DOI <http://dx.doi.org/10.18551/rjoas.2016-07.02>

**ОЦЕНКА БИОСОВМЕСТИМОСТИ КОМБИНИРОВАННОГО
ИМПЛАНТАЦИОННОГО МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ НИТИНОЛА И
МИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА**
BIOCOMPATIBILITY EVALUATION OF COMBINED IMPLANTATION MATERIAL
BASED ON NITINOL AND MINERALIZED BONE MATRIX

Силантьева Т.А., кандидат биологических наук
Silant'eva T.A., Candidate of Biological Sciences

Краснов В.В., доктор биологических наук
Krasnov V.V., Doctor of Biological Sciences

Кубрак Н.В., младший научный сотрудник
Kubrak N.V., Junior Researcher

Накоскин А.Н., кандидат биологических наук
Nakoskin A.N., Candidate of Biological Sciences

**ФГБУ «Российский научный центр «Восстановительная травматология и
ортопедия» имени академика Г.А. Илизарова» Министерства здравоохранения
Российской Федерации, Курган, Россия**

Russian Ilizarov Scientific Center «Restorative Traumatology and Orthopaedics» of Ministry
of Healthcare, Kurgan, Russia

E-mail: tsyl@mail.ru, v.v.krasnov@mail.ru, kubrak2@mail.ru, nakoskin_a@mail.ru

АННОТАЦИЯ

Целью исследования являлось тестирование биологической совместимости имплантационного материала - структурного и функционального аналога губчатой костной ткани. Экспериментальный образец импланта включал упруго-волокнистый компонент (конструкции из проволоки никелида титана), нативно-структурированный минеральный компонент (фрагменты ксеногенного минерализованного костного матрикса) и регуляторно-трофический компонент (аллоплазма в сочетании с метаболически активными веществами – аскорбиновой кислотой и глюкозой). Методами орто- и гетеротопической имплантации, рентгенографии, световой и электронной сканирующей микроскопии, рентгеновского электронно-зондового микроанализа показано улучшение биосовместимости, остеоиндуктивности и остеокондуктивности компонентов имплантационного материала вследствие их синергичного взаимодействия.

ABSTRACT

Purpose of the study consisted in testing biological compatibility of the implantation material – structural and functional analogue of cancellous bone. The implant experimental sample included an elastic-and-fibrous component (constructed of titanium nickeline wire), a natively structured mineral component (fragments of xenogenic mineralized matrix), and a regulatory-and-trophic component (alloplasm combined with metabolically active substances – ascorbic acid and glucose). The methods of ortho- and heterotopic implantation, radiography, light and electron scanning microscopy, X-ray electron probe microanalysis demonstrated the improvement of biocompatibility, osteoinductivity and osteoconductivity of the implantation material components due to their synergic interaction.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА

Костный дефект, имплантация, никелид титана, костный матрикс, плазма крови, аскорбиновая кислота, глюкоза.

KEY WORDS

Bone defect, implantation, titanium nickeline, bone matrix, blood plasm, ascorbic acid, glucose.

Проблемы замещения обширных дефектов кости после расширенного хирургического вмешательства чрезвычайно актуальны в травматологии, ортопедии, онкологии и стоматологии [10, 20]. Современные тенденции в лечении человека и животных с данной патологией характеризуются поиском подходов, обеспечивающих сохранение и активизацию собственного репаративного потенциала организма [9, 12]. Этим требованиям отвечают методики стимуляции репаративного остеогенеза с использованием биологически инертных и активных материалов и препаратов. К их числу относятся известные и апробированные в клинической практике металлоимплантаты из никелида титана с наноструктурированной поверхностью [2, 6, 14], остеопластические материалы на основе костного матрикса [5, 7, 9, 19], препараты метаболического действия и плазма крови [16, 17, 26].

