Некоммерческое акционерное общество
«Карагандинский медицинский университет»

УДК 616.71-002.1-085-07 На правах рукописи

РАШОВА МАДИНА ГАНИКЫЗЫ

Эффективность применения биокомпозита на основе наноцеллюлозы с антибиотиком в модели хронического остеомиелита *in vivo*

8D10100 «Медицина»

Диссертация на соискание степени доктора философии (PhD)

Научные консультанты:

заведующий кафедрой
травматологии и нейрохирургии НАО КМУ,
д. м. н. Тулеубаев Берик Еркебуланович

профессор кафедры молекулярной биологии,
биохимии и микробиологии НАО КМУ,
к. м. н. Ахметова Сауле Балтабаевна

заведующий патологоанатомическим
блоком клиники НАО КМУ,
PhD Камышанский Евгений Константинович
Зарубежный научный консультант:

заведующий кафедрой физической и коллоидной химии
Федерального государственного автономного образовательного
учреждения высшего образования «Российский государственный
университет нефти и газа имени И. М. Губкина»,
г. Москва, д. х. н., проф. Винокуров Владимир Арнольдович

Республика Казахстан
Караганда, 2026

СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ **4**
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ **5**
ВВЕДЕНИЕ **6**
ОСНОВНАЯ ЧАСТЬ
ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ **10**
1.1 Роль *S. aureus* как этиологического фактора при хроническом остеомиелите **10**
1.2 Современные костнопластические материалы **14**
1.3 Наноцеллюлоза как один из перспективных материалов в тканевой инженерии **19**
2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ **24**
2.1 Биокомпозит и животные **24**
2.2 Оценка общей токсичности **27**
2.2.1 Клинические проявления **28**
2.2.2 Гематологический профиль **30**
2.2.3 Гистологическое исследование органов **31**
2.3 Моделирование и лечение хронического остеомиелита **43**
2.4 Микробиологическое исследование **44**
2.5 ВЭЖХ-МС **46**
2.6 Статистическая обработка материалов **46**
3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ **47**
3.1 Результаты оценки общей токсичности **47**
3.1.1 Анализ клинических симптомов **47**
3.1.2 Анализ гематологического профиля **56**
3.1.3 Гистологическое исследование органов **65**
3.2 Результаты экспериментальных исследований БНЦ **108**
3.2.1Результаты определения антимикробной активности БНЦ в отношении музейных тест-штаммов *in vitro* **108**
3.2.2Результаты микробиологического мониторинга послеоперационной раны **110**
3.2.3 Результаты гистологического исследования ремоделирования биокомпозита в модели хронического остеомиелита **115**
3.2.4 Результаты количественного определения гентамицина методом ВЭЖХ-МС *in vivo* **124**
4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ **125**
ЗАКЛЮЧЕНИЕ **141**
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ **146**
ПРИЛОЖЕНИЕ А - Выписка из протокола заседания Локальной комиссии по биоэтике **158**
ПРИЛОЖЕНИЕ Б - Выписка из протокола заседания Локальной комиссии по биоэтике **159**
ПРИЛОЖЕНИЕ В - Патент на изобретение **160**

ПРИЛОЖЕНИЕ Г - Патент на изобретение **161**
ПРИЛОЖЕНИЕ Д - Патент на полезную модель **162**
ПРИЛОЖЕНИЕ Е - Патент на полезную модель **163**
ПРИЛОЖЕНИЕ Ж - Патент на полезную модель **164**
ПРИЛОЖЕНИЕ И - Свидетельство о регистрации прав на объекты авторского права **165**
ПРИЛОЖЕНИЕ К - Свидетельство о регистрации прав на объекты авторского права **166**
ПРИЛОЖЕНИЕ Л - Свидетельство о регистрации прав на объекты авторского права **167**
ПРИЛОЖЕНИЕ М - Свидетельство о регистрации прав на объекты авторского права **168**
ПРИЛОЖЕНИЕ Н - Акт внедрения **169**
ПРИЛОЖЕНИЕ П - Акт внедрения **170**
ПРИЛОЖЕНИЕ Р - Акт внедрения **171**
ПРИЛОЖЕНИЕ С - Нормы параметров общего анализа крови **172**
ПРИЛОЖЕНИЕ Т - Нормы параметров биохимического анализа крови **173**
ПРИЛОЖЕНИЕ У **-** Шкала для оценки активности остеомиелита **174**

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В диссертации учтены требования действующих нормативно-правовых актов и стандартов, регулирующих проведение экспериментальных и доклинических исследований:

ГОСТ 7.32-2017 «Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу».

ГОСТ 7.1-2003 «Библиографическая запись. Библиографическое описание. Общие требования и правила составления».

ГОСТ ISO 10993-11 – 2021 «Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследования общетоксического действия». Принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 26 августа 2021 г. № 142-П).

ГОСТ ISO 10993-6 – 2021 «Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации»». Принят Межгосударственным советом по стандартизации, метрологии и сертификации (протокол от 26 августа 2021 г. № 142-П).

Кодекс РК «О здоровье народа и системе здравоохранения» (с изменениями и дополнениями по состоянию на 04.09.2022 г.).

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 11 декабря 2020 г. № ҚР ДСМ-248/2020 «Об утверждении правил проведения клинических исследований лекарственных средств и медицинских изделий, клинико-лабораторных испытаний медицинских изделий для диагностики вне живого организма *(in vitro)* и требования к клиническим базам и оказания государственной услуги Выдача разрешения на проведение клинического исследования и (или) испытания фармакологических и лекарственных средств, медицинских изделий» (зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 14 декабря 2020 г. № 21772).

Приказ Министра сельского хозяйства Республики Казахстан от 30 декабря 2014 года № 16-02/701 «Об утверждении Правил обращения с животными» (зарегистрирован в Минюсте РК 4 февраля 2015 г. № 10183).

Приказ Министра здравоохранения Республики Казахстан от 11 декабря 2020 г. № ҚР ДСМ-255/2020 «Об утверждении правил проведения доклинических (неклинических) исследований и требований к доклиническим базам оценки биологического действия медицинских изделий» (зарегистрирован в Министерстве юстиции Республики Казахстан 15 декабря 2020 г. № 21794).

