

УДК 616.7:611.018:615.461(049.2)

Медико-біологічні дослідження штучних біоматеріалів для ортопедії та травматології

С.В. Малишкіна, Н.В. Дедух

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

Ключові слова: штучні біоматеріали, цитологічні, гістологічні, морфометричні методи

Вступ

Розвиток сучасних високотехнологічних галузей медицини, у 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 мають бути біосумісними та мати такі технологічні якості, які дозволяють у разі певної обробки одержати необхідну конструкцію, що характеризується стійкістю до сил тертя та має низьку теплопровідність [23]. Водночас імплантаційні матеріали мають виконувати не тільки замісну функцію, але, поступово інтегруючись у навколишню кістку, сприяти формуванню і ремоделюванню кісткової тканини. Наукові дані свідчать про активізацію розробок у створенні нових та удосконаленні відомих біоматеріалів для медицини [17, 28]. Відомо, що навіть незначна модифікація біоматеріалу (елементний склад, фазовий стан, топографія і структура поверхні та ін.) 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 ISO/ЕК9969-89 та ГОСТ Р 51148-98), 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, ме-

таболічний стан кісткової тканини, навантаження в ділянці імплантації, функцію імплантованого матеріалу — стабілізувальна чи замісна тощо).

Використання розробленого методологічного підходу до вивчення штучних біоматеріалів, а також їх клінічна апробація дозволили дослідникам нашого інституту дати путівку в життя таким матеріалам як: метали з різними покриттями, алюмооксидна (корундова) та кальцій-фосфатна кераміки, композитні матеріали на основі керамік (у тому числі кераміка, легована іонами срібла), сапфіри, різновиди вуглецевих матеріалів, полімерні матеріали на основі D, L-лактиду і гліколіду, а також їх композитам з біоактивною керамікою [6, 10, 12, 13, 17].

Метою повідомлення є висвітлення сучасної концепції методологічних підходів до дослідження штучних біоматеріалів для ортопедії та травматології за результатами власних розробок і даними літератури.

Матеріал і методи

Як приклад у роботі використано синтетичні біоматеріали: неіржавка сталь (12X18H9T), титан (BT1-6), кістковий цемент (CEMEX_{RX}), гідроксил-апатитна та біфазна (гідроксилапатит/трикальційфосфат — 60/40) кераміки (пористі та щільні зразки).

Дослідження виконано в культурі клітин і в експерименті на щурах, з використанням комплексу методів — морфологічних, цитологічних, електронно-мікроскопічних і морфометричних зі статистичною обробкою одержаних числових показників, що дозволило оцінити біоматеріали на рівні організму, тканинному та клітинному рівнях.

Результати і їх обговорення

Дослідження біоматеріалів у культурі клітин є чутливим експрес-методом біоіндикації. Це — по-

передній скринінг, що дозволяє в короткий термін зробити висновок щодо наявності чи відсутності цитотоксичного впливу досліджуваного матеріалу на клітини, біосумісності матеріалу, а також опосередковано, через визначення адгезії — наявності та вираженості остеointegraційних властивостей. Дослідження в культурі клітин характеризуються високою чутливістю та відтворюваністю, надійністю контролю за якістю проведення експерименту. Деякі автори стверджують, що чутливість досліджень *in vitro* вища, ніж *in vivo* [25].

Для вивчення біоматеріалів *in vitro* доцільніше використовувати первинні культури, бо клітинні лінії, які пересівають, генетично та метаболічно відрізняються від клітин організму та демонструють більшу стійкість до різних несприятливих факторів. У разі дослідження імплантаційних матеріалів, які *in vivo* контактують з такими біологічними тканинами, як кістка, суглобовий хрящ, кістковий мозок, параосальні тканини, доцільне використання культури клітин сполучної тканини — фіброblastів, кісткового мозку, мезенхімальних клітин, пре- та остеобlastів. Тому на даному етапі досліджень в якості джерела клітин може бути використана підшкірна клітковина, яка в умовах культивування *in vitro* дає ріст клітин фіброblastичного диферону. Крім того, вивчення культури фіброblastів доцільне ще й тому, що в разі проведення токсикологічних досліджень штучних біоматеріалів їх імплантують частіше за все у підшкірну клітковину, тобто реакція організму опосередковується через систему сполучної тканини, основними структурними елементами якої є клітини фіброblastичного диферону.

Клітини у моношарових культурах під час дослідження біоматеріалів аналізують у різні терміни, частіше на 1, 3, 5 та 7-му добу. Такі терміни спостереження обумовлено тим, що на 3–5-у добу в культурі фіброblastів чітко визначається зональне розташування клітин, а порушення зональності є одним із параметрів, що може характеризувати вплив зовнішніх факторів на культивовані клітини [1]. Що стосується пізнішого терміну спостереження (7–9-а доба), то звертали увагу на те, що саме в ці терміни культури фіброblastів виходять зі стадії стабільного росту і переходять у стадію дегенерації. За 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.

