

© С.В. Малишкіна, І.В. Вишнякова, Д.М. Пошелок

УДК 611.018.4:616.71-007.234

**С.В. Малишкіна, І.В. Вишнякова, Д.М. Пошелок**

### МЕТОДОЛОГІЧНИЙ ПІДХІД ДО ВИВЧЕННЯ МЕДИКО-БІОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ ШТУЧНИХ БІОМАТЕРІАЛІВ ДЛЯ КІСТКОВИХ ІМПЛАНТАТІВ

ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М.І.Ситенка АМН України» (м. Харків)

Робота є фрагментом науково-дослідних робіт «Вивчити остеointegraційні процеси при пластиці кісткових дефектів кальцій-фосфатними кераміками різного складу та структури (№ державної реєстрації 0104U0088) та «Розробити нові методи ендопротезування кістково-суглобових дефектів при лікуванні кісткових пухлин верхніх кінцівок» (№ державної реєстрації 0108U001076).

**Вступ.** Розвиток сучасних високотехнологічних галузей медицини, в тому числі ортопедії, травматології та стоматології, висуває високі вимоги до якості імплантаційних матеріалів. Основні з них - медико-біологічні, засновані на відсутності в матеріалі токсичних, канцерогенних і корозійних властивостей. Біоматеріали повинні бути біосумісними та мати такі технологічні якості, котрі дозволяють при певній обробці одержати необхідну конструкцію, яка характеризується стійкістю до сил тертя та має низьку теплопровідність [20, 26]. При цьому імплантаційні матеріали повинні виконувати не тільки замісну функцію, але, поступово інтегруючись у навколишню кістку, сприяти формуванню і ремоделюванню кісткової тканини. Літературні дані свідчать про активізацію розробок у створенні нових і удосконаленні відомих біоматеріалів для медицини [6, 30, 33, 34]. Відомо, що навіть незначна модифікація (елементного складу, фазового стану, топографії і структури поверхні та ін.) біоматеріалу може значно змінювати його властивості. Тому медико-біологічні дослідження штучних біоматеріалів залишаються актуальними і значущими.

З моменту застосування перших штучних біоматеріалів методологія їх досліджень зазнала значних змін. Сучасна концепція оцінки медико-біологічних ефектів імплантаційних матеріалів передбачає необхідність дослідження не тільки їх цитотоксичності та біосумісності (відповідність стандартам ДСТУ ISO 10993-1, -5 і -6: 2004), але й характерних для ортопедичних біоматеріалів властивостей – остеointegraції, остеокондуктивності, остеоіндуктивності та можливої їх біодеградації, що дозволяє забезпечити диференційоване застосування вже відомого біоматеріалу в кожній конкретній ситуації (враховуючи вік пацієнта, метаболічний стан кісткової тканини, навантаження у ділянці імплантації, функцію імплантованого матеріалу – стабілізуюча чи замісна і таке ін.), а також об'єктивне порівняння медико-біологічних ефектів різних біоматеріалів..

Використання розробленого методологічного підходу до вивчення штучних біоматеріалів, а також їх клінічна апробація дозволили дослідникам нашого інституту дати пугівку в життя таким біоматеріалам

як: метали з різними покриттями, алюмооксидна (корундова) та кальційфосфатна кераміки, композитні матеріали на основі керамік (в тому числі кераміка, легована іонами срібла), сапфіри, різновиди вуглецевих матеріалів, полімерні матеріали на основі D, L-лактіда і гліколіда, а також їх композитам з біоактивною керамікою [3, 7, 11, 12, 19, 34].

**Метою** повідомлення є висвітлення сучасної концепції методологічних підходів до вивчення медико-біологічних ефектів штучних біоматеріалів для ортопедії, травматології та стоматології за результатами власних розробок та даними літератури.

**Об'єкт і методи дослідження.** Для прикладу у роботі використані синтетичні біоматеріали: нержавіюча сталь (12X18H9T), титан (BT1-6), кістковий цемент (CEMEXRX), гідроксилapatитна та біфазна (гідроксилapatит/трикальційфосфат - 60/40) кераміки (пористі та щільні зразки).

Дослідження виконані в культурі клітин та в експерименті на щурах, при використанні комплексу методів – морфологічних [17], цитологічних [14, 15], електронно-мікроскопічних [18] та морфометричних [1] зі статистичною обробкою одержаних числових показників, що дозволило оцінити біоматеріали на рівні організму, тканинному та клітинному рівнях.

#### **Результати досліджень та їх обговорення.**

До дослідження біоматеріалів у культурі клітин є чутливим експрес-методом біоіндикації. Це - попередній скринінг, що дозволяє в короткий термін зробити висновок щодо наявності чи відсутності цитотоксичної дії досліджуваного матеріалу на клітини; біосумісності матеріалу; а також опосередковано, через визначення адгезії - наявності та вираженості остеointegraційних властивостей. Дослідження у культурі клітин характеризуються високою чутливістю і відтворенням, надійністю контролю за якістю проведення експерименту. Деякі автори стверджують, що чутливість досліджень *in vitro*, вища, ніж *in vivo* [23, 28].