Решение Локальной комиссии по биоэтике при Карагандинском медицинском университете (протокол № 22 от 30.12.2025 г., присвоенный номер 13-1).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

EUCAST – European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
fL – фемтолитр
G – гентамицин
MCV – средний объем эритроцитов
MCH – среднее содержание гемоглобина в эритроците
MCHC – средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах
Ns – нистатин
Pg - пикограмм
SA – *Staphylococcus aureus*
АБ – антибиотик
АСК – аутологичный сгусток крови
БАК – биохимический анализ крови
БК – бедренная кость
БНЦ – биокомпозит на основе наноцеллюлозы
БС – бактериальная суспензия
ГГТ – гаммаглутамилтрансфераза
Гр- – грамотрицательные
Гр+ – грамположительные
ГФ РК – Государственная Фармакопея Республика Казахстан
ДА – двигательная активность
Исх – исходное
НАО КМУ – Некоммерческое акционерное общество «Карагандинский медицинский университет»
НЦ – наноцеллюлоза
ОАК – общий анализ крови
ОП – открытое поле
ПК – периферический квадрат
ПС – стойка на периферическом квадрате
с – секунды
с/З – средняя треть
ФГАОУ ВО «РГУ» – Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный университет нефти и газа (национальный исследовательский университет) имени И. М. Губкина»
ХО – хронический остеомиелит
ХТ – хроническая токсичность
ЦК – центральный квадрат
ЦНС – центральная нервная система
ЦС – стойка на центральном квадрате

ВВЕДЕНИЕ

Частота хронического посттравматического остеомиелита после открытых переломов составляет от 5 до 30 %, при этом инвалидизация среди пациентов достигает 50–90 % [1, 2]. Высокий процент инвалидизации связан с длительностью лечения, формированием некрозов, секвестров, вовлечением в гнойно-воспалительный процесс окружающих мягких тканей, замедлением остеорепарации. Финансовые затраты при лечении одного пациента составляют около 25 тыс. долларов [3, 4, 5]. Рецидивы после соответствующей комбинированной терапии, включающей хирургическую санацию и медикаментозное лечение, регистрируются у 20–30 %, в литературе приводятся данные о реактивации инфекции даже после 50-летнего дебютного периода [6]. Частота ампутаций пораженного сегмента составляет от 20 % [7]. Лечение хронического остеомиелита является не только медицинской, но и социально-экономической проблемой, поскольку чаще всего страдают пациенты трудоспособного возраста [1, 2, 3].

Лечение хронического остеомиелита невозможно представить без современных заполнителей. Множественная вариативность от аутокости до синтетических биополимеров указывает на непреходящую важность изыскания такого импланта, который отвечал бы всем релевантным характеристикам: остеокондуктивности, остеоиндуктивности, биорезорбируемости, биосовместимости; обеспечению механической прочности, отсутствию цитотоксичности, биологической безопасности [8].

Известно, что биоматериалы, используемые при лечении остеомиелита, должны не только заполнять костные дефекты, но и быть средством для местной доставки антибиотиков. Поскольку местная минимальная бактерицидная концентрация и минимальная концентрация эрадикации биопленки с применением антибиотиков имеют большие количественные различия. Таким образом, указанные показатели концентрации в лечении остеомиелита не могут быть достигнуты только путем системного лечения из-за образования биопленок и плохого кровоснабжения некротизированных участков [9, 10].

Создание новейших нанокомпозиционных материалов сегодня является магистральным направлением развития науки и техники [8]. Среди современных биокомпозитов набирают популярность в научной среде материалы на основе наноцеллюлозы. Наноцеллюлоза (НЦ) и биокомпозиты на ее основе в исследованиях стали одними из самых перспективных «зеленых» материалов благодаря своим уникальным свойствам [11]. Однако, известно, что при переходе от объектов традиционных линейных размеров к наноразмерным физико-химические свойства веществ изменяются кардинально. На основе своих физических и химических свойств наночастицы могут вызывать повреждение тканей и нарушение функций внутриклеточных органелл, в частности, путем индукции воспалительных реакций/цитокинов [12]. Оценка общей токсичности нового БНЦ в настоящее время не

исследовано. Изучение ее в качестве не только заполнителя, но и системы доставки антибиотиков в остеомиелитический очаг являются темой данной исследовательской работы [13].

Рабочая гипотеза

Биокомпозит на основе наноцеллюлозы с антибиотиком эффективен в модели хронического остеомиелита *in vivo.*

Цель научного исследования: оценить эффективность применения биокомпозита на основе наноцеллюлозы с антибиотиком в модели хронического остеомиелита в эксперименте.

Задачи исследования:

1. Оценить общую токсичность биокомпозита на основе наноцеллюлозы *in vivo.*
2. Оценить гистологическую картину регенерации с применением БНЦ с антибиотиком в сравнении с традиционным методом при хроническом остеомиелите.
3. Оценить БНЦ в качестве вещества для локальной доставки антибиотика *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна

1) Впервые оценена общая токсичность биокомпозита на основе наноцеллюлозы.
2) Впервые изучена гистологическая характеристика регенерации костного дефекта при применении биокомпозита на основе наноцеллюлозы с антибиотиком в модели хронического остеомиелита.
3) Впервые оценена возможность применения БНЦ в качестве локального транспорта антибиотика в очаг хронического остеомиелита.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Биокомпозит на основе наноцеллюлозы при интрамедуллярной имплантации не оказывает общего острого и хронического токсического воздействия в условиях эксперимента *in vivo.* В течение исследуемых сроков параметры соответствовали физиологической норме и не было выявлено статистически значимых различий между экспериментальной и контрольной группами по клинико-гематологическим, биохимическим и поведенческим, гистологическим показателям ($p > 0,05$).

2. Биокомпозит на основе наноцеллюлозы стимулирует репаративную регенерацию костной ткани при хроническом остеомиелите, обеспечивая более раннее и выраженное формирование костной ткани на фоне регресса воспалительно-фиброзных изменений. К 28-м и 42-м суткам объём новообразованной костной ткани в группе биокомпозита достигал 56 [49;63] и 80,8 [78; 87], соответственно, против 28,5 [20,5; 36,7] и 50 [42,5; 60,5] в контрольной группе. Одновременно отмечалось снижение выраженности воспалительной реакции в 2,0 раза ($p = 0,0008288$) и увеличение показателей восстановления костной пластинки в 2,0 раза ($p = 0,002271$), что указывает на преимущественную направленность регенеративного процесса в сторону восстановления костной ткани.

3. Биокомпозит на основе наноцеллюлозы с антибиотиком обладает антибактериальной активностью *in vitro* и обеспечивает преимущественно локальное высвобождение гентамицина *in vivo.* Антибактериальная активность биокомпозита превышала стандарт на 5 мм. На 14-е сутки концентрация гентамицина в плазме составила 0,178 [0,171; 0,253] мкг/мл в группе биокомпозита против 0,193 [0,158; 0,202] мкг/мл в контрольной группе, что соответствует снижению системной концентрации на 7,8% при отсутствии статистически значимых различий ($p > 0,05$). Полученные данные характеризуют биокомпозит как систему, обеспечивающую пролонгированное высвобождение антибиотика с преимущественной локализацией его действия в зоне костного дефекта без признаков выраженного системного накопления.