Під час використання культури фіброblastів визначають загальні характеристики реакції клітин

на біоматеріал, а саме: адгезію (прилипання) клітин до біоматеріалу та їхню життєздатність; приріст клітин у культурі; наявність і кількість загиблих клітин; проліферацію клітин (кількість мітозів і наявність патологічних мітозів); стан (цитологія) клітин у культурі (збереження фенотипу, цілісність клітинної мембрани, стан цитоплазми та ядра).

Для успішної остеointegraції імплантаційних матеріалів з навколишніми 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, передусім, свідчить про високий ступінь його біосумісності. Адгезія передують клітинній проліферації та диференціації і являє собою невід’ємну ланку процесу остеointegraції [20, 28]. На інтенсивність і міцність адгезії значний вплив чинить склад матеріалу. Так, введення в біоскло 1,5 % алюмінію пригнічувало процес інтеграції біоскла, а в разі 3 %-го його складу біоскло повністю втрачало цю якість [33]. На вираженість адгезії впливає також структура поверхні біоматеріалу (гладка чи шорстка), а в разі шорсткої поверхні — топографія її шорсткості. Детальна інформація щодо поняття остеointegraції та впливу на неї фізико-хімічних властивостей імплантаційних матеріалів представлена нами в попередніх публікаціях [7, 8].

Адгезивні властивості біоматеріалу оцінюють за кількістю (щільністю) культивованих клітин, які прикріпилися до поверхні його зразка, у різні терміни під час дослідження в інвертованому мікроскопі (спеціальне забарвлення клітин) або в електронному сканувальному мікроскопі (рис. 1).

Цитологічні особливості клітин у культурі, наявність мітозів вивчають під час фарбування клітин на скельцях азур-еозином за Романовським або гематоксилином (Ерліха) та еозином.

Кількість клітин у культурах за термінами дослідження в разі застосування цитофотометра під-

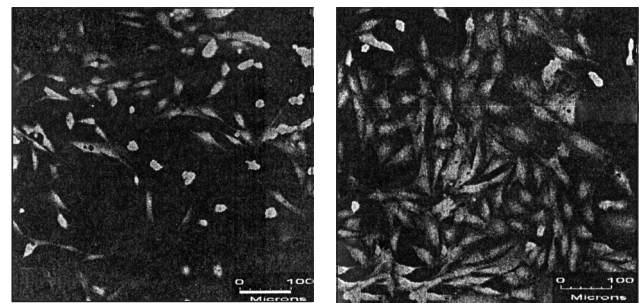


Рис. 1. Мікрофото фіброblastів, культивованих на зразках неіржавкої сталі, через 3 та 5 дб. Електронний сканувальний мікроскоп, напilenня золотом (за Bordji K., 1996)

раховують після зняття їх зі скелець і спеціального флуоресцентного фарбування. У разі використання для підрахунку клітин камери Горяєва їх фарбують 0,1% розчином кристалвіолету та обчислюють за формулою [14]. Число мертвих клітин визначають після фарбування клітин трипановим синім, який швидко проникає в мертві клітини, забарвлюючи їх. За необхідності зняті зі скельця культивовані клітини після спеціальної підготовки можуть бути досліджені гістологічними, гістохімічними, імуноморфологічними, електронно-мікроскопічними та біохімічними методами.

На рис. 2 наведено мікрофото фібробластів під час дослідження з витяжками зі зразків неіржавкої сталі та титану.

Із рисунків видно, що клітини в обох дослідах зберігають фенотип як на 3-тю, так і на 5-ту добу культивування. Це молоді фібробласти з чіткими контурами довгастої цитоплазми та овальними гіпохромними ядрами. У більшій частині ядер виявляються ядрця. Місцями зустрічаються клітини з фігурами мітозів, таких клітин більше в культурах із витяжкою титану. Щільність клітин зростає зі збільшенням терміну спостереження. Проте в культурі клітин з витяжкою із неіржавкої сталі кількість клітин менша як на 3-тю, так і на 5-ту добу порівняно з культурою, де досліджували витяжку з титану (рис. 3).

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

Дослідження в культурі остеогенних клітин дає можливість визначити специфічні характеристики: збереження клітинами фенотипу (остеобласти) за морфологією клітин і за додатковими показниками — синтезу специфічних (для остеогенних клітин)

білків колагену I типу та остеокальцину (з моноклональними антитілами, специфічними до них), ферментів — лужної фосфатази (цитохімічні методи з використаннями діагностичних китів); наявністю кристалів кальцію та фосфору (за методом Коса). У культурі остеогенних клітин (мезенхімальні клітини чи стромальні клітини кісткового мозку) досліджують здатність клітин до остеогенної диференціації, а також визначають наявність і вираженість остеointegraції (адгезія та щільність клітин на зразках біоматеріалу (рис. 4).