Для вивчення біоматеріалів *in vitro* доцільніше використовувати первинні культури, бо клітинні лінії, котрі пересівають, генетично та метаболічно відрізняються від клітин організму та демонструють більшу стійкість до різних несприятливих факторів. При дослідженні імплантаційних матеріалів, які *in vivo* контактують з такими біологічними тканинами, як кістка, суглобовий хрящ, кістковий мозок, параосальні тканини, доцільне використання культури клітин сполучної тканини – фібробластів, кісткового мозку, мезенхімальних клітин, пре- та остеобластів. Тому на даному етапі досліджень у якості джерела клітин може бути використана підшкірна клітковина, яка в

умовах культивування *in vitro* дає ріст клітин фібробластичного диферону. Крім того, вивчення культури фібробластів доцільне ще й тому, що при проведенні токсикологічних досліджень штучних біоматеріалів їх імплантують, частіше всього, у підшкірну клітковину, тобто реакція організму опосередковується через систему сполучної тканини, основними структурними елементами якої є клітини фібробластичного диферону.

Клітини у моношарових культурах при дослідженні біоматеріалів аналізують у різні терміни, частіше, на 1, 3, 5 та 7-му добу. Такі терміни спостереження обумовлюються тим, що на 3-5 добу у культурі фібробластів чітко визначається зональне розташування клітин, а порушення зональності є одним із параметрів, що може характеризувати вплив зовнішніх факторів на культивовані клітини [2]. Що стосується пізнішого терміну спостереження (7-9 доба), то звертали увагу на те, що саме в ці терміни культури фібробластів виходять зі стадії стабільного росту і вступають у стадію дегенерації. При необхідності термін культивування клітин можна зменшити або збільшити (що диктується конкретним завданням). У культурі клітин дослідження виконують як із витяжками біоматеріалів, так і з самими зразками біоматеріалів. Одержані результати порівнюють зі станом контрольної культури.

При використанні культури фібробластів визначають загальні характеристики реакції клітин на біоматеріал, а саме: адгезію (прилипання) клітин до біоматеріалу за певний проміжок часу і їхню життєздатність; якість клітинного шару, приріст клітин у культурі за термінами спостереження; наявність і кількість загиблих клітин; проліферацію клітин (кількість мітозів і наявність патологічних мітозів); стан (цитологія) клітин у культурі (збереження фенотипу, чіткість контурів клітин та ядра, цілісність клітинної мембрани, стан цитоплазми і ядра).

Для успішної остеоінтеграції імплантаційних матеріалів з оточуючими тканинами, важливою є наявність у біоматеріалів високих адгезивних властивостей. Саме адгезія (прилипання) обумовлює початковий етап інтеграції – приєднання клітин до поверхні імплантата. Вона, є наслідком сприйняття клітинами біоматеріалу як "природної матриці" і, перед усім, свідчить про високий ступінь його біосумісності. Адгезія передує клітинній проліферації та диференціації і представляє собою невід'ємну ланку процесу остеоінтеграції [22, 31]. На інтенсивність і міцність адгезії значний вплив чинить склад матеріалу. Так, введення у біоскло 1,5% алюмінію пригнічувало процес інтеграції біоскла, а при 3%-ому його складі біоскло повністю втрачало цю якість [38]. На вираженість адгезії впливає також структура поверхні біоматеріалу (гладка чи шорстка), а у разі шорсткої поверхні – топографія її шорсткості. Детальна інформація щодо поняття остеоінтеграції та впливу на неї фізико-хімічних властивостей імплантаційних матеріалів представлена нами у попередніх публікаціях [8, 9].

Адгезивні властивості біоматеріалу оцінюють за кількістю (щільністю) культивованих клітин, які прикріпилися до поверхні його зразка у різні терміни при дослідженні у інвертованому мікроскопі (спеціальне забарвлення клітин), у електронному скануючому мікроскопі (рис. 1), або знімають клітини зі зразків та підраховують їх у камері Горева.

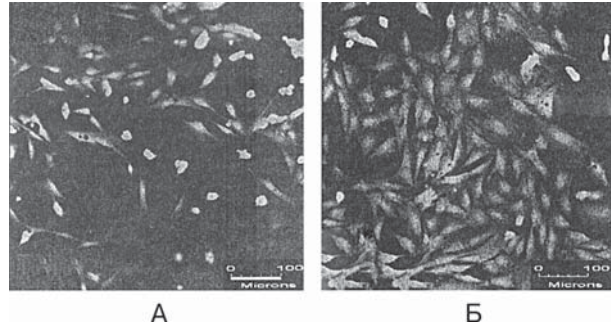


Рис. 1. Фібробласти культивовані на зразках нержавіючої сталі через 3 (а) та 5 (б) днів. Електронний скануючий мікроскоп, напilenня золотом (за Bordji K., 1996).

Цитологічні особливості клітин у культурі, наявність мітозів вивчають при фарбуванні клітин на скельцях азур-еозином за Романовським, або гематоксилином (Ерліха) та еозином [15].

Кількість клітин у культурах за термінами дослідження при застосуванні цитофотометра підраховують (після зняття їх зі скельць) та спеціального флуоресцентного фарбування. У разі використання для підрахунку клітин камери Горева, їх фарбують 0,1% розчином кристалвіолета і обчислюють за формулою [14]. Число мертвих клітин визначають після фарбування клітин трипановим синім, який швидко проникає у мертві клітини, забарвлюючи їх. При необхідності, зняті зі скельця культивовані клітини, після спеціальної підготовки, можуть бути досліджені гістологічними, гістохімічними, імуноморфологічними, електронно-мікроскопічними та біохімічними методами.

