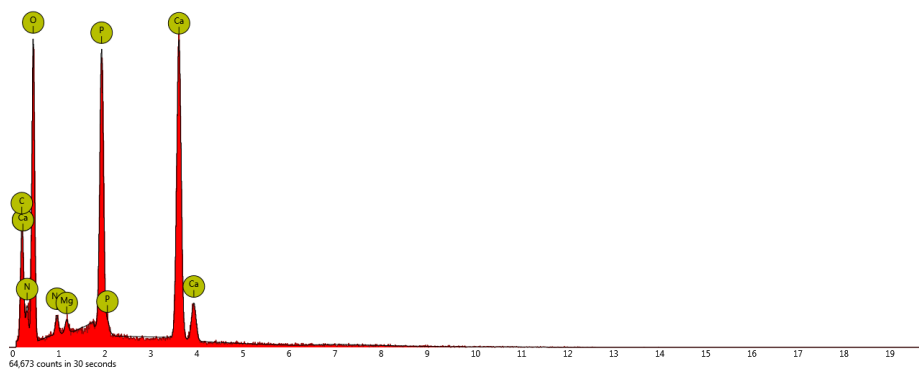
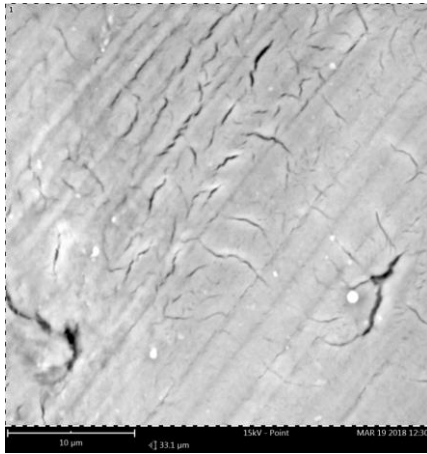


Рисунок 34 - Анализ в средней зоне ближе к центру образца №2 первой группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	69.63
Ca	10.17
P	7.51
N	6.15
C	4.41
Na	1.53
Mg	0.59

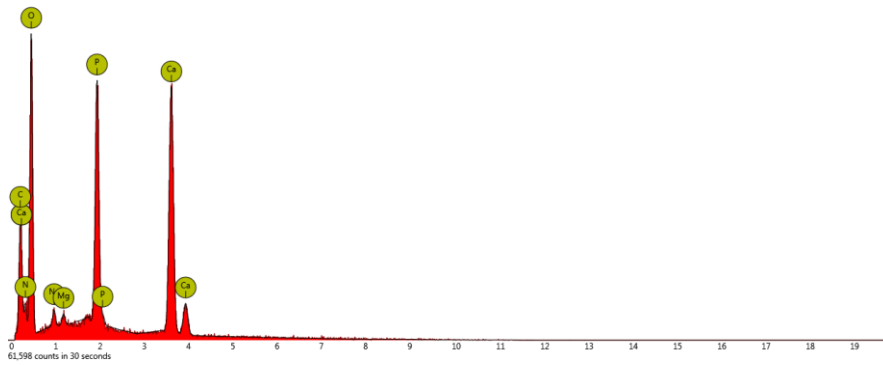
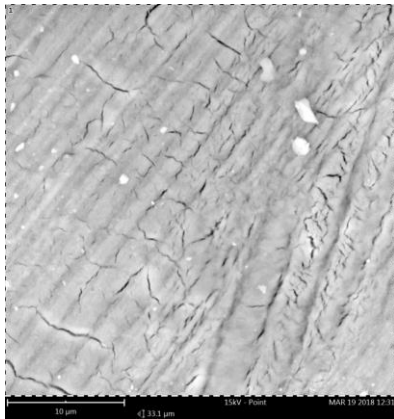


Рисунок 35 - Анализ в средней зоне образца №3 первой группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	69.13
Ca	10.72
P	7.61
N	6.14
C	4.61
Na	1.31
Mg	0.47

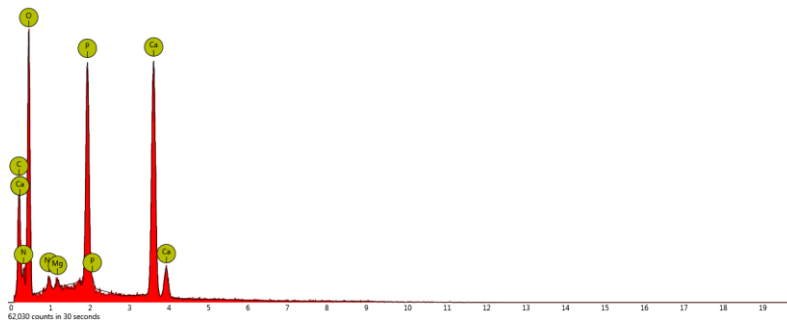
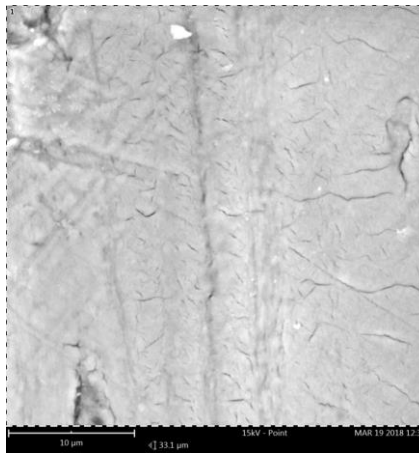


Рисунок 36 - Анализ в средней зоне ближе к краю образца №4 первой группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	71.14
Ca	8.70
P	6.56
N	6.02
C	5.15
Na	1.85
Mg	0.58

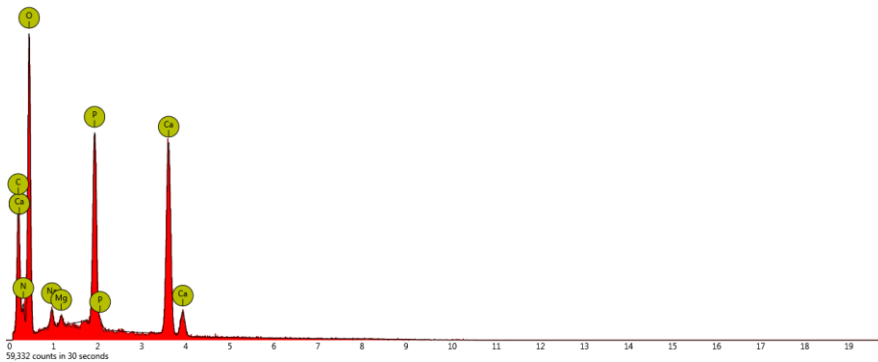


Рисунок 37 - Анализ в зоне края образца №5 первой группы

В Таблице 9 приведены значения содержания определяемых химических элементов в первой группе контрольных образцов в процентном соотношении количества атомов каждого элемента к общему количеству атомов.

Таблица 9 - Содержание определяемых химических элементов в первой группе образцов № 1 - 5

№	Химический элемент	Доля атомов в %
1.	O	68,92±0,7
2.	Ca	10,69±0,6
3.	P	7,61±0,3
4.	N	6,11±0,3
5.	C	4,52±0,2
6.	Na	1,55±0,1
7.	Mg	0,57±0,03

Элементный анализ второй группы образцов

Вторую группу образцов инкубировали в раствор соляной кислоты 0,8 н в течение 24 часов, вследствие чего на образцах образовался ярко выраженный фронт деминерализации. С использованием сканирующего электронного микроскопа Phenom XL получено изображение фронта деминерализации. Ширина зоны с удаленной минеральной фазой на образце через 24 часа деминерализации составила 0,323 мм (Рисунок 38).

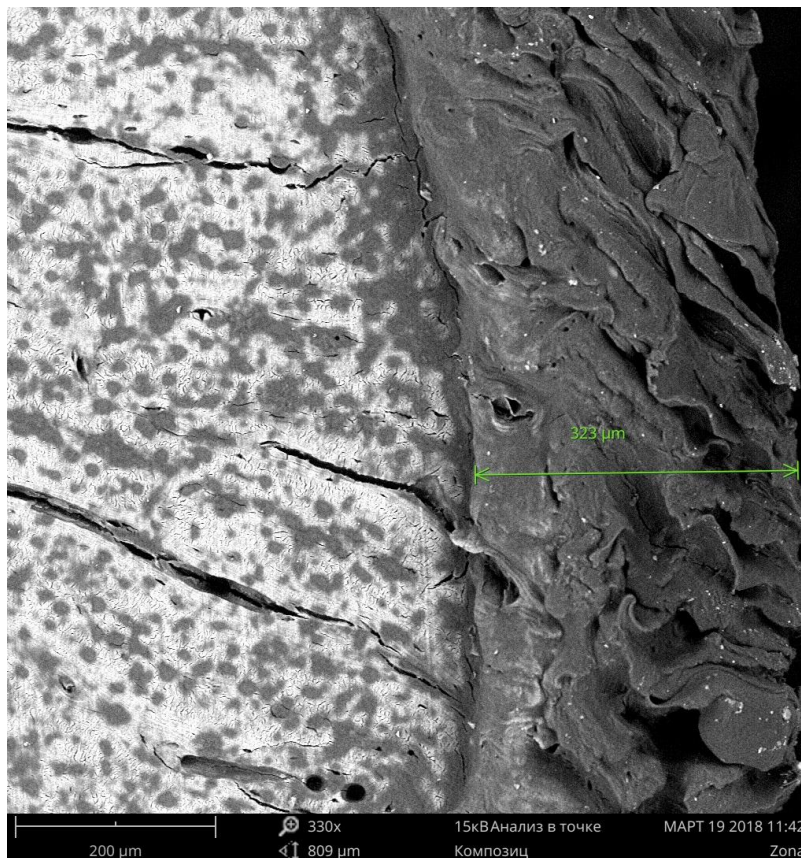
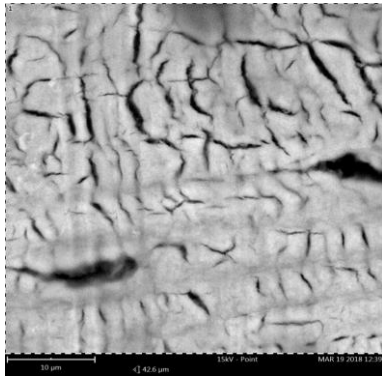


Рисунок 38 - Зона деминерализации на поперечном срезе образца. X 330

При проведении элементного анализа **второй группы** образцов, анализировали зоны пяти образцах № 1 – 5 распределенные от центра к краю образцов (Рисунки 39 - 42).



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	67.25
N	9.74
Ca	8.77
C	6.35
P	6.14
Na	1.33
Mg	0.43

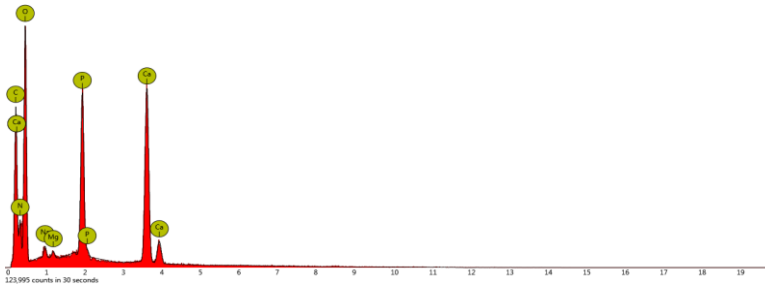
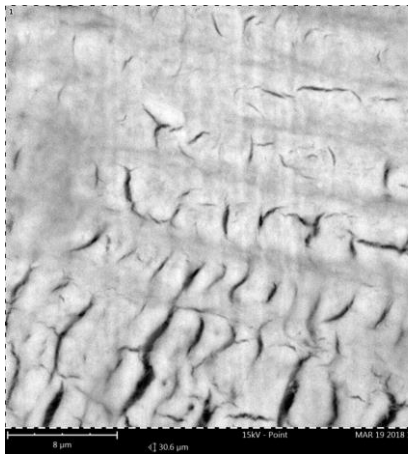


Рисунок 39 - Анализ в центральной зоне образца №1 второй группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	64.99
Ca	11.41
N	8.72
P	7.42
C	5.95
Na	1.24
Mg	0.27

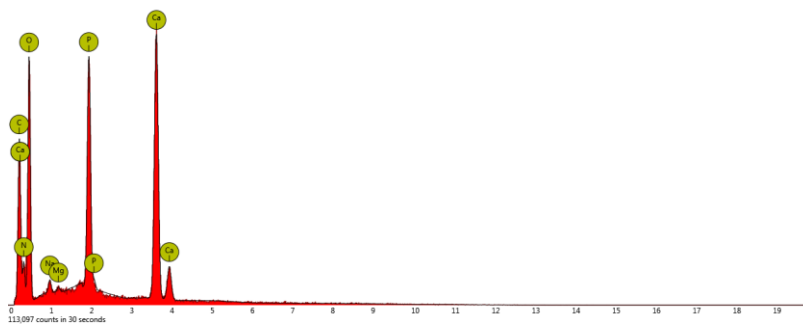
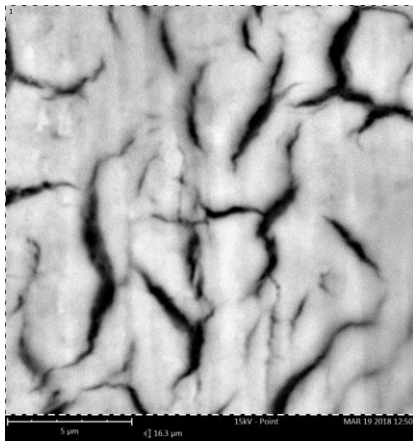


Рисунок 40 - Анализ в средней зоне ближе к центру образца №2 второй группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	63.25
Ca	12.26
N	9.05
P	8.16
C	5.86
Na	1.15
Mg	0.27

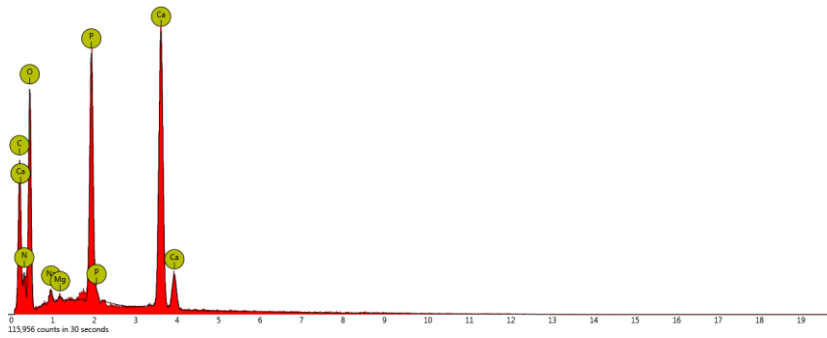
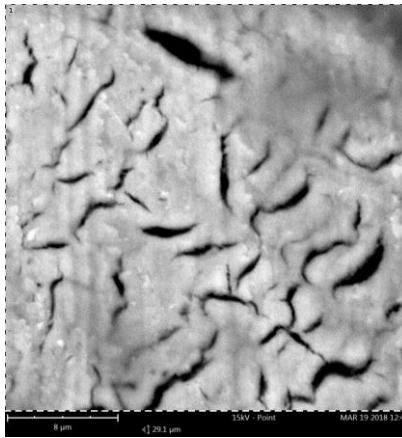


Рисунок 41 - Анализ в средней зоне образца №3 второй группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	62.34
Ca	11.14
N	10.35
C	7.52
P	7.30
Na	1.07
Mg	0.29

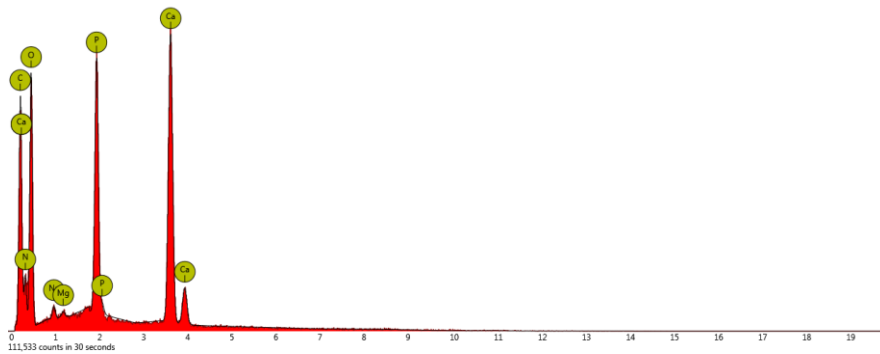
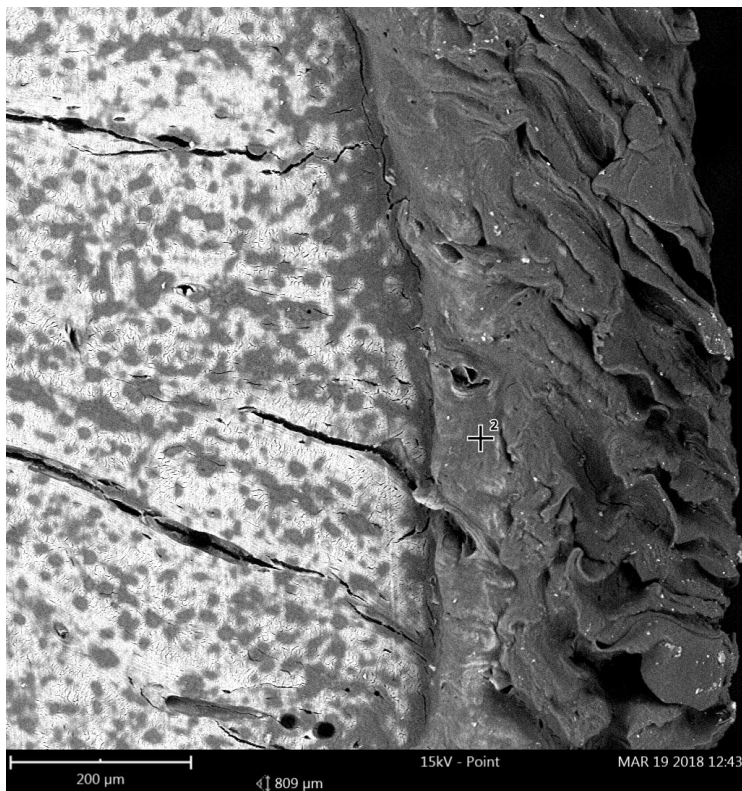


Рисунок 42 - Анализ в средней зоне ближе к краю образца № 4 второй группы

Для более подробного анализа образца №5, за пределами фронта деминерализации, элементный анализ провели в пяти точках деминерализованной зоны шириной 0,323 мм. Точки анализа № 2, 3, 5, 6, 7 обозначены на Рисунках 43 - 47.