Практическая значимость: всестороннее изучение БНЦ показало отсутствие общей токсичности, что обуславливает его безопасность для дальнейшего применения. Результаты моделирования и лечения остеомиелита с помощью наноцеллюлозного биокомпозита с антибиотиком создают экспериментальную основу для заполнения костных дефектов в условиях хронического остеомиелита с гистолого-микробиологическим обоснованием. Разработанный подход может быть внедрён в экспериментальную и потенциально клиническую практику реконструктивной хирургии костной ткани с подтверждением эффективности. Результаты проведенного исследования могут быть интегрированы в образовательный процесс при подготовке студентов медицинских вузов по дисциплинам «Микробиология», «Травматология и ортопедия». Оформлено 3 акта внедрения в учебный процесс (Приложения Н, П, Р).

Связь диссертации с другими научно-исследовательскими работами

Диссертационное исследование проведено на базе НАО «Карагандинский медицинский университет» в рамках грантового проекта МОН РК № AR19678427 «Исследование взаимодействия биокомпозита на основе наноцеллюлозы в модели костного дефекта трубчатой кости в эксперименте *in vivo*».

Личный вклад автора

Рашовой М. Г. проведены интрамедуллярная имплантация БНЦ, динамическое наблюдение за животными, термометрия, взвешивание, видеосъемка и анализ поведенческих реакций, приготовление бактериальных суспензий, исследование антимикробной активности БНЦ, бакпосевы с послеоперационных ран, выделение чистых культур с последующей идентификацией микроорганизмов. Систематизация, анализ и оформление результатов исследования выполнены соискателем самостоятельно. Автором работы при консультативной поддержке научного коллектива выполнены экспериментальные исследования на лабораторных животных, включавшие изучение проявлений общей токсичности, моделирование хронического остеомиелита и его лечение с применением биокомпозита на основе наноцеллюлозы с антибиотиком.

Апробация работы

Основные результаты исследования доложены на научных мероприятиях: 1) на конференции молодых ученых «Батпеновские чтения» (г. Астана, 28–29 августа 2024 г.), проведенной в рамках IV Съезда травматологов-ортопедов РК и III Съезда Казахстанской ассоциации травматологов-ортопедов; 2) на IX Всероссийском конгрессе по медицинской микробиологии, клинической микологии и иммунологии (XXVIII Кашкинские чтения), 5–6 июня 2025 г., г. Санкт-Петербург; 3) на Международной научно-практической конференции «Современные подходы в травматологии, ортопедии и реабилитации: инновации и практическое применение», приуроченной к 110-летию профессора Х. Ж. Макажанова и 75-летию НАО «Карагандинский медицинский университет» (г. Караганда, 9–10 октября 2025 г.); 4) на Всероссийской конференции молодых ученых «Вреденовские игры», посвященной 120-летию ФГБУ «НМИЦ ТО им. Р. Р. Вредена» Минздрава России, 10 апреля 2026 г., г. Санкт-Петербург; 5) на Международном научно-практическом конгрессе «Мультидисциплинарные подходы в медицине: интеграция в клинической практике, науке и образовании», 16–17 апреля 2026 г., г. Караганда; 6) на собрании Областного общества травматологов и ортопедов по Карагандинской области 26 июня 2026 г., г. Караганда; 7) на международной юбилейной научно-практической конференции «Междисциплинарная травматология и ортопедия: от диагностики к реабилитации», посвящённой 35-летию Независимости Республики Казахстан и 25-летию РГП на ПХВ «Национальный научный центр травматологии и ортопедии имени академика Батпенова Н. Д.» МЗ РК, 10–11 сентября 2026 г., г. Астана; 8) на II Международном биомедицинском форуме «International Biomedical Forum: Research and Innovation», 21–23 октября 2026 года, г. Караганда; 9) на расширенном заседании кафедр травматологии и ортопедии, молекулярной биологии, биохимии и микробиологии.

Публикации

По результатам выполненной работы соискателем опубликовано 15 научных трудов, в том числе 4 статьи в изданиях, рекомендованных ККСОН МНВО РК, и 2 статьи в журналах, индексируемых международной базой данных Scopus (39 % и 52 % соответственно на дату публикации). Также получены 5 патентов и 4 свидетельства о государственной регистрации прав на объекты, охраняемые авторским правом. Оформлено 3 акта внедрения.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа имеет объем 174 страницах и выполнена с использованием текстового редактора Microsoft Word. Работа включает введение, четыре раздела основной части, заключение и список использованной литературы. В качестве дополнительных материалов представлены 17 приложений. Основной текст сопровождается 36 таблицами и 21 рисунком. Библиографический список сформирован из 155 источников на русском и английском языках.

1 ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Успешность лечения хронического остеомиелита зависит от двух основных факторов: эрадикации инфекционного агента и выбора оптимального заменителя кости. Для реализации первого фактора требуется раскрытие патогенетических процессов, приводящих к хронизации инфекции кости, что интерпретируется через понятие «этиологический агент», в том числе и «биопленкообразование». Подбор идеального материала для замещения костной ткани характеризуется множественными критериями: биосовместимость, остеокондуктивность, остеоиндуктивность, остеогенность, контролируемая биодеградация, механическая прочность, пористость и взаимосвязанная архитектоника, способность к васкуляризации, антимикробные свойства, технологичность и клиническая применимость.

1.1 Роль *S. aureus* как этиологического фактора при хроническом остеомиелите

Хронический остеомиелит представляет собой полиэтиологическое инфекционно-воспалительное заболевание, микробиологическая структура которого отличается значительным разнообразием и зависит от механизма инфицирования, локализации процесса, наличия металлоконструкций, предшествующей антибактериальной терапии и региональных особенностей циркуляции возбудителей. В отличие от острого гематогенного остеомиелита, при хронической форме заболевания микробный спектр существенно шире и включает как грамположительные, так и грамотрицательные бактерии, анаэробы, а в отдельных случаях — грибы. При этом нередко выявляются полимикробные ассоциации, формирующие сложные микробные сообщества, способные поддерживать длительное персистирование инфекции и снижать эффективность проводимой антибактериальной терапии [14].