На **рисунку 2** представлені культури фібробластів при дослідженні зі зразками із нержавіючої сталі та титану.

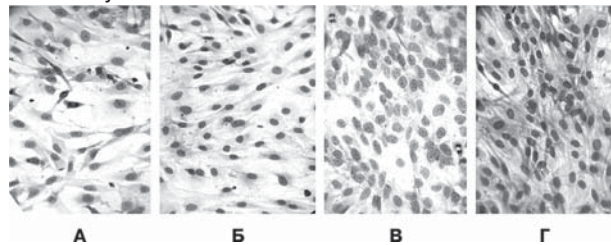


Рис. 2. Фібробласти на 3 та 5 добу культивування з витяжкою із біоматеріалів: А, Б - нержавіючої сталі; В, Г - титану. На рис. В у культурі спостерігаються клітини з фігурами мітозу. Азур-еозин. Зб.200.

Із **рисунків** видно, що клітини в обох дослідках зберігають фенотип як на 3-ю, так і на 5-у добу культивування. Це молоді фібробласти з чіткими

## МЕТОДИКИ

контурами продовгуватої цитоплазми та овальними гіпохромними ядрами. У більшості ядер виявляються ядерця. Місцями зустрічаються клітини з фігурами мітозів, таких клітин більше у культурах із витяжкою титану. Щільність клітин зростає зі збільшенням терміну спостереження. Проте у культурі клітин з витяжкою із нержавіючої сталі кількість клітин менша як на 3-ю, так і на 5-у добу при порівнянні

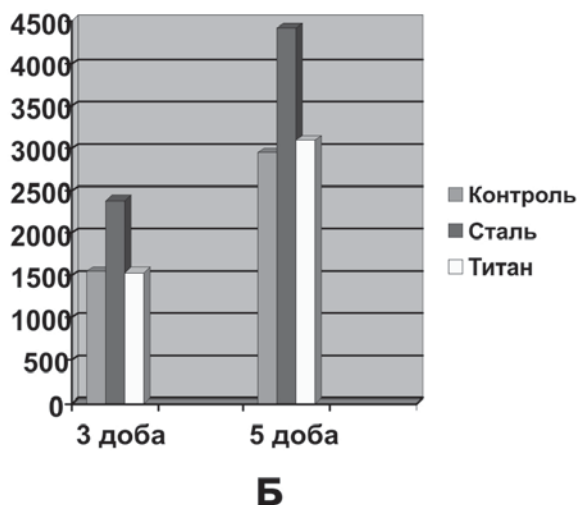
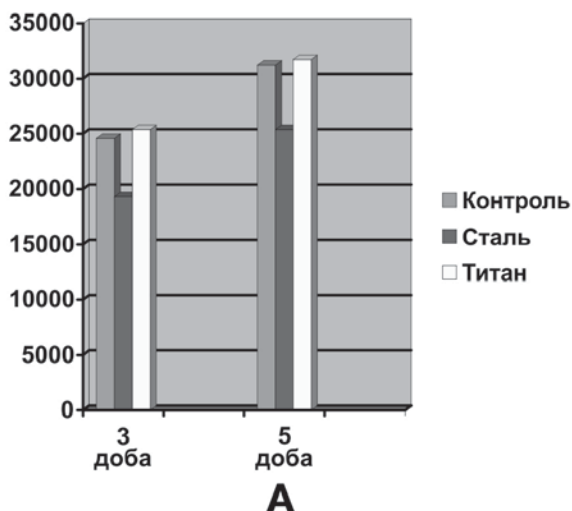


Рис 3. Діаграми, які представляють: А) - кількість життєздатних клітин (1 мл суспензії) та Б) – кількість мертвих клітин у культурах з витяжками із нержавіючої сталі та титану.

з культурою, де досліджували витяжку з титану (рис. 3).

Число мертвих клітин, навпаки, було більшим у культурах з витяжкою із нержавіючої сталі, проте воно не перевищувало допустимих значень для первинних культур (до 25 % у первинних культурах [15]).

На **рисунок 4** представлені культури фібробластів на 5 добу культивування у присутності зразків високомолекулярного поліетилену (ВМПЕ) та метилметакрилату (ММТК). У культурах клітин спостерігаються виражені деструктивні зміни, що свідчить

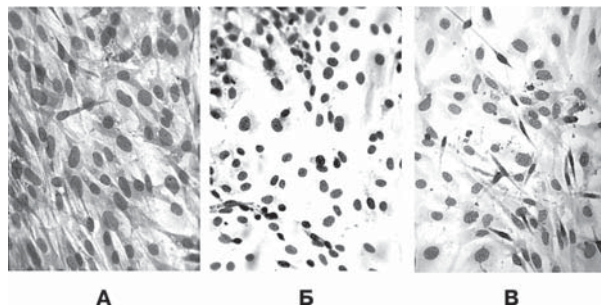


Рис. 4. Фібробласти культивовані в присутності зразків ВМПЕ (Б) та ММТК (В). А). контрольна культура. Б). Численні «голядерні» клітини. В). Численні клітини зі збудженими (патологічна профаза) ядрами. Азур-еозин. Зб.200.

про негативний вплив на клітини досліджуваних біоматеріалів.