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	63.44
C	16.06
N	14.89
P	2.72
Ca	2.67
S	0.22

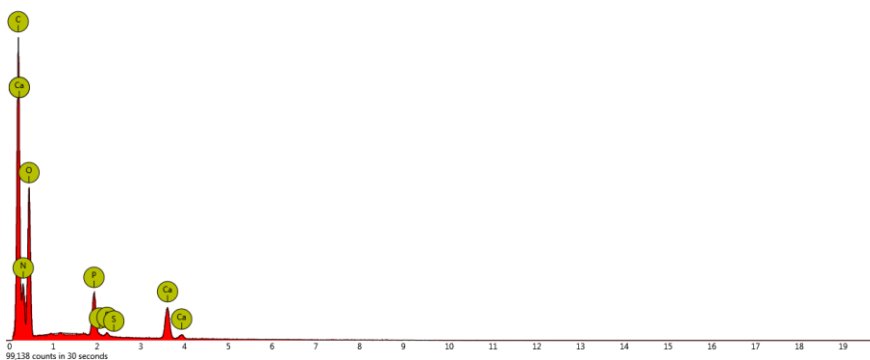
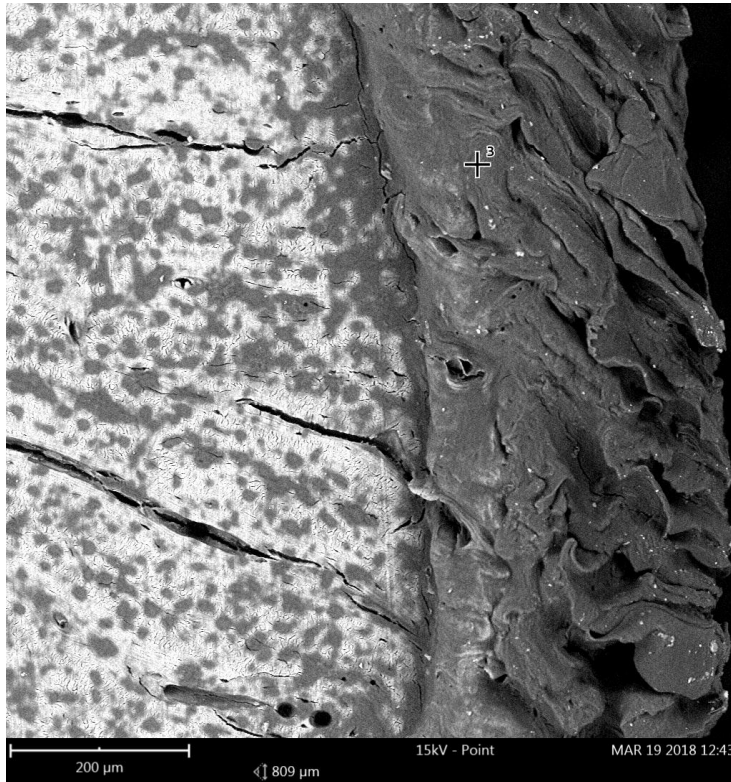


Рисунок 43 - Анализ за фронтом деминерализации в точке № 2 образца №5 второй группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	60.18
C	18.01
N	17.80
Ca	2.06
P	1.65
S	0.28

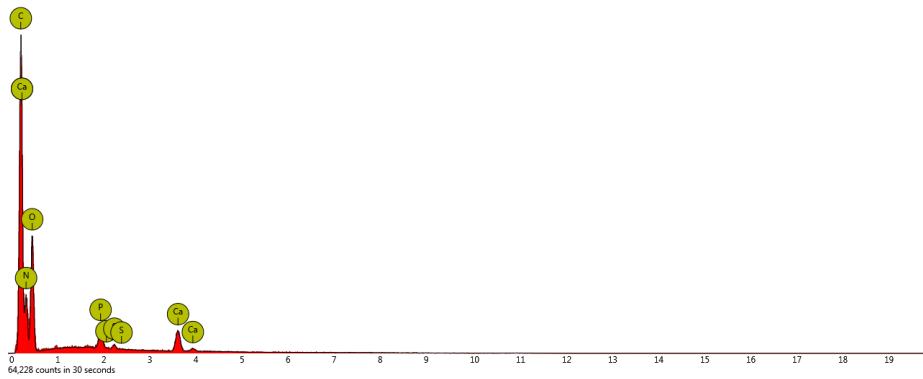
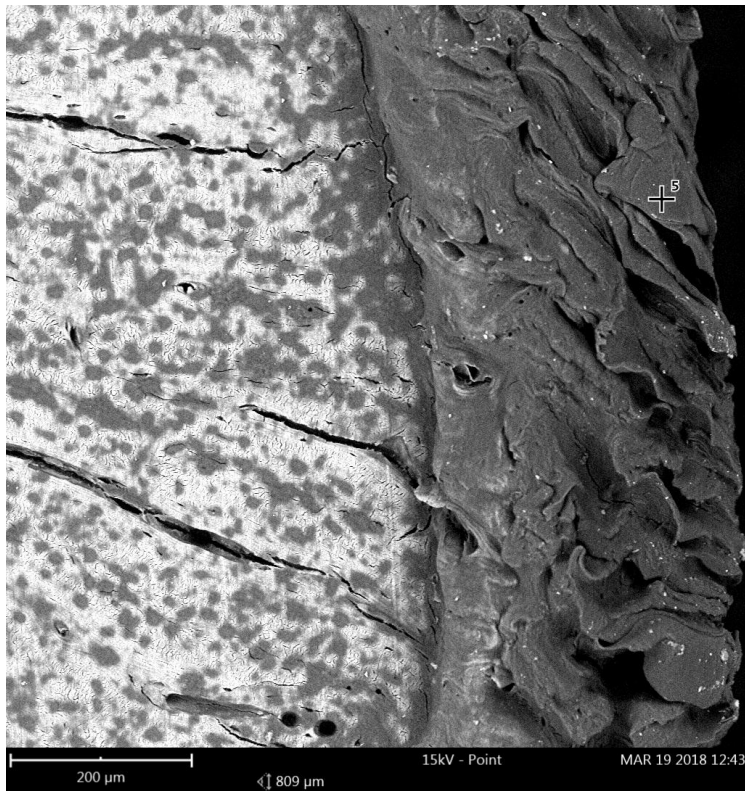


Рисунок 44 - Анализ за фронтом деминерализации в точке № 3 образца №5 второй группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	52.12
C	27.11
N	16.12
Ca	2.20
P	1.65
S	0.80

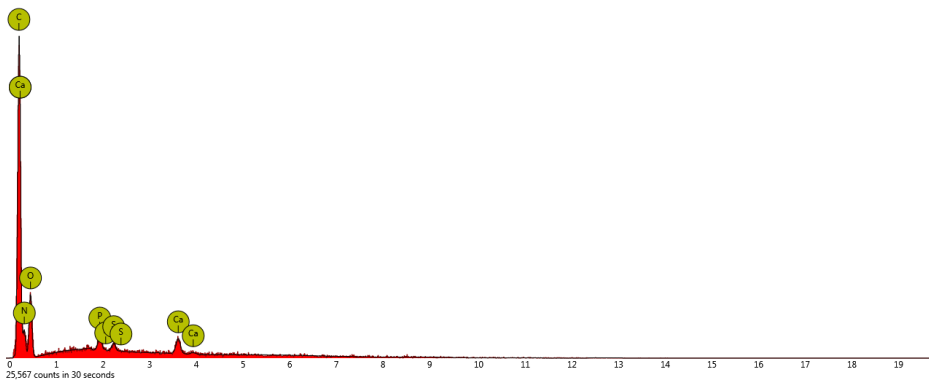
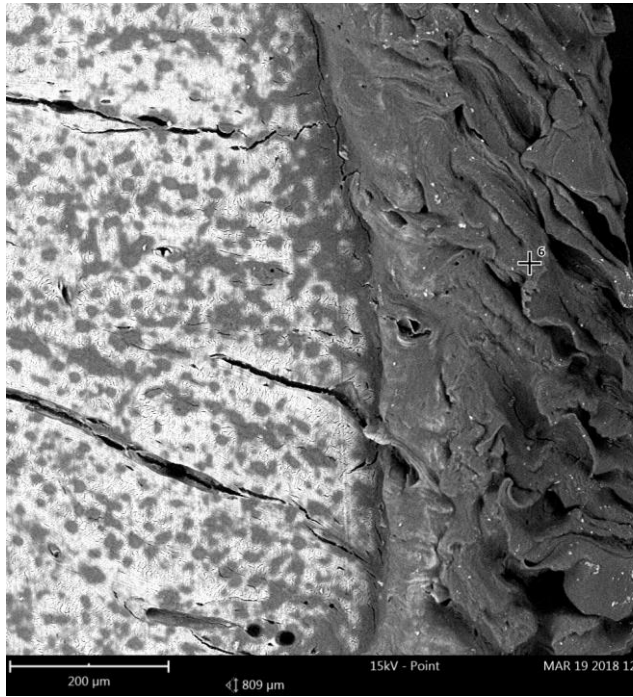


Рисунок 45 - Анализ за фронтом деминерализации в точке № 5 образца №5 второй группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	61.19
C	21.09
N	15.22
P	1.41
Ca	0.82
S	0.27

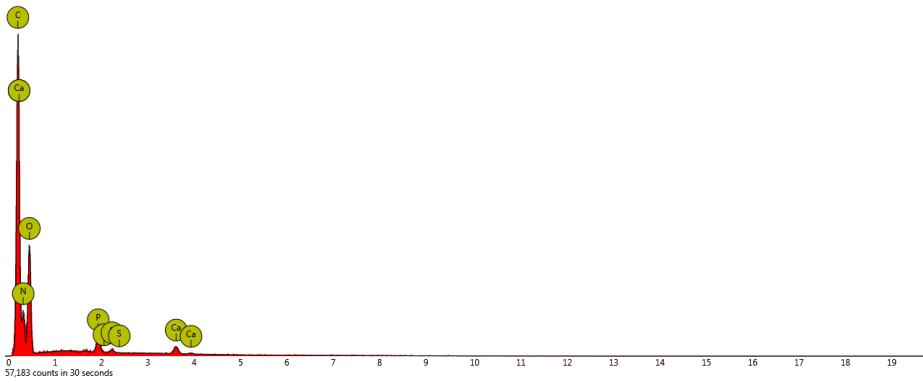
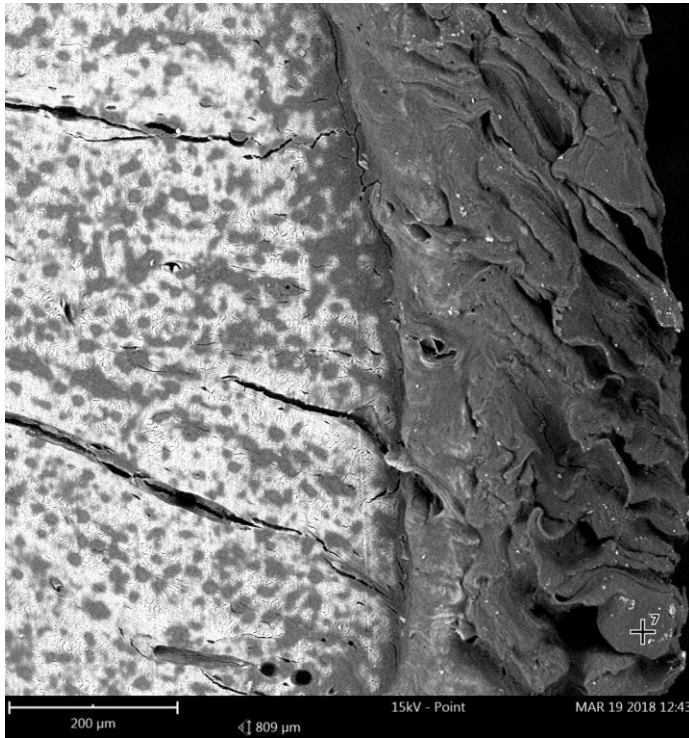


Рисунок 46 - Анализ за фронтом деминерализации в точке № 6 образца №5 второй группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	62.85
N	15.68
C	13.75
Ca	4.13
P	3.02
S	0.57

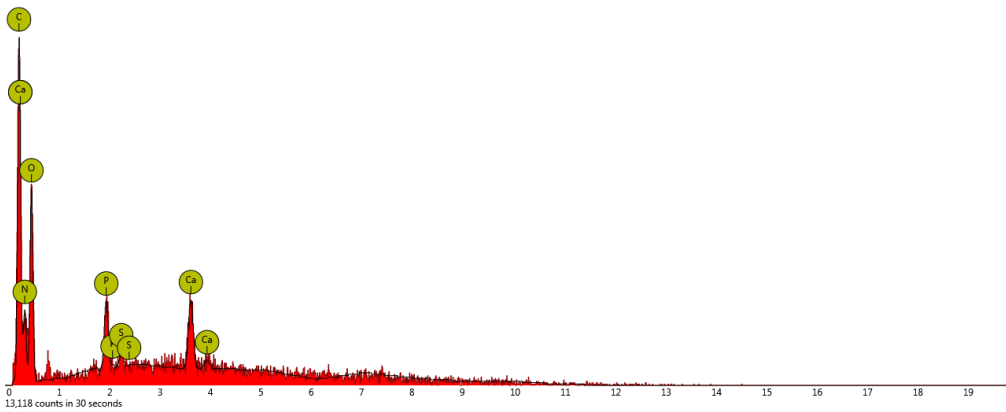


Рисунок 47 - Анализ за фронтом деминерализации в точке № 7 образца №5 второй группы

В Таблице 10 приведены значения содержания определяемых химических элементов во второй группе образцов № 1 - 4 с внутренней стороны относительно фронта деминерализации и образца №5 с внешней стороны относительно фронта деминерализации, после 24 часового воздействия раствора соляной кислоты 0,8 моль/дм³.

Таблица 10 - Содержание определяемых химических элементов во второй группе образцов

Анализ в зонах в пределах фронта деминерализации (образцы № 1,2,3,4)		
№	Химический элемент	Доля атомов в %
1.	O	64,45±1,1
2.	Ca	10,89±0,7
3.	N	9,46±0,4
4.	P	7,25±0,4
5.	C	6,42±0,4
6.	Na	1,19±0,1
7.	Mg	0,31±0,04
Анализ в пяти точках в зоне за пределами фронта деминерализации (образец №5)		
1.	O	59,95±2,04
2.	C	19,20±2,3
3.	N	15,94±0,5
4.	Ca	2,37±0,5
5.	P	2,09±0,3
6.	S	0,42±0,1

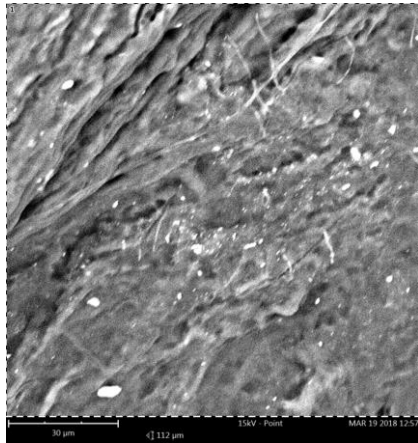
Через 24 часа инкубации второй группы образцов в раствор соляной кислоты $0,8 \text{ моль/дм}^3$ в зоне анализа в пределах фронта деминерализации в сравнении с контрольной группой образцов происходит увеличение относительного процентного содержания N – в 1,5 раза, C – в 1,5 раза. Уменьшение относительного процентного содержания Na - в 1,3 раза, Mg - в 2 раза. Относительное процентное содержание Ca и P – без изменений.

В зоне анализа за пределами фронта деминерализации происходит значительное снижение относительного процентного содержания следующих химических элементов в сравнении с контрольной группой: Ca – в 4,5 раза, P – в 3,5 раза. Увеличение относительного процентного содержания C – в 4,2 раз, N – в

2,6 раза. Анализ определил незначительное содержание S и не определил содержание Na и Mg.

Элементный анализ третьей группы образцов

Третью группу образцов инкубировали в раствор соляной кислоты 0,8 моль/дм³ в течение 48 часов. На Рисунках 48 - 52 приведены данные элементного анализа образцов № 1 - 5 в зонах распределенных от центра к краю образцов.