Дослідження біоматеріалів in vivo в експериментах на тваринах

Медико-біологічні дослідження на тваринах виконують в умовах асептики та у відповідності до Європейської конвенції, Закону України щодо гуманного відношення до експериментальних тварин, а також згідно з загальноприйнятими міжнародними стандартами, які засновано на принципах трьох R [3, 16]. Це — refinement (покращання), тобто гуманізація експериментів (зменшення болювого навантаження, використання наркозу під час хірургічних втручань й евтаназії та ін.); reduction (скорочення) — визначення оптимально доцільної кількості тварин для експерименту, необхідного виду тварин та їх віку (частіше — молоді статевозрілі); вибір адекватної та коректної моделі; обґрунтування об'єктивних методів досліджень; replacement — заміна експериментальних тварин альтернативними моделями, широке впровадження досліджень in vitro та ін. План експериментів має бути узгоджений із Комітетом з біоетики. Дрібних гризунів (щурів, мишей) виводять з експерименту шляхом передозування ефіру або внутрішньочеревним введенням 10 % водного розчину тіопенталу натрію, кролів — введенням у крайню вену вуха 2 мл 10 % розчину тіопенталу натрію і в стані наркотичного сну перерізанням

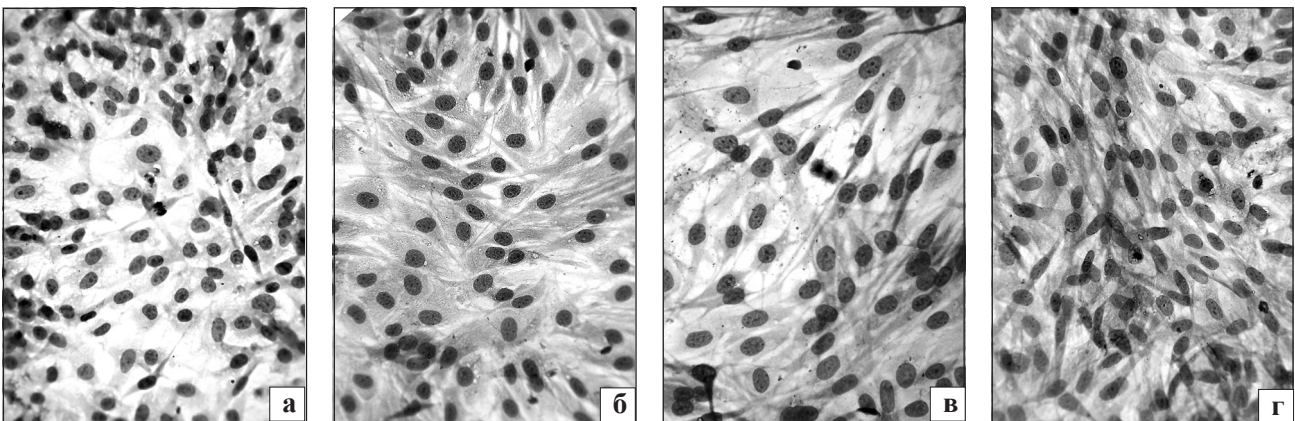


Рис. 2. Мікрофото фібробластів на 3-тю та 5-ту добу культивування з витяжкою із біоматеріалів: а, б — неіржавкої сталі; в, г — титану. У культурі (рис. в) спостерігаються клітини з фігурами мітозу. Азур-еозин. Зб. 200

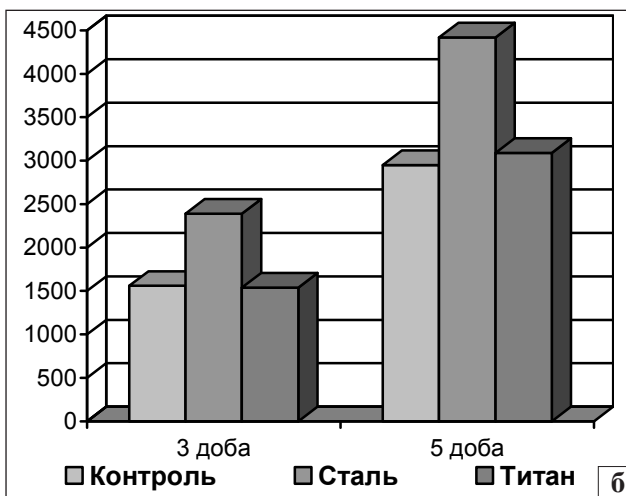
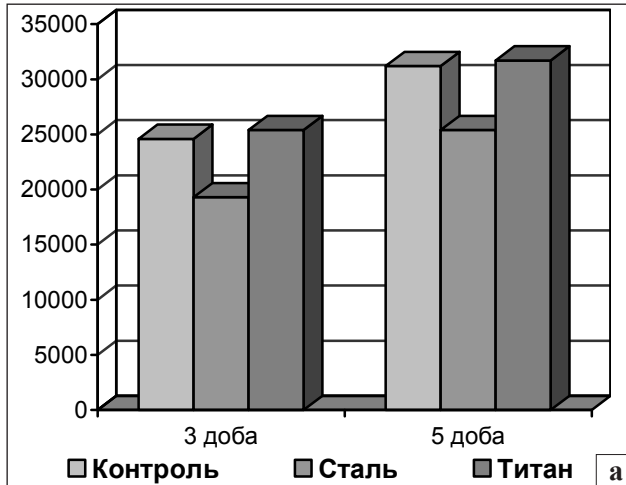


Рис. 3. Діаграми, які представляють: а) кількість життєздатних клітин (1 мл суспензії); б) кількість мертвих клітин у культурах з витяжками з неіржавкої сталі та титану

зовнішньої та внутрішньої сонних артерій; собак — введенням у латеральну вену гомілки 5 мл 10 % розчину тіопенталу натрію і в стані наркотичного сну перерізанням зовнішньої та внутрішньої сонних артерій.

