

Генез костной ткани на поверхности имплантатов для остеосинтеза

И.А. Хлусов, А.В. Карлов, И.В. Суходоло*

Bone tissue genesis on the surface of the implants for osteosynthesis

I.A. Khlousov, A.V. Karlov, I.V. Soukhodolo*

Центр ортопедии и медицинского материаловедения Томского научного центра СО РАМН,

*Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

Существуют два подхода к повышению остеointеграции имплантатов для остеосинтеза. Во-первых, постепенное приближение состава и структуры их поверхностного слоя к свойствам нативной кости с перспективой создания универсального имплантата. Однако в этом случае ухудшаются механические свойства и адгезия покрытий к титановой подложке, увеличивается цена изделий. Второй подход связан с технологической модификацией поверхности кальций фосфатных (КФ) покрытий, обладающих высоким сцеплением с титаном при недостаточной остеointеграции. В частности, макро- и микроструктурирование покрытий способствует прилипанию остеогенных клеток и их дифференцировке в костную ткань, зафиксированной в тесте подкожного костеобразования на мышах BALB/c и зависящей от физико-химических свойств поверхности имплантатов. Согласно вектору метаплазии костного мозга в костную ткань в тесте эктопического остеогенеза биоактивные покрытия располагались следующим образом: КФ рыхлое (анодно-искровое) > КФ стеклокерамическое > КФ плотное (анодно-искровое). Это может быть полезным для оптимизации биомедицинских и экономических параметров остеointеграции, создания панели имплантатов для конкретных клинических ситуаций.

Ключевые слова: кальций фосфатные покрытия, костный мозг, мыши, эктопическое костеобразование, гистология тканей.

There are two approaches to enhance osteointegration of the implants for osteosynthesis. First, gradual approximation of their surface layer's composition and structure to the properties of native bone with the outlook to design a universal implant. However, in this case both mechanical characteristic and adhesion of coatings to titanium base are getting worse, and production cost increases. Second approach is connected with technological modifying surface of calcium phosphate (CP) coatings which have high adhesion to titanium but insufficient osteointegration. In particular, macro- and micro structuring of the coatings promotes osteogenic cell adherence and their differentiation into bone tissue, that was marked in subcutaneous osteogenesis test on BALB/c mice and depended on physical-and-chemical properties of implant surface. According to vector of bone marrow metaplasia into bone tissue under ectopic osteogenesis test, bioactive coatings were placed as follows: CP friable (anode-spark) > CP glass ceramic > CP dense (anode-spark). This may be useful to optimize biomedical and economic parameters of osteointegration, to design implant panels for specific clinical situations.

Keywords: calcium phosphate coatings, bone marrow, mice, ectopic osteogenesis, tissue histology.

ВВЕДЕНИЕ

Эффективность вставления имплантатов в кость зависит от ряда факторов, среди которых выделяют четыре основных: состояние кости реципиента, условия механической стабилизации, структура и свойства самого имплантируемого протеза и сопутствующее лечение [1]. По мнению ряда авторов, граница кость/имплантат считается самым слабым звеном внешней фиксации. Отсутствие стабильности в этой области может привести к расшатыванию стержня, возникновению инфекции и повлиять на результаты лечения [2-5]. Этого можно избежать, если поверхность погружных элементов – спиц, стержней, пластин и т.д. – будет подобна структуре кости. В таком случае можно будет достичь су-

перпозиции физико-химического и биологического взаимодействия кости и искусственного материала, приводящего к формированию апатитового или аналогичного слоя вокруг имплантата и его интеграции с костной тканью [6-8]. Одним из предпочтительных способов повышения биосовместимости металлических имплантируемых изделий является формирование на их поверхности кальций фосфатных (КФ) покрытий [9-12].

Остеогенные свойства кальций фосфатных материалов (КФМ) убедительно доказаны феноменом эктопического костеобразования, когда на поверхности КФМ при их подкожном или внутримышечном введении формируются костные структуры [13-15]. Одним из первых описал

данный феномен Urist [16]. Однако каким образом КФ действительно участвуют в процессах остеоинтеграции – остается непонятным [17, 18]. Анализ литературы позволяет заключить, что для реализации этого феномена необходимо несколько обязательных условий [18-20]: 1) источник остеогенных клеток-предшественников; 2) оптимальная концентрация специфического регулятора(ов) (например, морфогенетического белка кости); 3) наличие специфического костного микроокружения.

Помимо этого различные образцы фосфатов кальция, в зависимости от физико-химических свойств (степень кристалличности и пористости, растворимость, шероховатость поверхности и т.д.), обладают разной способностью поддержи-

вать костеобразование в системах *in vitro* и *in vivo* [9, 14, 18, 21-23]. Несмотря на огромное количество исследований, посвященных поиску оптимальных характеристик имплантатов для ортопедии и травматологии, до сих пор не удалось найти ключевое сочетание их биосовместимости и функциональности [24, 25]. Тем более это относится к имплантатам для чрескостного остеосинтеза, при котором успех остеоинтеграции определяется процессами, протекающими как на границе раздела *покрытие/костная ткань*, так и *покрытие/металлическая подложка*.

В связи с этим изучение особенностей гистогенеза на изделиях для остеосинтеза с различными параметрами поверхности представляло несомненную актуальность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Адекватным экспериментальным подходом для определения возможных остеогенных свойств КФМ является вариант феномена эктопического костеобразования, когда искусственный образец имплантируется под кожу или внутримышечно без использования ростовых факторов [13, 14]. Так, Yang с соавт. [15] при имплантации пористых КФ наблюдал эктопический остеогенез у собак, свиней, но не у коз, крыс или кроликов. Аналогичные данные на собаках получили другие исследователи [14, 26]. Другие исследователи, напротив, фиксировали остеоиндукцию при внутримышечной или подкожной имплантации КФ кроликам и мышам [13, 27].

В наших экспериментах использовались мыши линии BALB/c. Животным под эфирным наркозом разрезали кожу живота и подкожно вводили имплантат с предварительно нанесенным в асептических условиях столбиком сингенного костного мозга (по 1 гибриднему имплантату на мышь). Через 1,5 месяца имплантаты извлекали, фотографировали (рис.1) в отраженном свете с фиксированными параметрами. Проводили количественную морфометрию цифровых изображений до и после имплантации посредством программы Photoshop 5.0. Для проведения гистологического анализа применяли стандартные методы световой микроскопии тонких срезов. После декальцинации тканевых пластинок, выросших на имплантатах (рис. 1), осуществляли обычную окраску гематоксилином-эозином парафиновых срезов, выполненных параллельно поверхности дисков.