Дослідження в культурі остеогенних клітин дає можливість визначити специфічні характеристики: збереження клітинами фенотипу (остеобласти) по морфології клітин та за додатковими показниками - синтезу специфічних (для остеогенних клітин) білків колагену 1 типу та остеокальцину (з моноклональними антитілами специфічними до них), ферментів - лужної фосфатази (цитохімічні методи з використанням діагностичних китів); наявності кристалів кальцію та фосфору (за методом Коса).

У культурі остеогенних клітин (мезенхімальні клітини чи стромальні клітини кісткового мозку) досліджують спроможність клітин до остеогенної диференціації, а також визначають наявність і

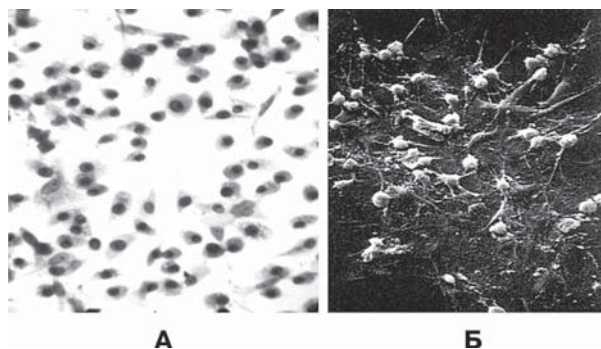


Рис. 5. А). Культура остеобластів на 2-у добу культивування із витяжкою із титану. Азур-еозин. Зб.100. Б). Остеобласти на поверхні титанових зразків. Сканиуючий електронний мікроскоп, напilenня золотом (за Bordji K., 1996).

вираженість остеointegraції (адгезія та щільність клітин на зразках біоматеріалу) (рис. 5).

Дослідження біоматеріалів in vivo в експериментах на тваринах.

Медико-біологічні дослідження на тваринах виконуються в умовах асептики та у відповідності до Європейської конвенції, Закону України щодо гуманного відношення до експериментальних тварин, а також згідно із загальноприйнятими міжнародними стандартами (ДСТУ ISO 10993-6:2004), які зазначені на принципах трьох R [4, 16]. Це - refinement (покращення), тобто гуманізація експериментів

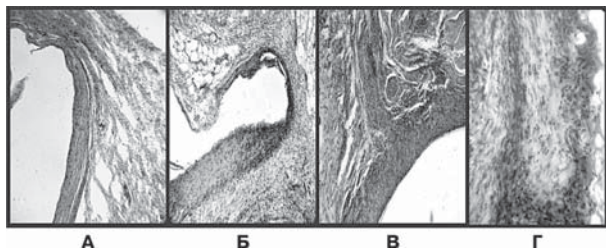


## МЕТОДИКИ

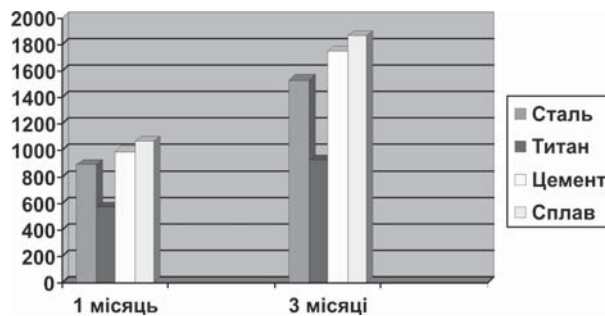
(зменшення больового навантаження, використання наркозу при оперативних втручаннях і евтаназії та ін.); reduction (скорочення) - визначення оптимально доцільної кількості тварин для експерименту; необхідного виду тварин та їх віку (частіше – молоді статевозрілі); вибір адекватної і коректної моделі; обґрунтування об'єктивних методів досліджень; replacement заміна експериментальних тварин альтернативними моделями, широке впровадження досліджень in vitro та ін. План експериментів повинен бути узгоджений з Комітетом по біоетиці. Дрібні гризуни (щури, миші) виводяться з експерименту шляхом передозування ефіру або внутрішньо черевним введенням 10 % водного розчину тіопенталу натрію, кролики – введенням у крайню вену вуха 2 мл 10 % розчину тіопенталу натрію і в стані наркотичного сну перерізанням зовнішньої та внутрішньої сонної артерії; собаки – введенням у латеральну вену гомілки 5 мл 10 % розчину тіопенталу натрію і в стані наркотичного сну перерізанням зовнішньої та внутрішньої сонної артерії.

На першому етапі досліджень зразки біоматеріалів імплантують у підшкірну-жирову клітковину (ПЖК), яка добре забезпечується кров'ю та має високу щільність клітин різних диферонів. Це дозволяє оцінити реакцію організму на імплантований біоматеріал і за станом внутрішніх органів тварин (структурна організація, наявність чи відсутність патологічних змін) визначити цитотоксичність біоматеріалів.