На першому етапі досліджень зразки біоматеріалів імплантують у підшкірно-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 і стан судин у капсулі характеризують біосумісність мате-

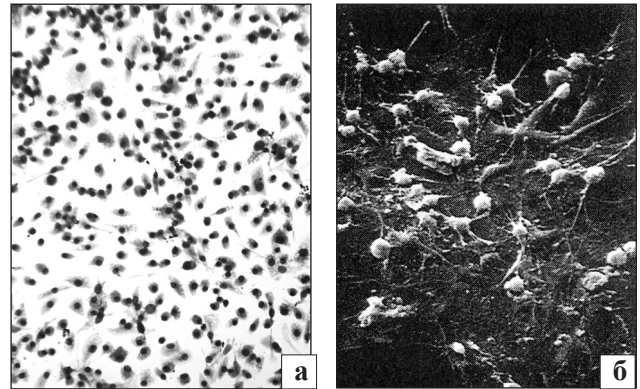


Рис. 4. Мікрофото. а) культура остеобластів на 2-у добу культивування із витяжкою із титану. Азур-еозин. Зб. 100; б) остеобласти на поверхні титанових зразків. Сканувальний електронний мікроскоп, наплення золотом (за Bordji K., 1996)

ріалу. На рис. 5 (мікрофото препаратів) зображено капсули, які утворилися через 30 діб навколо зразків різних матеріалів, імплантованих щурам.

Як видно з рисунків, капсули відрізняються товщиною, структурою і клітинним складом. Найтоншу капсулу (рис. 6) зі щільним розташуванням тонких колагенових волокон і незначною щільністю клітин фібробластичного диферону відзначено навколо титану (рис. 5 а), що вказує на його виражену біосумісність. Навколо кісткового цементу відзначається товста капсула. Її товщина (рис. 6) достовірно більша за показники капсул навколо неіржавкої сталі та титану. Товсті колагенові волокна розташовані нещільно та невпорядковано.

У капсулі (рис. 5 в) виявляються судини мікроциркуляторного русла (окремі з них — повнокровні), скупчення лімфоїдних клітин, велика кількість макрофагів та поодинокі багатоядерні клітини. Щільність фіброblastів у капсулі незначна. Усе це свідчить про низьку біосумісність кісткового цементу.

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

- вираженість процесу остеоінтеграції;
- наявність чи відсутність остеокондуктивних та остеоіндуктивних властивостей;
- характер і темп можливої біодеградації біоматеріалу, а також вплив компонентів біодеградації на процеси перебудови навколишньої кісткової тканини;
- характер кісткоутворення у разі імплантації розроблених біоматеріалів у губчасту та компактную кісткову тканину.

Термін «остеоінтеграція» (об'єднання в одне ціле) використовують для визначення безпосереднього контакту імплантата з кісткою, що характеризує біоматеріал як високобіосумісний. До таких

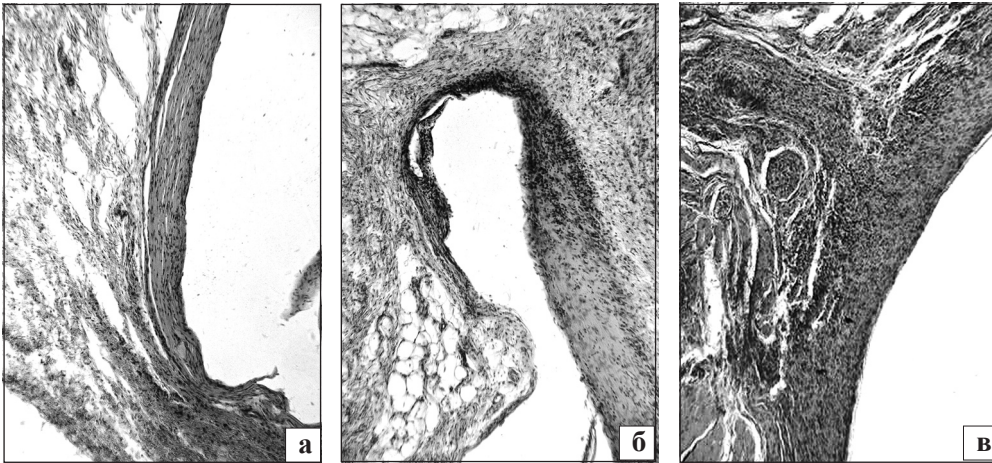


Рис. 5. Мікрофото сполучотканинних капсул навколо зразків із титану (а), неіржавкої сталі (б), кісткового цементу (в). 30-та доба після імплантації. Гематоксилін та еозин. Шб. 100

матеріалів відносяться біоактивні кальцій-фосфатні кераміки (рис. 7 а). Навколо біоінертних матеріалів (метали, сплави, щільна алюмооксидна кераміка, кістковий цемент), особливо зразків з гладкою поверхнею, часто формується волокниста капсула, за допомогою якої організм захищається від чужорідних тіл (рис. 7 б).