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	67.33
C	18.45
N	13.13
S	0.48
Cl	0.39
Si	0.23

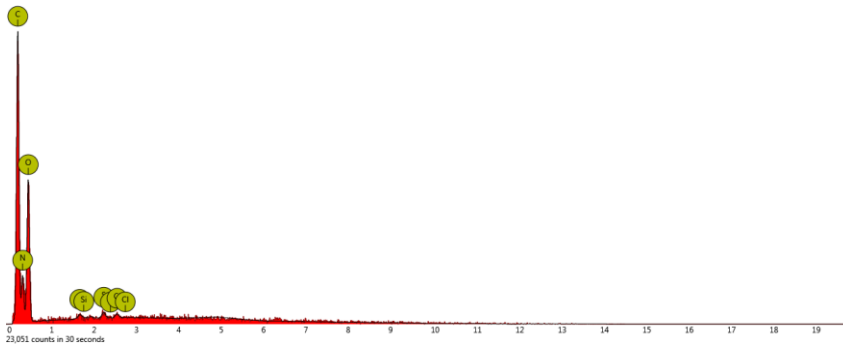
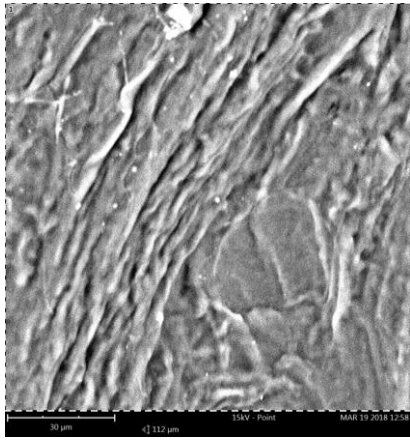


Рисунок 48 - Анализ в центральной зоне образца №1 третьей группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	68.64
C	17.42
N	13.46
Cl	0.26
S	0.22

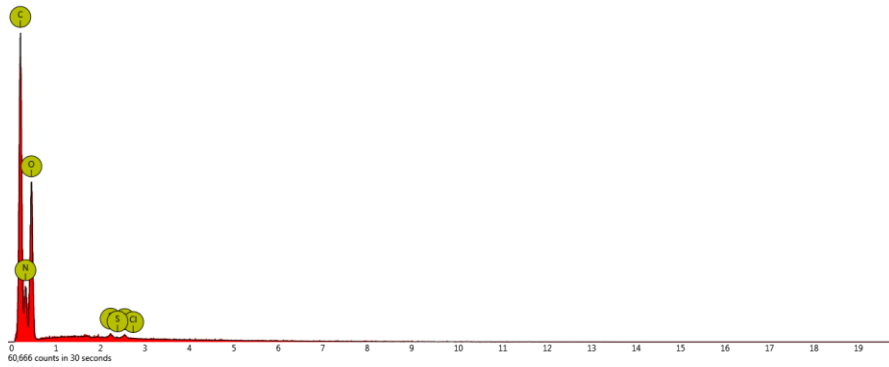
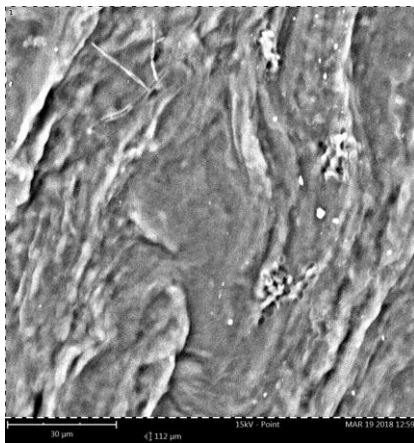


Рисунок 49 - Анализ в средней зоне ближе к центру образца №2 третьей группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	68.78
C	17.69
N	13.09
Cl	0.26
S	0.18

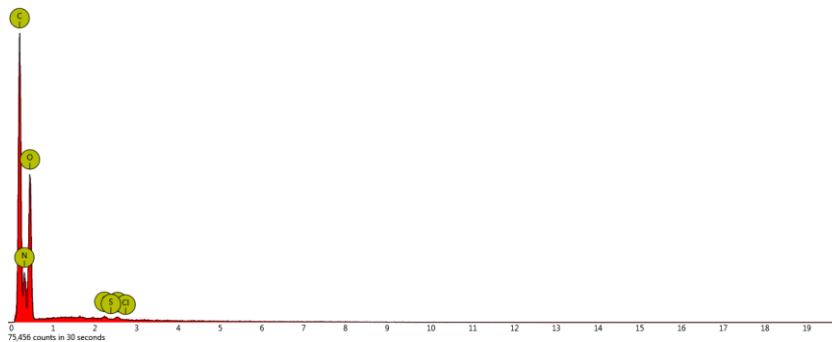
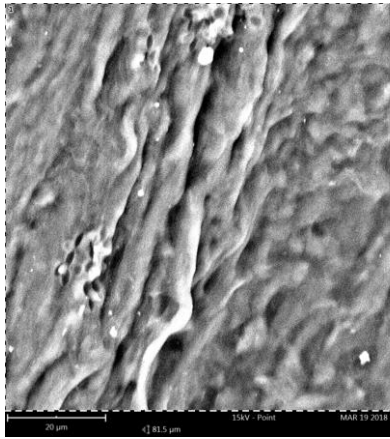


Рисунок 50 - Анализ в средней зоне образца №3 третьей группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	67.61
C	18.19
N	13.59
Cl	0.37
S	0.24

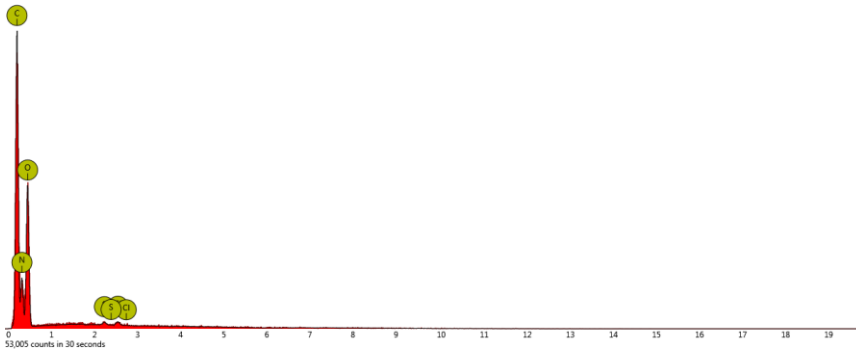
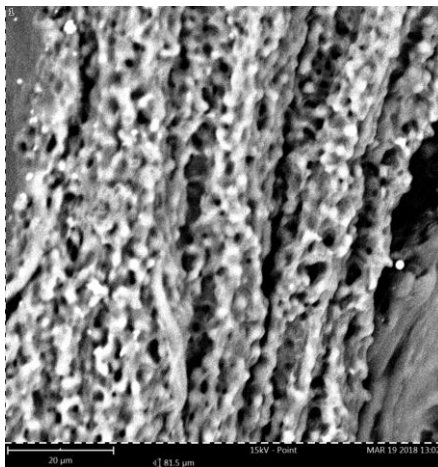


Рисунок 51 - Анализ в средней зоне ближе к краю образца №4 третьей группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	68.22
C	17.81
N	12.12
P	0.63
S	0.31
Si	0.30

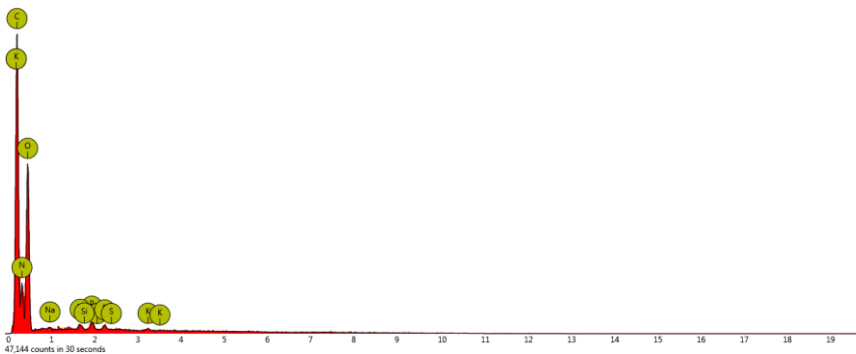


Рисунок 52 - Анализ в зоне края образца №5 третьей группы

В Таблице 11 приведены значения содержания определяемых химических элементов в третьей группе образцов, после 48 часов их инкубации в раствор соляной кислоты 0,8 моль/дм³.

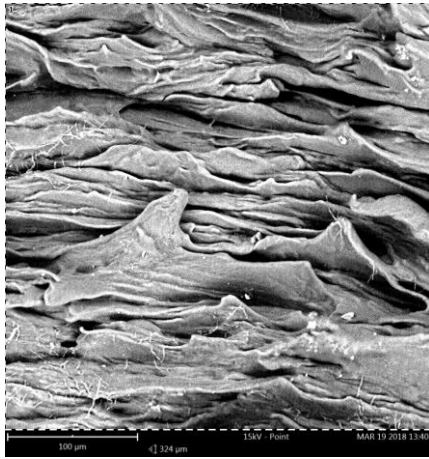
Таблица 11 - Содержание определяемых химических элементов в третьей группе образцов № 1 - 5

№	Химический элемент	Доля атомов в %
1.	O	68,11±0,3
2.	C	17,91±0,2
3.	N	13,07±0,3
4.	P	0,63
5.	S	0,28±0,05
6.	Cl	0,25±0,1
7.	Si	0,10 ±0,06

Анализ не определил в образцах - Ca, Mg. При сравнении с контрольной группой образцов, в образцах третьей группы увеличилось относительное процентное содержание N - в 2 раза, C - в 4 раза. Анализ определил незначительное содержание - S, Cl, Si, а также P при анализе одного из образцов.

Элементный анализ четвертой группы образцов

Четвертую группу образцов инкубировали в 0,8 моль/дм³ раствор соляной кислоты в течение 72 часов. На Рисунках 53 - 57 приведены данные элементного анализа образцов № 1 - 5 в зонах распределенных от центра к краю образцов.



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	59.84
C	20.70
N	15.17
P	0.24
S	0.20
Si	0.14

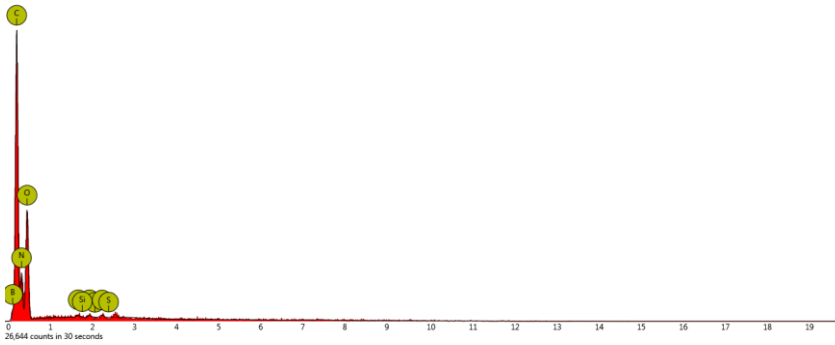
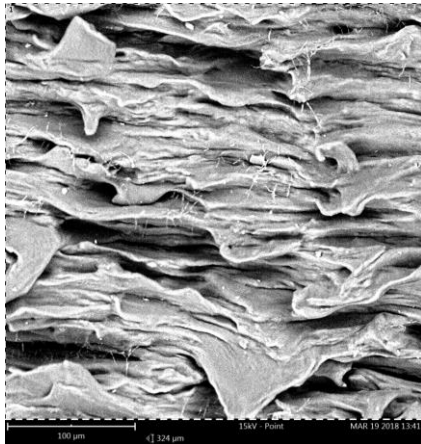


Рисунок 53 - Анализ в центральной зоне образца №1 четвертой группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	63.20
C	19.90
N	16.12
S	0.38
P	0.19
Si	0.21

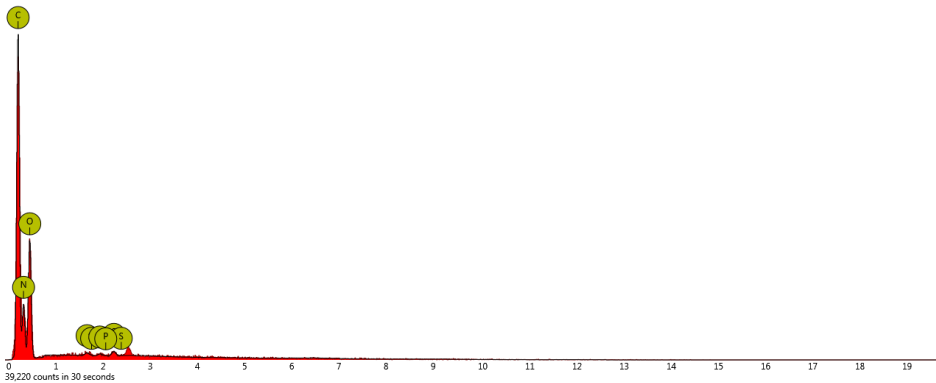
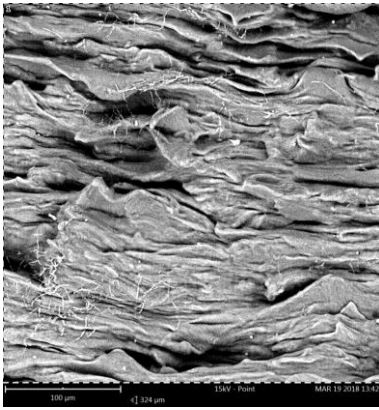


Рисунок 54 - Анализ в средней зоне ближе к центру образца №2 четвертой группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	63.17
C	20.35
N	15.97
S	0.40
Si	0.10

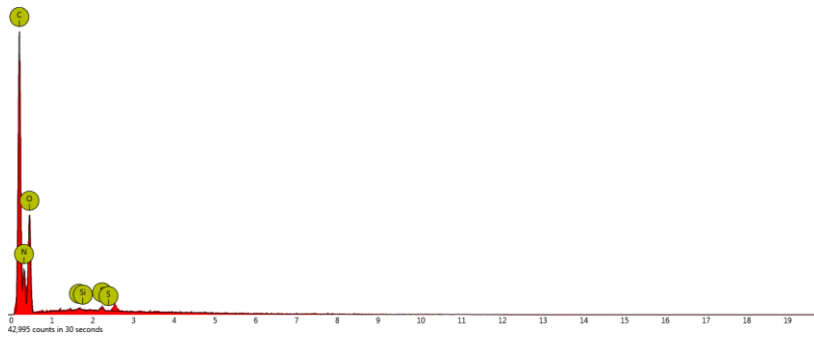
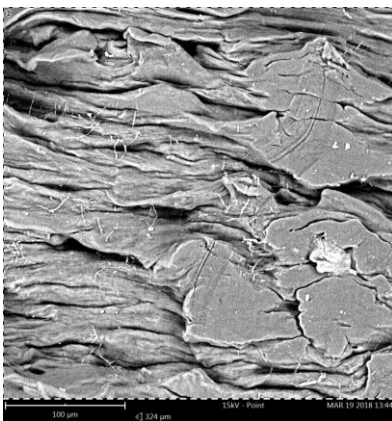


Рисунок 55 - Анализ в средней зоне образца №3 четвертой группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	62.00
C	21.35
N	15.70
S	0.50
P	0.23
Si	0.22

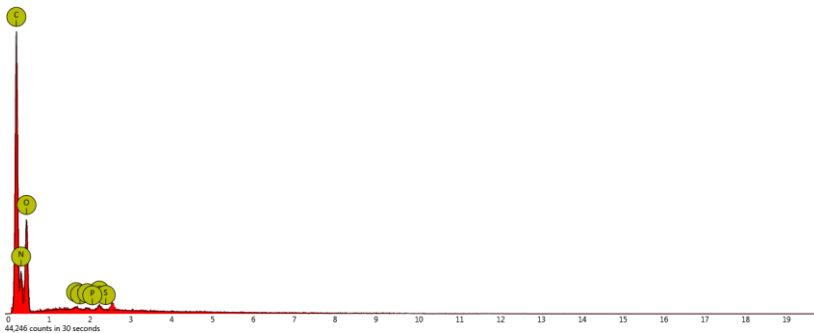
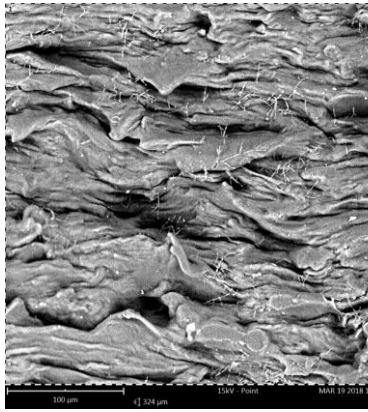


Рисунок 56 - Анализ в средней зоне ближе к краю образца №4 четвертой группы



Хим. элемент	Доля атомов в %
O	63.44
C	20.44
N	15.22
S	0.37
Si	0.31
P	0.22

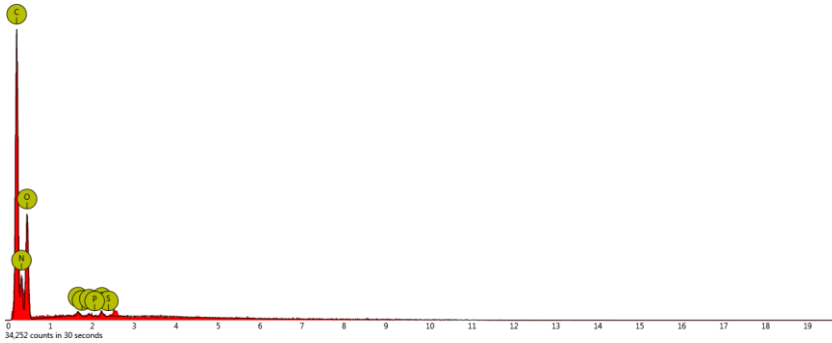


Рисунок 57 - Анализ в зоне края образца №5 четвертой группы

В Таблице 12 приведены значения содержания определяемых химических элементов в четвертой группе образцов.

Таблица 12 - Содержание определяемых химических элементов в четвертой группе образцов № 1 - 5

№	Химический элемент	Доля атомов в %
1.	O	62,33±0,7
2.	C	20,54±0,2
3.	N	15,63±0,2
5.	P	0,17±0,04
6.	S	0,37±0,1
7.	Si	0,19±0,03

Через 72 часа инкубации образцов в раствор соляной кислоты 0,8 моль/дм³, в деминерализованном костном матриксе анализ не определил содержание Ca, Na, Mg. Уменьшилось относительное процентное содержание P – в 45 раз.

Увеличилось относительное процентное содержание N - в 2,5 раза, С - в 4,5 раза (Таблица 13).