При замещении обширных дефектов губчатых костей и эндопротезировании перспективным является создание имплантационных материалов с улучшенными характеристиками биомеханического соответствия, остеоиндуктивности и биосовместимости. Исследования последних лет демонстрируют синергичное влияние комбинированного применения указанных материалов и препаратов на течение репаративного процесса [31]. Сочетание их в составе имплантационных конструкций позволяет объединять и усиливать индуктивные, кондуктивные, трофические, цитопротективные, иммуномодуляторные и антимикробные свойства [1, 16, 17, 18, 19, 25, 27]. Исходя из этого, целью исследования явилось изучение биосовместимости комбинированного имплантационного материала - структурного и функционального аналога губчатой костной ткани, полученного путем сочетания металлоконструкций из нитинола, биоматериалов и метаболически активных веществ.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Структурный и функциональный эквивалент губчатой костной ткани изготавливали на основе объемных конструкций из проволоки никелида титана (TiNi) «ТН-10» диаметром 90 мкм (НПП МИЦ, Россия) и ксеногенного бесклеточного минерализованного костного матрикса (МКМ) [11].

Стерилизацию имплантационного материала осуществляли с использованием низкотемпературного газового стерилизатора/аэрата «3М™ Steri-Vac™ 5XL» (3М, Россия).

Непосредственно перед имплантацией композиционный материал пропитывали эквивалентным объемом композиции на основе аллогенной плазмы крови и метаболически активных препаратов – официальных растворов аскорбиновой кислоты и глюкозы [18].

Для получения аутологичной плазмы осуществляли взятие крови у интактных животных (у крыс – после декапитации, у кроликов – из подкожной вены предплечья), используя вакуумные системы с гепарином (BD, США). Плазму отделяли центрифугированием в лабораторной центрифуге «ОПн-3М» (Дастан, Кыргызстан) при 1000 об/мин в течение 10 мин. Аликвоты плазмы объемом 1 мл помещали в пластиковые пробирки с крышками типа «Эппендорф» и замораживали при -20° С. Перед применением плазму размораживали при 37° С.

Эксперименты выполнены на 14 лабораторных животных – крысах линии Вистар массой 180-250 г (n=10) и кроликах породы Шиншилла массой 3,5-4,5 кг (n=4). До начала экспериментальных исследований было получено одобрение Комитета по этике ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова» на их выполнение (протокол заседания Комитета по этике при ФГБУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова №3(35) от 09.12.2013). Животных содержали в стандартных условиях вивария на лабораторном рационе при свободном доступе к воде и корму. Все манипуляции осуществляли в соответствии с правилами лабораторной практики РФ и соблюдением норм гуманного обращения с животными [3, 13].

У крыс (I-V серии) выполняли гетеротопическую подкожную имплантацию. В грудной и поясничной области тела производили симметричные разрезы кожного

покрова длиной 1 см и формировали полости ($n=8$), в которые помещали образцы исследуемых материалов объемом $0,5 \text{ см}^3$ (таблица 1, рис. 1).

Таблица 1 – Состав образцов исследуемых материалов при гетеротопической подкожной имплантации

Серия	Состав имплантационных материалов
I	МКМ + 0,9% раствор NaCl ($n=16$)
II	МКМ + аллогенная плазма крови + МАВ ($n=16$)
III	МКМ + двумерные конструкции из TiNi + 0,9% раствор NaCl ($n=16$)
IV	МКМ + двумерные конструкции из TiNi + аллогенная плазма крови + МАВ ($n=16$)
V	МКМ + трехмерные конструкции из TiNi + аллогенная плазма крови + МАВ ($n=16$)

Рисунок 1 – Микрофото (а, б) и электронная сканограмма (б) имплантационных материалов:
а – бесклеточный костный матрикс; б – двумерные конструкции из проволоки TiNi и МКМ;
в – трехмерные конструкции из проволоки TiNi и МКМ

В VI серии кроликам выполняли ортотопическую имплантацию. После осуществления доступа к латеральной поверхности проксимального метафиза плечевой кости, высверливали несквозное цилиндрическое отверстие диаметром 5 мм и глубиной 12 мм. Полости дефектов справа заполняли фрагментами МКМ с конструкциями из TiNi, пропитанными композицией на основе аллоплазмы крови и МАВ. Полости дефектов слева оставляли незаполненными. Операционные раны послойно ушивали.