Товщина та клітинний склад капсули є «мірою» біосумісності імплантаційного матеріалу. Зміна гладкої структури поверхні імплантатів на шорстку або пористу надає їм остеокондуктивності, що сприяє підвищенню їх остеоінтеграційних якостей [5, 24]. Остеоінтеграція ініціюється утворенням хімічного зв'язку між кісткою та матеріалом імплантата, а далі — адгезією клітин [20]. Остеоінтеграцію біоматеріалів на цей час описують не тільки якісно, але й оцінюють кількісно. Остеоінтеграція 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 (рис. 8) [9]. Так, коефіцієнт остеоінтеграції гладкого титану (визначений у разі імплантації циліндричних зразків у кістку) дорів-

нює 0,65, щільної алюмооксидної кераміки — 0,79, а кальцій-фосфатної кераміки — 0,92.

Остеокондуктивність забезпечує інтеграцію біоматеріалу з кістковою тканиною за рахунок створення умов для проникнення кровоносних судин у пори біоматеріалу, вrostання материнської кісткової тканини та міграції детермінованих остеогенних клітин-попередників реципієнта [19]. Остеокондуктивність біоматеріалів залежить від їх фізико-хімічних характеристик, біосумісності та структури поверхні (архітекtonіки, розмірів пор та об'єму пористості) [7, 8, 34]. Остеокондуктивність визначається показником площі новоутвореної кісткової тканини в зоні імплантації біоматеріалу за одиницю часу (за добу) [32, 33]. Одержані показники для різних біоматеріалів порівнюють між собою. Чим більший показник площі новоутвореної кісткової тканини за одиницю часу, тим вищі остеокондуктивні якості біоматеріалу.

Остеоіндуктивність — це модуляція фенотипічної експресії неспецифічних сполучотканинних

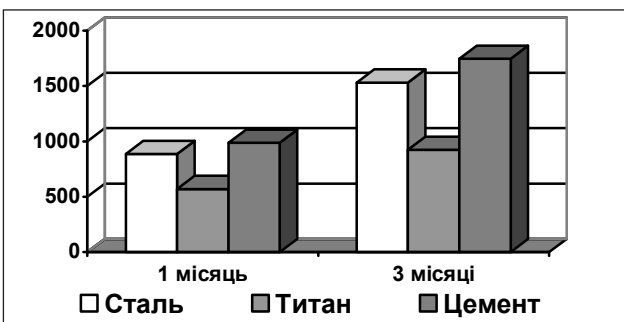


Рис. 6. Діаграма залежності товщини (мкм) капсул навколо біоматеріалів від часу їх формування

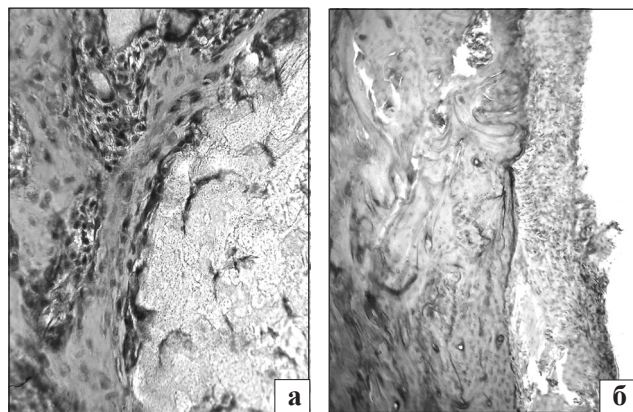


Рис. 7. Мікрофото. а) молоді кісткові трабекули щільно контактують з біфазною кальцій-фосфатною керамікою. Гематоксилін та еозин. Шб. 200; б) товста волокниста капсула між зразком із неіржавкої сталі та кісткою. Гематоксилін та еозин. Шб. 100