В качестве исследуемых образцов применяли диски из титана марки ВТ-6 (диаметр 12 мм, толщина до 1 мм). На некоторых из них формировали линейный либо сетчатый макрорельеф посредством 22-24 регулярных бороздок глубиной 150 мкм. В последующем на поверхность имплантатов (по 5 на группу) наносили один из

следующих типов двусторонних биосовместимых покрытий: 1) биоинертное (металлокерамическое) покрытие (МК), нанесенное анодно-искровым способом в 10% растворе фосфорной кислоты; 2) биоактивное кальций фосфатное плотное (КФП) покрытие, нанесенное анодно-искровым способом в растворе 10% фосфорной кислоты и гидроксилатапата (размер пор 5-10 мкм); 3) биоактивное кальций фосфатное рыхлое (КФР) покрытие, нанесенное анодно-искровым способом в растворе 10% фосфорной кислоты и гидроксилатапата (размер пор 10-20 мкм); 4) биоактивное кальций фосфатное стеклокерамическое (КФС) покрытие, нанесенное по шликерной технологии и отожженное при 600° С (размер пор до 600 мкм).

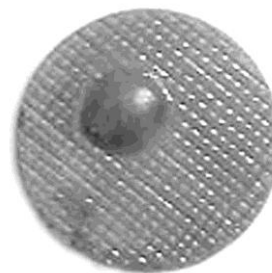


Рис. 1. Тканевая пластинка, сформировавшаяся при подкожной имплантации биоактивного диска с предварительно нанесенными клетками костного мозга мышей

Химические и структурные свойства изделий изучали с применением дифракции рентгеновских лучей, микрорентгеноспектрального анализа (МРСА) и растровой электронной микроскопии (РЭМ). Адгезионную прочность покрытий измеряли методом нормального отрыва на стандартной разрывной машине для испытания пластмасс Р-50 с применением цианакрилата (Henkel) в качестве клеевой основы.

Статистическую обработку результатов осуществляли согласно непараметрическому U-критерию Вилкоксона-Манна-Уитни (U).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

РЭМ выявила качественные различия в морфологии поверхности биоинертных и биоактивных имплантатов. Металлокерамическая поверхность черного цвета с равномерно расположенными микропорами, оплавленная, без наличия ярко выраженных кратеров с острыми краями. КФП покрытие имеет поверхность серого цвета, некоторую шероховатость которой придают сферолиты с порами неправильной формы разного размера, похожие на “кратеры”. Кратеры расположены хаотично, отделены трещинами около основания, часто сливаются и наслаиваются друг на друга. Однако сравнение КФП поверхности с КФР покрытием, также полученным с помощью анодного оксидирования, демонстрирует у последнего при одинаковом увеличении более развитую структуру поверхности. Так, если характерный размер сферолитов для КФП покрытия составляет 4,9 мкм ($n=20$), то для КФР поверхности – 34 мкм. Значительно возрастает и размер пор (табл. 1).

РЭМ неподготовленной поверхности КФС покрытий не несет смысловой нагрузки вследствие ее макрорельефности. В то же время электронное сканирование поперечного среза позволяет различить трехслойную структуру биоактивных имплантатов: титан – переходный (барьерный) слой оксида титана (толщина около 20 мкм) – собственно КФС покрытие. Кальций фосфатный слой состоит из зерен кристаллического гидроксилапатита, разделенных прослойками рентгеноаморфных кальций-фосфатов, формирующих капилляры, а также микропористость на поверхности покрытия. Размер макропор сопоставим с размерами зерен, формирующих покрытие (табл. 1).

Рентгеноструктурный анализ (рентгеновская дифрактометрия) и МРСА демонстрируют существенное влияние технологии формирования покрытий на их химический состав. Основными элементами в составе покрытий (содержание 1 атомный % и более) являются титан (Ti), фосфор (P) и кальций (Ca) в различных соотношениях (табл. 1). При этом биоинертные покрытия, сформированные анодно-искровым способом в слабом растворе фосфорной кислоты, практически не содержат кальций. Добавление в раствор суспензии гидроксилапатита при нанесении на титан биоактивных слоев электрохимическим (анодно-искровым) способом резко повышает уровень кальция и соотношение кальций/фосфор. При этом в составе покрытий увеличивается содержание комплексных соединений титана и фосфора, появляются фазы кальция титанат, кальция титанофосфат и кальция фосфат. Другими словами, образуется переходный слой между титановой подложкой и собственно кальций

фосфатным поверхностным слоем.

Согласно рентгенофазовому анализу покрытия, полученные анодно-искровым способом (МК, КФП и КФР), находятся в рентгеноаморфном (квазиаморфном) состоянии. В то же время просвечивающая электронная микроскопия, позволяющая установить микродефрацию, показала субмикроструктурную структуру (размер зерен в среднем 460 нм, $n=200$) кальций фосфатных анодно-искровых покрытий.

КФС покрытие, полученное шликерным методом в суспензии гидроксилапатита и биостекла с последующим отжигом, характеризуется максимальным содержанием кальция (табл. 1). Полное отсутствие титана в составе поверхностного слоя обусловлено, скорее всего, значительной толщиной покрытия (порядка 200 мкм). При этом его фазовый состав и кристаллическая структура (табл. 1) близки к кальций фосфатам костной ткани, обладающим существенной биологической активностью.

Полученные данные позволяют говорить о качественном скачке химических свойств биоактивных имплантатов по сравнению с биоинертными изделиями. Реализация и увеличение биоактивности их поверхностного слоя обусловлены появлением и повышением в его составе уровня кальция, возрастанием соотношения кальций/фосфор, формированием комплексных соединений кальция, фосфора и титана (переходный слой), возникновением кальций фосфатных соединений, близких по структуре и биологическим свойствам к естественным минералам костной ткани.

Исследование реакции тканей показало (табл. 2), что через 1,5 месяца после подкожной имплантации изучаемых изделий не отмечалось признаков воспалительной реакции ни в одной из групп наблюдения. По силе сцепления со слизистой оболочкой, оцененной в баллах, покрытия титановых имплантатов располагались в следующем порядке: МК гладкое < МК текстурированное = КФП гладкое < КФП текстурированное = КФР = КФС. Таким образом, наличие биоактивного кальций фосфатного слоя повышало срастание имплантатов по сравнению с биоинертной металлокерамикой. Механическое текстурирование еще более усиливало интенсивность процесса. Кроме того, оно достоверно увеличивало и толщину капсулы, образующейся вокруг имплантированного изделия (табл. 2), что свидетельствует об активации фибробластов. Тем не менее следует отметить в целом высокую биосовместимость имплантатов, вызывающих только слабую инкапсуляцию, говорящую о незначительном раздражении соединительной ткани на их введение.