В послеоперационном периоде всем животным в течение 5-7 дней назначали анальгетики и антибактериальные препараты согласно инструкции по применению. Рентгенографическое исследование проводили с помощью рентгеновского аппарата «Premium Vet» (Sedecal, Испания). Продолжительность эксперимента составляла 60 ± 2 суток.

Образцы биологических тканей в области имплантации извлекали после эвтаназии экспериментальных животных. Половину образцов мягких тканей с имплантированным костным матриксом помещали на 3 суток в смесь 2% растворов глутарового и параформальдегидов на фосфатном буфере (pH 7,4). Затем образцы обезжиривали в ацетоне, декальцинировали в смеси Рихмана-Гельфанда-Хилла и уплотняли в парафине по общепринятым гистологическим методикам [15]. На санном микротоме (Reichert, Германия) изготавливали гистологические парафиновые срезы, которые окрашивали гематоксилином и эозином. Исследование и микрофотосъемку препаратов проводили с использованием стереоскопического микроскопа «Stemi 2000-C», микроскопа «AxioScope. A1» и цифровой камеры «AxioCam ICc5», в комплекте с программным обеспечением «Zen blue» (Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Германия).

Другую часть образцов мягких тканей с имплантированными материалами (как на основе МКМ, так и МКМ в сочетании с TiNi), а также костные блоки пропитывали эпоксидными смолами для электронно-микроскопических исследований [4, 15]. Поверхность эпоксидных блоков шлифовали мелкоабразивными материалами и покрывали токопроводящим слоем в ионном напылителе «IB-6» (EICO, Япония). Поверхность некоторых блоков дополнительно обрабатывали 10% этиолятом натрия

для выявления стереоструктурной организации тканей. Исследование образцов выполняли методом сканирующей электронной микроскопии и рентгеновского электронно-зондового микроанализа с использованием сканирующего электронного микроскопа «JSM-840» (JEOL, Япония) и системы для энергодисперсионного микроанализа «INCA Energy 200» (Oxford Instruments Analytical, Англия). В участках имплантации оценивали распределение и концентрацию химических элементов кальция, фосфора, магния, серы, никеля и титана. Количественные данные представлены в виде среднего значения и стандартной ошибки среднего ($M \pm m$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Течение послеоперационного периода соответствовало объему и тяжести травмы. Операционные раны заживали первичным натяжением. Кожа и подкожно-жировая клетчатка в области имплантаций легко смещались, гиперемии и других признаков воспаления отмечено не было.

Анализ результатов рентгенографического исследования показал отсутствие миграции образцов материалов из области имплантации на всем протяжении послеоперационного периода. На 60 сутки опыта рентгенографическая картина различалась в зависимости от вида имплантационного материала. К этому сроку у животных I серии имплантированные образцы МКМ имели размытые границы и определялись в виде гетерогенных теней слабой интенсивности (рис. 2 а). У животных III серии аналогичные фрагменты МКМ, армированные проволокой из TiNi, также слабо визуализировались, тени проволоки наблюдались отчётливо, в большинстве наблюдений петли разгибались (рис. 2 б).

Рисунок 2 – Рентгенограммы фрагментов МКМ при гетеротопической подкожной имплантации на 60 сутки у крыс: а – I, б – II, в – III, г – IV, д – V серии эксперимента

В то же время, у животных II серии фрагменты МКМ, пропитанные аллогенной плазмой крови с МАВ, имели более четкие контуры с выраженным трабекулярным рисунком (рис. 2 в). При дополнительном армировании указанных фрагментов МКМ

проволокой из TiNi (в виде петель или трехмерных конструкций, IV-V серии) отмечалось значительное увеличение интенсивности их теней (рис. 2 г, д).