Таблица 13 - Результаты элементного анализа

№	Хим. элемент	Доля атомов в % (контроль)	Доля атомов в % (деминерализованный матрикс)
1.	O	68,92±0,7	62,33±0,7
2.	Ca	10,69±0,6	нет
3.	P	7,61±0,3	0,17±0,04
4.	N	6,11±0,26	15,63±0,2
5.	C	4,52±0,2	20,54±0,2
6.	Na	1,55±0,09	нет
7.	Mg	0,57±0,02	нет

Результаты элементного анализа контрольной группы и деминерализованных на разных этапах 3-х групп образцов свидетельствуют о поэтапном уменьшении относительного процентного содержания в костной ткани определяемых химических элементов, формирующих минеральную фазу кости и увеличении относительного процентного содержания определяемых химических элементов, формирующих органическую фазу костной ткани.

Элементный анализ с использованием рентгеновской спектроскопии позволил провести контроль удаления минеральной фазы при получении деминерализованных костных имплантатов. Полученные деминерализованные костные имплантаты подготовлены для дальнейших исследований в рамках настоящей работы.

Таким образом, для удаления минеральной фазы и получения деминерализованного костного матрикса экспериментально установлен оптимальный способ и режим деминерализации в течение 72 часов - инкубации образцов в растворе соляной кислоты 0,8 моль/дм³, t = 20°C при объемном соотношении образец/раствор - 1/100.

3.3. Оценка сорбционных свойств имплантатов и времени высвобождения лекарственного средства

Построение калибровочной кривой для определения количества высвобождаемого сангвиритрина из деминерализованного костного имплантата фотометрическим способом.

Для количественного определения высвобождения адсорбированного лекарственного средства из имплантата в раствор 0,9% натрия хлорида с использованием спектрофотометра построили калибровочную кривую. При построении калибровочной кривой подбирали оптимальную концентрация сангвиритрина в растворе. Для этого изначально использовали концентрацию сангвиритрина в растворе - 5 мг/мл (0,5% раствор). На весах Sartorius 1602 MP8-1 (Sartorius, Германия) с точностью 0,0000 гр брали навеску 125 мг сангвиритрина и растворяли в 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида при $t = 50^{\circ}\text{C}$ [109, 110]. Данный раствор хранили в термостате при 37°C . Для фотометрии готовили опытные пробы, содержащие сангвиритрин с возрастающей концентрацией 0,1 мг/мл; 0,2 мг/мл; 0,3 мг/мл; 0,4 мг/мл и т.д. до 1,0 мг/мл в 5 мл раствора 0,9% натрия хлорида. На основании фотометрических исследований было установлено, что раствор сангвиритрина в диапазоне концентрации 0,1 мг/мл - 1,0 мг/мл обладает высокой оптической плотностью, которая возрастает с 2,45 единиц до $> 4,00$ единиц, что не является достоверным результатом для построения калибровки.

Необходимо было значительно уменьшить концентрацию сангвиритрина для уменьшения оптической плотности раствора. Для этого раствор готовили из 10 мг сангвиритрина в 20 мл раствора 0,9% натрия хлорида, что соответствует его концентрации в растворе - 0,5 мг/мл. Этот раствор разбавляли в 10 раз до 0,05 мг/мл. Для этого брали 2 мл из исходного раствора и добавляли 18 мл раствора 0,9% натрия хлорида. Полученный раствор с концентрацией сангвиритрина 0,05 мг/мл (50 мкг/мл) использовали для получения 5,0 мл проб с разной концентрацией сангвиритрина для построения калибровочной кривой.

При построении калибровочной кривой использовали пробы общим объемом 5,0 мл, в которых содержание сангвиритрина составляло 1 мкг/мл, 2 мкг/мл, 4 мкг/мл и т.д. до 16 мкг/мл. Полученные результаты представлены в Таблице 14.

Таблица 14 - Определение сангвиритрина (СВ) в зависимости от его концентрации в 5 мл раствора 0,9% натрия хлорида при $\lambda = 321$ нм

Состав пробы 5 мл: 0,9% натрия хлорида + СВ р-вор	Конц-ция СВ на 1мл пробы (мкг/мл)	Оптическая плотность проб при $\lambda = 321$ нм	Оптическая плотность, $M \pm m$
4,9мл +0,1мл	1,0	0,057;0,048;0,045	0,050 \pm 0,004
4,8мл +0,2мл	2,0	0,081;0,089;0,087	0,086 \pm 0,002
4,6мл+0,4мл	4,0	0,190;0,195;0,197	0,194 \pm 0,002
4,4мл +0,6мл	6,0	0,286;0,289;0,290	0,288 \pm 0,001
4,2мл +0,8мл	8,0	0,396;0,400;0,404	0,400 \pm 0,002
4,0мл+1,0мл	10,0	0,490;0,496;0,500	0,495 \pm 0,003
3,8мл+1,2мл	12,0	0,585;0,592;0,580	0,586 \pm 0,003
3,6мл+1,4мл	14,0	0,673;0,683;0,676	0,677 \pm 0,003
3,4мл+1,6мл	16,0	0,766;0,770;0,778	0,771 \pm 0,003

В таблице представлен состав проб объемом 5 мл, концентрация сангвиритрина в 1 мл раствора 0,9% натрия хлорида и показатели оптической плотности раствора при длине волны - 321 нм в зависимости от концентрации сангвиритрина.

На основании полученных данных построена калибровочная кривая для количественной оценки содержания сангвиритрина в 1 мл раствора 0,9% натрия хлорида (Рисунок 58).

Показатели оптической
плотности раствора

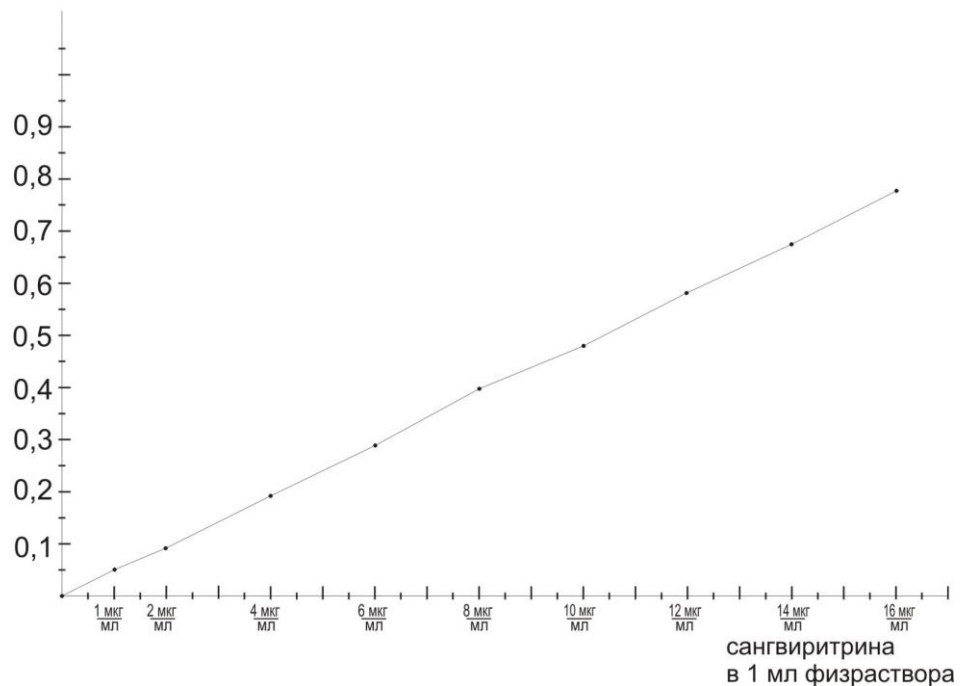


Рисунок 58 - Калибровочная кривая для оценки количества сангвиритрина в растворе 0,9% натрия хлорида

Приготовление раствора 0,2% сангвиритрина для инкубации деминерализованных имплантатов

Для иммобилизации сангвиритрина и определения его количественного выхода в раствор 0,9% натрия хлорида из образцов, обработку деминерализованных имплантатов в растворе с концентрацией сангвиритрина 0,2% проводили в рамках двух опытов. Для опыта №1 в раствор 0,9% натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина 0,2% инкубировали три образца в течение 72 часов. Для опыта №2 в раствор 0,9% натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина 0,2% инкубировали девять образцов в течение 144 часов.

Опыт №1.

Содержание сангвиритрина в 0,9% натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина 0,2% составляет 200 мкг в 1 мл. Для приготовления раствора с использованием электронных весов брали навеску сангвиритрина в количестве 20 мг и растворяли в 100 мл раствора 0,9% натрия хлорида. Раствор 0,9% натрия

хлорида предварительно нагревали до $t = 50^{\circ}\text{C}$, после этого в него засыпали субстанцию сангвиритрина.

Для полного растворения сангвиритрина раствор помешивали стеклянной палочкой. Приготовленный раствор хранили в термостате при $t = 37^{\circ}\text{C}$.

Непосредственно после отмывки образцов от раствора соляной кислоты после деминерализации и перед обработкой их раствором 0,9% натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина 0,2%, образцы взвешивали на электронных весах. Взятые в опыт три образца имели вес: образец №1 – 261 мг, образец №2 – 254 мг, образец №3 – 266 мг.

Далее каждый образец помещали в стеклянный бюкс и заливали 25 мл 0,2% раствором сангвиритрина. Содержание сангвиритрина в 25 мл раствора составило 5 мг. Рассчитывали соотношение веса образца (мг) на вес сангвиритрина (мг) в растворе. Полученные показатели по весовому соотношению для исследованных образцов составили:

- образец №1 в 25 мл раствора – $261 \text{ мг} / 5 \text{ мг} = 52,2$;
- образец №2 в 25 мл раствора – $254 \text{ мг} / 5 \text{ мг} = 50,8$;
- образец №3 в 25 мл раствора – $266 \text{ мг} / 5 \text{ мг} = 53,2$.

Среднее соотношение веса образцов (мг) к весу сангвиритрина (мг) составило 52,1.

Бюксы с образцами в растворе 0,9% натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина 0,2% помещали на **72** часа в термостат при $t = 37^{\circ}\text{C}$. Через 72 часа образцы извлекали из раствора, каждый образец помещали на фильтровальную бумагу (Рисунок 59).

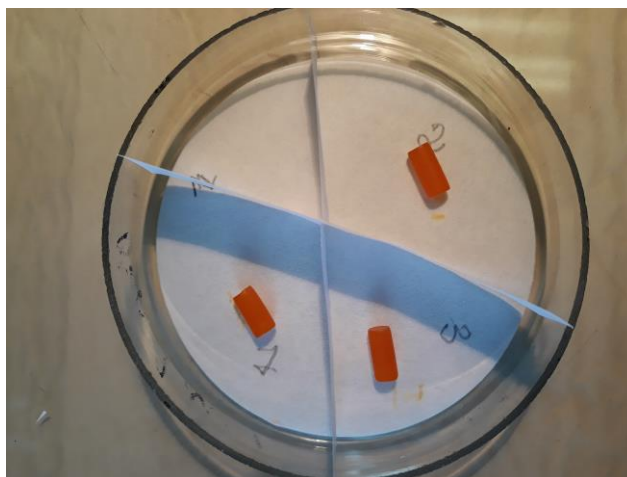


Рисунок 59 - Образцы имплантационных препаратов № 1 - 3 после их инкубации в раствор 0,9% натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина 0,2% в течение 72 часов

Образцы оставляли сохнуть при комнатной температуре в асептических условиях на бумажном фильтре в чаше Петри в течение 2-х суток. После высушивания образцы взвешивали. Масса высушенных образцов после обработки в 0,9% натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина 0,2% составила:

- № 1 – 97,8 мг;
- № 2 – 98,3 мг;
- № 3 – 93,4 мг.

Образцы инкубировали в растворе 0,9% натрия хлорида при $t = 37^{\circ}\text{C}$ с одновременным спектрофотометрическим контролем высвобождения сангвиритрина.

Опыт №2.

Для приготовления раствора с использованием электронных весов брали навеску сангвиритрина в количестве 46 мг и растворяли в 230 мл раствора 0,9% натрия хлорида. Раствора 0,9% натрия хлорида предварительно нагревали до $t = 50^{\circ}\text{C}$, после этого в него засыпали порошок сангвиритрина. Для полного растворения сангвиритрина раствор помешивали стеклянной палочкой. Приготовленный раствор хранили в термостате при $t = 37^{\circ}\text{C}$.

Непосредственно после отмывки образцов от раствора соляной кислоты $0,8$ моль/дм³, девять образцов одновременно взвешивали на электронных весах. Взятые в опыт образцы имели общую массу – 2446 мг или $2,446$ г.

Образцы помещали в стеклянный бюкс и заливали раствором $0,9\%$ натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина $0,2\%$ в количестве 230 мл. Показатель соотношения веса деминерализованных костных образцов к весу сангвиритрина в растворе составил - 2446 мг / 46 мг = $53,1$.

Бюксы с девятью образцами в растворе помещали на **144** часа в термостат при $t = 37^{\circ}$ С. Через 144 часа образцы извлекали из раствора и помещали на фильтровальную бумагу (Рисунок 60).



Рисунок 60 - Образцы имплантационных препаратов после их инкубации в раствор $0,9\%$ натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина $0,2\%$ в течение 144 часов

Далее образцы высушивали при комнатной температуре в асептических условиях на бумажном фильтре в чаше Петри в течение 2 -х дней.

Контроль высвобождения адсорбированного сангвиритрина из деминерализованного костного имплантата фотометрическим способом

Опыт №1 – 3 образца, инкубация в раствор 0,9 % натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина 0,2% в течение 72 часов

Отмывку образцов от сангвиритрина в растворе 0,9% натрия хлорида и контроль фотометрическим способом проводили при 37°C в течение 2-х суток. Образцы помещали в стеклянные бюксы с 12,5 мл раствора 0,9% натрия хлорида, а через 1,5 часа, когда образцы увеличивались в растворе в объеме, количество отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида в бюксах увеличивали до 25 мл.

Далее исследовали время и количество выхода в раствор 0,9% натрия хлорида сангвиритрина из деминерализованных образцов. Для этого бюксы доставали из термостата и измеряли оптическую плотность раствор при длине волны - 321 нм. Объем проб составлял 1,0 мл. После увеличения поглощения отмывочного раствора выше 0,700 единиц (калибровочная кривая построена до 0,700 единиц), его разбавляли до объема 3,0 мл, при этом к 1,0 мл отмывочного раствора добавляли 2,0 мл раствора 0,9% натрия хлорида. Количество высвобожденного из образцов сангвиритрина в 1 мл раствора определяли по ранее построенной калибровочной кривой, построенной по оптическому поглощению раствора сангвиритрина в диапазоне концентраций от 1 мкг/мл до 16 мкг/мл. После этого содержание сангвиритрина в 1,0 мл пересчитывали на 3,0 мл и на 25 мл отмывочного раствора в бюксах.

Содержание сангвиритрина через 1,5 часа в 12,5 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

- **образец №1** + 12,5 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности 1,0 мл исследуемого раствора составил 0,640 единиц, что по калибровочной кривой соответствует 13,1 мкг/мл сангвиритрина. Следовательно, в 12,5 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида количество сангвиритрина составляет - $13,1 \text{ мкг/мл} \times 12,5 \text{ мл} = 163,75 \text{ мкг}$ или **0,164 мг**.

- **образец №2** + 12,5 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности 1,0 мл исследуемого раствора составил 0,608 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 12,25 мкг/мл сангвиритрина. Во всем объеме 12,5 мл содержится - $12,25 \text{ мкг/мл} \times 12,5 \text{ мл} = 153,13 \text{ мкг}$ сангвиритрина или **0,153** мг.
- **образец №3** + 12,5 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности 1,0 мл исследуемого раствора составил 0,656 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 13,5 мкг/мл сангвиритрина. Во всем объеме 12,5 мл содержится - $13,5 \text{ мкг/мл} \times 12,5 \text{ мл} = 168,75 \text{ мкг}$ сангвиритрина или **0,169** мг.

Среднее количество сангвиритрина для одного образца в отмывочном растворе 0,9% натрия хлорида через 1,5 часа инкубации составило **0,162** мг.

Содержание сангвиритрина через **4** часа в 25 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

- **образец №1** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности 1,0 мл исследуемого раствора составил 0,482 единиц. В соответствии с калибровочной кривой - $10 \text{ мкг/мл} \text{ сангвиритрина} \times 25 \text{ мл} = 250 \text{ мкг}$ или **0,250** мг сангвиритрина перешло через 4 часа инкубации.
- **образец №2** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности 1,0 мл исследуемого раствора составил 0,462 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – $9,5 \text{ мкг/мл} \text{ сангвиритрина} \times 25 \text{ мл} = 237,5 \text{ мкг}$ или **0,238** мг сангвиритрина перешло в физраствор через 4 часа инкубации.
- **образец №3** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности 1,0 мл исследуемого раствора составил 0,490 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – $10,2 \text{ мкг/мл} \text{ сангвиритрина} \times 25 \text{ мл} = 272,5 \text{ мкг}$ или **0,273** мг сангвиритрина перешло в раствор через 4 часа инкубации.

Среднее количество сангвиритрина в отмывочном растворе 0,9% натрия хлорида через 4 часа инкубации для одного образца составило **0,253** мг.

Содержание сангвиритрина через 6 часов в 25 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

- **образец №1** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности 1,0 мл исследуемого раствора составил 0,595 единиц, что по калибровочной кривой соответствует 12,3 мкг/мл сангвиритрина \times 25 мл = 307,5 мкг или **0,308** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 6 часов инкубации.
- **образец №2** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности 1,0 мл исследуемого раствора составил 0,570 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 11,7 мкг/мл сангвиритрина \times 25 мл = 293 мкг или **0,293** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 6 часов инкубации.
- **образец №3** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности 1,0 мл исследуемого раствора составил 0,608 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 12,5 мкг/мл сангвиритрина \times 25 мл = 312,5 мкг или **0,312** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 6 часов инкубации.

Среднее количество сангвиритрина в отмывочном растворе 0,9% натрия хлорида через 6 часов инкубации для одного образца составило **0,304** мг.