Вероятность образования миелокариоцитами тканевой макроструктуры на покрытиях биоинертных и биоактивных дисков после их подкожной имплантации распределялась следующим образом (табл. 3): МК гладкое = МК текстурированное < КФП гладкое < КФП текстурированное < КФР = КФС. При этом как гладкие, так и механически текстурированные (линейные и сетчатые) МК имплантаты не адгезировали количество клеток костного мозга, достаточное для роста тканевой макроструктуры. Другими словами, для развития феномена необходимо присутствие в покрытии достаточного

количества ионов фосфора и кальция, составляющих основную часть неорганического матрикса кости.

Тем не менее присутствие ионов кальция и фосфора является необходимым, но не достаточным условием успешного эктопического тканеобразования на поверхности изделий. Так, эффективность формирования ткани на гладком КФП слое составляла 40 %. Механическое макротекстурирование (как линейное, так и сетчатое) КФП покрытий повышало вероятность развития тканевой пластинки на 20 % (табл. 3).

Таблица 1

Параметры поверхности биоинертных и биоактивных имплантатов, сформированных с применением различных технологий

Имплантат	Покрытие	Основной фазовый состав покрытия	Основной элементный состав покрытия, атомные %	Соотношение кальций/фосфор	Размер пор, мкм
Биоинертный	Металло-керамическое оксидное	оксиды титана (анатаз, рутил), небольшое количество титанофосфата $Ti_4P_6O_{23}$	Ti – 82,08 P – 16,83 Ca – 0,93	0,055	1,0±0,1 n=40
Биоактивный	Кальций фосфатное плотное	оксифосфат титана $(TiO)_2P_2O_7$, фосфат титана $Ti_4P_6O_{23}$, кальция титанат $CaTi_4O_9$, кальция титанофосфат $CaTi_4(PO_4)_6$, кальция фосфат CaP_4O_{11}	Ti – 65,16 P – 27,64 Ca – 7,03	0,254	5,5±1,0* n=40
Биоактивный	Кальций фосфатное рыхлое	кальция титанофосфат $CaTi_4(PO_4)_6$, небольшое количество фосфата титана TiP_2O_7 , фосфата кальция $Ca_2P_2O_7$, трикальций фосфата $Ca_3(PO_4)_2$, оксида титана	Ti – 40,90 P – 40,20 Ca – 18,39	0,457	21±4* n=40
Биоактивный	Кальций фосфатное стекло-керамическое	гидроксилпатит $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, трикальций фосфат $Ca_3(PO_4)_2$	Ti – 0 P – 36,05 Ca – 61,95 Si – 1,32	1,72	211±15* n=40

Таблица 2

Состояние подкожной слизистой оболочки (в баллах) у мышей линии BALB/c через 45 дней после имплантации биоинертных и биоактивных дисков

Покрытие	Воспаление	Нагноение	Сцепление со слизистой кожи	Инкапсуляция имплантата
Металлокерамическое гладкое	0	0	1	-
Металлокерамическое текстурированное	0	0	2	1,0 n=5
Кальций фосфатное плотное, гладкое	0	0	2	0,8* n=5
Кальций фосфатное плотное, текстурированное	0	0	3	1,33 n=9
Кальций фосфатное рыхлое	0	0	3	0,63* n=8
Кальций фосфатное стеклокерамическое	0	0	3	-

Примечание: 0 - отсутствие реакции, 1 - слабая реакция, 2 - умеренная реакция, 3 - выраженная реакция на имплантат. * - достоверные ($P < 0,05$) различия с КФП текстурированным покрытием согласно U-критерию Вилкоксона-Манна-Уитни.

Таблица 3

Вероятность формирования тканевых пластинок из столбика костного мозга на различных покрытиях титановых имплантатов в тесте эктопического костеобразования, X

Покрытие (n=5)	Вероятность, %
Металлокерамическое гладкое	0
Металлокерамическое, текстурированное линиями	0
Металлокерамическое, текстурированное в виде сетки	0
Кальций фосфатное плотное гладкое	40
Кальций фосфатное плотное, текстурированное линиями	60
Кальций фосфатное плотное, текстурированное в виде сетки	60
Кальций фосфатное рыхлое	80*
Кальций фосфатное стеклокерамическое	80*

Примечание: *) – отмечены достоверные ($P < 0,05$) различия с МК покрытием согласно U-критерию Вилкоксона-Манна-Уитни.

Одним из механизмов повышенной адгезии миелокариоцитов к кальций фосфатным покрытиям после структурирования их поверхности может быть примерно 50%-ное увеличение площади контакта с клетками. Кроме того, в бороздках формируются пространства, по своим размерам соответствующие остеону, способствующие направленному движению жидкостей и характеризующиеся максимальным приростом толщины кальций фосфатного слоя (до 50 мкм). По-видимому, подобные ниши создают оптимальные условия для формирования микроокружения, необходимого для адгезии и роста клеток.

С другой стороны, формирование микро-рельефа (шероховатости) кальций фосфатной поверхности на КФР покрытиях повышало эффективность тканеобразования до уровня КФС покрытий (80 %), состав и рельеф которых среди использованных имплантатов наиболее приближался к минеральной части костного матрикса.

Итак, как биоинертные, так и биоактивные имплантаты обладают высокой совместимостью с мягкими тканями организма и не вызывают активных воспалительных и компенсаторных пролиферативных реакций со стороны соединительной ткани подкожной слизистой оболочки. Для прочной адгезии костного мозга, образующего тканевые макроструктуры на поверхности имплантатов в тесте эктопического костеобразования, требуется присутствие в покрытии ионов фосфора и кальция. Формирование на изделиях макро- (регулярное структурирование КФП покрытий) и микрорельефа (нерегулярной шероховатости КФР покрытий) кальций фосфатной поверхности значительно повышает сцепление с мягкими тканями, а также эффективность образования тканевой пластинки до уровня КФС слоя, структурно наиболее близкого к минеральному матриксу кости.

Изучение окрашенных срезов тканевых пластинок, выросших из столбика костного мозга на биоактивных имплантатах в тесте подкожного костеобразования, позволило установить зависимость дифференцировки миелокариоцитов от состава и структуры различных видов кальций фосфатных покрытий. На различных препаратах были выявлены костный мозг, собственно соединительная ткань (рыхлая и плотная), скелетная (костная грубоволокнистая и пластинчатая) ткань.

На КФП слое определялись кальцифицированные, инкапсулированные участки красного костного мозга, включающего бластные клетки различных гемопоэтических ростков и большое количество мегакариоцитов (рис. 2). Стромальные элементы паренхимы были представлены капиллярами, заполненными эритроцитами. На некоторых образцах участки рыхлой неоформ-

ленной соединительной ткани перемежались с продольно ориентированными фиброзными тяжами. По периферии отмечалось уплотнение фибриллярных элементов (коллагеновых волокон), формирующих капсулу. Между волокнами выявлялись фиброциты и фибробласты обычного вида (рис. 3).