При ортотопической имплантации трехмерных конструкций из TiNi с фрагментами МКМ, пропитанными аллогенной плазмой крови с МАВ (VI серия), наблюдалось равномерное заполнение области дефекта гетерогенными тенями, преимущественно высокой интенсивности (рис. 3 а). Область аналогичного дефекта контралатеральной конечности (без установки имплантата) к этому сроку эксперимента визуализировалась в виде участка округлой формы, заполненного гомогенными тенями слабой и средней интенсивности, не имеющими трабекулярной структуры. В одном наблюдении выявлен поперечный перелом плечевой кости в исследуемой области (рис. 3 б).

Рисунок 3 – Рентгенограммы области проксимального метафиза плечевой кости кроликов на 60 сутки эксперимента по ортотопической имплантации: а – заполнение дефекта имплантатом; б – патологический перелом в области дефекта без имплантации

При светооптическом микроскопическом исследовании оценивали местную реакцию тканей в области имплантации, биodeградируемость и остеоинтеграцию компонентов имплантационных материалов.

При гетеротопической подкожной имплантации на момент окончания эксперимента во всех случаях вокруг имплантатов формировалась фиксирующая капсула из рыхлой волокнистой соединительной ткани (рис. 4). Реакция клеточного воспаления не наблюдалась – практически отсутствовали лимфоциты, гранулоциты и элементы моноцитарно-макрофагального ряда.

У животных I серии соединительнотканная капсула была объемной, слабо васкуляризированной, с высокой плотностью фибробластоподобных клеток (рис. 4 а). Недостаток васкуляризации компенсировался большим количеством кистозных полостей. Костные трабекулы обнаруживались в виде небольших округлых фрагментов в отдельных полостях, окруженных соединительной тканью с концентрически ориентированными коллагеновыми волокнами. На поверхности трабекул сохранялись резорбционные лакуны, наблюдалось разрыхление и растрескивание костного матрикса (рис. 4 б).

У животных II серии соединительная капсула была менее объемной, хорошо васкуляризированной, с умеренной плотностью фибробластоподобных клеток. Промежутки между трабекулами имплантированного костного матрикса заполняла рыхлая волокнистая соединительная ткань аналогичного строения (рис. 4 в). Трабекулы имели сложную, близкую к нативной форму, их поверхность была ровной, без узур и трещин. Они располагались в полостях соединительной ткани в непосредственной близости от микрососудов капиллярного типа, заполненных эритроцитами (рис. 4 г).

Анализ результатов исследования образцов имплантационных материалов методом рентгеновского электронно-зондового микроанализа показал, что в минеральном составе МКМ преобладали кальций ($25,8 \pm 0,56\%$), фосфор ($11,0 \pm 0,43\%$),

сера ($0,2 \pm 0,01\%$), магний ($0,1 \pm 0,005\%$). Проволока «ТН-10» включала титан и никель в весовом соотношении 60% и 40% соответственно.

Рисунок 4 – Гистологическая структура тканей в области гетеротопической подкожной имплантации МКМ в I (а, б) и II (в, г) сериях эксперимента: а – объемное соединительнотканное образование с инкапсулированными фрагментами костного матрикса; б – фрагмент резорбированного костного матрикса в капсуле из бессосудистой соединительной ткани; в – тонкая соединительнотканная капсула с включенными фрагментами костного матрикса; г – фрагмент гомогенного костного матрикса в капсуле из васкуляризированной соединительной ткани; а, б – ув. 100; б, г – ув. 400. Парафиновые срезы. Окраска гематоксилином и эозином

Рисунок 5 – Osteoinductivity эквивалента губчатой костной ткани при его гетеротопической имплантации: а – новообразованная губчатая костная ткань (NFB), остеоид, остеобласты (Ob) на поверхности костной трабекулы импланта (электронная сканограмма, ув. 1200); б – взаиморасположение трабекул МКМ (красно-желто-белое окрашивание) и фрагментов проволоки TiNi (синее окрашивание) в области имплантации (совмещенные карты распределения в характеристическом рентгеновском излучении кальция и титана, ув. 43)

После 60 суток подкожной гетеротопической имплантации минерализация образцов МКМ претерпевала изменения: в I серии содержание Са в костном матриксе трабекул снижалось до $19 \pm 0,6\%$, тогда как во II серии снижение минерализации было менее выраженным и составляло $21 \pm 1,4\%$.