Несмотря на географические различия в структуре возбудителей хронического остеомиелита, результаты крупных международных исследований последних лет свидетельствуют, что во всех регионах мира доминирующим этиологическим агентом остается *Staphylococcus aureus*. По данным современных систематических обзоров, его доля среди всех выделяемых возбудителей варьирует от 30 до 60 %, достигая наиболее высоких значений при гематогенном остеомиелите и несколько снижаясь при посттравматических и имплант-ассоциированных инфекциях вследствие увеличения частоты полимикробных инфекций. В странах Европы и Северной Америки *S. aureus* сохраняет лидирующее положение, при этом значительную проблему представляет распространение метициллин-резистентных штаммов *(MRSA),* доля которых в различных исследованиях составляет 10–40 % среди всех изолятов *S. aureus*. В странах Азии наряду с высокой частотой выделения *S. aureus* отмечается увеличение роли грамотрицательных микроорганизмов *(Pseudomonas aeruginosa, Klebsiella pneumoniae, Escherichia coli, Acinetobacter baumannii),* особенно при посттравматическом и послеоперационном

остеомиелите. В странах Африки и Латинской Америки, несмотря на ограниченность эпидемиологических данных, *S. aureus* также остается ведущим возбудителем заболевания, тогда как вклад других микроорганизмов определяется преимущественно локальными особенностями антибиотикорезистентности и доступностью специализированной медицинской помощи. Таким образом, независимо от региона мира именно *Staphylococcus aureus* рассматривается как основной этиологический фактор хронического остеомиелита, что обусловлено его высокой адгезивной активностью, способностью к внутриклеточной персистенции, формированию сообществ и быстрому приобретению устойчивости к антимикробным препаратам [14, 16, 17, 18].

В Республике Казахстан, как и в большинстве стран мира, ведущим возбудителем хронического остеомиелита остается *Staphylococcus aureus.* По данным исследований, выполненных в г. Караганде, *S. aureus* является наиболее часто выделяемым микроорганизмом у пациентов с хроническим посттравматическим остеомиелитом, тогда как среди других возбудителей встречаются *Staphylococcus epidermidis, Pseudomonas aeruginosa,* представители семейства *Enterobacterales и Enterococcus spp.* Полученные результаты соответствуют мировым тенденциям, свидетельствующим о доминирующей роли *S. aureus* в этиологии хронических инфекций костной ткани, несмотря на увеличение доли полимикробных ассоциаций и грамотрицательных микроорганизмов при посттравматических формах заболевания [2].

Staphylococcus aureus рассматривается как основной патоген хронического остеомиелита благодаря сочетанию высокой вирулентности и комплекса механизмов персистенции. Эти свойства позволяют ему длительно сохраняться в костной ткани, избегать элиминации иммунной системой и снижать эффективность антибактериальной терапии. Одним из ключевых механизмов, определяющих хронизацию инфекционного процесса и развитие рецидивов, является способность микроорганизма к образованию биопленок. С учетом изложенного, изучение процессов такого особого существования микроорганизмов имеет принципиальное значение для понимания патогенеза хронического остеомиелита [15].

Биопленки представляют собой сложный полимерный матрикс, образующийся и прикрепляющийся к поверхности сред, содержащий структурно организованное сообщество микроорганизмов, обладающих более высокой толерантностью к антибиотикам, чем планктонные формы [19]. Теорией данных ассоциаций объясняется этиология 65-80 % хронических инфекционных заболеваний, при этом их многообразие указывает на способность большинства бактерий к росту в этих самогенерируемых экосистемах [20, 32]. Термин был введен в 1987 г. американским исследователем J. Costerton [21]. Существуют две большие группы микробных сообществ, разделение которых обусловлено средой образования. Первая группа связана с инородными телами, внедряемыми в организм человека:

импланты, различные катетеры, эндотрахеальные трубки, линзы, заменители ткани и др. Вторая когорта включает их развитие без участия чужеродных предметов на метаболических средах и тканях внутри организма (камни, тонзиллиты, дентальные бляшки и т. д.).

«Гонка за поверхность», описанная A. G. Gristina в 1988 г., между клетками хозяина и патогенными микроорганизмами предопределяет развитие данных ассоциаций [22]. После имплантации биоматериал покрывается внеклеточным матриксом, состоящим из фибронектина, фибриногена, альбумина, витронектина, коллагена и комплемента [23]. Существует несколько этапов в формировании микробных сообществ: обратимое прикрепление, образование внеклеточного матрикса – необратимая фиксация, рост, созревание и фрагментация [24]. После прикрепления *SA* с помощью адгезинов, тейхоевых кислот, сортазы к биотической или абиотической поверхности происходит его размножение с образованием микроколоний. Они удерживаются внутри матрикса благодаря продукции полисахаридного межклеточного адгезина – гомополимера N-ацетилглюкозамина, который кодируется генами оперона *icaABCD* и скрывает микроорганизмы от фагоцитоза хозяина [23, 24]. Стадия созревания характеризуется секрецией гликокаликса, состоящего из бактериальных экзополисахаридов. Его функциональность состоит в захвате минералов и питательных веществ из окружающей среды, обеспечении механического закрепления и стабильности, защите от иммунного ответа. Также он является средой для трансколониальной коммуникации *«quorum sensing»* - обмен сигнальными молекулами и ДНК, что определяет уникальный фенотип и генотип микробных популяций [25]. Процесс фрагментации характеризуется условием, возникающим из-за нехватки питательных веществ и кислорода, так бактерии в активной зоне открепляются и создают новые ассоциации [23, 24]. При изучении архитектуры микробных сообществ обращает на себя внимание соотношение объемов, при котором микроколонии составляют лишь 15–20 %, а экзополимерный матрикс формирует 75–85 %. Матрикс содержит полисахариды, амилоидоподобные белки, внеклеточную ДНК. Также в толще колоний находятся клетки-персистеры, обладающие высокой устойчивостью к антибиотикам и вызывающие рецидивы инфекции.

В состоянии подобного сосуществования бактерии приобретают другой уровень метаболической активности и могут фенотипически отличаться от своего планктонного аналога. Shengpeng Yu с соавт. на 137 изолятах показали взаимосвязь между образованием микробных сообществ и различными генетическими и фенотипическими характеристиками ортопедических штаммов *S. aureus*, так штаммы *ST88, t377* и *ST630-MSSA-t377* образуют очень прочные связи, в то время как типы *MLST ST15, ST25, ST398, ST5, ST59* и *cna - типы t002, t2325, t437* имеют тенденцию образовывать более слабые биопленки [26].

Сравнительный анализ *MRSA и MSSA* штаммов *S. aureus* продемонстрировал, что экспрессия транскриптов *yycF, yycG и yycH*,

отвечающих за рост бактерий, экспрессия гена *ica*, ответственного за кодирование важного белка полисахаридной межклеточной адгезии (PIA), увеличенная биомасса сообществ выше именно у *MRSA*. Данными положениями авторы объясняют высокую вирулентность *MRSA*, который часто выступает в качестве этиологического фактора при хроническом остеомиелите [27].