Біосумісність імплантатів досліджують аналізуючи капсули, які утворюються навколо зразків біоматеріалів у підшкірній клітковині. Її товщина, клітинний склад (кількість і фенотип клітин), характеристика колагенових волокон; наявність та стан судин у капсулі характеризує біосумісність матеріалу. На **рисунку 6** представлені капсули, які утворилися через 30 днів, навколо зразків різних матеріалів, імплантованих щурам. Як видно з рисунків, капсули відрізняються товщиною, структурою і клітинним складом. Найтонша капсула (**рис. 6 А**) зі щільним розташуванням тонких колагенових волокон і незначною щільністю клітин фібробластичного диферону відмічена навколо титану, що вказує на його виражену біосумісність. Капсула навколо нержавіючої сталі (**рис. 6 В**) товстіша за титан (**рис. 7**). В ній виявляються судини мікроциркуляторного русла (окремі з них - повнокровні), невеликі скупчення лімфоїдних клітин поодинокі макрофаги.



**Рис. 6.** Сполучнотканинні капсули навколо зразків із титану (А), нержавіючої сталі (Б), кісткового цементу (В), сплаву заліза із міддю (Г). 30 доба після імплантації. Гематоксилін та еозин. Зб. 100. Г – Зб. 200.



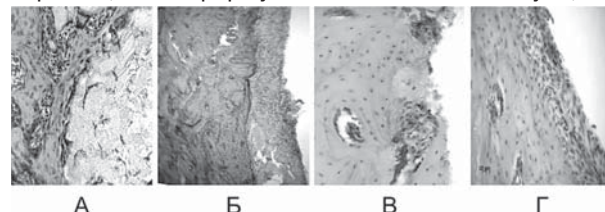
**Рис. 7.** Товщина (мкм) сформованих капсул навколо біоматеріалів.

Щільна і товста капсула навколо кісткового цементу (**рис. 6 Г**). Її товщина (**рис. 7**) вірогідно більша за показники капсул навколо нержавіючої сталі та титану. Колагенові волокна розташовані нещільно та невпорядковано. Щільність фібробластів у капсулі незначна. В ній визначаються лімфоїдні клітини, макрофаги і навіть поодинокі багатоядерні клітини. Все це свідчить про низьку біосумісність кісткового цементу. Капсула навколо сплаву заліза з міддю – товста (**рис. 7**), з великою щільністю клітин (**рис. 6 Г**). В капсулі спостерігаються навіть мікро часточки металу, що вказує на деградацію сплаву та можливий негативний вплив на організм.

На другому етапі досліджень зразки біоматеріалів імплантують у кістку, що дозволяє оцінити такі властивості, як:

- вираженість процесу остеоінтеграції;
- наявність чи відсутність остеоіндуктивних та остеоіндуктивних властивостей;
- характер та темпу можливої біодеградації біоматеріалу, а також вплив компонентів біодеградації на процеси перебудови оточуючої їх кісткової тканини;
- характер кісткоутворення при імплантації розроблених біоматеріалів у губчасту та компактну кісткову тканину.

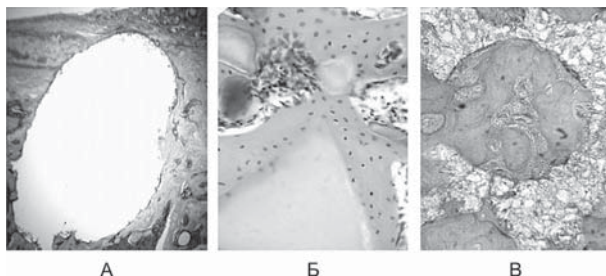
Термін “остеоінтеграція” (об'єднання в одне ціле) використовується для визначення безпосереднього контакту імплантата з кісткою, що характеризує біоматеріал як високо біосумісний. До таких матеріалів відносяться біоактивні кальційфосфатні кераміки (**рис. 8 А**). Навколо біоінертних матеріалів (метали, сплави, щільна алюмооксидна кераміка, кістковий цемент), особливо зразки із гладкою поверхнею, часто формується волокниста капсула, за



**Рис. 8.** А). Молоді кісткові трабекули щільно контактують з бифазною кальцій фосфатною керамікою. Б) – Товста волокниста капсула між зразком із нержавіючої сталі та кісткою; деструктивні зміни у кістці. В). Безпосередній зв'язок кістки із щільним гідроксилапатитом. Г). Фіброзна капсула навколо титану. Гематоксилін та еозин. Зб. 200.

допомогою якої організм захищається від чужорідних тіл (рис. 8 Б).

Товщина і клітинний склад капсули являється «мірою» біосумісності імплантаційного матеріалу. Зміна гладкої структури поверхні імплантатів на шорстку або пористу надає їм остеокондуктивності, що сприяє підвищенню їх остеointegraційних якостей [6, 13, 27]. Остеointegraція ініціюється утворенням хімічного зв'язку між кісткою та матеріалом імплантату, а далі - адгезією клітин [21]. Остеointegraцію біоматеріалів на цей час описують не тільки якісно, але й оцінюють кількісно. Остеointegraція щільного матеріалу виражається відношенням довжини безпосереднього контакту кісткової тканини до периметра імплантованого зразка біоматеріалу, а пористого - відношенням площі кісткової тканини в зовнішніх і внутрішніх порах до площі всіх його пор [10]. Так, коефіцієнт остеointegraції (КО) гладкого титану, визначений при імплантації циліндричних зразків у кістку (рис. 9), дорівнює 0,76, щільного