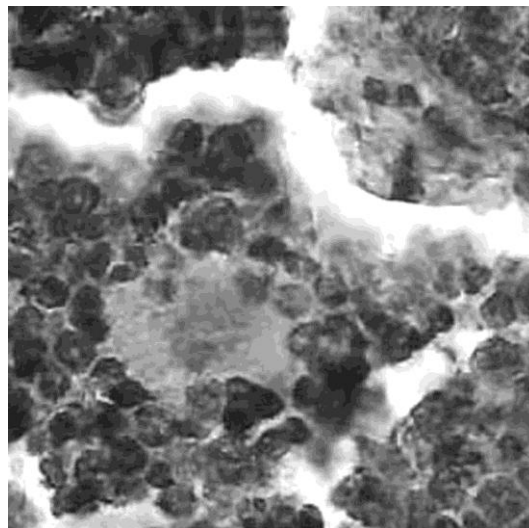


Рис. 2. Морфологическая структура тканевых пластинок, выросших на кальций-фосфатных плотных поверхностях дисков, имплантированных под кожу мышей. Обнаруживаются бластные клетки различных гемопоэтических ростков и мегакариоциты. Окраска гематоксилином – эозином. Увеличение 400

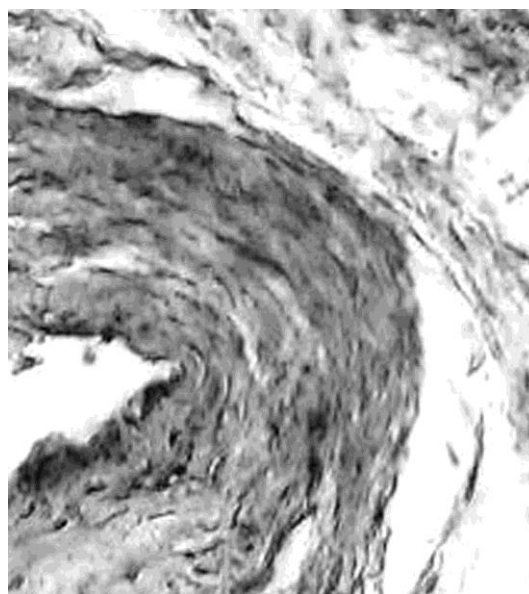


Рис. 3. Морфологическая структура тканевых пластинок, выросших на кальций фосфатных плотных поверхностях дисков, имплантированных под кожу мышей. Определяются участки рыхлой, неоформленной соединительной и фиброзной тканей. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение 400

Ткань, растущая на КФР покрытии (рис. 4), характеризовалась на срезах разреженными участками красного костного мозга, представленного как стромальными, так и паренхиматозными клетками. Определялись разнообразной ве-

личины и формы участки оссеоидной ткани, образующие как отдельные островки, так и ячейки, в которых располагается костный мозг. Основное вещество оссеоидной ткани окрашивалось гомогенно, главным образом оксифильно с небольшими фрагментами базофилии. Наблюдалась отчетливая "слоистость" основного вещества ткани, определяемая ходом правильно ориентированных, строго упорядоченных оссеиновых (коллагеновых) волокон и расположенных вдоль них клеток. Костные клетки располагались более или менее регулярно, имели отростчатую или округлую форму с овальными либо уплощенными ядрами. Внутри оссеоидной ткани отмечались признаки неоваскулегенеза и уже сформированные, немногочисленные кровеносные сосуды.



Рис. 4. Морфологическая структура тканевых пластинок, выросших на кальций фосфатных рыхлых поверхностях дисков, имплантированных под кожу мышей. Определяются участки оссеоидной ткани, образующие как отдельные островки, так и ячейки, в которых располагается костный мозг. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение 400

Дифференцировка костномозговых клеток на поверхности КФС покрытий зависела от параметров их макрорельефа (табл. 4). Поры неправильной овальной формы располагались на дисках в количестве 2-5 на 1 мм^2 поверхности и занимали в целом от 17 до 35 % площади диска. Средний линейный размер и площадь пор, измеренные с помощью средств компьютерной морфометрии, варьировали в пределах 147-368 мкм и $0,017-0,126 \text{ мм}^2$ соответственно. Вследствие неправильной конфигурации пор был произведен перерасчет их диаметра исходя из измеренной площади. Для круглых пор гипотетический линейный размер составлял бы около 150-400 мкм (табл. 4).

Максимальная площадь выросшей из костного мозга тканевой пластинки ($22,5 \text{ мм}^2$) отмечалась при диаметре пор около 300-350 мкм. При этом показатель увеличивался пропорционально возрастанию поверхностной пористости диска (табл. 4).

Фотометрия показала, что структура тканей, формирующихся на биоактивных дисках, зависит от числа пор на поверхности диска. Так, тканевые пластинки активно поглощали видимый свет при 2,5-3,5 и более 5-ти пор/ мм^2 . В интервале 3,5-4,5 пор/ мм^2 , имеющих гипотетический диаметр 300-350 мкм (реальный размер 270-320 мкм), коэффициент поглощения и оптическая плотность тканей снижались более чем в 1,5-2,5 раза соответственно (табл. 4).

При оптимальной пористости на продольных срезах выросших тканевых пластинок (рис. 5) определялись яркие, оксифильные участки ("островки") волокнистых образований неправильной формы. В каждом из них наблюдался по крайней мере один кровеносный капилляр, заполненный эритроцитами. Между беспорядочно ориентированными оссеиновыми волокнами располагаются отростчатые клетки, похожие на остециты грубоволокнистой костной ткани. По периферии "островков" наблюдались клетки, располагающиеся в один ряд и напоминающие остеобласты.



Рис. 5. Морфологическая структура тканевых пластинок, выросших на кальций фосфатных стеклокерамических поверхностях дисков с оптимальной пористостью, имплантированных под кожу мышей. Определяются ярко-оксифильные участки ("островки") волокнистых образований неправильной формы. В каждом из них наблюдался по крайней мере один кровеносный капилляр, заполненный эритроцитами. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение 400

В остальных случаях (поры размером менее 250 и более 350 мкм, число пор 2,5-3,5 и более 5-ти на 1 мм^2) оптические характеристики пластинок выражали преимущественный рост рыхлой неоформленной соединительной и жировой

тканей (рис. 6), перемежающихся с продольно ориентированными тяжами фиброзной ткани толщиной около 80 мкм. Фиброзная ткань состояла из коллагеновых волокон, фибробластов, фиброцитов, включала кровеносные сосуды. В периферических отделах определялись сгущения клеток, напоминающих остеобласты и формирующих ряды, прилегающие к фиброзным пучкам. При линейном размере пор менее 150 мкм формирование миелокариоцитами тканевых пластинок не наблюдалось (табл. 4).