Содержание сангвиритрина через 8 часов в 25 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

- **образец №1** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности 1,0 мл исследуемого раствора составил 0,690 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 14,10 мкг/мл сангвиритрина \times 25 мл = 352,5 мкг или **0,352** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 8 часов инкубации.
- **образец №2** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности 1,0 мл исследуемого раствора составил 0,644 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 13,3 мкг/мл сангвиритрина \times 25 мл

= 332,5 мкг или **0,332** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 8 часов инкубации.

- **образец №3** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности 1,0 мл исследуемого раствора составил 0,690 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 14,10 мкг/мл сангвиритрина x 25 мл = 352,5 мкг или **0,352** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 8 часов инкубации.

Среднее количество сангвиритрина в отмывочном растворе 0,9% натрия хлорида через 8 часов инкубации для одного образца составило **0,345** мг.

Учитывая, что показатели оптической плотности раствора после 8 часов инкубации составляли около или более 0,700 единиц и построенная калибровочная кривая не позволяла определить количество высвобожденного сангвиритрина, начиная с 24 часов инкубации, отмывочный раствор дополнительно разбавляли раствором 0,9% натрия хлорида. Для этого отбирали пробы 1,0 мл, к которой добавляли 2,0 мл раствора 0,9% натрия хлорида. После чего, общий объем разбавленного для фотометрии раствора составлял 3,0 мл. Определяли содержание сангвиритрина в 1,0 мл разбавленного раствора и умножали на 3,0 мл, что соответствовало содержанию сангвиритрина в исходном 1 мл отмывочного раствора, после этого пересчитывали содержание сангвиритрина на весь объем в 25 мл.

Содержание сангвиритрина через 24 часа в 25 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

- **образец №1** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности разбавленной до 3,0 мл пробы составил 0,360 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 7,5 мкг/мл сангвиритрина x 3 мл = 22,5 мкг x 25 мл = 562,5 мкг или **0,562** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 24 часа инкубации.
- **образец №2** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности разбавленной до 3,0 мл пробы составил 0,340 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 7,0 мкг/мл сангвиритрина x 3 мл =

21,0 мкг x 25 мл = 525,0 мкг или **0,525** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 24 часа инкубации.

- **образец №3** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности разбавленной до 3,0 мл пробы составил 0,371 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 7,7 мкг/мл сангвиритрина x 3 мл = 23,1 мкг x 25 мл = 577,0 мкг или **0,577** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 24 часа инкубации.

Среднее количество сангвиритрина в отмывочном растворе 0,9% натрия хлорида через 24 часа инкубации для одного образца составило **0,554** мг.

Содержание сангвиритрина через 28 часов в 25 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

- **образец №1** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности разбавленной до 3,0 мл пробы составил 0,374 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 7,7 мкг/мл сангвиритрина x 3 мл = 23,1 мкг x 25 мл = 577,5 мкг или **0,578** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 28 часов инкубации.
- **образец №2** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности разбавленной до 3,0 мл пробы составил 0,350 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 7,3 мкг/мл сангвиритрина x 3 мл = 21,9 мкг x 25 мл = 547,5 мкг или **0,548** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 28 часов инкубации.
- **образец №3** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности разбавленной до 3,0 мл пробы составил 0,389 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 8,0 мкг/мл сангвиритрина x 3 мл = 24,0 мкг x 25 мл = 600,0 мкг или **0,600** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 28 часов инкубации.

Среднее количество сангвиритрина в отмывочном растворе 0,9% натрия хлорида через 28 часов инкубации для одного образца составило **0,575** мг.

Содержание сангвиритрина через 32 часа в 25 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

- **образец №1** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности разбавленной до 3,0 мл пробы составил 0,397 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 8,2 мкг/мл сангвиритрина x 3 мл = 24,6 мкг x 25 мл = 615,0 мкг или **0,615** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 32 часа инкубации.
- **образец №2** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности разбавленной до 3,0 мл пробы составил 0,375 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 7,8 мкг/мл сангвиритрина x 3 мл = 23,4 мкг x 25 мл = 585,0 мкг или **0,585** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 32 часа инкубации.
- **образец №3** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности разбавленной до 3,0 мл пробы составил 0,410 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 8,5 мкг/мл сангвиритрина x 3 мл = 25,5 мкг x 25 мл = 637,5 мкг или **0,638** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 32 часа инкубации.

Среднее количество сангвиритрина в отмывочном растворе 0,9% натрия хлорида через 32 часа инкубации для одного образца составило **0,612** мг.

Содержание сангвиритрина через 42 часа в 25 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

- **образец №1** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности разбавленной до 3,0 мл пробы составил 0,400 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 8,3 мкг/мл сангвиритрина x 3 мл = 24,9 мкг x 25 мл = 622,5 мкг или **0,622** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 42 часа инкубации.
- **образец №2** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности разбавленной до 3,0 мл пробы составил 0,385 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 8,0 мкг/мл сангвиритрина x 3 мл = 24,0 мкг x 25 мл = 600,0 мкг или **0,600** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 42 часа инкубации.

- **образец №3** + 25 мл раствора 0,9% натрия хлорида – показатель оптической плотности разбавленной до 3,0 мл пробы составил 0,420 единиц. В соответствии с калибровочной кривой – 8,6 мкг/мл сангвиритрина x 3 мл = 25,8 мкг x 25 мл = 645,0 мкг или **0,645** мг сангвиритрина перешло в 25 мл раствора через 42 часа инкубации.

Среднее количество сангвиритрина в отмывочном растворе 0,9% натрия хлорида через 42 часа инкубации для одного образца составило **0,622** мг.

Полученные количественные данные представлены в Таблице 15.

Таблица 15 - Количество высвобожденного сангвиритрина в зависимости от времени инкубации образцов в раствор 0,9% натрия хлорида

Время инкубации, часы	Количество сангвиритрина в растворе, мг/12,5 мл			Мг, $M \pm m$
	Образец №1	Образец №2	Образец №2	
1,5	0,164	0,153	0,169	0,162±0,005
Количество сангвиритрина в растворе, мг/25 мл				
4	0,250	0,238	0,273	0,253±0,01
6	0,308	0,293	0,312	0,304±0,006
8	0,352	0,332	0,352	0,345±0,006
24	0,562	0,525	0,578	0,554±0,015
28	0,578	0,547	0,600	0,575±0,015
32	0,615	0,585	0,638	0,612±0,015
42	0,622	0,600	0,645	0,622±0,013

В соответствии с полученными количественными данными построена кривая динамики высвобождения сангвиритрина из деминерализованных имплантатов в зависимости от времени их инкубации в раствор 0,9% натрия хлорида (Рисунок 61).

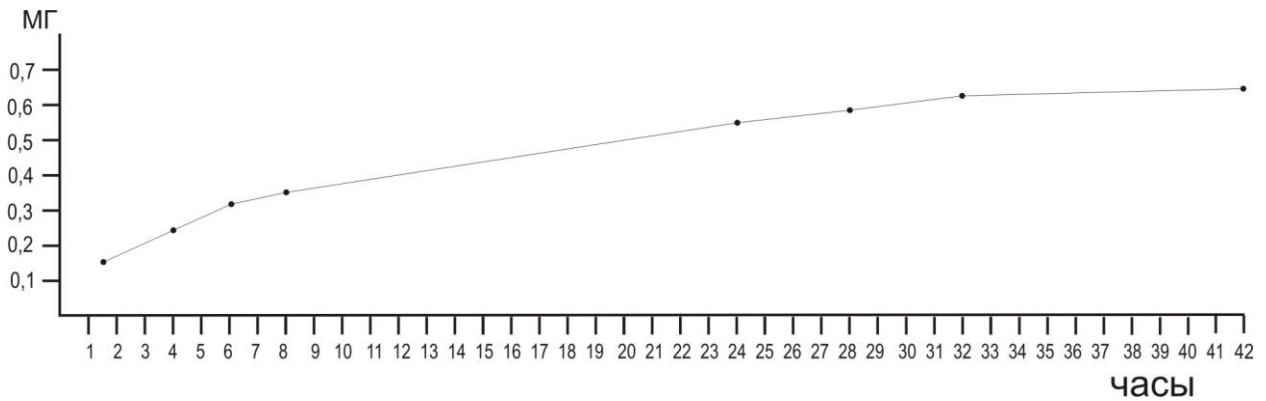


Рисунок 61 - Динамика высвобождения сангвиритрина

С помощью контроля фотометрическим способом получены данные, о количестве высвобождаемого сангвиритрина из образцов деминерализованных имплантатов в раствор 0,9% натрия хлорида в течение 42 часов при $t = 37^{\circ}\text{C}$.

Так, за первые 8 часов в раствор элюирует около 55% адсорбированного сангвиритрина и высвобождение препарата происходило не ранее чем через 42 часа, т.е. наблюдался выраженный пролонгирующий эффект.

Опыт №2 – 8 образцов, инкубация в раствор 0,9% натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина 0,2% в течение 144 часов.

Отмывку образцов от адсорбированного сангвиритрина в растворе 0,9% натрия хлорида и контроль высвобождения сангвиритрина проводили при $t = 37^{\circ}\text{C}$ в течение 2-х суток. Образцы в количестве восьми штук, обработанные раствором 0,9% натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина 0,2% одновременно помещали в 230 мл раствор 0,9% натрия хлорида. Первый контроль отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида проводили через 30 минут. Для этого из раствора отбирали 1,0 мл и добавляли 6,0 мл раствора 0,9% натрия хлорида, а начиная с 1,5 часов инкубации к исходной пробе 1,0 мл добавляли раствора 0,9% натрия хлорида в количестве 5,0 мл. После этого измеряли оптическую плотность раствора при длине волны. По калибровочной кривой определяли количество сангвиритрина в 1,0 мл раствора, затем полученные данные умножали на объем, разведенной для исследования пробы (7,0 или 6,0 мл) и на общий объем раствора для отмывки восьми образцов – 230 мл. Для пересчета среднего количества сангвиритрина в растворе на 1 образец, делили общее количество высвобожденного сангвиритрина на количество образцов (8 шт.).

Содержание сангвиритрина через 30 минут в 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

Показатель оптической плотности 1,0 мл разбавленной до 7,0 мл пробы составил 0,079 единиц. В соответствии с калибровочной кривой это соответствует 1,7 мкг/мл сангвиритрина.

Пересчитываем количество сангвиритрина на 230 мл отмывочного раствора раствора 0,9% натрия хлорида для 8 образцов: $1,7 \text{ мкг/мл} \times 7,0 \text{ мл} = 11,9 \text{ мкг} \times 230 \text{ мл} = 2737 \text{ мкг}$ или **2,737** мг сангвиритрина в объеме 230 мл.

Пересчитываем количество сангвиритрина в среднем на один образец: $2,737 \text{ мг} / 8 \text{ образцов} = 0,342 \text{ мг}$ сангвиритрина в среднем высвободилось из одного образца в отмывочный раствор 0,9% натрия хлорида через 30 минут инкубации.

Содержание сангвиритрина через 1,5 часа в 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

Показатель оптической плотности 1,0 мл разбавленной до 6,0 мл пробы составил 0,133 единиц. В соответствии с калибровочной кривой это соответствует 2,75 мкг/мл сангвиритрина.

Пересчитываем количество сангвиритрина на 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида для 8 образцов: $2,75 \text{ мкг/мл} \times 6,0 \text{ мл} = 16,5 \text{ мкг} \times 230 \text{ мл} = 3795 \text{ мкг}$ или **3,795** мг сангвиритрина в объеме 230 мл.

Пересчитываем количество сангвиритрина в среднем на один образец: $3,795 \text{ мг} / 8 \text{ образцов} = 0,474 \text{ мг}$ сангвиритрина в среднем высвободилось из одного образца в отмывочный раствор 0,9% натрия хлорида через 1,5 часа инкубации.

Содержание сангвиритрина через 3 часа в 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

Показатель оптической плотности 1,0 мл разбавленной до 6,0 мл пробы составил 0,156 единиц. В соответствии с калибровочной кривой это соответствует 3,25 мкг/мл сангвиритрина.

Пересчитываем количество сангвиритрина на 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида для 8 образцов: $3,25 \text{ мкг/мл} \times 6,0 \text{ мл} = 19,5 \text{ мкг} \times 230 \text{ мл} = 4485 \text{ мкг}$ или **4,485** мг сангвиритрина в объеме 230 мл.

Пересчитываем количество сангвиритрина в среднем на один образец: $4,485 \text{ мг} / 8 \text{ образцов} = \mathbf{0,560}$ мг сангвиритрина в среднем высвободилось из одного образца в отмывочный раствора 0,9% натрия хлорида через 3 часа инкубации.

Содержание сангвиритрина через **4,5** часа в 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

Показатель оптической плотности 1,0 мл разбавленной до 6,0 мл пробы составил 0,174 единиц. В соответствии с калибровочной кривой это соответствует 3,6 мкг/мл сангвиритрина.

Пересчитываем количество сангвиритрина на 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида для 8 образцов: $3,6 \text{ мкг/мл} \times 6,0 \text{ мл} = 21,6 \text{ мкг} \times 230 \text{ мл} = 4968 \text{ мкг}$ или **4,968** мг сангвиритрина в объеме 230 мл.

Пересчитываем количество сангвиритрина в среднем на один образец: $4,968 \text{ мг} / 8 \text{ образцов} = \mathbf{0,621}$ мг сангвиритрина в среднем высвободилось из одного образца в отмывочный раствор 0,9% натрия хлорида через 4,5 часа инкубации.

Содержание сангвиритрина через **6** часов в 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

Показатель оптической плотности 1,0 мл разбавленной до 6,0 мл пробы составил 0,190 единиц. В соответствии с калибровочной кривой это соответствует 3,9 мкг/мл сангвиритрина.

Пересчитываем количество сангвиритрина на 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида для 8 образцов: $3,9 \text{ мкг/мл} \times 6,0 \text{ мл} = 23,4 \text{ мкг} \times 230 \text{ мл} = 5382 \text{ мкг}$ или **5,382** мг сангвиритрина в объеме 230 мл.

Пересчитываем количество сангвиритрина в среднем на один образец: $5,382 \text{ мг} / 8 \text{ образцов} = \mathbf{0,672}$ мг сангвиритрина в среднем высвободилось из одного образца в отмывочный раствор 0,9% натрия хлорида через 6 часов инкубации.

Содержание сангвиритрина через **7,5** часов в 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

Показатель оптической плотности 1,0 мл разбавленной до 6,0 мл пробы составил 0,203 единиц. В соответствии с калибровочной кривой это соответствует 4,25 мкг/мл сангвиритрина.

Пересчитываем количество сангвиритрина на 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида для 8 образцов: $4,25 \text{ мкг/мл} \times 6,0 \text{ мл} = 25,5 \text{ мкг} \times 230 \text{ мл} = 5865 \text{ мкг}$ или **5,865** мг сангвиритрина в объеме 230 мл.

Пересчитываем количество сангвиритрина в среднем на один образец: $5,865 \text{ мг} / 8 \text{ образцов} = \mathbf{0,733}$ мг сангвиритрина в среднем высвободилось из одного образца в отмывочный раствор 0,9% натрия хлорида через 7,5 часов инкубации.

Содержание сангвиритрина через 25 часов в 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

Показатель оптической плотности 1,0 мл разбавленной до 6,0 мл пробы составил 0,214 единиц. В соответствии с калибровочной кривой это соответствует 4,45 мкг/мл сангвиритрина.

Пересчитываем количество сангвиритрина на 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида для 8 образцов: $4,45 \text{ мкг/мл} \times 6,0 \text{ мл} = 26,7 \text{ мкг} \times 230 \text{ мл} = 6141 \text{ мкг}$ или **6,141** мг сангвиритрина в объеме 230 мл.

Пересчитываем количество сангвиритрина в среднем на один образец: $6,141 \text{ мг} / 8 \text{ образцов} = \mathbf{0,767}$ мг сангвиритрина в среднем высвободилось из одного образца в отмывочный раствор 0,9% натрия хлорида через 24 часа инкубации.

Содержание сангвиритрина через 28 часов в 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

Показатель оптической плотности 1,0 мл разбавленной до 6,0 мл пробы составил 0,213 единиц. В соответствии с калибровочной кривой это соответствует 4,4 мкг/мл сангвиритрина.

Пересчитываем количество сангвиритрина на 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида для 8 образцов: $4,4 \text{ мкг/мл} \times 6,0 \text{ мл} = 26,4 \text{ мкг} \times 230 \text{ мл} = 6072 \text{ мкг}$ или **6,072** мг сангвиритрина в объеме 230 мл.

Пересчитываем количество сангвиритрина в среднем на один образец: $6,072 \text{ мг} / 8 \text{ образцов} = \mathbf{0,759}$ мг сангвиритрина в среднем высвободилось из одного образца в отмывочный раствор 0,9% натрия хлорида через 28 часов инкубации.

Содержание сангвиритрина через 31 час в 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

Показатель оптической плотности 1,0 мл разбавленной до 6,0 мл пробы составил 0,217 единиц. В соответствии с калибровочной кривой это соответствует 4,5 мкг/мл сангвиритрина.

Пересчитываем количество сангвиритрина на 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида для 8 образцов: $4,5 \text{ мкг/мл} \times 6,0 \text{ мл} = 27,0 \text{ мкг} \times 230 \text{ мл} = 6210 \text{ мкг}$ или **6,210** мг сангвиритрина в объеме 230 мл.

Пересчитываем количество сангвиритрина в среднем на один образец: $6,210 \text{ мг} / 8 \text{ образцов} = \mathbf{0,776}$ мг сангвиритрина в среднем высвободилось из одного образца в отмывочный раствор 0,9% натрия хлорида через 31 час инкубации.

Содержание сангвиритрина через 42 часа в 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида:

Показатель оптической плотности 1,0 мл разбавленной до 6,0 мл пробы составил 0,220 единиц. В соответствии с калибровочной кривой это соответствует 4,55 мкг/мл сангвиритрина.

Пересчитываем количество сангвиритрина на 230 мл отмывочного раствора 0,9% натрия хлорида для 8 образцов: $4,55 \text{ мкг/мл} \times 6,0 \text{ мл} = 27,3 \text{ мкг} \times 230 \text{ мл} = 6279 \text{ мкг}$ или **6,279** мг сангвиритрина в объеме 230 мл.