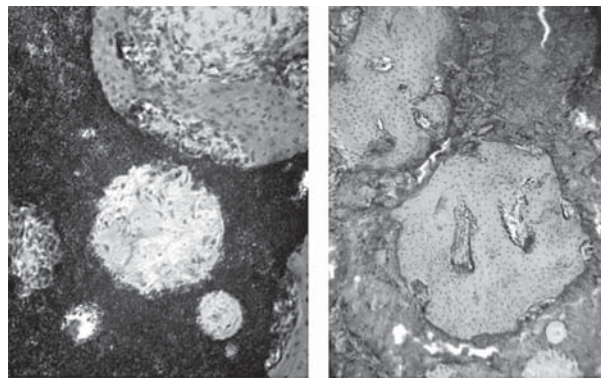


**Рис. 9. А).** ділянка імплантації титанового зразка. Порожнина від видаленого імплантата. Коефіцієнт остеointegraції дорівнює 0,76. **Б).** Щільний контакт кістки з гранулами щільного гідроксилапатиту (КО = 0,86); **В).** Кісткова тканина у порах кальцій-фосфатної кераміки (КО = 0,92). Гематоксилін та еозин. 36.200.

гідроксилапатиту – 0,86 та пористої кальцій фосфатної кераміки – 0,92.

Остеокондуктивність забезпечує інтеграцію біоматеріалу з кістковою тканиною за рахунок створення умов для міграції детермінованих остеогенних клітин-попередників реципієнта та проникнення кровонесних судин у пори біоматеріалу, вrostання материнської кісткової тканини [21]. Остеокондуктивність біоматеріалів залежить від їх фізико-хімічних характеристик, біосумісності та структури поверхні (архітектоники, розмірів пор і об'єму пористості) [8, 9]. Так, на **рисунку 10 А** представлено зразок щільної кальцій-фосфатної кераміки з порами різних розмірів, які не з'єднуються між собою, а на **рисунку 10 Б** – зразок кальцій-фосфатної кераміки зі з'єднаними між собою порами. Площі кісткової тканини на 90 добу після імплантації у кістку у зразках різні (**рис. 10 А, Б**).

Остеокондуктивність визначається показником площі новоутвореної кісткової тканини, у зоні імплантації біоматеріалу, за одиницю часу (за добу) [36, 39]. Одержані показники для різних біоматеріалів порівнюють між собою. Чим більший показник площі новоутвореної кісткової тканини за одиницю часу, тим вищі остеокондуктивні якості біоматеріалу.



**Рис. 10. А).** Кісткова та фіброретикулярна тканина у несполучних порах кальцій-фосфатної кераміки. **Б).** Кісткова тканина у порах кераміки. Гематоксилін та еозин. 36.200.

Остеоіндуктивність це - модуляція фенотипічної експресії неспецифічних сполучнотканинних клітин-попередників та їх направлена диференціація у остеопрогеніторні клітини [8]. Остеоіндуктивні матеріали забезпечують можливість диференціації не тільки остеогенних, але й некомпітованих клітин [30, 35], що визначає енхондральний та інтрамембранний тип остеогенезу.

Адекватним методологічним підходом до визначення можливих остеоіндуктивних якостей біоматеріалів є феномен ектопічного кісткоутворення, коли зразки біоматеріалу імплантують під шкіру або внутрішньо м'язово без використання додаткових стимулюючих факторів (ростових). Якщо матеріал має остеоіндуктивні якості на його поверхні та у порах спостерігається формування кісткової тканини. Темпи остеогенезу та величина площі сформованої кісткової тканини залежать від вираженості остеоіндуктивності матеріалу. Якщо матеріал не має остеоіндуктивних якостей ектопічного утворення кістки не спостерігається. Деякі автори відмічали ектопічне кісткоутворення у порах кальцій-фосфатної кераміки [25, 35]. Модифікація поверхні титанових імплантатів за рахунок специфічної зміни рель'єфу (шорсткості та пористості) або нанесення біоактивного покриття супроводжується активацією остеоіндуктивних якостей титану. При цьому видозмінена поверхня імплантату, його мікротекстура служить пусковим сигналом для клітинної адгезії з наступною проліферацією та диференціацією остеопрогеніторних клітин [13, 24, 37]. Ми вважаємо, що остеоіндуктивність кераміки та модифікованого титану є вторинною, тобто пов'язаною з адсорбцією біологічно активних речовин, а при імплантації біоматеріалів у кістку – і з адсорбцією клітин кісткового мозку. Саме цим можна пояснити формування кісткової тканини на кераміці у місцях відділених від материнської кістки.

Ектопічне формування кісткової тканини у порах гідроксилапатиту ми спостерігали на 90 добу після імплантації зразків у підшкіряну-жирову клітковину щурів (**рис. 11**).