При электронно-микроскопическом исследовании области гетеротопической и ортотопической имплантации эквивалента губчатой костной ткани, включающего конструкции из проволоки TiNi, МКМ и композицию на основе аллоплазмы крови и МAB (IV-VI серии), наблюдали феномены остеиндукции и остеокондукции (рис. 5). На поверхности трабекул имплантированного костного матрикса формировалась грубоволокнистая костная ткань, включающая ядросодержащие костные клетки – остециты и остеобласты. Содержание Са в имплантированном МКМ составляло $23 \pm 1,5\%$, в различных участках матрикса новообразованной грубоволокнистой костной ткани – от 5% до 18%, в остеоиде 1-2% (рис. 5 а).

Профили фрагментов проволоки TiNi располагались в окружении межтрабекулярной соединительной ткани, реже – в непосредственном контакте с фрагментами имплантированного костного матрикса (рис. 5 б).

Остеокондуктивная связь новообразованной кости с элементами TiNi на данном сроке эксперимента не была выявлена. Однако клеточные и волокнистые элементы соединительной ткани фиксировались на микро-структурированной поверхности проволоки, обеспечивая ее тканевую интеграцию.

ОБСУЖДЕНИЕ

При необходимости восполнения обширных дефектов костной ткани широко используются методики трансплантации и имплантации. Ограничение потенциала регенерации кости при использовании большинства современных имплантационных материалов является стимулом для разработки новых усовершенствованных аналогов костной ткани с улучшенными характеристиками остеиндуктивности и остеоинтеграции [9, 29].

Имплантационные конструкции из никелида титана обладают биомеханическими свойствами, близкими к нативной костной ткани, и хорошей биосовместимостью – не являются цитотоксичными, не вызывают реакции отторжения и обеспечивают адгезию клеток реципиента [2, 6, 8, 14]. Специально обработанные костные алло- и ксенотрансплантаты традиционно используются в медицине. Однако их применение осложнено высоким риском отторжения, обусловленным реакцией на чужеродные органические соединения [7, 22].

В течение последних десяти лет в качестве доступного средства для стимуляции репаративных процессов рассматривается аутологичная плазма крови, обогащенная тромбоцитами. Интерес к ее применению обусловлен содержанием различных цитокинов (PDGF, TGF β 1- β 2, IGF1-2, VEGF), высвобождающихся после дегрануляции активированных тромбоцитов и обладающих хемотактическими, митогенными и ангиогенными свойствами. [23, 27]. Однако на сегодняшний день клиническая эффективность применения аутологичной плазмы крови в качестве монопрепарата для ускорения репаративного остеогенеза объективно не доказана и является предметом дальнейшего изучения. В ходе экспериментальных исследований установлено, что очаговое применение обогащенной тромбоцитами плазмы крови усиливает остеогенез в раннем посттравматическом периоде [28, 33], ангиогенез в области имплантации девитализированной аллокости [37], улучшает характеристики биосовместимости ксенокости [30], кальцийфосфатных материалов [21], биоситаллов [28], металлоимплантатов [32]. Вместе с этим, совместное введение плазмы не усиливает или снижает остеиндуктивность имплантационных материалов [26, 28, 30, 32].

Аскорбиновая кислота (витамин С) относится к незаменимым регуляторам метаболических процессов в соединительных тканях, способствующим репаративной регенерации и активизирующим заживление ран и переломов костей. За последние

годы выполнено значительное количество экспериментальных и клинических исследований, посвященных изучению различных аспектов биологической активности аскорбиновой кислоты в качестве препарата метаболического действия при лечении патологии опорно-двигательной системы.