Тканевые пластинки КФС покрытий характеризовались уплотнением структуры, появлением костных клеток (остеобластов), развитием грубоволокнистой костной ткани при оптимальном размере пор поверхностного слоя. Оптимальными параметрами макрорельефа (пористости) кальций фосфатных (биоактивных) поверхностей для роста и продвижения (кондукции) костной ткани можно считать диаметр пор порядка 250-350 мкм при их числе около 3,5-4,5 на 1 мм² и площади поверхностной пористости около 35%.

Согласно вектору метаплазии костного мозга в костную ткань в тесте эктопического остеогенеза биоактивные покрытия располагались следующим образом: КФР > КФС > КФП.

неза биоактивные покрытия располагались следующим образом: КФР > КФС > КФП.



Рис. 6. Морфологическая структура тканевых пластинок, выросших на кальций фосфатных стеклокерамических поверхностях дисков, имплантированных под кожу мышей. Определяются участки жировой ткани. Окраска гематоксилином-эозином. Увеличение 400

Таблица 4

Зависимость показателей роста тканевых пластинок от макрорельефа поверхности кальций фосфатных имплантатов, X±m

Расчетный диаметр пор, мкм	Средний измеренный размер пор, мкм	Средняя площадь поры, мм ²	Число пор на 1 мм ² поверхности диска	Площадь пористой поверхности, %	Площадь тканевой пластинки, мм ²	Коэффициент поглощения ткани, у.е.о.п.	Оптическая плотность, у.е.о.п.
150	147±14 n=12	0,017±0,004 n=10	—	—	0 n=3	0	0
250	249±20 n=45	0,055±0,011 n=29	4,14±0,28 n=9	17,41±1,21 n=9	10,26±0,14 n=3	1,835±0,027 n=9	24,30±1,02 n=9
300-350	213±11 n=14	0,072±0,004 n=10	5,32±0,44 n=6	25,05±2,35 n=5	10,32±1,13 n=10	2,529±0,010 n=10	17,75±0,15 n=10
	320±36 n=47	0,079±0,010 n=31	3,50±0,45 n=8	19,79±1,22 n=8	7,56±0,32 n=4	1,591±0,032 n=23	13,11±0,71 n=23
	246±11 n=12	0,098 ± 0,019 n=8	3,23±0,39 n=7	31,79±3,94 n=7	13,92±1,59 n=5	2,289±0,018 n=5	17,30±0,29 n=5
	274±13 n=15	0,109±0,011 n=10	4,19±0,51 n=5	35,21±4,17 n=4	22,50±1,73 n=9	1,720±0,004 n=8	14,42±0,12 n=8
350-400	351±23 n=43	0,119±0,014 n=25	2,82±0,19 n=8	32,63±3,02 n=8	15,32±0,20 n=5	2,274±0,040 n=12	38,17±2,07 n=12
	368±29 n=44	0,126±0,010 n=26	2,88±0,06 n=6	28,09±1,32 n=6	12,26±0,59 n=3	2,035±0,037 n=29	33,33±1,31 n=29

ОБСУЖДЕНИЕ

Различные технологии модификации поверхности имплантатов позволяют формировать панель изделий для ортопедии и травматологии, имеющих покрытия с индивидуальными параметрами рельефа и химического состава. По степени приближения к структурным характеристикам губчатой кости исследуемые покрытия располагаются в следующем порядке: КФС > КФР > КФП > МК (табл. 1). С нашей точки зрения, физико-химические свойства поверхности имплантатов в значительной мере могут определять их биологическую активность.

Согласно современным представлениям, процессы пролиферации и дифференцировки родоначальных клеток любой ткани находятся под контролем специфических факторов, имеющих белковое происхождение. Так, для стромальной ткани идентифицировано семейство факторов роста фибробластов и трансформирующих факторов роста, для лейкоцитов – гранулоцито-макрофагальный, гранулоцитарный и макрофагальный колониестимулирующий факторы, для эпителия – эпидермальный фактор роста, для красного ростка крови – эритропо-

этин. Костная ткань, имеющая мезодермальное происхождение, также имеет специфический индуктор, получивший название морфогенетический белок кости (МБК). В настоящее время наибольшее значение для образования костной ткани придается белкам типа МБК-1, 2, 4, 6 [28].

МБК обладают не только способностью стимулировать процессы пролиферации и дифференцировки остеогенных прекурсоров, но и оказывают влияние на морфологически дифференцированные клетки (остеобласты и остециты), стимулируя их созревание и функциональную активность. Кроме того, оказалось, что экзогенное введение МБК самостоятельно или на различных носителях, способствует эктопическому костеобразованию [29, 30]. Данный процесс получил название прямой остеиндукции [31].

Несмотря на сведения о том, что только МБК обладают способностью к прямой остеиндукции, неоднократно был описан феномен эктопического образования костной ткани на КФМ. Так, в эксперименте на животных было показано, что введение пористых фосфатов кальция в мягкие ткани без клеток костного мозга и вспомогательных ростовых факторов приводит к появлению на их поверхности вновь образованной костной ткани [13, 14, 32].

Наилучший эффект был отмечен при имплантации КФМ под кожу или внутримышечно. Одними из первых описали данный феномен Urist [16] и его коллеги. Авторы не смогли убедительно объяснить его. Дальнейший акцент работ данных исследователей был смещен в сторону идентификации МБК [33]. Тем не менее они активно использовали КФМ для выделения МБК и отметили их высокую способность связывать белки [34].

Способность фосфатов кальция, в большей степени гидроксиапатита (ГА) и трикальций фосфата (ТКФ), специфически адсорбировать на своей поверхности МБК легла в основу гипотезы об их опосредованной (непрямой) остеиндукции [29, 35].

Иными словами, гипотеза об опосредованной остеиндукции подразумевает то, что КФМ через каскадоподобный механизм перекодируют заключенную в них морфообразующую информацию в доступную для циркулирующих остеогенных прекурсоров форму. Как уже было сказано, это многостадийный процесс, в котором ключевую роль, вероятно, играет первый этап, при котором КФМ взаимодействуют с определенными белками и форменными элементами крови. Обычно эту фазу при введении любых имплантатов связывают с развитием воспалительного процесса [36]. Однако исход стандартной воспалительной ткани, как правило, заканчивается образованием рубцовой ткани. При введении КФМ этого не происходит, а процесс

фиброза трансформируется в остеогенез. Следовательно, КФМ уже на самых ранних стадиях после имплантации закладывают основы для последующей интеграции с костной тканью.

Действительно, как биоинертные, так и биоактивные (кальций фосфатные) имплантаты обладали высокой совместимостью с мягкими тканями организма и не вызывали активных воспалительных и компенсаторных пролиферативных реакций со стороны соединительной ткани подкожной слизистой оболочки (табл. 2).