## МЕТОДИКИ

4. Европейська конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та інших наукових цілей. Страсбург, 18 березня 1986 року : офіційний переклад [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. – Офіц. веб-сайт. – (Міжнародний документ Ради Європи). Режим доступу до документа: [http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994\\_137](http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=994_137).
5. Иванова Л.А. Методика исследования костной ткани путем поляризационной микроскопии // Биология опорно-двигательного аппарата. Мат. Школы.- Харьков, 1992.-С. 34-37.
6. Карлов А.В. Зависимость процессов репаративного остеогенеза от поверхностных свойств имплантатов для остеосинтеза / А.В. Карлов, И.А. Хлусов // Гений ортопед. -2003. - №3. -С.46-51.
7. Корж А.А. Керамопластика в ортопедии и травматологии / А.А. Корж, Г.Х. Грунтовский, Н.А. Корж, В.Т. Михайлив // Львов, Свит. – 1992. – 112 с.
8. Корж Н.А. Имплантационные материалы и остеогенез / Н.А. Корж, В.А. Радченко, С.В. Малышкина, Л.А. Кладченко // Ортопедия, травматология и протезирование.- 2003, № 1.С.41-47.
9. Корж Н.А. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль биологической фиксации и остеоинтеграции в реконструкции кости /Н.А. Корж, С.В. Малышкина, Л.А.Кладченко, И.Б. Тимченко // Ортопедия, травматологи и протезирование, 2005.- №4.- С.118-127.
10. Кулаков О.Б. Остеоинтеграция имплантатов из циркония и титана в эксперименте / О.Б. Кулаков, А.А. Докторов, С.В. Дьякова [др.] // Морфология. – 2005. – Т. 127. - № 1. – С. 52 -55.
11. Малишкіна С.В. Біосумісність та цитотоксичність композиту на основі полілактиту / С.В. Малишкіна // Український морфологічний альманах .-2006.-№1.-С. 47-50.
12. Малишкіна С.В. Порівняльний аналіз остеорепаративного процесу у зонах імплантації композитів на основі полімерів з різним вмістом трикальційфосфату та гідроксилapatиту / С.В. Малишкіна, Л.М. Бенгус, І. О. Батура // Медицина І.....2007, № 2 (17), с. 45-48.
13. Малишкіна С.В.Остеоінтеграція кісткової тканини з титановими імплантатами/ [Текст] С.В.Малишкіна, Н.В.Дедух // Ортопед. травматол. – 2010. - № 1.- С. 115-123.
14. Методические рекомендации по криоконсервированию и цитологическому контролю качества культур клеток и фрагментов ткани. - Харьков: НИИ экспериментальной ветеринарии. - 1981. - 27 с.
15. Методические рекомендации по получению, культивированию и использованию в научных и производственных ветеринарных лабораториях первичных, перевиваемых и диплоидных культур клеток живого происхождения. М. – 1978.-30 с.
16. Про захист тварин від жорстокого поводження : Закон України № 3447-IV від 21.02.2006 р. [Електронний ресурс] / Верховна Рада України. – Офіц. веб-сайт. – Режим доступу до документа: <http://zakon.rada.gov.ua/cgi-bin/laws/main.cgi?nreg=3447-15>.
17. Саркисов Д.С. Микроскопическая техника [Текст] / Д.С.Саркисов, Ю.Л.Перова. – М.: Медицина, 1996. – 542 с.
18. Уикли Б. Электронная микроскопия для начинающих [Текст]. - М.: Мир, 1975.-324 с.
19. Филиппенко В.А. Структурные характеристики и бактерицидные свойства гидроксилapatита, обогащенного серебром / В.А. Филиппенко, С. В. Малышкина, М. Фархан, Б.Н. Шевцов, Н.В. Ульянчик // Ортопедия, травматология и протезирование 2000, № 4.С.50-55
20. Филиппенко В.А. Роль материалов и биоимплантационных покрытий в развитии проблемы эндопротезирования / В.А.Филиппенко, Л.А. Кладченко, И.Б. Тимченко // Ортопедия, травматологи и протезирование, 1998.- №3.- С.47-52.
21. Albrektsson T. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration / Albrektsson T., Johansson C. // Eur. Spine J. -2001. -№10. -P.96-101.
22. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials / K. Anselme //Biomaterials. -2000. -№21. -P.667-681.
23. Bordji K. Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5 Fealloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts / K.Bordji , J.Jouzeau, D.Mainard [et al] // Biomaterials.-1996.-Vol.17.-P.929-940.
24. Butz F. Enhanced mineralized tissue adhesion to titanium over polystyrene assessed by the nano-scratch test / F. Butz, H. Aita, K. Takeuchi, T. Ogawa // J Biomed Mater Res A. – 2005. – Vol. 74. – P. 164 – 170.
25. Chen W. Early osteoinduction in calciumphosphate ceramics in various species / W. Chen, S. Qu, Z. Eang [et al] // Firth World biomaterials congress. – 1996. – P.120 – 121.
26. Duguay N. Biomaterials and osseous regeneration / N. Duguay, H. Petite, E. Arnaud // Ann.Chir. Plast. Esthet. -2000. -Vol.45, №3. -P.364-376.
27. Eisenbarth E. Interactions between cells and titanium surfaces / E. Eisenbarth, D. Velten, K. Schenk-Meuser [et al.] // Biomolecular Eng. -2002. -№-19. -P.243-249.
28. Johnson H.J. Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro II. Objective methods of toxicity / H.J. Johnson, S. J. Northup, P.A. Seagraves // J. Biomed. Med. Res. – 1995. – Vol. 19. P. 489 – 6111.
29. Langstaff S. Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates / S. Langstaff, M. Sayer, T.J. Smith [et al.] // Biomaterials. -1999. -Vol.20, №18. -P.1727-1741.
30. Lee T.M. Attachment and proliferation of neonatal rat calvarial osteoblasts on Ti6Al4V: effect of surface chemistries of the alloy / Lee T.M., Chang E., Yang C.Y.// Biomaterials. -2004. -Vol.25. -№1. -P.23-32.
31. Linez-Bataillon P. In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates / P. Linez-Bataillon, F. Monchau, M. Bigerelle, M. Hildebrand // Biomolecular Eng. -2002. -№19. -P.133-141.
32. Meenen N.M. Hydroxyapatite-ceramic for luxta-articular implantation / Meenen N.M., Osborn J.F., Dallek M., Donath K. // J. Materials Science: Materials In Medicine -1992. -№ 3 -P.345-351.
33. Montanaro L. Nanostructured materials for inhibition of bacterial adhesion in orthopedic implants: a minireview / L. Montanaro, D. Campoccia, C. R. Arciola // Int. J. Artif Organs. – 2008. – Vol. 31. - № 9. – P. 771 -776.
34. Porous calcium phosphate ceramic granules and their behaviour in differently loaded areas of skeleton / Z.Zyman, V.Glushko, N.Dedukh, S.Malyshkina, N. Ashukina // J. Mater Sci: Mater Med., 2008.- Vol.19, № 5.- P. 2197-2205.
35. Ripamonti U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models / Ripamonti U. // Biomaterials.-1996.- №17.- P. 31-35.