Пересчитываем количество сангвиритрина в среднем на один образец: $6,279 \text{ мг} / 8 \text{ образцов} = \mathbf{0,784}$ мг сангвиритрина в среднем высвободилось из одного образца в отмывочный раствор 0,9% натрия хлорида через 42 часа инкубации.

Полученные количественные данные представлены в Таблице 16 , а также на графике высвобождения лекарственного препарата в раствор 0,9% натрия хлорида (Рисунок 62).

Таблица 16 - Количество высвобожденного сангвиритрина из образцов в зависимости от времени их инкубации в раствор 0,9% натрия хлорида

Время инкубации, час.	Количество сангвиритрина в растворе, мг/230 мл	Среднее количество высвобожденного сангвиритрина из одного образца, мг
0,5	2,737	0,34
1,5	3,795	0,47

Время инкубации, час.	Количество сангвиритрина в растворе, мг/230 мл	Среднее количество высвобожденного сангвиритрина из одного образца, мг
3,0	4,485	0,56
4,5	4,968	0,62
6,0	5,382	0,67
7,5	5,865	0,73
24,0	6,141	0,76
28,0	6,072	0,76
31,0	6,210	0,77
42,0	6,279	0,78

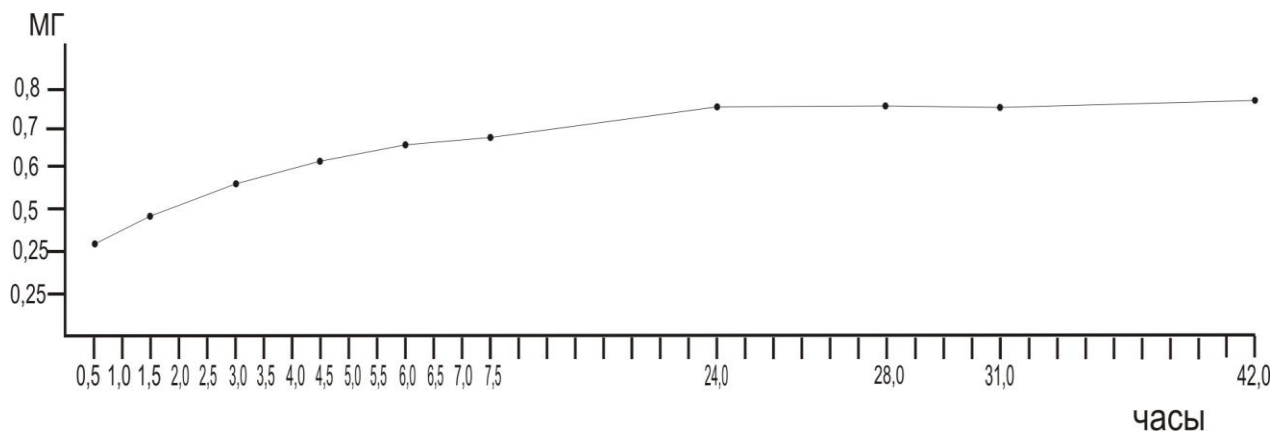


Рисунок 62 - Динамика высвобождения сангвиритрина

С помощью контроля фотометрическим способом получены данные, о количестве высвобождаемого сангвиритрина из восьми образцов деминерализованных имплантатов в раствор 0,9% натрия хлорида в течение 42 часов при $t = 37^{\circ}\text{C}$.

Так, высвобождение препарата из образцов в раствор 0,9% натрия хлорида происходит не ранее чем через 42 часа, что подтверждает полученные данные **Опыта №1**, а также вывод о наличии выраженного пролонгирующего эффекта при высвобождении лекарственного средства.

Пролонгирующий эффект высвобождения сангвиритрина может объясняться равномерным распределением сравнительно малых молекул

коллагена и постепенным высвобождением лекарственного средства за счет диффузии, а на более поздних сроках за счет медленного лизиса коллагена деминерализованного костного матрикса. Так, спектрофотометрическая характеристика коллагеновых пленок с сангвиритрином является суммарным спектром чистого коллагена и сангвиритрина, что может свидетельствовать об отсутствии химического взаимодействия между коллагеном и сангвиритрином при его адсорбции деминерализованным костным матриксом [89].

Количество высвобожденного через 42 часа в раствор 0,9% натрия хлорида адсорбированного сангвиритрина из образцов в опыте №2 в среднем для одного образца составило 0,784 мг, что превысило количество высвобожденного сангвиритрина для одного образца в опыте №1 на 25 % при двукратном увеличении времени инкубации (Рисунок 63).

Следовательно, оптимальное время инкубации деминерализованных костных имплантатов в раствор 0,9% натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина 0,2% при 37°C составляет около 72 часов.

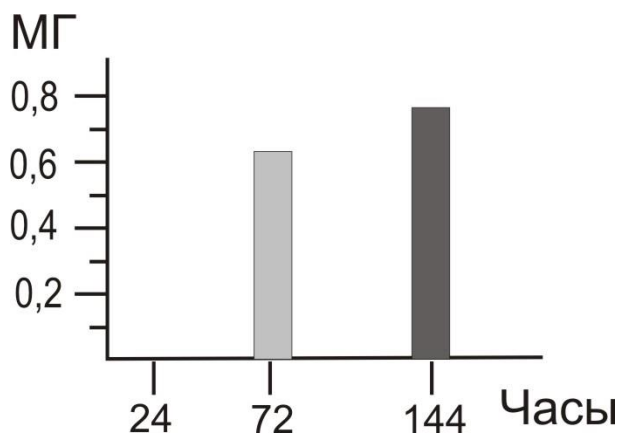


Рисунок 63 - Количество высвобожденного сангвиритрина из одного образца в зависимости от времени инкубации в раствор 0,9% натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина 0,2%

Проверка высвобожденного сангвиритрина на подлинность

Подлинность, высвобожденного в раствор 0,9% натрия хлорида лекарственного средства (сангвиритрин) проверяли в соответствии с фармакопейной статьей ФС 42-3572-98 (Раствор сангвиритрина 0,2%) [109]. К 5 мл раствора 0,9% натрия хлорида с высвобожденным из образцов

сангвиритрином добавляли 3 капли реактива Майера, что давало характерную реакцию на сульфаты - в растворе образовался осадок оранжевого цвета (алкалоиды), что свидетельствовало о подлинности высвобожденного из образцов сангвиритрина и отсутствии химического взаимодействия между коллагеном деминерализованного костного матрикса и сангвиритрином.

Исследования антимикробных свойств сангвиритрина после радиационной стерилизации не проводили, т.к. согласно исследованию [113] установлено отсутствие влияния радиационной стерилизации с величинами поглощенных доз 2,5 - 25 кГр на качественный состав и количественное содержание алкалоидов сангвинарина и хелеритрина, а также на их антимикробную активность.

3.4. Основы технологии получения костных имплантатов, деминерализованных костных имплантатов и деминерализованных костных имплантатов с антимикробными, противовирусными и антимикотическими свойствами

В соответствии с методологией и экспериментально апробированными методами изготовления, проверки качества и оценки безопасности костных имплантатов, деминерализованных костных имплантатов и деминерализованных костных имплантатов с антимикробными свойствами предложена технология получения имплантатов на основе стерильного деминерализованного костного матрикса для их применения в биоимплантологии, в гнойной остеологии, в том числе для восстановления соединительной ткани в инфицированных ранах. Ниже представлена схема-алгоритм технологии получения костных имплантатов и имплантационных препаратов (Рисунок 64).



Рисунок 64 - Биотехнологический алгоритм получения костных имплантатов и имплантационных препаратов с антимикробными свойствами

1. Отбор кортикальной кости - диафиз бедренной кости от клинически здорового быка (возраст от 1,5 до 2 лет) с посмертным периодом от 1 до 5 часов, умершим внезапно.

2. Удаление мягких тканей с эндостальной поверхности кости.

3. Разделение кости на фрагменты.

4. Удаление миелоидного-жирового костного мозга.

5. Удаление компонентов крови в 3% растворе перекиси водорода в течение 1 часа.

6. Стерилизация костных фрагментов методом озонной стерилизации - обдувом озono-кислородной смесью с концентрацией 6-8 мг/л в течение 7-10 минут.

7. Механическая обработка имплантатов с учетом направление остеонных структур с использованием стерильной охлаждающей среды (раствор 0,9% натрия хлорида, охлажденный до 4-6 °С).

7.1. Морфологическое исследование:

- световая и сканирующая электронная микроскопия;

- фрактографический анализ с помощью прецизионного 3D-стереосканирования.

7.2. Биомеханические испытания:

- проверка прочностных характеристик при испытаниях на сжатие;
- проверка упруго-пластических свойств ткани в микрообъемах (микротвердость по Виккерсу).

Для костных имплантатов:

7.3. Стерилизация имплантатов и упаковки комбинированным способом - в стерилизующей среде – озono-кислородной смеси (концентрация 6-8 мг/л) в течение 10 – 15 мин с последующим радиационным облучением имплантатов в герметичной упаковке с величиной поглощенной дозы – 10 - 15 кГр;

Для деминерализованных костных имплантатов:

8. Удаление минеральной фазы с помощью раствора соляной кислоты 0,8 моль/дм³. Время деминерализации – 72 часа при $t = 20^{\circ}\text{C}$ и соотношении объема кость/раствор – 1/100.

8.1. Контроль удаления минеральной фазы с помощью световой микроскопии и элементного анализа с использованием энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

8.2. Стерилизация имплантатов и упаковки комбинированным способом - в стерилизующей среде – озono-кислородной смеси (концентрация 6-8 мг/л) с последующим радиационным облучением имплантатов в герметичной упаковке с величиной поглощенной дозы – 10 - 15 кГр;

Для деминерализованных костных имплантатов с антимикробными свойствами:

9. Первый этап комбинированного способа стерилизации - обработка имплантатов и упаковки в стерилизующей среде – озono-кислородной смеси (концентрация 6-8 мг/л) в течение 10 – 15 мин.

10. Иммобилизация лекарственного средства (сангвиритрин) на деминерализованном костном имплантате путем инкубации имплантата в раствор 0,9% натрия хлорида с концентрацией сангвиритрина 0,2% при $t = 37^{\circ}\text{C}$ в течение 72 часов. Объемное соотношение имплантат/раствор – 1/100.

11. Высушивание в асептических условиях и герметичная упаковка.

12. Второй этап комбинированного способа стерилизации - радиационное облучением имплантатов в герметичной упаковке с величиной поглощенной дозы – 10 - 15 кГр.

12.1. Фотометрический контроль пролонгирующего действия лекарственного средства:

- контроль количества и времени высвобождения лекарственного средства из деминерализованного имплантата в раствор 0,9% натрия хлорида при $t = 37^{\circ}\text{C}$;
- проверка на подлинность высвобожденного лекарственного средства с использованием реактива Майера.

Для всех типов имплантатов:

Микробиологический контроль стерильности – проверка контрольных образцов на наличие аэробных и анаэробных бактерий с использованием тиогликолевой среды и микроскопических грибов с использованием среды Сабуро в течение 14 суток.

5. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

В исследовании применен комплексный подход к анализу и оценке критериев качества создаваемых костных имплантатов для биоимплантологии и предложена технология получения костных имплантатов на основе деминерализованного костного матрикса быка с выраженными антимикробными свойствами за счет иммобилизации лекарственного средства.

Усовершенствованная методология включила комплекс методов, предназначенных для определения качественных и количественных характеристик нативной кости и деминерализованной для получения имплантатов. Методы обработки кости с учетом направления ее остеонных структур, определения биомеханических характеристик и биологических параметров охватили весь цикл технологии получения костных имплантатов и имплантационных препаратов.

Метод обработки костных имплантатов различной конфигурации с учетом структуры и прочностных характеристик кости, позволил обрабатывать костные заготовки с исключением их излишней травматизации (перегрев), сохранением микроструктуры ткани после ее разделения в приемлемом состоянии и обеспечением заданных размеров.

В рамках исследования оптимизирован процесс стерилизации и получен патент Российской Федерации на изобретение комбинированного способа стерилизации костных имплантатов озоно-воздушной смесью и радиационным облучением.

Необходимо особо отметить, что предлагаемый способ позволил одновременно решить другой важный вопрос - обеспечение стерильности упаковки имплантата, которая при рассматриваемом техническом решении проходит те же две последовательные стадии стерилизации, что и костный имплантат. На первой стадии - обработка озоно-кислородной смесью значительно снижает численность патогенов на внутренней поверхности упаковки, что приводит в свою очередь к уменьшению резистентности их оставшейся

популяции к радиационному воздействию. В результате, на второй стадии (радиационная обработка), пониженной дозы облучения быстрыми электронами в (10-15) кГр оказывается достаточно для обеспечения стерильности упаковки, что гарантирует обеспечение надежности длительного хранения. После стерилизации указанным способом имплантационный препарат готов к использованию в пластической операции и может храниться при температуре 18-20°C до 5 лет. При использовании только радиационной обработки потребовались бы значительно более высокие дозы – не менее (20-40) кГр.

Проведение биомеханических испытаний и микроскопический анализ позволили разработать критерии качества кортикальной кости диафиза бедренной кости клинически здорового быка по микротвердости, пределу прочности и микроструктуре.

Апробированный метод деминерализации и элементного анализа кости позволили контролировать степень удаления минералов из костных имплантатов. Элементный анализ имплантатов с использованием рентгеновской спектроскопии на разных стадиях деминерализации показал удаление минеральной фазы кости, уменьшение относительного процентного содержания Ca, P, Na, Mg.

Осуществлена иммобилизация лекарственного средства, проведена оценка сорбционных свойств деминерализованных костных имплантатов, количества и времени высвобождения в раствор 0,9% натрия хлорида адсорбированного лекарственного средства (сангвиритрин). Исследования показали равномерное высвобождение алкалоидов сангвинарина и хелеритрина в чистый раствор 0,9% натрия хлорида. Высвобождение сангвиритрина из имплантата на основе деминерализованного костного матрикса в раствор продолжалось не менее 42 часов, что подтвердило наличие пролонгирующего эффекта, необходимого для терапевтического действия лекарственного средства.

4.1 Показатели контроля качества и безопасности костных имплантатов и имплантационных препаратов

Проведенные исследования позволили разработать критерии контроля качества кортикальной кости диафиза бедренной кости быка при получении ксеноимплантатов.

При выборе костных фрагментов и получении ксеноимплантатов необходимо учитывать следующие факторы и критерии:

1. Условия забора ткани:

1.1. Клинически здоровый донор. Посмертный период – от 1 до 5 часов;

1.2. Возраст донора – половозрелый.

2. Механическая обработка должна обеспечивать:

2.1. Отсутствие нагрева и минимальную продолжительность обработки;

2.2. Заданные размеры с учетом направления остеонных структур.

3. Микроскопический и фрактографический анализ:

3.1. Отсутствие патологических изменений микроструктуры компактной костной ткани – центральные каналы остеонов, фолькмановские каналы, соединяющие каналы и каналы;

3.2. Фрактографический 3D-анализ - отсутствие видимых разрушений и микротрещин.

4. Биомеханические характеристики костных образцов с неизменным композитным составом:

4.1. Величина микротвердости зрелой кости по Виккерсу (50 гс/ 10 сек.):

- нативная влажная кость - 350 ± 14 МПа;

- нативная сухая кость - 553 ± 8 МПа.

4.2. Условный предел прочности при сжатии образцов 12,5x5 мм продольной ориентации (вдоль оси остеонов):

- нативная влажная кость - $222,56 \pm 8,591$ МПа;

- нативная сухая кость - $2135,33 \pm 45,727$ МПа.

4.3. Показатели микротвердости костных имплантатов существенно не меняются после химико-физического стерилизующего воздействия комбинированным способом - последовательной обработкой озono-кислородной смесью с концентрацией 6-8 мг/л в течение 10-20 мин и радиационному облучению с величинами поглощенных доз – (10 – 15) кГр.

5. Стерильность материала:

5.1. Отсутствие патогенов по результатам микробиологических исследований через 14 суток с момента инкубации имплантатов в Тиогликолевую среду и среду Сабуро после обработки озono-кислородной смесью с концентрацией 6-8 мг/л в течение 10-20 мин и радиационного облучения с величинами поглощенных доз – 10 - 15 кГр.

6. Деминерализация костных имплантатов и контроль степени деминерализации:

6.1. Удаление минеральной фазы кости в растворе соляной кислоты 0,8 моль/дм³ через 72 часа при $t = 20^{\circ}\text{C}$;

6.2. По данным контроля методом световой микроскопии – изменение структуры соединительной ткани;

6.3. По данным элементного анализа – существенное уменьшение относительного процентного содержания - Ca, Na, Mg.

7. Контроль терапевтической активности имплантационного препарата за счет пролонгированного высвобождения лекарственного средства и проверка на подлинность:

7.1. Высвобождение сангвиритрина не менее чем через 42 часа инкубации имплантата в раствор 0,9% натрия хлорида при объемном соотношении имплантат/раствор – 1/100 и $t = 37^{\circ}\text{C}$;

7.2. Проверка на подлинность высвобожденного лекарственного средства (сангвиритрин) с помощью реактива Майера - характерная реакция на сульфаты (осадок желто-оранжевого цвета).

Представленные данные создают предпосылки для разработки единой системы стандартизации условий и технологии изготовления, хранения,

стерилизации костных и деминерализованных костных имплантатов, создания новой адсорбционной биоимплантологической лекарственной формы с антимикробными свойствами. В дальнейшем планируется расширить исследования с использованием разработанных имплантатов для восстановления минерализованной соединительной ткани в инфицированных ранах, лечения кистозных поражений, несовершенного остеогенеза, для заполнения остеомиелитических полостей, костных дефектов и других патологий.

ВЫВОДЫ

1. В соответствии с усовершенствованной методологией получения, контроля качества и оценки безопасности костных имплантатов, получены костные имплантаты 2-х видов и имплантационный препарат: костные имплантаты с неизменным композитным составом, деминерализованные имплантаты, имплантационный препарат на основе стерильного деминерализованного костного матрикса с антимикробными, противовирусными и антимикотическими свойствами.