В ходе экспериментальных исследований установлено, что очаговое введение аскорбиновой кислоты в отсутствие индукторов остеогенеза подавляет активность репаративного костеобразования. Так, однократное очаговое введение аскорбиновой кислоты (0,5 мг/кг) в область нарушенного соединения верхнечелюстных костей крыс через 24 часа после травмы предотвращает ее оссификацию [34]. Дозированное совместное введение равных объемов 5 % растворов аскорбиновой кислоты и глюкозы (1 мл/сутки) индуцирует формирование фиброзного сращения сопоставленных отломков суставной впадины [18]. Вместе с тем, растворимая и иммобилизованная в виде функциональных групп на пленочном полимерном носителе формы аскорбата синергически стимулируют пролиферацию и остеогенную дифференциацию мезенхимальных стволовых клеток *in vitro* [36]. Системное и локальное введение аскорбиновой кислоты в экспериментах *in vivo* синергично усиливает остеоиндуцирующий эффект анаболического гормона метандростенолона [24], морфогенетического протеина БМГ-2 [35], аутологичной плазмы крови [16, 17, 18].

Технология комбинирования перечисленных имплантационных материалов – упруго-волокнистого (конструкции из никелида титана) и нативно-структурированного минерализованного (фрагменты модифицированного костного матрикса) в сочетании с регуляторно-трофическим компонентом (аллоплазма и метаболически активные вещества – аскорбиновая кислота и глюкоза) позволила нам добиться синергичного улучшения биосовместимости, остеоиндуктивных и остеокондуктивных свойств по сравнению с их раздельным применением. Задачей дальнейших исследований является доклиническая апробация разработанного материала и внедрение его в клиническую практику.

Таким образом, тестирование биосовместимости комбинированного имплантационного материала – структурного и функционального аналога губчатой костной ткани, полученного путем сочетания объемных металлоконструкций из проволоки TiNi, ксеногенного минерализованного костного матрикса, аллогенной плазмы крови, препаратов аскорбиновой кислоты и глюкозы подтвердило отсутствие реакции клеточного воспаления и его тканевую интеграцию в области орто- и гетеротопической имплантации. Улучшение остеоиндуктивности и остеокондуктивности минерализованного костного матрикса в составе имплантационного материала, по всей видимости, является следствием синергичного взаимодействия его компонентов.

БИБЛИОГРАФИЯ

1. Гизатуллин Р.М. Применением наногеля гидроксиапатита кальция и пористого никелида титана для лечения деструктивных форм хронического периодонтита / Казанский медицинский журнал. - 2009. - Том 90, № 3. - С. 438-440.
2. Гюнтер В.Э. Направления создания и применения материалов и имплантов с памятью формы в травматологии и ортопедии // Повреждения и заболевания опорно-двигательного аппарата / Под ред. проф. В.Э. Гюнтера. - Томск: Изд-во МИЦ, 2005. - С. 3-6.
3. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей // Вопросы реконструктивной и пластической хирургии. - 2003. - № 4. - С. 34-36, продолж. там же. - 2004. - № 1. - С. 20-36, продолж. там же. - 2004. - № 2. - С. 29-31.
4. Ирьянов Ю.М. Сканирующая электронная микроскопия регенерата кости: Учебное пособие. - Курган. - 2012. - 16 с.
5. Ирьянов Ю.М. Остеопластическая эффективность минерализованного костного матрикса // Морфология. - 2013. - Том 143, № 1. - С. 63-68.