36. Ruhaimi K.A. Bone graft substitutes: A comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials / Ruhaimi K.A // Int J Oral Maxillofac Implants- 2001. – Vol 16. - № 1 -P.105-113.
37. Saruwatari L. Osteoblasts generate harder, stiffer, and more delamination-resistant mineralized tissue on titanium than on polystyrene, associated with distinct tissue micro- and ultrastructure / L. Saruwatari, H. Aita, F. Butz [et al] // J Bone Miner Res. – 2005. – Vol. 20. – P. 2002 – 2016.
38. Suominen E.A. Hydroxyapatite - glass composite as a bone substitute in large metaphyseal cavities in rabbits / E.A. Suominen, A.J. Aho, J. Juhanoja, A. Yli-Urpo // Intern. Orthop. -1995. -Vol. 19. -P.167-173.
39. Vaccaro A. R. The role of the osteoconductive scaffold in syntetic bone graft / Vaccaro A. R.// Orthopedics.- 2002.- Vol.25.- №5.- P/ 571-578.

УДК 611.018.4:616.71-007.234

### **МЕТОДОЛОГІЧНИЙ ПІДХІД ДО ВИВЧЕННЯ МЕДИКО-БІОЛОГІЧНИХ ЕФЕКТІВ ШТУЧНИХ БІОМАТЕРІАЛІВ ДЛЯ КІСТКОВОЇ ПЛАСТИКИ**

**Малишкіна С.В., Вишнякова І.В., Пошелок Д.М.**

**Резюме.** В роботі представлено методологічний підхід до вивчення медико-біологічних ефектів штучних біоматеріалів для ортопедії, травматології та стоматології з використанням комплексу методів дослідження *in vitro* в культурі клітин та в експерименті на тваринах, який дозволяє виявити не тільки наявність чи відсутність біосумісності та цитотоксичності біоматеріалів, алей охарактеризувати їх остеоінтеграційні, остеокондуктивні, остеоіндуктивні якості, а також біодеградацію, що забезпечує можливість диференційованого застосування біоматеріалів у конкретному випадку та об'єктивного порівняння різних біоматеріалів.

**Ключові слова:** штучні біоматеріали, медико-біологічні ефекти, дослідження *in vitro*, *in vivo*.

УДК 611.018.4:616.71-007.234

### **МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ИЗУЧЕНИЮ МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ИСКУССТВЕННЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ КОСТНОЙ ПЛАСТИКИ**

**Малишкіна С.В., Вишнякова І.В., Пошелок Д.М.**

**Резюме.** В работе изложен методологический подход к изучению медико-биологических эффектов искусственных биоматериалов для ортопедии, травматологии и стоматологии с использованием комплекса методов исследования *in vitro* в культуре клеток и в эксперименте на животных. Представленный методологический подход позволяет выявить не только наличие или отсутствие биосовместимости и цитотоксичности биоматериалов, но и охарактеризовать их остеоинтеграцию, остеокондукцию, остеоиндукцию, а также биодеградацию, что обеспечивает возможность дифференцированного использования биоматериалов в конкретном случае и объективного сравнения различных биоматериалов.

**Ключевые слова:** искусственные биоматериалы, медико-биологические эффекты, исследования *in vitro*, *in vivo*.

UDC 611.018.4:616.71-007.234

### **The Methodological Approach To Studying Of Medical And Biological Effects Of Artificial Biomaterials For Bone's Implants**

**Malishkina S.V., Vishnjakova I.V., Poshelok D.M.**

**Summary.** In this work the methodological approach to studying of medicobiological effects of artificial biomaterials for orthopedic, traumatology and stomatology with use of a complex of methods of research *in vitro* in culture of cells and in experiment on animals were described. The presented methodological approach allows to tap not only presence or absence of biocompatibility and cytotoxicity of biomaterials, but also to characterize their osteointegration, an osteoconduction, an osteoinduction, and also biodegradation. This provides possibility differentiated use of biomaterials in a concrete case and objective comparison of various biomaterials.

**Key words:** artificial biomaterials, medical and biological effects, researches *in vitro*, *in vivo*.

Стаття надійшла 7.07.2011 р.