В конечном счете результатом первого этапа взаимодействия КФМ с биомолекулами и клетками-мишенями является образование структурно-функционального комплекса, закладывающего фундамент (специфическое микроокружение) для остеointegrации материала и последующего построения костной ткани. В дальнейшем было подтверждено, что бифазная КФ керамика (ГА/ТКФ) обладает способностью к остеиндукции. При этом были сформулированы два узловых момента, согласно которым абсорбция МБК происходит за счет микропористости КФМ, а макропористость необходима для роста и продвижения костной ткани. Соотношение кальция и фосфора между 1,50 и 1,67 способствует образованию коллагеновых волокон, содержащих карбонатные, натриевые и фторидные ионы [20].

Адгезия клеток является одним из первых этапов остеointegrации имплантатов [37]. При этом текстурирование поверхности позволяет управлять расположением миеокариоцитов [38]. Однако как гладкие, так и механически текстурированные (линейные и сетчатые) МК имплантаты не адгезировали количества клеток, достаточных для роста тканевой макроструктуры в тесте эктопического костеобразования (табл. 3). Для прочного прилипания костного мозга, предварительно нанесенного на диски и образующего тканевые макроструктуры на поверхности имплантатов, требуется присутствие в покрытии ионов фосфора и кальция. Другими словами, МК покрытия действительно биоинертны.

Однако присутствие ионов кальция и фосфора является необходимым, но не достаточным условием успешного прилипания клеток к поверхности изделий. Так, эффективность образования тканевой пластинки на гладком КФП слое составляла 40%. В то же время механическое текстурирование (как линейное, так и сетчатое) КФП покрытий повышало вероятность образования тканевой пластинки на 20% при площади формирующейся ткани от 3,2 до 13,5 мм².

После установления факта прямого влияния поверхности КФМ на индукцию костной ткани поиски ученых были сосредоточены на определении их физико-химических свойств, оптимальных для остеогенеза. При этом гистологические исследования проводились при введении

материалов как в кость, так и в мягкие ткани. Так, N. Taganobu с соавт. [21] при имплантации керамики на основе гидроксиапатита в большеберцовую кость кролика на срок до 4 недель показали зависимость ее биомедицинских свойств от технологии получения ГА. Оказалось, что: 1) ГА со стехиометричным молярным отношением $\text{Ca/P}=1,67$ обладает повышенной остеоиндуцирующей активностью; 2) снижение содержания магния в материале повышает биосовместимость; 3) увеличение скорости растворения керамики в организме повышает остеоиндуцирующую активность и снижает биосовместимость биоматериала; 4) остеоиндуцирующая активность максимальна у керамик с нерегулярным размером пор и шероховатой поверхностью.

Активное влияние шероховатости поверхности на остеоиндуктивные свойства описано, в частности, H. Yuan с соавт. [39]. Образцы ГА керамики были имплантированы в спинные мышцы собак. Одни имплантаты были изготовлены из макропористой керамики с шероховатыми стенками пор, другие – с гладкими стенками макропор, выполненные из регулярно расположенных кристаллических гранул. Остальные параметры изделий (химическая и кристаллическая структура) совпадали. Гистологически и микрорентгенографически были обнаружены различные тканевые реакции на имплантаты через 3 и 6 мес. эксперимента. В случае шероховатой керамики образование кости отмечалось к 3 месяцам и увеличивалось к 6 мес. При имплантации “гладких” образцов рост кости не обнаруживался.

Действительно, и в наших исследованиях усиление шероховатости (микрорельефа) поверхности на КФР покрытиях повышает эффективность тканеобразования до уровня КФС покрытий (80%) (табл.3), состав и рельеф которых среди использованных имплантатов наиболее приближался к минеральной части костного матрикса.

Размер пор (макрорельеф) также оказывает существенное влияние на способность КФ к остеointegrации и остеоиндукции [23]. Однако, существуют разноречивые данные, что, по мнению S. Klein с соавт. [14], зависит от способа получения изделия. Некоторые авторы устанавливают широкие пределы оптимальных с точки зрения биомеханики имплантата и его биосовместимости размеров пор от 50 до 400 мкм [40] и даже от 100 до 800 мкм [41]. По другим данным, наиболее быстро кость вырастает в порах с диаметром 240-480 мкм [42] либо в узком диапазоне, близком к 565 мкм [43].

Наши исследования также показали, что макрорельеф имплантируемого изделия имеет значение для взаимодействия с окружающими тканями, экспансии клеток, формирования но-

вой функциональной системы имплантат/ткань и, таким образом, увеличения силы его фиксации. Оптимальными параметрами пористости кальций фосфатных (биоактивных) поверхностей для роста и продвижения (кондукции) костной ткани, формирующейся из костномозговых клеток, можно считать диаметр пор порядка 250-350 мкм при их числе около 3,5-4,5 на 1 мм^2 и площади поверхностной пористости около 35% (табл. 4).

Фотометрическое изучение поведения миелокариоцитов в данном диапазоне пористости имплантатов показывает, что развивается “метаплазия” костного мозга с падением общего числа хромофоров, интенсивно поглощающих свет в видимой части спектра (табл. 4). Одним из наиболее активных хромофоров является гемоглобин [44], что является косвенным доказательством значительного изменения первоначальной структуры костного мозга через 1,5 месяца его подкожного культивирования на кальций фосфатном носителе.

Тем не менее мы согласны с мнением В.И. Севастьянова [45] о том, что имплантаты со строго детерминированными свойствами поверхности могут иметь только ограниченное применение. В частности, подобная макропористость нарушает адгезию покрытия к металлической подложке. Так, сила адгезии КФС покрытий к титановой основе варьировала в пределах $2,0 \pm 0,4 \text{ Н/мм}^2$ ($n=5$), что не менее чем в 15-20 раз ниже таковой для покрытий (МК, КФП и КФР), нанесенных анодно-искровым способом. Показатели их адгезионной прочности составляли более 30-40 Н/мм^2 . При этом отрыв КФС покрытия происходил по границе с оксидным слоем титана (переходная зона). Адгезия анодно-искровых покрытий превышала границы прочности клеевой основы.

Итак, биоактивные КФМ в зависимости от состава и структуры поверхности позволяют регулировать гистологическую структуру формирующейся тканевой пластинки от бластных элементов костного мозга до костной ткани. Согласно вектору “метаплазии” костного мозга в костную ткань в тесте эктопического остеогенеза биоактивные покрытия располагались следующим образом: КФР > КФС > КФП.