2. Разработана современная технология изготовления костных имплантатов и имплантационных препаратов с применением инновационного комбинированного способа стерилизации, основанного на предварительном воздействии озono-кислородной смеси и с последующим радиационным облучением, обеспечивающим стерильность, неразрушающее стерилизующее воздействие на имплантат, снижение величины дозы радиационного поглощения в 2 раза с сохранением остеоиндуктивных свойств имплантата.

3. Предложены биотехнологические основы включающие технологии производства костных имплантатов, которые отличаются от традиционных способов производства технологичностью, применимостью в условиях ограниченного количества материала, позволяют учитывать направление остеонных структур кости; деминерализацию раствором соляной кислоты 0,8 н с получением деминерализованного матрикса – носителя лекарственного средства.

4. Исследована сорбционная способность деминерализованного костного матрикса, время высвобождения из него биологически активного вещества. Доказано пролонгирующее действие высвобождаемого биологически активного вещества и отсутствие химического взаимодействия между алкалоидами сангвинарина, хелеритрина и коллагеном деминерализованного имплантата.

5. Предложены показатели качества костных имплантатов для их эффективного применения в биоимплантологии, что подтверждено патентами

Российской Федерации на изобретения: «Способ изготовления костных имплантатов», «Комбинированный способ стерилизации костных имплантатов».

б. Отработана биотехнология получения имплантационного препарата, оформлен патент Российской Федерации на изобретение: «Способ получения костного имплантата на основе стерильного деминерализованного костного матрикса» для применения в гнойной остеологии и репарации соединительных тканей в инфицированных ранах с использованием биологически активного лекарственного средства растительного происхождения – сангвиритрин® с антимикробными, противовирусными и антимикотическими свойствами.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор считает своим долгом выразить благодарность директору ФГБНУ ВИЛАР, члену-корреспонденту РАН Сидельникову Н.И. за предоставленную возможность выполнения данной работы, научному руководителю работы д.б.н., профессору Матвейчуку И.В., д.б.н., профессору Розанову В.В. за оказание неоценимой методической помощи при проведении исследований, д.т.н., профессору, академику РАН Быкову В.А. за оказанную помощь и поддержку в выполнении работы, а также к.ф-м.н. Николаевой А.А. и всем сотрудникам НИИЯФ МГУ им. М.Ю. Ломоносова за совместные исследования.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Адгина, В.В. Изучение антимикробных свойств сангвиритрина и входящих в него компонентов / В.В. Адгина, С.А. Вичканова // В кн.: «Фитонциды».- Киев. – 1975. – С. 159-161.
2. Атлас лекарственных растений России. Под общей редакцией академика РАМН и РАСХН, проф. В.А. Быкова. – М. – 2006. – 346 с.
3. Беняев, Н.Е. Возможности и перспективы применения в биомедицинских технологиях элементного анализа биологических проб с использованием лазерной масс-спектрометрии / Беняев Н.Е., Макеев Е.В., Леонов Б.И., Колкутин В.В., Матвейчук И.В., Чергештов Ю.И., Авагян А.А., Медведь Л.Н., Беняева Н.Н. // Биомедицинские технологии: сб. науч. работ/ Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2004. – Вып.23. – С.6 - 14.
4. Богатов, В.Н. Особенности структуры и химического состава минерального компонента кости человека / В.Н. Богатов // Успехи современной биологии.-1978.-№1.-С.71-84.
5. Богонатов, Б.Н. Структура пластинок остеона / Б.Н. Богонатов // Архив АГЭ.-1975.-№8.-С.56-60.
6. Бортникова, В.В. Новые перспективы применения антимикробного препарата «Сангвиритрин» / В.В. Бортникова, Л.В. Крепкова, А.А. Шкаоенков // Вестник Бурятского университета, Улан-Удэ, 2002. - С.37 – 42.
7. Патент 2143260 Российская Федерация. Ранозаживляющее средство «Санглирен» / В.А. Быков, С.А. Вичканова, Г.А. Реброва, В.К. Василевский, В.К. Колхир, В.И. Глызин, Н.М. Крутикова; заявитель и патентообладатель Государственное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (Приор. Изобр. от 24.11.1998).
8. Быков, В.А. Санглирен – ранозаживляющее растительное средство / В.А. Быков, С.А. Вичканова, Г.А. Реброва, В.К. Колхир, Н.М. Крутикова, В.К.

Василевский // В кн.: «Человек и лекарство». IX Российский Национальный конгресс. Тез. Докл. – М. – 2002. – С. 595.

9. Василев, С.И. Применение электродиализа для одновременной фиксации и декальцинации костной ткани / С.И. Василев, Я.Е. Хесин // Арх. патологии.-1958.-№3.-С.80-81.

10. Винц, Х. Изменение механических свойств компактной костной ткани человека в зависимости от возраста / Х. Винц // Мех. Полимеров.-1975.-№4.- С.659-663.

11. Вичканова, С.А. Сангвиритрин. Подарок природы человеку: научное издание / С.А. Вичканова, Т.В. Фатеева, Н.М. Крутикова, Л.В. Крепкова, В.В. Бортникова, О.Н. Толкачев, Г.И. Климахин, Т.А. Сокольская // М.: «One Book.ru», 2015.-164 с.

12. Вичканова, С.А. Антифунгальные свойства сангвиритрина / С.А. Вичканова, В.В. Адгина // Антибиотики. – М. – 1971. - №7. – С. 609-612.

13. Вичканова, С.А. Новая лекарственная форма растительного антимикробного препарата сангвиритрина для лечения ран / С.А. Вичканова, В.В. Адгина, Л.Д. Шипулина, Т.В. Фатеева, Г.А. Реброва, В.К. Василевский // I международная конференция «Современные подходы к разработке эффективных перевязочных средств и полимерных имплантатов» М.- 1992. – С. 89-90.

14. Вичканова, С.А. Создание высокоэффективного оригинального природного лекарственного средства сангвиритрин / С.А. Вичканова, Н.М. Крутикова, Т.В. Фатеева // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – М. – 2013.- №11.- С.49 – 55.

15. Вичканова, С.А. Лекарственные средства из растений (опыт ВИЛАР): научное издание / С.А. Вичканова, В.К. Колхир, Т.А. Сокольская, И.В. Воскобойникова, В.А. Быков. – М.: АДРИС. – 2009. – 432 с.

16. Вичканова, С.А. Сангвиритрин – новый лекарственный препарат противомикробного действия / С.А. Вичканова, О.Н. Толкачев, Р.Г. Мартынова, Е.В. Арзамасцев // Фармацевтический журнал. – М.: Медицина. – 1982. - том XVI.- №7. – С. 107 – 112.

17. Вичканова, С.А. Итоги и перспективы работ Всесоюзного научно-исследовательского института лекарственных растений по изысканию новых химиотерапевтических средств растительного происхождения / С.А. Вичканова // В сборнике: «Фитонциды. Экспериментальные исследования, вопросы теории и практики». – Под. Ред. Б.Е. Айзенман, С.И. Зелепуха. – Киев.: Наукова думка. – 1975. – С. 89 – 93.

18. Выборнов, Д.Ю. Методы стимуляции репаративного остеогенеза и направления их дальнейшего развития / Д.Ю. Выборнов, М.А. Петров, В.В. Коротеев, Е.Н. Борхунова // Биомедицинские технологии: сб. науч. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2002. – Вып.18. – С.23 - 30.

19. Головаха, Л.М. Механические свойства гетеротрансплантатов / Л.М. Головаха // Ортопедия, травматология и протезирование.-1972.-№5.-С.90.

20. Государственный реестр лекарственных средств, 2009.-Том 1, Часть 1. – С. 66, 389-390.

21. Деминерализованный костный трансплантат и его применение / Сборник научных трудов - С-Пб.: Изд. ППМИ.-1993.-157с.

22. Денисов-Никольский, Ю.И. Механизмы регуляции ремоделирования и репаративный остеогенез / Ю.И. Денисов-Никольский // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 1996. – Вып. 5. – С.5 - 9.

23. Денисов-Никольский, Ю.И. Морфологическая характеристика минеральной фазы кости / Ю.И. Денисов-Никольский, А.А. Докторов, И.В. Матвейчук // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1990. - №6. – С.614 – 616.

24. Денисов-Никольский, Ю.И. Роль минерального компонента в обеспечении механической функции и композитности кости как материала / Ю.И. Денисов-Никольский, И.В. Матвейчук, А.А. Докторов, Ю.А. Смольков // В кн. Медицинская биомеханика. В 4-х т. (Тезисы докладов международной

конференции «Достижения биомеханики в медицине». – Рига, 1986. – Т.І. – С.497 – 502.

25. Денисов-Никольский, Ю.И. Современные аспекты функциональной морфологии кости в связи с проблемами биопротезирования / Ю.И. Денисов-Никольский // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва. – Вып.6. – С.5 – 8.

26. Денисов-Никольский, Ю.И. Функциональная морфология в развитии проблемы репродукции тканей и биопротезирования/Ю.И. Денисов-Никольский, Г.А. Реброва, В.К. Василевский, А.А. Докторов, И.В. Матвейчук // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ/Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2000. – Вып.14. – С.5 – 13.

27. Денисов-Никольский, Ю.И. Костные трансплантаты: разновидности, методы изготовления и оценки их состояния / Ю.И. Денисов-Никольский, А.А. Докторов, И.В. Матвейчук // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 1995. – Вып.2. – С.40 – 44.

28. Денисов-Никольский, Ю.И. Актуальные проблемы теоретической и клинической остеоартрологии / Ю.И. Денисов-Никольский, С.П. Миронов, Н.П. Омеляненко, И.В. Матвейчук // ОАО «Типография «Новости», Москва, 2005. – 336 с.

29. Денисов-Никольский, Ю.И. Пространственная организация лакунарно-канальцевой системы в структурах пластинчатой кости / Ю.И. Денисов-Никольский, А.А. Докторов // Архив АГЭ.-1987.-№8.-С.37-43.

30. Денисова, Л.А. Экспериментальное исследование возможности применения неинвазивных методов акустической микроскопии в имплантологии / Л.А. Денисова, Р.Г. Маев, В.К. Леонтьев, А.Ф. Денисов, Д.Ю. Гаврилов, Ф.С. Русанов, Г.Г. Грейсон, Ф.М. Северин // Биомедицинские технологии: сборник научных работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-

методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2006. – Вып.24. – С.70 – 78.

31. Денисова, Л.А. Закономерности изменения акустических свойств костной ткани при нарушении ее композиционного состава. Часть I. Деминерализация / Л.А. Денисова, И.В. Матвейчук, Р.Г. Маев, А.А. Денисов, Ю.И. Чергештов, А.А. Авагян, А.С. Ханзрацян // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2002. – Вып.18. – С.95 – 104.

32. Денисова, Л.А. Закономерности изменения акустических свойств костной ткани при нарушении ее композиционного состава. Часть II. Деорганификация / Л.А. Денисова, И.В. Матвейчук, Р.Г. Маев, А.А. Денисов // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2002. – Вып.18. – С.105 – 110.

33. Денисова, Л.А. Закономерности изменения акустических свойств костной ткани при нарушении ее композиционного состава. Часть III. Дегидратация / Л.А. Денисова, И.В. Матвейчук, Р.Г. Маев, А.А. Денисов // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2002. – Вып.18. – С.111 – 115.

34. Дорошенко, А.Г. Методологические основы изучения минерального компонента костной ткани в практике биомедицинских исследований / А.Г. Дорошенко, Б.М. Гутнов, А.А. Авагян, А.С. Ханзрацян, К.А. Агафонов, Ю.И. Чергештов, И.В. Матвейчук, Н.П. Омеляненко // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2006. – Вып.24. – С.80 – 92.

35. Докторов, А.А. Теоретические и прикладные аспекты в изучении минерализованных тканей / А.А. Докторов // Биомедицинские технологии: сб.

научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 1996. – Вып.5. – С.10 – 14.

36. Докторов, А.А. Структурная организация минеральной фазы костной ткани / А.А. Докторов // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ/Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 1999. – Вып.12. – С.42 – 52.

37. Докторов, А.А. Некоторые аспекты функциональной морфологии кости в развитии проблемы «Репродукция тканей и биопротезирование» / А.А. Докторов // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2001. – Вып.17. – С.5 – 11.

38. Жилкин, Б.А. Современные подходы к изучению строения минерального компонента костного матрикса / Б.А. Жилкин, А.А. Докторов, И.В. Матвейчук, Ю.И. Денисов-Никольский // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ/Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2000. – Вып.14. – С.14 – 19.

39. Зеленов, Е.С. Резание костных тканей / Е.С. Зеленов // Обзорная информация.-1984.-№3.-С.48.

40. Кабак, С.Л. Костно-суставная система. Морфологические и биохимические аспекты формирования / С.Л. Кабак, С.П. Фещенко, Е.П. Аниськова // Минск: Наука и техника.-1990.-181с.

41. Калабухов, Е.П. О механических свойствах костной ткани./Е.П. Калабухов // В кн.: Сборник научных трудов Иркутского политехнического института.-Иркутск.-1971.-Вып.65.-С.84-87.

42. Касавина, Б.С. Жизнь костной ткани / Б.С. Касавина, В.В. Торбенко // М.:Наука.-1979.-176с.

43. Патент 2223104 Российская Федерация. Способ изготовления костного аллотрансплантата / Кирилова И.А., Подорожная В.Т.; заявитель и

патентообладатель Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии. - № 20001126472/15; заявл. 28.09.2001; опубл. 20.08.2003.

44. Клен Рудольф. Заготовка и консервирование тканей / Клен Рудольф // Государственное издательство медицинской литературы. - Прага, 1962.- 316 с.

45. Клиническая биомеханика / Под ред. В.И. Филатова.-Л.:Медицина.-1975.-199 с.

46. Кнетс, И.В. Механика биологических тканей / И.В. Кнетс // Механика полимеров.-1977.-№3.-С.510-518.

47. Кнетс, И.В. Деформирование и разрушение твёрдых биологических тканей / И.В. Кнетс, Г.О. Пфафрод, Ю.Ж. Саулгозис // Рига: Зинатне.-1980.-319с.

48. Кнетс, И.В. Биомеханика жёстких биологических тканей / И.В. Кнетс // В кн.: Тезисы докладов 3-ей Всесоюзной конференции по проблемам биомеханики.-Рига: Зинатне.-1983.-Т.1.-С.8-10.

49. Крепкова, Л.В. Токсикологическое изучение сангвиритрина линимента 0,5% / Л.В. Крепкова, В.В. Бортникова, А.А. Шкаренков, М.В. Боровкова, В.Б. Гнутов // Тезисы докладов XIV Российского национального конгресса «Человек и лекарство». – М., - 2007 – С. 836.

50. Крепкова, Л.В. Доклиническое изучение безопасности новой лекарственной формы сангвиритрина общерезорбтивного действия/ Л.В. Крепкова, В.В. Бортникова, А.А. Шкаренков // Сб. науч. трудов ВИЛАР: Химия, технология, медицина. – М. – 2003. – С. 215 – 226.

51. Крепкова, Л.В. Изучение потенциальных канцерогенных свойств антимикробного средства сангвиритрин / Л.В. Крепкова, В.В. Бортникова, О.Н. Толкачев, А.А. Шкаренков, А.А. Белошапко // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. – М. – 2013. - №4. – С. 4 – 9.

52. Кузнецова, И.А. Некоторые данные о химическом составе костей / И.А. Кузнецова // В кн.: Сборник научных трудов Саратовского медицинского института - Саратов.-1960.-С.31-48.

53. Кулагин, И.Н. Механическая обработка гомокости / И.Н. Кулагин // В кн.: Сборник научных трудов института им. Склифосовского.-Москва, 1967.- Т.14.-С.156-161.

54. Лаврищева, Г.И. Морфологические и клинические аспекты репаративной регенерации опорных органов и тканей / Г.И. Лаврищева, Г.А. Оноприенко // М.:Медицина.-1996.-208с.

55. Лекарственные средства, применяемые в медицинской практике в СССР / Под ред. М.А. Клюева.- М.: Медицина. – 1989. – 512 с.

56. Патент 2172104 Российская Федерация. Способ изготовления имплантатов из губчатой костной ткани / Лекишвили М.В., Михайлов А.Ю., Васильев М.Г.; заявитель и патентообладатель ГУН Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. - № 2000115228/14; заявл. 15.06.2000; опубл. 20.08.2001.

57. Патент 2147800 Российская Федерация. Способ изготовления имплантатов из губчатой костной ткани / Лекишвили М.В., Касымов Ильгар Абульфас Оглы; заявитель и патентообладатель ГУН Центральный научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. - № 99102801/14; заявл. 17.02.1999; опубл. 27.04.2000.

58. Патент 2456003 Российская Федерация. Способ получения деминерализованного костного матрикса в виде крошки / Лунин В. Г., Карягина-Жулина А.С., Шарапова Н.Е., Ершова А.С., Громов А.В., Никитин К.Е., Субботина М.Е., Котнова А.П., Лаврова Н.В., Семихин А.С., Соболева Л.А., Грунина Е.М., Овечкина Т.А., Бартов М.С., Мишина Д.М., Гинцбург А.Л.; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение "Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи" Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации (ФГБУ "НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи" Минздравсоцразвития России). - № 2011108938/15; заявл. 10.03.2011; опубл. 20.07.2012.