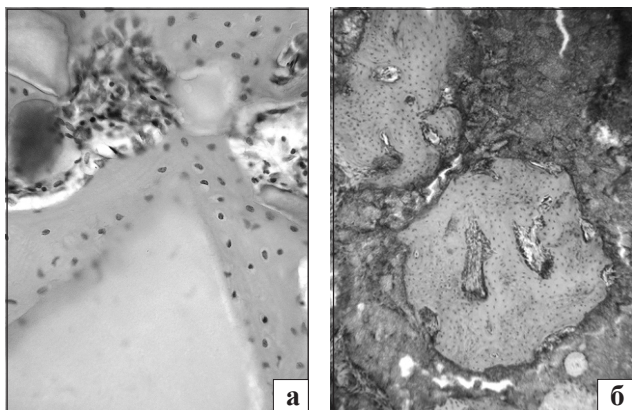


Рис. 8. Мікрофото. а) щільний контакт (по всьому периметру) гідроксилапатиту з кістковою тканиною. Гематоксилін та еозин. Зб. 200; б) кісткова тканина в порах кальцій-фосфатної кераміки щільно контактує з біоматеріалом. Гематоксилін та еозин. Зб. 100

клітин-попередників та їх направлена диференціація в остеопрогеніторні клітини [7]. Остеоіндуктивні матеріали забезпечують можливість диференціації не тільки остеогенних, але й некомітованих клітин [18, 27], 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 внутрішньом'язово без використання додаткових стимулювальних факторів (ростових). Якщо матеріал має остеоіндуктивні якості, на його поверхні та в 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 відзначали ектопічне кісткоутворення в порах кальцій-фосфатної кераміки [22, 31]. Ми вважаємо, що остеоіндуктивність біоактивної пористої кераміки — вторинна, пов'язана з адсорбцією біологічно активних речовин і клітин кісткового мозку в разі імплантації зразків у кістковий дефект. Саме цим можна пояснити формування кісткової тканини на кераміці в місцях, віддалених від материнської кістки.

Ектопічне формування кісткової тканини на поверхні та в порах кераміки ми спостерігали в разі насичення пористих зразків кальцій-фосфатної кераміки клітинами кісткового мозку та імплантації в підшкірно-жирову клітковину щурів [11]. Водночас у зразках, насичених клітинами кісткового мозку молодих тварин, площі сформованої кісткової тканини були достовірно більшими, ніж у зразках,

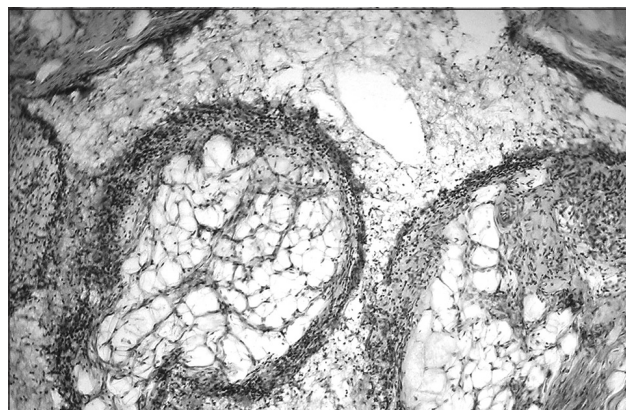


Рис. 9. Мікрофото. Невеличкі ділянки новоутвореної кісткової тканини в порах гідроксилапатитної кераміки, насиченої клітинами кісткового мозку щурів, у разі імплантації в підшкірно-жирову клітковину. 1 місяць після операції. Гематоксилін та еозин. Зб. 100

насичених клітинами від старих тварин (рис. 9).

Біодеградація є важливою та необхідною для імплантаційних матеріалів характеристикою, яку можна моделювати як *in vitro* (фізико-хімічне розчинення біоматеріалу в агресивних рідинах), так і *in vivo* (клітинно-опосередкована резорбція, яка відбувається за участі макрофагів, остеокластів і нейтрофілів). Повинна існувати кореляція між ступенем біодеградації матеріалу та інтенсивністю остеогенезу, оскільки надто швидка біодеградація імплантаційних матеріалів не співпадає з темпами кісткоутворення. Це призводить до формування пухкої сполучної тканини в ділянці імплантації. Повільна біодеградація супроводжується замуруванням біоматеріалів кістковою тканиною [26]. Біодеградацію досліджують, застосовуючи морфометричні методи для визначення (за термінами спостереження) площі біоматеріалів на однакових за розміром ділянках імплантації. Значне зменшення площі кераміки на 90-ту добу дослідження (рис. 10) свідчить про виражену біодеградацію біоматеріалу. У випадку використання пористого імплантаційного матеріалу та його повільної біодеградації вимірюють площі пор, які поступово збільшуються.

Характер кісткоутворення в разі імплантації біоматеріалів у кістку вивчають, використовуючи комплекс методичних заходів, що містить як стандартні гістологічні методи з морфометрією, так і спеціальні — гістохімічні, поляризаційно-оптичні та електронно-мікроскопічні. Це дозволяє простежити за утворенням кісткової тканини в зоні імплантації біоматеріалів у ранні післяопераційні періоди, а також дослідити як клітинний склад регенерату, так і його матрикс (на рівні макромолекул) на різних стадіях формування кісткової тканини [2, 4, 29].