Основными факторами устойчивости данных ассоциаций являются:

– α-токсин, вызывающий повреждение мембран макрофагов и последующую гибель этих клеток;

– лейкотоксины *LukSF, HlgAB* и *HlgCB, LukED* и *LukAB,* изменяющие функциональное состояние макрофагов;

– стафилококковый ингибитор комплемента (*SCIN*), который блокирует классические пути комплемента;

– белок, ингибирующий хемотаксис стафилококков (*CHIPS*);

– фактор слипания А (*ClfA*) и белок внеклеточной адгезии (*Eap*);

– изменение генотипа за счет «*quorum sensing*» [23].

В клинической диагностике микробных сообществ отсутствуют патогномоничные симптомы, и лишь нарастание признаков интоксикации, предрасполагающие состояния пациента в анамнезе, персистирующая инфекция, неэффективность лечения антибиотиками могут опосредованно указывать на образование ассоциаций. Неинвазивные УЗИ, обзорные рентгенограммы, КТ, МРТ также не позволяют напрямую устанавливать наличие инфекции. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия является эталоном диагностики, которая предоставляет возможность визуализации динамики бактериальных популяций и их взаимодействие в собственной трехмерной среде [28]. Все вышеперечисленные структурно-функциональные особенности объясняют высокую резистентность бактериальных клеток до 1000 раз, чем у планктонных форм, что требует значительно более высоких концентраций антибиотиков в очаге для лечения [29].

Альтернативные методы лечения, описанные в последних статьях научного сообщества Adriana Vollaro с соавт. сообщают, что гетероциклическое кортикостероидное производное дефлазакорта – прегнадиен-11-гидрокси-16α,17α-эпокси-3,20-дион-1 (PYED-1) обладает ингибирующим действием в отношении ассоциаций, образованных *S. aureus ATCC 29213*, при этом соединение не только предотвращает их синтез, но и разрушает уже сформировавшуюся ассоциацию в результате подавления экспрессии генов, относящихся к кворуму (*agrA*, *RNAIII*, *hld*, *psm*, *sarA*), поверхностных белков (*clfB* и *fnbB*), секретируемых токсинов *(hla*, *hlb*, *lukD)* и капсульных полисахаридов (*capC*), что выявлено при транскрипционном анализе [30]. Приводятся данные об ингибирующей роли липотейхоевой кислоты, выделяемой от *Lactobacillus plantarum (Lp.LTA),* в отношении популяций *S. aureus*. *Lp.LTA* подавляет экспрессию оперона *ica*, ответственного за синтез поли-N-ацетилглюкозамина – ключевого компонента

биопленкообразования. При этом в экспериментах *in vitro* было продемонстрировано, что *Lp.LTA* блокирует их не только на ранних стадиях формирования, но и на поздних: 0, 3, 6, 12, 24 и 48 часов [31].

Ausbacher D. с соавт. заявляют о бактерицидных свойствах α,α-дизамещенные β-аминоамидов, представляющих собой небольшие противомикробные пептидомиметики с молекулярной массой менее 500 Да. Инкубация биопленок в течение одного часа приводила к снижению метаболической активности и проницаемости мембран *S. aureus (ATCC 25923).* Бактерицидные свойства этих производных объясняются прямым действием на мембраны бактерий, при этом вид A3 вызвал одновременную потерю флуоресценции сообщества и удаление биомассы при конфокальной лазерной сканирующей микроскопии [32].

Минимальная бактерицидная концентрация 1,4-Нафтохинон в исследованиях Paul P. составила 100 мкг/мл против *Staphylococcus aureus*. Данное соединение, помимо подавления метаболизма микробных популяций, также снижает подвижность *S. aureus*. Оно еще увеличивает накопление в клетках активных форм кислорода, что ведет к ингибированию образования ассоциаций [33]. Антимикробная активность производного хинолина *HT61* в отношении ассоциаций *S. aureus* рассмотрена в работе Frapwell C. J. Соединение было одинаково эффективно против сообществ и планктонных культур, что указывает на преимущество в отношении неделящихся клеток биопленочного фенотипа [34].

Анализ приведенных выше результатов исследований говорит об активном поиске средств для подавления микроорганизмов, в том числе и *S. aureus*. Предложенные вещества могут выступить потенциальными терапевтическими компонентами, однако требуется дальнейшая экспертиза для клинической апробации с оценкой безопасности и переносимости доз с целью снижения заболеваемости инфекциями, связанными с *S. aureus*. Необходимо продолжить поиск методов борьбы с микроорганизмами в составе различных колоний. Одной из актуальных проблем терапии хронического остеомиелита остается ограниченная возможность применения антибактериальных средств непосредственно в очаге инфекции. В связи с этим особое внимание уделяется разработке подходов, позволяющих обеспечить высокую локальную концентрацию антибиотика в зоне поражения при минимальном системном воздействии.

1.2 Современные костнопластические материалы

Одним из актуальных направлений реконструктивной ортопедии является применение биотехнологии. Множественная вариативность в научных исследованиях от аутокости до синтетических биополимеров указывает на непреходящую важность изыскания такого импланта, который отвечал бы всем релевантным характеристикам. Заменителем кости является биоматериал человеческого, животного, растительного или синтетического генеза, имплантируемый в организм для восстановления и укрепления

костного вещества [35]. При этом свойства, которыми должен обладать заполнитель, условно можно разделить на биологические, физические и химические.

К биологическим критериям относятся: остеокондуктивность, остеоиндуктивность, биорезорбируемость, биосовместимость. К физическим – обеспечение механической прочности, к химическим – отсутствие цитотоксичности, биологическая безопасность. Остеоиндукция – это направление недифференцированных мезенхимальных стволовых клеток в образование остеопрогениторных клеток не только в костных ложах, но и в эктопических участках. Остеокондукция – это трехмерный процесс врастания вновь образующихся капилляров, периваскулярной ткани и остеопрогениторных клеток из костного ложа в трехмерную структуру пористого имплантата. Стоит отметить, что помимо вышеперечисленных свойств имплантат, применяемый при лечении остеомиелита, должен обладать антибиотической, абсорбционно-кумулятивной способностью, то есть служить системой доставки лекарственных препаратов в очаг и не потенцировать действие микроорганизмов.

Представленная классификация (Рисунок 1), предложенная M. L. Wickramasinghe, демонстрирует все виды материалов, использующихся на сегодняшний день в костной инженерии [8].