6. Ирьянов Ю.М., Чернов В.Ф., Радченко С.А., Чернов А.В. Пластическая эффективность различных имплантатов при замещении дефектов мягких и костных тканей // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2013. - Том 155, № 4. - С. 517-520.
7. Кирилова И.А., Садовой М.А., Подорожная В.Т. Сравнительная характеристика материалов для костной пластики: состав и свойства // Хирургия позвоночника. - 2012. - № 3. - С. 72-83.
8. Кобызов А.Е., Силантьева Т.А., Краснов В.В., Ирьянов Ю.М. Сравнительная оценка эффективности временной фиксации позвоночно-двигательного сегмента винтами и скобами из никелида титана в растущем организме // Хирургия позвоночника. - 2013. - № 2. - С. 62-67.
9. Корж Н.А., Кладченко Л.А., Малышкина С.В. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль оптимизации и стимуляции в реконструкции кости // Ортопед. травматол. - 2008. - № 4. - С. 5-14.
10. Корнюшенков Е.А., Голуб Л.В., Анисимова Н.Ю., Киселевский М.В., Глазов Н.А., Максимкин А.В., Кузнецова А.Л., Шимширт А.А., Митрушкин Д.Е., Мусаев Э.Р., Сушенцов Е.А. Новые пути решения проблемы замещения дефектов при обширной резекции у животных с опухолями костей // РВЖ. Мелкие домашние и дикие животные. - 2013. - №3. - С.12-16.
11. Лунева С.Н., Накоскин А.Н., Ковинька М.А. Способ получения и консервации минерализованного костного матрикса. Патент 2495567 РФ. 2013.
12. Попсуйшапка А.К., Литвишко В.А., Подгайская О.А. Сращение отломков после перелома кости // Международный медицинский журнал. - 2009. - № 1. - С. 73-80.
13. Приказ Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации»
14. Применение биологически и механически совместимых имплантатов из нитинола для хирургического лечения повреждений и заболеваний позвоночника / Е.А. Давыдов, А.Ю. Мушкин, И.В. Зуев, А.А. Ильин, М.Ю. Коллеров // Гений ортопедии. - 2010. - № 1. - С. 5-11.
15. Саркисов Д.С. Микроскопическая техника. / Под ред. Д.С. Саркисова и Ю.Л. Перова // М: Медицина. - 1996. - 544 с.
16. Силантьева Т.А., Краснов В.В. Влияние локального комплексного введения аутологичной плазмы крови, аскорбиновой кислоты и глюкозы на заживление переломов таза в эксперименте // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. - 2014. - № 1. - С. 45-51.
17. Силантьева Т.А., Краснов В.В. Стимуляция заживления переломов таза путем локального введения аутологичной плазмы крови в сочетании с метаболически активными веществами антиоксидантного и антигипоксанта действия // Вестник Российской академии медицинских наук. - 2014. - № 7-8. - С. 137-143.
18. Силантьева Т.А., Краснов В.В., Кирсанова А.Ю. Способ стимуляции репаративных процессов при лечении внутрисуставных переломов. Патент 2463986 РФ. 2012.
19. Талашова И.А., Силантьева Т.А. Качественный и количественный состав имплантационных кальцийфосфатных материалов // Успехи современного естествознания. - 2007. - № 11. - С. 5-9.
20. Хафизов Р.Г., Азизова Д.А., Миргазизов М.З., Фролова А.И., Цыплаков Д. Э., Гюнтер В. Э., Хафизов И. Р. Особенности восстановления сегментарного дефекта альвеолярной части нижней челюсти у собак // Ученые записки КГБВМ им. Н.Э. Баумана. - 2012. Т. 209. - № С.335-339.
21. Янушевич О.О., Никулина О.М., Докторов А.А., Рунова Г.С, Воложин А.И. Тромбоцитарно-обогащенная плазма крови в сочетании с «Гапколом» и Bio-Gen Putty для ускорения репаративной регенерации челюсти в эксперименте // Пародонтология. - 2008. - Том 47, №2. - С 10-14.
22. Ghanaati S., Barbeck M., Booms P., Lorenz J., Kirkpatrick C.J., Sader R.A. Potential lack of "standardized" processing techniques for production of allogeneic and