При этом на КФП покрытиях определялись в основном пролиферирующий костный мозг, рыхлая, неоформленная, с участками плотной (фиброзной), соединительная ткань (рис. 2, 3). Тканевые пластинки КФС покрытий при оптимальной пористости характеризовались уплотнением структуры, появлением костных клеток (остеобластов), развитием грубоволокнистой костной ткани (рис. 5). Как правило, костная ткань разрастается не только по поверхности, но и внедряется за счет остеокластического ремоделирования внутрь КФМ, а также образует

своеобразную муфту вокруг имплантата [9]. Однако, как и в наших исследованиях, механические и биологические свойства новой кости, а также уровень ее минерализации обычно ниже нормальных показателей [46].

Считается, что для реализации остеокондуктивного (ОК) потенциала (продвижения костной ткани по поверхности изделия) достаточно сформировать на металлических имплантатах кальций фосфатную пленку, которая может и не соответствовать минеральному составу костной ткани, например, методами электрохимии или осаждения. В нашем случае это соответствует

КФП покрытию. При этом ведущая роль, по-видимому, принадлежит кальцию, а не фосфору, т.к. ОК свойствами обладают покрытия, полученные, в частности, оксидированием титана и состоящие из CaTiO_3 [47]. В то же время для индукции роста и дифференцировки остеогенных клеток требуется наличие фосфатов кальция, особенно ГА и ТКФ. По-видимому, это является одним из ключевых моментов, позволяющих костному мозгу формировать пластинчатую костную ткань на КФР, но не КФП поверхностях (табл. 1, рис. 3, 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, успех теста эктопического костеобразования, как и остеоинтеграции, зависит от огромного числа факторов. В связи с этим не удастся найти ключевые (интегральные) характеристики поверхности, определяющие оптимальные биосовместимость и функциональность имплантируемого изделия [25]. Полученные нами данные позволили перейти от поисков имплантата с “идеальными” биомедицинскими свойствами, от бесконечного тестирования одной технологии нанесения кальций фосфатного покрытия, как это представлено в цикле работ А. Морони и соавторов [4, 5, 11], к формированию реальной панели инструментов для лечения различных видов ортопедо-травматологической патологии.

В то время, как в литературе до сих пор дискутируется вопрос о преимуществах биоинертных и биоактивных материалов [48], мы сформулировали концепцию “квазиинтеллектуальных” имплантатов [49] как основу для создаваемой панели биоинертных и биоактивных

изделий, призванных решить конкретные задачи остеосинтеза. Она постулирует тот факт, что физико-химические свойства поверхности, придающие имплантатам биоинертные либо биоактивные свойства, позволяют регулировать и даже программировать реакцию костной ткани за счет моделирования информационных сигналов остеогенеза. Это при широком разнообразии технологий нанесения покрытий способствует созданию инструментов для конкретных ортопедо-травматологических заболеваний (индивидуальный подход к пациенту). Полученные результаты вносят существенный вклад в расшифровку интимных механизмов, лежащих в основе взаимосвязанной цепочки событий: технология нанесения покрытия – индивидуальные физико-химические параметры – индивидуальные биологические свойства – индивидуальные медицинские параметры – индивидуальная биомеханика – индивидуальная сфера клинического применения имплантатов с модифицированной поверхностью.

ЛИТЕРАТУРА

1. Soballe K. Hydroxyapatite ceramic coating for bone implant fixation mechanical and histological studies in dogs // *Acta Orthop. Scand.* - 1993. - Vol. 64. - P. 255.
2. De Bastiani G., Algegheri R., Renzi Brivio L.R. The treatment of fractures with a dynamic axial fixator // *J. Bone Jt. Surg.* - 1984. - Vol. 66. - P. 538.
3. Aro H.T., Markel M.D., Chao E.Y.S. Cortical bone reactions at the interface of external fixation half – pins under different loading condition // *J. Trauma.* - 1993. - Vol. 35, N 5. - P. 776-785.
4. Histomorphometry of hydroxyapatite coated and uncoated porous titanium bone implants / A. Moroni, V.L. Caja, E.L. Egger et al. // *Biomaterials.* - 1994. - Vol. 15. - P. 926-933.
5. Biomechanical, scanning electron microscopy, and microhardness analyses of the bone-pin interface in hydroxyapatite coated versus uncoated pins / A. Moroni, V.L. Caja, L. Savarino et al. // *J. Orthop. Trauma.* - 1997. - Vol. 11. - P. 154-161.
6. The role of hydrated silica, titania and alumina in inducing apatite on implants / P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* - 1994. - Vol. 28. - P. 7-15.
7. Леонтьев В.К. Биологически активные синтетические кальцийфосфат содержащие материалы для стоматологии // *Стоматология.* - 1996. - Т. 75, № 5. - С. 4-6.
8. Initial tissue response to a titanium implant coated with apatite at room temperature using a blast coating method / T. Mano, Y. Ueyama, K. Ishikawa et al. // *Biomaterials.* - 2002. - Vol. 23. - P. 1931-1936.
9. De Groot K. Bioceramics consisting of calcium phosphate salts // *Biomaterials.* - 1981. - Vol. 1. - P. 47-50.
10. Карлов А.В., Шахов В.П. Системы внешней фиксации и регуляторные механизмы оптимальной биомеханики. - Томск, 2001. - 480 с.
11. State of art review: techniques to avoid pin loosening and infection in external fixation / A. Moroni, F. Vannini, M. Mosca, S. Giannini // *J. Orthop. Trauma.* - 2002. - Vol. 16. - P. 189-195.
12. Pommer A., Muhr G., David A. Hydroxyapatite-coated Schanz pins in external fixators used for distraction osteogenesis // *J. Bone Jt. Surgery.* - 2002. - Vol. 84-A. - P. 1162-1166.
13. The influence of multiphase calcium phosphate bioceramics on bone formation in non-osseous tissues / Y. Li, X. Zhang, W. Chen et al.