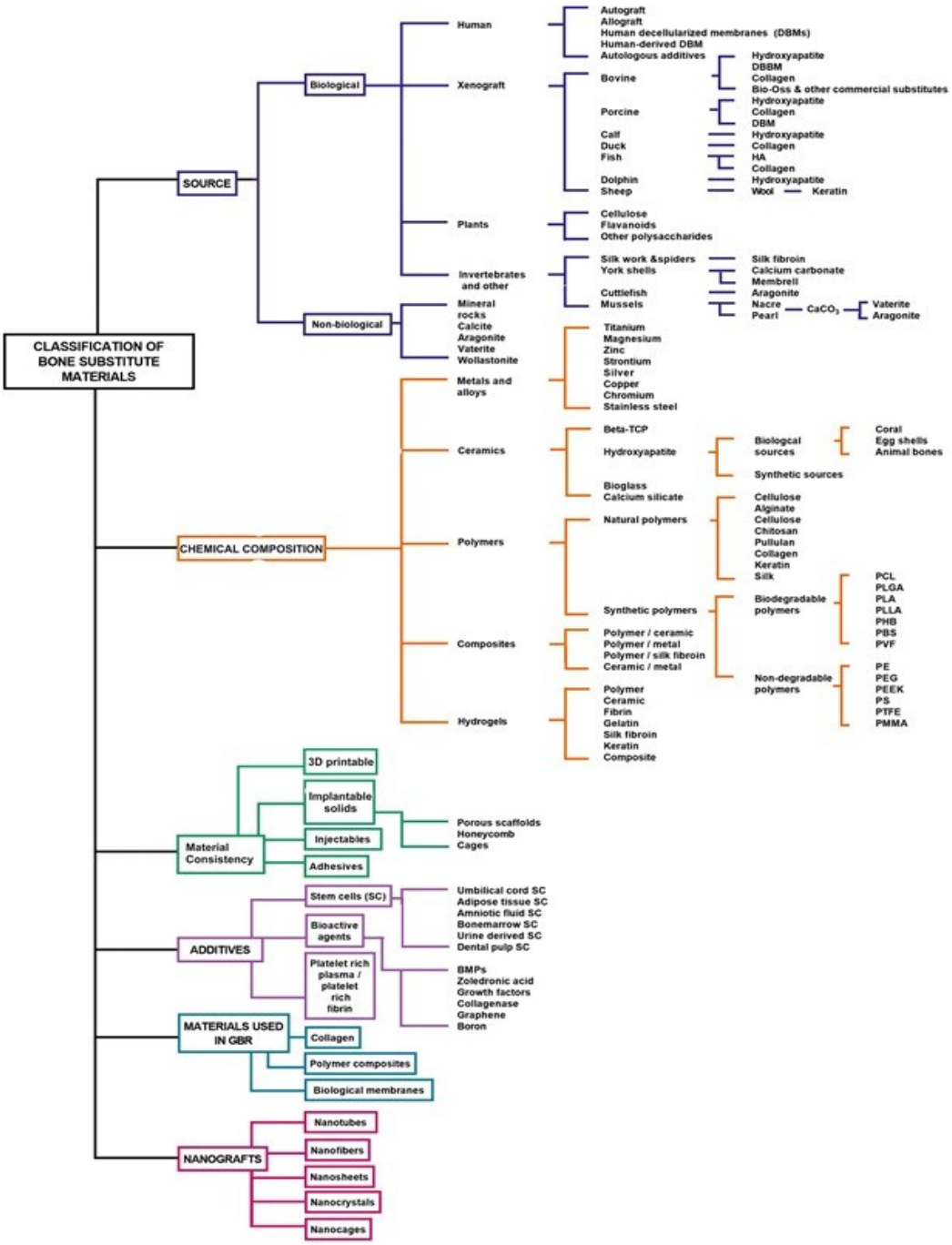


Рисунок 1 – Новая классификация заменителей кости, Wickramasinghe, M. L. [8]

На текущий момент классификация, представленная на Рисунке 1, является наиболее полной, отражает всё многообразие существующих вариантов биоматериалов в мировой науке. Разнообразие видов свидетельствует о том, что исследования в этой области будут продолжаться. Вероятно, в дальнейшем классификация будет совершенствоваться, расширяться в связи с открытием новых вариантов обработки биологических тканей и синтеза новых биокомпозитов.

Далее рассмотрим основные биоматериалы, применяемые в клинике и в экспериментах. Кальцийсодержащие заполнители в клинической практике позволяют успешно их применять благодаря выраженным

остеокондуктивным свойствам, остеорезорбируемости, достаточной скорости элюирования антибиотика и возможности одноэтапного хирургического вмешательства. В Таблице 1 приведены основные композиты, применяемые в лечении костной патологии.

Таблица 1 - Препараты на основе сульфата кальция для лечения инфекций опорно-двигательного аппарата

Препарат, состав, форма выпуска/ ссылка	**Объем выборки, пациенты/ Осложнения**	**Особенности исследования**
OsteoSet-T® [36] -сульфат кальция; - 4% тобрамицина; -гранулы 3 мм; 4,8 мм	21 -серозное отделяемое у 33%; -у 1 пациента повторная санация	- нет контр. группы; - малая выборка; - срок наблюдения - 6 мес.
Stimulan® [37] - сульфат кальция; - ванкомицин у 90%; -гранулы 3/4,8/6/7/9 мм	106 -у 6 пац. (5,6%) сепсис и летальный исход от сопутствующих заболеваний; -персистенция инфекции у 5 чел. (5%); -несращение у 4 (4,2 %)	- нет контр. группы; - срок наблюдения - 20 мес.
Cerament® [38] -60% сульфат кальция + 40% гидроксиапатит; - гентамицин – G, ванкомицин – V	20 -у 10 (50%) ревизионная операция	- нет контр. группы; - малая выборка; - срок наблюдения - 20 мес.
PerOssal® [39] -48.5% сульфат кальция + 51,5% нанокристаллы гидроксиапатита; -ванкомицин 86,0%; -гранулы 6 мм	93 -длительное асептическое дренирование у 8,6%	- нет контр. группы; - Rg только у 58 (62,3 %) пациентов: отсутствие заполнения дефекта через 6 мес. у 42; частичное – у 16. Через 12 мес: отсутствие – в 12 случаях (20,7%); частичное – у 24 (41,4%); полное – 22 (37,9%)

Представленные в Таблице 1 коммерческие названия заменителей костной ткани прошли все фазы клинических исследований, однако при их

использовании необходимо учитывать уровень Ca в сыворотке и сопутствующие заболевания, сопровождающиеся гиперкальциемией. В связи с вышесказанным существуют ограничения в объеме применяемых гранул до 40 мл на одну операцию (80 мл при интрамедуллярном использовании) [40].