59. Луньков, А.Е. Порометрические методики морфометрии костной ткани / А.Е. Луньков / - Саратов: Издательство Саратовского медицинского университета, 2015. – 120 с.
60. Луньков, А.Е. Порометрия костной ткани / А.Е. Луньков, Г.Н. Абросимов // Саратовский медицинский институт. - Саратов. - 1987. - 13с.
61. Луньков, А.Е., Абросимов Г.Н. Метод определения состава костной ткани / А.Е. Луньков, Г.Н. Абросимов // Архив АГЭ.-1991.- №2.- с.88-91.
62. Матвейчук, И.В. Биомеханические подходы к изучению морфофункциональных особенностей кости с целью создания ее синтетического аналога / И.В. Матвейчук // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 1996. – Вып.5. – С.15 – 22.
63. Матвейчук, И.В. Роль биоматериаловедения в развитии биопротезирования / И.В. Матвейчук // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 1995 - Вып.6. – С.16 – 19.
64. Матвейчук, И.В. Изучение системы внутрикостных пространств с позиций биоматериаловедения и его прикладное значение / И.В. Матвейчук // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 1998. – Вып.9. – С.54 – 58.
65. Миронов, С.П. Возможности использования костного матрикса для стимуляции репаративного остеогенеза / С.П. Миронов, Н.П. Омеляненко, О.А. Малахов, И.Н. Карпов, И.В. Матвейчук, А.И. Дорохин // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2001. – Вып.17. – С.12 – 16.
66. Миронов, С.П. Деминерализованные костные аллоимплантаты: некоторые свойства и закономерности / С.П. Миронов, М.В. Лекишвили //

Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2006. – Вып.24. – С.154 – 165.

67. Миронов, С.П. Внедрение современных технологий в практику тканевого банка ЦИТО для получения вариантов биологических имплантатов / С.П. Миронов, М.В. Лекишвили // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ/Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2004. – Вып. 23. – С.76-90.

68. Миронов, С.П. Опыт применения лиофилизированных губчатых аллотрансплантатов, изготовленных по методике ЦИТО, в клинической практике / С.П. Миронов, М.В. Лекишвили, А.В. Балберкин, Д.В. Елкин, М.Г. Васильев // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ/Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2000. – Вып. 14. – С.27 - 32.

69. Миронов, С.П. Создание разновидности деминерализованных костных трансплантатов по технологии ЦИТО / С.П. Миронов, А.И. Снетков, М.В. Лекишвили, С.Ю. Братков, М.Г. Васильев // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2000. – Вып. 14. – С.33 - 38.

70. Мелнис, А.Э. Вязкоупругие свойства компактной костной ткани / А.Э. Мелнис, И.В. Кнетс // В кн.: Современные проблемы биомеханики.-Рига.- 1985.- Вып.2.-С.38-69.

71. Модяев, В.П., Утенькин А.А., Свешникова А.А., Карпова А.А. Количественные характеристики структуры компактного вещества кости / В.П. Модяев, А.А. Утенькин, А.А. Свешникова, А.А. Карпова // Архив АГЭ.-1973.- Т.64.-№5.-С.69-72.

72. Надеин, А.П. Биологическое обоснование трансплантации костной гомоткани и методы её консервации / А.П. Надеин // Л.: Медицина.-1969.-296с.

73. Николаева, А.А. Использование радиационного воздействия в комбинированном способе стерилизации костных имплантатов: автореферат диссертации на сискание ученой степени кандидата физико-математических наук / Николаева Анна Александровна. – М., 2018. – 26 с.

74. Ога, М.Я. Исследование акустических и механических свойств костной ткани человека / М.Я. Ога, В.А. Загорский, В.В. Дзенис, М.А. Добелис // В кн.: Тезисы докладов 3-ей Всесоюзной конференции по проблемам биомеханики.-Рига:Зинатне.-1983.-Т.1.-С.187-188.

75. Омеляненко Н.П., Слукций Л.И Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). В 2 т. Т. I / Под ред. Академика РАН и РАМН С.П. Миронова. – М.: Издательство «Известия», 2009. – 380 с.

76. Омеляненко Н.П., Слукций Л.И Соединительная ткань (гистофизиология и биохимия). В 2 т. Т. II / Под ред. Академика РАН и РАМН С.П. Миронова. – М.: Издательство «Известия», 2010. – 600 с.

77. Омеляненко, Н.П. Количественный анализ межструктурного пространства компактного вещества кости человека / Н.П. Омеляненко, Г.М. Бутырин // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова.-1994.-№1.- С.51-54.

78. Омеляненко, Н.П. Использование деминерализованного костного матрикса для восстановления поврежденных длинных трубчатых костей со значительными дефектами/Н.П. Омеляненко, Э.Б. Базанова, Ю.Г. Шапошников, И.Н. Карпов, И.В. Матвейчук // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 1995. – Вып.6. – С.9 – 15.

79. Омеляненко, Н.П. Современные аспекты управления репаративной регенерацией костной ткани / Н.П. Омеляненко, С.П. Миронов, Ю.И. Денисов-Никольский, И.В. Матвейчук, И.Н. Карпов // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2002. – Вып. 18. – С.9 - 22.

80. Омеляненко, Н.П. Ультраструктурный анализ дистракционных костных регенератов в эксперименте / Н.П. Омеляненко, Л.П. Михайлова, И.Н. Карпов // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ/Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 1998. – Вып. 9. – С.11 – 15.

81. Панин, А.М. Использование различных остеопластических материалов для заживления экспериментально воспроизведенных костных дефектов / А.М. Панин, С.Ю. Иванов, Нури Фарзин, А.С. Григорьян // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2003. – Вып. 21. – С.88 – 98.

82. Паникаровский, В.В. Сравнительное изучение микротвёрдости различных костей скелета человека / В.В. Паникаровский, А.А. Прохончуков, А.С. Григорьян, С.М. Ремезов // Ортопедия, травматология и протезирование.-1974.-№12.-С.48-50.

83. Песин, Р.С. Реакция костной ткани на имплантацию композиции полиметилметакрилат – гидроксиапатит с нанесенной на ее поверхность культурой клеток костного мозга в эксперименте / Р.С. Песин, А.А. Докторов, А.И. Воложин, В.Г. Лебедев, Ю.Б. Дешевой// Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2001. – Вып.17. – С.55 – 63.

84. Пирогов, А.В. Энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия /А.В. Пирогов, А.И. Бобров, Н.О. Кривулин, Д.А. Павлов // Электронное учебно-методическое пособие / под редакцией Павлова Д.А. – Нижний Новгород: Нижегородский государственный университет, 2014. - 73 с.

85. Получение и клиническое применение деминерализованных костных трансплантатов / Сб. науч. трудов по проблеме «Травматология и ортопедия» - Л.: ЛНИИТО.-1987.-94 с.

86. Пуритис, Ю.П. Изменение акустических свойств кости в процессе сращения перелома / Ю.П. Пуритис, Ю.К. Вилкс // В кн.: Тезисы докладов 2-ой Всесоюзной конференции по проблемам биомеханики.-Рига:Зинатне.-1979.-Т.4.- С.291-294.

87. Родионова, Н.В. Функциональная морфология клеток в остеогенезе/ Н.В. Родионова // Киев: Наукова думка. - 1989.-192с.

88. Реброва, Г.А. Применение коллагеносодержащих биополимеров в качестве носителей лекарственных препаратов / Г.А. Реброва, Ю.И. Денисов-Никольский, В.К. Василевский, А.А. Докторов, И.В. Матвейчук, И.А. Синькова//Биомедицинские технологии: сб. научн. работ/Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 1996. – Вып.3. – С.48 – 51.

89. Реброва, Г.А. Разработка лекарственных форм на основе коллагена с фитопрепаратами / Г.А. Реброва, В.К. Василевский, С.А. Вичканова, Л.Д. Шипулина, Т.А. Сокольская, В.К. Колхир, Э.М. Фейзуллаева, Т.В. Фатеева, Н.М. Крутикова // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ/Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 1996. – Вып.3. – С.52 – 57.

90. Руководство по остеопорозу / Под. Ред. Л.И. Беневоленской // М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2003. – 524 с.

91. Савельев, В.И. Опыт изготовления и применения деминерализованной костной ткани в эксперименте и в клинике / Савельев В.И., Калинин А.В. // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ/Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2001.- Вып. 17.- С.17-24.

92. Савельев, В.И. Бромистоводородная кислота как альтернативный способ заготовки деминерализованных костных трансплантатов /В.И. Савельев, А.А. Булатов // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2006. – Вып.24. – С.230 – 237.

93. Савельев, В.И. Деминерализованная кость как особая разновидность костно-пластического материала / В.И. Савельев // В сборнике.: ЛНИИТО им Р.Р. Вредена Заготовка и пересадка деминерализованной костной ткани в эксперименте и клинике. - Л.: НИИТО.-1983,-С.3 - 12.

94. Савельев, В.И. Экспериментальная модель для сравнительной оценки костных алло- и ауто трансплантатов, заготовленных разными способами / В.И. Савельев, А.В. Калинин // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ/Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2001. – Вып.17. – С.25 – 33.

95. Савельев, В.И. Опыт изготовления и применения деминерализованной костной ткани в эксперименте и в клинике/В.И. Савельев, А.В. Калинин // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ/Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2001. – Вып.17. – С.17 – 24.

96. Савельев, В.И. Стерилизация биологических трансплантатов низкотемпературной плазмой пероксида водорода в эксперименте/ В.И. Савельев, Г.Е. Афиногенов, Ю.А. Рыков, А.А. Булатов // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 2006. – Вып.24. – С.216 – 229.

97. Савельев, В.И. Деминерализованный костный трансплантат: его свойства, заготовка и возможности клинического применения / В.И. Савельев // Проблемы аллопластики в стоматологии. – Москва, 1984. – С.10 – 15.

98. Савельев, В.И. Наш опыт в применении деминерализованных костных трансплантатов / В.И. Савельев, С.Н. Сивков // Ортопедия, травматология. – 1986. - №8. – С.22 – 25.

99. Патент 2472516 Российская Федерация. Биоматериал для замещения костных дефектов / Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А., Тепляков В.В. ; заявитель и патентообладатель Общество с ограниченной

ответственностью "АйБИОСТ". - №2011124244/15; заявл. 16.06.2011; опубл. 20.01.2013.

100. Поисковые исследования структурно-функциональных методов анализа и контроля сохранности биологических структур/ Разработка и усовершенствование химических, физико-химических (в том числе термографических) методик анализа БАС лекарственного растительного сырья, стандартов, фитосубстанций, лекарственных форм. Часть 1 «Разработка инновационных подходов к технологии изготовления и структурно-функциональному анализу сохранности биологических структур с позиций биоматериаловедения»: отчет о НИР / Матвейчук И.В., Розанов В.В., Литвинов Ю.Ю., Никитина З.К., Гордонова И.К., Шутеев С.А., Николаева А.А. Москва: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений» (ФГБНУ ВИЛАР), 2016. – 58 с. (Инв. № 42)

101. Сергеева, Н.С. Комплексное изучение природных кораллов для решения проблем реконструкции и инженерии костной ткани Часть I. Изучение физико-химических и матричных свойств природных кораллов / Н.С. Сергеева, И.К. Свиридова, С.М. Баринев, В.С. Комлев, В.А. Кирсанова, С.А. Ахмедова, И.В. Фадеева, Т.Н. Молодцова, Н.В. Петракова, А.И. Антохин, Г.В. Павлова, Я.Д. Шанский // Технологии живых систем.- Москва, 2012.- том 9.-№8.- С. 3-13.

102. Серов, В.В. Соединительная ткань/В.В. Серов, А.Б. Шехтер // М.:Медицина.-1981.-312с.

103. Слуцкий, Л.И. Органический матрикс кости: новые биохимические данные / Л.И. Слуцкий, Н.А. Севастьянова // Ортопедия, травматология и протезирование.-1986.-№8.-С.69-73.

104. Сокольская, Т.А. Фитопрепараты ВИЛАР / Т.А. Сокольская, В.А. Быков, Е.В. Валь, Л.Д. Вечканова, В.К. Колхир, Т.В. Лукашина, Н.И. Либизов // М.: Борус-Пресс, 2009, 256 с.

105. Сорокин, А.П. Общие закономерности строения опорного аппарата человека / А.П. Сорокин // М.:Медицина.-1973.-263с.

106. Стентон, Гланц. Медико-биологическая статистика / Г. Стентон // Пер. с англ. – М., Практика, 1998. – 459 с.
107. Утенькин, А.А. К методике исследования механических свойств кости / А.А. Утенькин, А.А. Свешникова // Архив АГЭ.-1969.-Т.56.-Вып.5.-С.93-96.
108. Утенькин, А.А., Ашкенази Е.К. Об анизотропии компактного вещества кости / А.А. Утенькин, Е.К. Ашкенази // Мех. полимеров.-1972.-№4.-С.711-716.
109. Фармакопейная статья (ФС-42-3572-98) - раствор сангвиритрина 0,2%.
110. Фармакопейная статья (ФС 42-2444-98) - сангвиритрин.
111. Фон Верзен, Р. Подготовка деминерализованного костного матрикса к клиническому использованию / Р. Фон Верзен // В кн. «Деминерализованный костный трансплантат и его применение». – Санкт-Петербург, 1993. – С.4-16.
112. Френкель, Л.А. Экспериментальные исследования структурной организации костной ткани по данным микротвёрдости / Л.А. Френкель // В кн.: Биомеханика / Сб. науч. тр. РНИИТО.-Рига.-1975.-Вып.13.-С.103-106.
113. Фролова, А.В., Бузук Г.Н., Царенков В.М., Петров П.Т., Трухачева Т.В., Дунец Л.Н. Лабораторная оценка влияния радиационной стерилизации на химический состав и антибактериальную активность лекарственного средства «ФИТОМП» и его компонента – маклейи мелкоплодной / А.В. Фролова, Г.Н. Бузук, В.М. Царенков, П.Т. Петров, Т.В. Трухачева, Л.Н. Дунец // Вестник фармации. Витебск.- 2007. - №1.- С. 83-91.
114. Хенч, Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей/ Л. Хенч, Д. Джонс // М.-Техносфера.-2007.- 303 с.
115. Чижикова, Т.В. Биомеханика костной ткани животных / Т.В. Чижикова // М.- АгроНИИТЭИПП. -1990.-164 с.
116. Шкаренков, А.А. Экспериментальное изучение потенциальной канцерогенности сангвиритрина / А.А. Шкаренков, А.А. Белошапко, Л.В. Крепкова, В.В. Бортникова, О.Н. Толкачев // В сборнике научных трудов: «Нетрадиционные природные ресурсы, инновационные технологии и продукты». – М.: РАЕН. – 2012. – Выпуск 20. - С. 162 – 166.

117. Шкарин, В.В. Дезинфектология: Руководство для студентов медицинских вузов и врачей / В.В. Шкарин, М.Ш. Шафеев // Нижний Новгород.-2003.- 368 с.
118. Янсон, Х.А. Ультразвуковые исследования трубчатых костей / Х.А. Янсон, В.В. Дзенис // Рига:Зинатне.-1990.-224с.
119. Янсон, Х.А. Некоторые вопросы механики биополимеров и создания их синтетических аналогов / Х.А. Янсон, И.В. Кнетс, Б.А. Пурина, Ю.Ж. Саулгозис // Итоги науки.-М.-1976.-С.153-199.
120. Янсон, Х.А. Искусственные аналоги кости: перспективы и проблемы / Х.А. Янсон // В кн.: Тезисы докладов 3-ей Всесоюзной конференции по проблемам биомеханики.-Рига:Зинатне.-1983.-Т.2.-С.154-155.
121. Ясенчук С.М. Изменение репаративной регенерации кости при имплантации депротенизированной костной ткани и синтетического гидроксиапатита: дис. канд. наук. – Москва, 1995. – 143с.
122. Ясенчук, С.М. Применение депротенизированной костной ткани для закрытия костных дефектов в эксперименте / С.М. Ясенчук, И.В. Матвейчук, А.А. Докторов, Ю.И. Денисов-Никольский // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ / Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий. – Москва, 1994. – Вып.1 – С.85 – 88.
123. Alexander, W Metal in the service of man/W. Alexander, A. Street // Penguin. - New York. - 1998.
124. Bacon, G.E. The orientation of apatite crystals in bone / G.E. Bacon, P.J. Bacon, R.K.Griffiths // J.Appl.Crystallogr.-1979.-V.12.-№1.-P.99-103.
125. Burstein, A.H. The ultimate properties of bone tissue. The effect of yielding / A.H. Burstein, J.D.Currey, V.N. Frankel, D.T. Reily // J. Biomech.-1972.-V.5.-№1.-P.35-44.
126. Burstein, A.H. Contribution of collagen and mineral to the elastic-plastic properties of bone / A.H. Burstein, J.M. Zika, K.G. Heiple, L. Klein // J. Bone Joint Surg.-1975.-V.57A.-P.956-961.

127. Callister, W.D. Materials science and engineering: an introduction/W.D. Callister // New York. – Wiley. –2003.
128. Davies, J.E. Bone engineering / J.E. Davies // Toronto.-EM Inc.-2000.
129. Hench, L.L. An introduction to bioceramics / L.L. Hench, J. Wilson // Singapore.-World Scientific.-1993.
130. Hugles, S.P.R. Sciences Basic of Orthopaedics/S.P.R. Hugles, I.D. McCarthy // Philadelphia.-W.B. Saunders.- 1998.
131. Lees, S. The role of collagen in the elastic properties of calcified tissue / S. Lees, C.L. Davidson // J. Biomech.-1977.-V.10.- №8.-P.473-486.
132. Park, J. Biomaterials: an introduction, 2-ond edition / J. Park, R.S. Lakes // New York.-Plenum.-1992.
133. Piekarski, K.R. Analysis of bone as a composite material / K.R. Piekarski // Int.J.Eng.Sci.-1973.-V.11.- №6.-P.557-565.
134. Ratner, B.D. Biomaterials Science / B.D. Ratner, A.S. Hoffman, F.J. Schoen, J.E. Lemons // Philadelphia.-Academic Press.- 2004.
135. Revell, P. Pathology of Bone / P. Revell // Berlin.-Springer Verlag.- 1986.
136. Robinson, R.A. Crystal-collagen-water relationship in bone matrix / R.A. Robinson // Clin.Orthopaed.-1960.-V.17.-P.69-76.
137. Simon, SR Orthopaedic Basic Science/S.R. Simon // Illinois.- American Academy of Orthopaedic Surgeons.- 1994.
138. Tsuruta, T. Multiphase biomedical materials / T. Tsuruta, A. Nikajima // Nitherlands. -VSP Utrecht, 1989.
139. Wise, D.L. The biomaterials and bioengineering handbook / D.L. Wise // New York.-Marcel Dekker.-2000.