- // Transactions of the 19th Annual meeting of society for biomaterials. - Birmingham, USA. - 1993. - P. 165.
14. Osseous substance formation induced in porous calcium phosphate ceramics in soft tissues / C. Klein, K. De Groot, W. Chen et al. // *Biomaterials*. - 1994. - Vol. 15. - P. 31-34.
 15. Osteogenesis in extraskeletal implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals / Z. Yang, H. Yuan, W. Tong et al. // *Biomaterials*. - 1996. - Vol. 17. - P. 2131-2137.
 16. Urist M.R. Bone: Formation by autoinduction // *Science*. - 1965. - Vol. 150. - P. 893-899.
 17. Албертс Б. И др. Молекулярная биология клетки / Б. Албертс, Д. Брей, Дж. Льюис и др. / Пер. с англ. - М.: Мир, 1994. - Т.3. - 504 с.
 18. Daculsi G. New technology for calcium phosphate bioactive ceramics in bone repair // *Medical Biological Engineering & Computing*. - 1999. - Vol. 37, Suppl. 2. - Part II. - P. 1598-1599.
 19. Bruijn J.D. Calcium phosphate biomaterials: Bone-bonding and biodegradation properties. - Leiden, 1993. - 170 p.
 20. Li Y. Synthesis and characterization of bone-like minerals: Macroscopic approach and microscopic emulation. - Leiden, 1994. - 119 p.
 21. The influence of sintering condition and surface shape of hydroxyapatite ceramics for the osteoconductivity / O. Taranobu, J. Nailo, N. Takahashi et al. // *Oral. Implantol. and Biomater. Proc. 3rd Jnt. Congr. Implantos. and Biomater. Stomatol., Osaka, Ap. 27-29, 1988. - Amsterdam ets., 1989. - P. 233-238.*
 22. Kim H.D., Ferris D.M., Valentini R.F. Sustained polymeric delivery of BMP-2 does not induce ectopic bone in vivo // 24th Annual Meeting of the Society for Biomaterials. - San Diego, California, 1998. - P. 148.
 23. Ikeda N., Kawanabe K., Nakamura T. Quantitative comparison of osteoconduction of porous, dense A-W glass-ceramic and hydroxyapatite granules (effects of granule and pore sizes) // *Biomaterials (England)*. - 1999. - Vol. 20, N 12. - P. 1087-1095.
 24. Structure of the interface between rabbit cortical bone and implants of gold, zirconium and titanium / P. Thomsen, C. Larsson, L.E. Ericson et al. // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 1997. - Vol. 8, N 11. - P. 653-665.
 25. Калита В.И. Физика и химия формирования бионертных и биоактивных поверхностей на имплантатах // *Физика и химия обработки материалов*. - 2000. - № 5. - С. 28-45.
 26. Early osteoinduction in calciumphosphate ceramics in various species / W. Chen, S. Qu, Z. Eang et al. // *Firth World biomaterials congress.* - 1996. - P. 120-121.
 27. Experimental cranioplasty and skeletal augmentation using an alpha-tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement: a preliminary short-term experiment in rabbits / K. Kurashina, H. Kurita, A. Kotani et al. // *Biomaterials*. - 1998. - Vol. 19. - P. 701-706.
 28. McKay I., Leidh I. Growth factors: A practical approach. - Oxford University Press, UK, 1993. - 272 p.
 29. Ectopic bone induction on and in porous hydroxyapatite combined with collagen and bone morphogenetic protein / K. Takaoka, H. Nakahara, H. Yoshikawa et al. // *Clin. Orthop.* - 1988. - N 234. - P. 250-254.
 30. Osteogenin, a bone morphogenetic protein adsorbed on porous hydroxyapatite substrats, induces rapid bone differentiation in calvaria defects of adult primates / U. Ripamonti, S. Ma, B. Van der Heever, A.H. Reddi // *Plast. Reconstr. Surg.* - 1992. - Vol. 90. - P. 382-393.
 31. A correlation between osteoinductive activity and local retention of recombinant human bone morphogenetic proteins / D. Gusta, R. Palmer, J. Golden et al. // 24th Annual Meeting of the Society for Biomaterials. - San Diego, California, 1998. - P.147.
 32. Osteoinduction by calcium phosphate biomaterials / H. Yuan, Z. Yang, Y. Li et al. // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 1998. - Vol. 9. - P. 723-726.
 33. Urist M.R., Strates B.S. Bone morphogenetic protein // *J. Dent. Res.* - 1971. - Vol. 50. - P. 1391-1395.
 34. Purification of bone morphogenetic protein by hydroxyapatite chromatography / M.R. Urist, A. Budy, F. McLean et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* - 1984. - Vol. 81. - P. 371-375.
 35. Urist M.R., Leitz A., Davidson E. B-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein // *Clin. Orthop.* - 1984. - N 187. - P. 277.
 36. Имаи Е. Биомедицинские полимеры // *Биополимеры*. - М.: Мир, 1988. - С. 470-490.
 37. Confocal microscopic analysis of osteoblast implant interaction / A.K. Shah, R.K. Sinha, N.J. Hickok, R.S. Tuan // *Annu. Fall Meet. Eng. Soc. - San Diego, Calif., 1997. - Vol. 25, Suppl. 1. - P. 74.*
 38. Kinetics of bone cell organization and mineralization on materials with patterned surface chemistry / K.E. Healy, C.H. Thomas, A. Rezanian et al. // *Biomaterials*. - 1996. - Vol. 17. - P. 195-208.
 39. A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics Zhang Xingdong / H. Yuan, K. Kurashina, J.D. Bruijn et al. // *Biomaterials*. - 1999. - Vol. 20. - P. 1799-1806.
 40. Cook S.D., Thomas K.A. Porous metal coatings for implant fixation // *Proc. 38th Annu. Conf. Eng. Med. and Biol., Sept. 30-Oct. 2, 1985, Chicago. -Washington, 1985. - Vol. 27. - P. 25.*
 41. Cellular biocompatibility and resistance to compression of macroporous beta-tricalcium phosphate ceramics / M. Sous, R. Bareille, F. Rouais et al. // *Biomaterials*. - 1998. - Vol. 19. - P. 2147-2153.
 42. Quantitative histomorphometric evaluation of spinal arthrodesis after biphasic calcium phosphate ceramic implantation in sheep / P. Hardoun, D. Chopin, B. Devyver et al. // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 1992. - Vol. 3, N 3. - P. 212-218.
 43. Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth / O. Gauthier, J.-M. Boulter, E. Aguado et al. // *Biomaterials*. - 1998. - Vol. 19, N 1-3. - P. 133-139.
 44. Синичкин Ю.П., Утц С.Р. In vivo отражательная и флуоресцентная спектроскопия кожи человека. - Саратов, 2001. - 92 с.
 45. Севастьянов В.И. Новое поколение материалов медицинского назначения // *Перспективные материалы*. - 1997. - № 4. - С. 56-60.
 46. Matsumura T., Suzuki K. Initial tissue response to a titanium implant coated with apatite at room temperature using a blast coating method // *Biomaterials*. - 2002. - Vol. 23. - P. 1931-1936.
 47. Aoki H. Medical applications of hydroxyapatite. - Tokyo and St. Louis: Ishiyaku EuroAmerica Inc, 1994. - 530 p.
 48. Суров О.Н. Бионертный или биоактивный имплантат? // *Новое в стоматологии*. -1998. - № 3. - С. 14-18.
 49. Карлов А.В., Хлусов И.А. Регулируемые клеточные и тканевые механизмы оптимальной биомеханики аппаратов внешней фиксации // *Способы контроля процессов остеогенеза и перестройки в очагах костеобразования: Тез. докл. симпоз. (19-21 сентября 2000 г.)* - Курган, 2000. - Ч. 2. - С. 185-186.

Рукопись поступила 068.05.03.