Далее рассмотрим другие основные биокомпозиты и материалы, применяемые для борьбы с остеомиелитом, находящиеся на экспериментальном этапе исследования. Padrão T. с соавт. разработали гепаринизированный биокомпозит на основе полиуретановой губки, пропитанной наногидроксиапатитом и раствором коллагена из бычьего ахиллова сухожилия, при этом данные гранулы, изготовленные при 1050 °C, показали более стабильную механическую прочность, чем при 830 °C. Оценка на сжатие определялась по кривым напряжения-деформации и составила для nanoHA_830 – 0,06 ± 0,04 МПа; для nanoHA_1050 – 0,21 ± 0,06 МПа. Длительное высвобождение ванкомицина (19 дней) с ингибированием роста *MRSA*, профилактика образования ассоциаций и отсутствие цитотоксичности дают основание полагать, что данный биокомпозит может быть избран в качестве системы доставки антибиотика в остеомиелитический очаг [41]. Последующие экспериментальные исследования данной группы ученых в 2023 г. на модели овец подтвердили ранее достигнутые результаты *in vitro* [42]. Требуются дальнейшие испытания биокомпозита для клинической апробации.

Использование мезенхимальных стромальных клеток в эксперименте на кроликах [43] и мышах [44] показало, что их применение усиливает остеобластогенез и ангиогенез, так после окончания лечения в основной группе исследования выявлялись новообразованные костные трабекулы, при этом они были более зрелыми и эффективнее заполняли зону дефекта (100 % против 60,0 % контрольной группы). Стволовые клетки могут стать одним из альтернативных пластических биоматериалов в регенеративной ортопедии. Тем не менее, по данным литературы, отсутствует информация об эффективности в отношении *MRSA*. Для создания стандартизированного подхода к клеточной терапии требуется проведение дополнительных изысканий с целью прояснения механизмов их воздействия, а также серия тестов, направленных на оценку безопасности, что в перспективе обеспечит надежную основу для клинического применения.

Хитозан – катионный полисахарид, получаемый из моллюсков в результате деацитилирования хитина. В ряде доклинических исследований доказана нетоксичность, биосовместимость, биоразлагаемость, также пролонгированное высвобождение антибиотика до 5 недель, так данный продукт может применяться в качестве системы местной доставки антибиотиков при лечении остеомиелита [45, 46, 47, 48]. Требуется дальнейшая клиническая апробация полимера и проведение исследований с группами контроля.

Среди групп «других материалов» следует особо отметить аутоткани. Ряд авторов сообщает о применении перфорантных мышечных лоскутов для заполнения остеомиелитической полости, однако подготовка лоскута на

ножке, кровопотеря, удлинение наркоза, малая выборка, повреждение здоровой мышцы, отсутствие контрольных групп сравнения, ограниченный срок наблюдения – эти факторы не дают в полной мере оценить данный биоматериал, и он не может быть рекомендован для повсеместного применения [49, 50, 51, 52].

Золотым стандартом из небиодеградируемых имплантатов остается цемент, применяемый в виде бус или шариков, что уменьшает мертвое пространство при заполнении дефекта. Выбор антибиотика (должны быть водорастворимыми для приготовления кет, термостабильными – из-за экзотермической реакции полимеризации), повышение устойчивости к антибиотикам (считается, что после высвобождения большинства антибиотиков из ПММА оставшиеся приводят к субингибирующим концентрациям, вызывая мутационную устойчивость), отсутствие биологических свойств для остеоинтеграции, дополнительное вмешательство для их удаления через некоторое время – являются критериями, которые необходимо учитывать при применении данного материала [56].

Марбургская система костного банка характеризуется заготовкой костного аллотрансплантата – забор головки бедренной кости от живого донора во время артропластики. К ограничениям Марбургской системы относятся неполная инактивация термоустойчивых бактериальных спор и необходимость предварительного обследования доноров, включая серологическое тестирование [58]. Большое разнообразие материалов для костной имплантации свидетельствует о высоком научном потенциале в решении проблемы заполнения остеодефектов и непрерывном развитии этой области.

1.3 Наноцеллюлоза как один из перспективных материалов в тканевой инженерии

Наноцеллюлоза представляет собой перспективный материал природного происхождения, обладающий комплексом свойств, определяющих возможности его применения в биомедицине. К ним относятся высокая удельная поверхность, малая масса, прочностные и термостабильные характеристики, а также способность к биологическому разложению и хорошая совместимость с тканями организма [11]. НЦ считается подходящей платформой для доставки лекарств, белков и плазмид [54]. Согласно известным данным, системы на базе наноцеллюлозы эффективно замедляют процесс высвобождения лекарственных препаратов [57]. Перспективными направлениями ее использования являются биомедицинские технологии, разработка материалов для тканевой инженерии и имплантации, создание функциональных упаковочных и текстильных материалов, аддитивное производство, а также технологии очистки воды и биокатализа [59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69] (Рисунок 2).