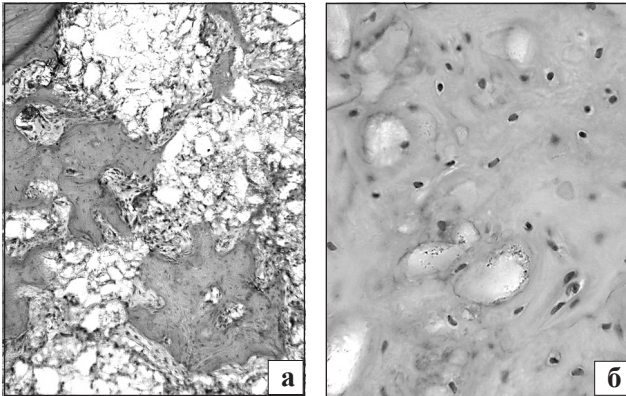


Рис. 10. Мікрофото. Ділянки кісткової тканини дистального відділу стегнової кістки шурів з різними за площею осередками біфазної кераміки на 90-ту добу (а) та 180-ту добу (б) після імплантації. Гематоксилін та еозин. Зб. 100

Висновки

Запропонований методологічний підхід до медико-біологічної оцінки штучних біоматеріалів з використанням комплексу методів дослідження *in vitro* в культурі клітин і в експерименті на тваринах дозволяє виявити не тільки наявність чи відсутність біосумісності та цитотоксичності матеріалу, але й охарактеризувати його остеоінтеграційні, остеокондуктивні, остеоіндуктивні якості, а також біодеградацію. До методів, які можуть забезпечити якісну та кількісну оцінку вказаних важливих характеристик штучних біоматеріалів, необхідно віднести методи біологічної індикації в культурі клітин; дослідження тканин, які утворюються навколо біоматеріалів у разі їх імплантації тваринам у підшкірну клітковину, а також у кісткову тканину в разі використання гістологічних методів світлової мікроскопії з морфометрією, гістохімічних поляризаційних методів, імуногістохімії, електронної трансмісійної та сканувальної мікроскопії. Кожний з застосованих методів забезпечує виконання окремих завдань. Наявність у біоматеріалів спеціальних властивостей (наприклад, бактерицидних та ін.) потребує додаткових досліджень. До вивчення впливу штучних біоматеріалів на навколишні тканини та організм у цілому можуть бути залучені біохімічні та імунологічні методи.

Література

1. Визначення гістотоксичності полімерів медичного призначення з використанням тканинної культури [Текст] / Н.А. Галатенко, В.П. Яценко, Г.О. Пхакадзе, Т.Е. Ліпатова // Доповіді Академії наук УРСР (Серія Б. Геологічні, хімічні та біологічні науки). — 1982. — № 9. — С. 52–59.
2. Пористий гідроксилапатит — матеріал для замещення кости в участках скелета с различной физиологической нагрузкой [Текст] / Н.В. Дедух, Н.А. Ашукина, С.В. Малышкина и др. // Ортопед. травматол. — 2006. — № 1. — С. 9–14.
3. Європейська 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.
4. Иванова Л.А. Методика исследования костной ткани путем поляризационной микроскопии [Текст]: мат. школы «Биология опорно-двигательного аппарата». — Харьков, 1992. — С. 34–37.
5. Карлов А.В. Зависимость процессов репаративного остеогенеза от поверхностных свойств имплантатов для остеосинтеза [Текст] / А.В. Карлов, И.А. Хлусов // Гений ортопед. — 2003. — № 3. — С. 46–51.
6. Керамопластика в ортопедии и травматологии [Текст] / А.А. Корж, Г.Х. Грунтовский, Н.А. Корж, В.Т. Михайлив. — Львов, Свит, 1992. — 112 с.
7. Имплантационные материалы и остеогенез [Текст] / Н.А. Корж, В.А. Радченко, С.В. Малышкина, Л.А. Кладченко // Ортопед. травматол. — 2003. — № 1. — С. 41–47.
8. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль биологической фиксации и остеоинтеграции в реконструкции кости [Текст] / Н.А. Корж, С.В. Малышкина, Л.А. Кладченко, И.Б. Тимченко // Ортопед. травматол. — 2005. — № 4. — С. 118–127.
9. Остеоинтеграция имплантатов из циркония и титана в эксперименте [Текст] / О.Б. Кулаков, А.А. Докторов, С.В. Дьякова и др. // Морфология. — 2005. — Т. 127, № 1. — С. 52–55.
10. Малишкіна С.В. Біосумісність та цитотоксичність композиту на основі полілактиту [Текст] / С.В. Малишкіна // Укр. морфол. альманах. — 2006. — № 1. — С. 47–50.
11. Малишкіна С.В. Вплив вікових змін остеогенного потенціалу шурів на кісткоутворення при імплантації гідроксилапатитної кераміки [Текст] / С.В. Малишкіна, О.А. Нікольченко // Медицина и ... — 2008. — №3 (21). — С. 79–84.
12. Малишкіна С.В. Цитологічні особливості мікрооточення кальційфосфатної кераміки при імплантації у кістку [Текст] / С.В. Малишкіна // Вісник Білоцерківського держ. аграрного ун-ту. — 2000. — Вип. 14. — С. 119–125.
13. Малишкіна С.В. Порівняльний аналіз остеорепаративного процесу у зонах імплантації композитів на основі полімерів з різним вмістом трикальційфосфату та гідроксилапатиту [Текст] / С.В. Малишкіна, Л.М. Бенгус, І.О. Батура // Медицина и ... — 2007. — № 2 (17). — С. 45–48.
14. Методические рекомендации по криоконсервированию и цитологическому контролю качества культур клеток и фрагментов ткани [Текст]. — 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 [Текст]. — 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. Филиппенко В.А. Структурные характеристики и бактерицидные свойства гидроксилатапгита, обогащенного серебром [Текст] / В.А. Филиппенко, С.В. Малышкина, М. Фархан и др. // Ортопед. травматол. — 2000. — № 4. — С. 50–55.
18. Фриденштейн А.Я. Индукция костной ткани и остеогенные клетки-предшественники [Текст] / А.Я. Фриденштейн,