- xenogeneic bone blocks for application in humans // *Acta Biomater.* - 2014. - Vol.10, No 8. - P. 3557-3562.
23. Griffin X.L., Smith C.M., Costa M.L. The clinical use of platelet-rich plasma in the promotion of bone healing: a systematic review // *Injury.* - 2009. - Vol.40. - P. 158–162.
 24. Gupta L.P., Udupa K.N. Studies on the effect of combined therapy of anabolic hormone and ascorbic acid in the treatment of fractures // *Indian J. Med. Res.* - 1966. - Vol. 54, No 6. - P. 542-550.
 25. Intini G., Andreana S., Intini F.E., Buhite R.J., Bobek L.A. Calcium sulfate and platelet-rich plasma make a novel osteoinductive biomaterial for bone regeneration // *J. Transl. Med.* - 2007. - № 5. - P. 13.
 26. Lim H.P., Mercado-Pagan A.E., Yun K.D., Kang S.S., Choi T.H., Bishop J., Koh J.T., Maloney W., Lee K.M., Yang Y.P., Park S.W. The effect of rhBMP-2 and PRP delivery by biodegradable β -tricalcium phosphate scaffolds on new bone formation in a non-through rabbit cranial defect model // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 2013. - Vol. 24, No 8. - P. 1895-1903.
 27. Nguyen R.T., Borg-Stein J., McInnis K. Applications of Platelet-Rich Plasma in Musculoskeletal and Sports Medicine: An Evidence-Based Approach // *PM&R.* - 2011. - Vol. 3. - P. 226-250.
 28. Penteado L.A., Colombo C.E., Penteado R.A., Assis A.O., Gurgel B.C. Evaluation of bioactive glass and platelet-rich plasma for bone healing in rabbit calvarial defects // *J. Oral Sci.* - 2013. - Vol. 55, No 3. - P. 225-232.
 29. Peter M.J. Miller, A.W. Yasko, M.J. Yaszemski, A.G. Mikos, Polymer concepts in tissue engineering // *J. Biomed. Mater. Res.* - 1998. Vol. 43. - P. 422–427.
 30. Ranly D.M., Lohmann C.H., Andreacchio D., Boyan B.D., Schwartz Z. Platelet-rich plasma inhibits demineralized bone matrix-induced bone formation in nude mice // *J. Bone Joint Surg. Am.* - 2007. Vol. 89, No. 1. P. 139-147.
 31. Rodrigues M.T., Martins A., Dias I.R., Viegas C.A., Neves N.M., Gomes M.E., Reis R.L. Synergistic effect of scaffold composition and dynamic culturing environment in multilayered systems for bone tissue engineering // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* - 2012. - Vol. 6, No 10. - P. e24-30.
 32. Torres J., Tamimi F., Alkhraisat M.H., Manchón A., Linares R., Prados-Frutos J.C., Hernández G., López C.E. Platelet-rich plasma may prevent titanium-mesh exposure in alveolar ridge augmentation with anorganic bovine bone // *J. Clin. Periodontol.* - 2010. - Vol. 37, No 10. - P. 943-951.
 33. Torres J., Tresguerres I., Tamimi F., Clemente C., Niembro E., Blanco L. Influence of platelet-rich plasma on bone regeneration: a histomorphometric study in rabbit calvaria // *Int. J. Oral Maxillofac. Implants.* - 2007. - Vol. 22, No 4. - P. 563-568.
 34. Uysal T., Amasyali M., Olmez H., Enhos S., Karslioglu Y., Gunhan O. Effect of vitamin C on bone formation in the expanded inter-premaxillary suture. Early bone changes // *J. Orofac. Orthop.* 2011. - Vol. 72, No 4. - P. 290-300.
 35. Volk S.W., Diefenderfer D.L., Christopher S.A., Haskins M.E., Leboy P.S. Effects of osteogenic inducers on cultures of canine mesenchymal stem cells // *Am. J. Vet. Res.* - 2005. - Vol. 66, No 10. - P. 1729-1737.
 36. Wang Y., Singh A., Xu P., Pindrus M.A., Blasioli D.J., Kaplan D.L. Expansion and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells on a vitamin C functionalized polymer // *Biomaterials.* - 2006. - Vol. 27, No 17. - P. 3265-3273.
 37. Yokota K., Ishida O., Sunagawa T., Suzuki O., Nakamae A., Ochi M. Platelet-rich plasma accelerated surgical angiogenesis in vascular-implanted necrotic bone: an experimental study in rabbits // *Acta Orthop.* - 2008. - Vol. 79, No 1. - P. 106-110.