- К.С. Лалыкина. — М.: Медицина, 1973. — 224 с.
19. **Albrektsson T. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration** [Text] / T. Albrektsson, C. Johansson // *Eur. Spine J.* — 2001. — № 10. — P. 96–101.
 20. Anselme K. Osteoblast adhesion on biomaterials [Text] / K. Anselme // *Biomaterials.* — 2000. — № 21. — P. 667–681.
 21. **Cytocompatibility of Ti-6Al-4V and Ti-5Al-2.5 Fealloys according to three surface treatments, using human fibroblasts and osteoblasts** [Text] / K. Bordji, J. Jouzeau, D. Mainard et al. // *Biomaterials.* — 1996. — Vol. 17. — P. 929–940.
 22. Early osteoinduction in calciumphosphate ceramics in various species [Text] / W. Chen, S. Qu, Z. Eang et al.: *Firth World biomaterials congress, 1996.* — P. 120–121.
 23. Duguy N. Biomaterials and osseous regeneration [Text] / N. Duguy, H. Petite, E. Arnaud // *Ann. Chir. Plast. Esthet.* — 2000. — Vol. 45, № 3. — P. 364–376.
 24. Interactions between cells and titanium surfaces [Text] / E. Eisenbarth, D. Velten, K. Schenk-Meuser et al. // *Biomolecular Eng.* — 2002. — № 19. — P. 243–249.
 25. Johnson H.J. Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro II. Objective methods of toxicity [Text] / H.J. Johnson, S.J. Northup, P.A. Seagraves // *J. Biomed. Med. Res.* — 1995. — Vol. 19. — P. 489–611.
 26. **Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates** [Text] / S. Langstaff, M. Sayer, T.J. Smith et al. // *Biomaterials.* — 1999. — Vol. 20, № 18. — P. 1727–1741.
 27. Lee T.M. Attachment and proliferation of neonatal rat calvarial osteoblasts on Ti6Al4V: effect of surface chemistries of the alloy [Text] / T.M. Lee, E. Chang, C.Y. Yang // *Biomaterials.* — 2004. — Vol. 25, № 1. — P. 23–32.
 28. In vitro MC3T3 osteoblast adhesion with respect to surface roughness of Ti6Al4V substrates [Text] / P. Linez-Bataillon, F. Monchau, M. Bigerelle, M. Hildebrand // *Biomolecular Eng.* — 2002. — № 19. — P. 133–141.
 29. Hydroxyapatite-ceramic for luxta-articular implantation [Text] / N.M. Meenen, J.F. Osborn, M. Dallek, K. Donath // *J. Materials Science: Materials In Medicine* — 1992. — № 3 — P. 345–351.
 30. **Montanaro L. Nanostructured materials for inhibition of bacterial adhesion in orthopedic implants: a minireview** [Text] / L. Montanaro, D. Campoccia, C.R. Arciola // *Int. J. Artif. Organs.* — 2008. — Vol. 31, № 9. — P. 771–776.
 31. Ripamonti U. Osteoinduction in porous hydroxyapatite implanted in heterotopic sites of different animal models [Text] / U. Ripamonti // *Biomaterials.* — 1996. — № 17. — P. 31–35.
 32. Ruhaimi K.A. Bone graft substitutes: A comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials [Text] / K.A. Ruhaimi // *Int J Oral Maxillofac Implants.* — 2001. — Vol. 16, № 1 — P. 105–113.
 33. Hydroxyapatite — glass composite as a bone substitute in large metaphyseal cavities in rabbits [Text] / E.A. Suominen, A.J. Aho, J. Juhanoja, A. Yli-Urpo // *Intern. Orthop.* — 1995. — Vol. 19. — P. 167–173.
 34. Vaccaro A.R. The role of the osteoconductive scaffold in syntetic bone graft / A.R. Vaccaro // *Orthopedics.* — 2002. — Vol. 25, № 5. — P. 571–578.