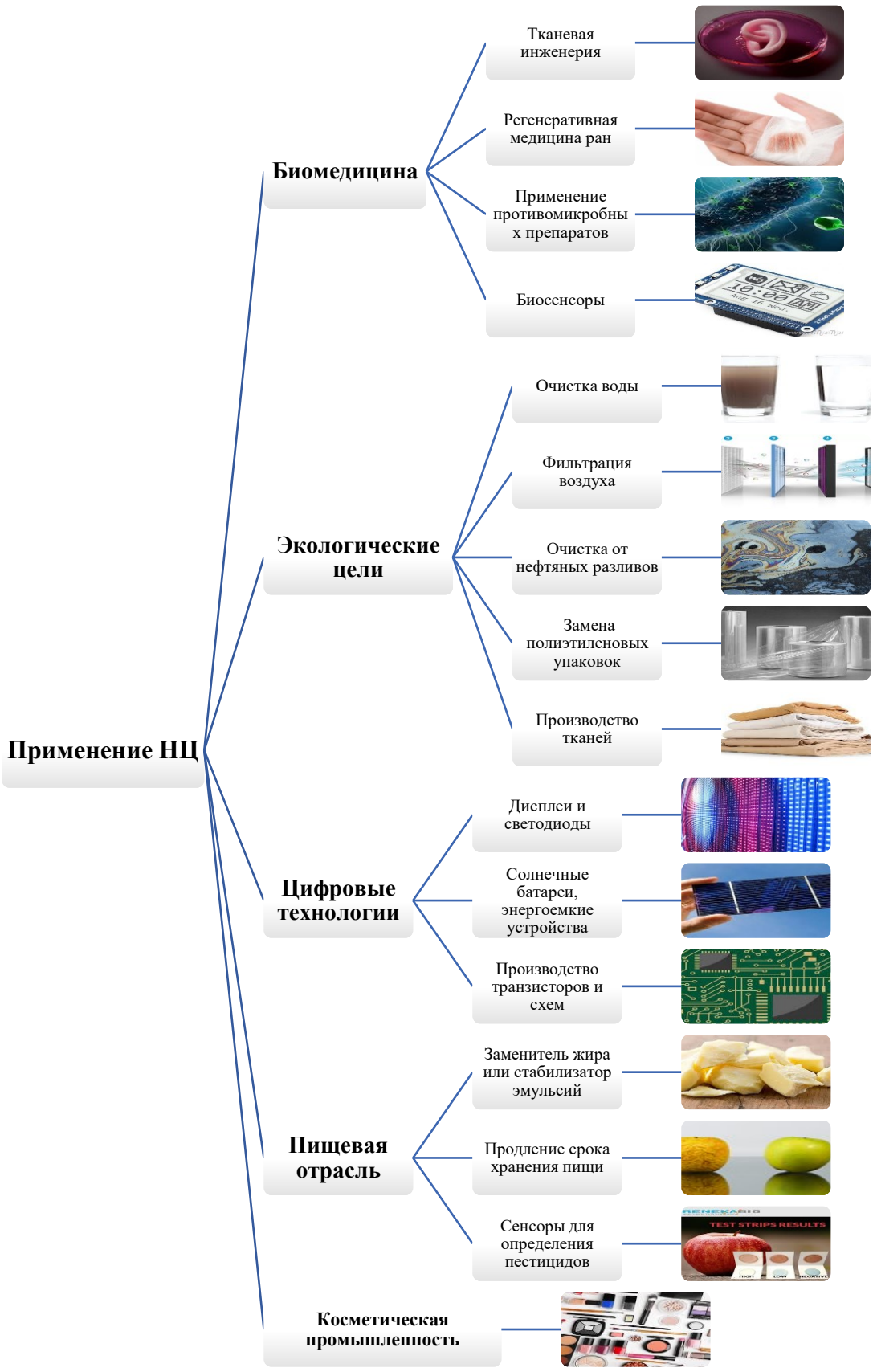


Рисунок 2 – Сферы применения наноцеллюлозы [70]

Как видно из Рисунка 2, широкий спектр применения данного материала подтверждает его высокую востребованность в различных областях естественных наук, как в исследовательских, так и в прикладных целях [70].

1.3.1 Происхождение наноцеллюлозы

Наноцеллюлоза может быть получена из широкого спектра целлюлозосодержащего сырья растительного, микробного и водного происхождения [71]. Растительные отходы и побочные продукты сельскохозяйственного производства рассматриваются как доступная и перспективная основа для ее получения. В качестве исходного сырья используют древесину, хлопок, рисовую и пшеничную солому, банановые листья, кукурузные початки, кокосовую шелуху, сахарный жом, сизаль и другие растительные материалы [72]. В последние годы расширяется перечень нетрадиционных источников наноцеллюлозы. Исследования демонстрируют возможность ее получения из кофейной гущи, имбиря, отходов кожуры дуриана, семян лимона, окары, гороховой шелухи, тростниковых растений, каучукового дерева и отходов чайного производства [73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81]. Продуцентами бактериальной НЦ являются: *Acetobacter xylinum, Achromobacter, Agrobacterium, Acanthamoeba, Alcaligenes, Rhizobium, Pseudomonas, Sarcina* и виды водорослей *Cladophora, Rhizoclonium, Microdiction и Chaetomorpha* [82]. Из водорослей рода *Cladophora* были получены устойчивые прозрачные гелевые структуры после интенсивной ультразвуковой обработки [83]. Еще одним перспективным источником является оболочник *Styela clava,* из которого выделенная целлюлоза исследовалась для создания хирургических нитей, рассасывающихся гемостатических материалов, тканеинженерных каркасов и мембран для гемодиализа [84].



Рисунок 3 – Источники НЦ [70]

Как демонстрирует Рисунок 3, множественность источников НЦ говорит нам о непрекращающемся поиске и неисчерпаемой перспективности данного материала, а также свидетельствует о неизученном потенциале каждого из видов в полном объеме.

1.3.2 Наноцеллюлоза в качестве депо (системы доставки) лекарственных средств в исследованиях *in vitro*

В научной литературе наноцеллюлоза рассматривается как перспективный носитель антибактериальных агентов, что обусловлено сочетанием ее высокой удельной площади поверхности с превосходными механическими характеристиками, включая жесткость и прочность [54]. Так, V. Bundjaja с соавт. в своей работе показал адсорбционную способность нанокристаллической наноцеллюлозы и ее модифицированной формы по отношению к тетрациклину, которая составила13,97-18,11 мг/г (при 60 °C), также оценил эффективность кинетического высвобождения антибиотика из биополимера – 18,28 % при pH 3 и 55,49 % при pH 7 [55]. В работе Панайтеску с соавт. (2018) был разработан композит на основе поли(3-гидроксибутирата) и наноцеллюлозы, модифицированный наночастицами оксида цинка (ZnO). Использование данного метода позволило существенно улучшить физико-механические характеристики материала, а также обеспечить выраженный антибактериальный эффект в отношении штаммов *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus* [85]. Сочетание наночастиц серебра с наноцеллюлозой показало хороший антимикробый эффект в отношении *B. subtilis, E. coli* и *S. aureus, P. aeruginosa* [87]. В других исследованиях пленки из хитозана с наноцеллюлозой, обработанные плазмой показали высокую зону ингибирования и 99 % снижение роста *E. coli* [89]. Антифунгицидный и антибактериальный потенциал продемонстрировала НЦ в комплексе с аллицином (органическое соединение, образующееся при механическом разрушении клеток чеснока) и лизоцимом против *Aspergillus niger*, *C. albicans*, *S. aureus* и *E. coli* [90]. Ряд исследований находится на доклинической апробации, требуется дальнейшее изучение высвобождения лекарств *in vivo* на животных.

1.3.3 Биосовместимость и токсичность наноцеллюлозы

Известно, что материалы, используемые в построении каркасов, должны обладать следующими свойствами биосовместимости и биоразлагаемости; механической жесткости и гибкости; подходящей топографией и химией поверхности; высоким отношением площади поверхности к объему; подходящим размером пор и большей пористостью [91, 92].

Уникальные свойства наноцеллюлозы привели к тому, что в последнее время она стала рассматриваться как один из наиболее перспективных «зеленых» материалов. В зависимости от способа получения и источника сырья выделяют три основные разновидности данного полимера: нанокристаллическую, нанофибриллярную и бактериальную наноцеллюлозу [93]. Биосовместимость нановолокнистых каркасов НЦ обусловлена их

трехмерной архитектурой, которая создает оптимальные условия для клеточной инфильтрации и последующей пролиферации [94]. De Loid G. M. с соавт. при проведении токсикологического анализа обнаружили, что не было никаких существенных изменений в сывороточных маркерах, гематологии и гистоморфометрии между контрольной группой и крысами, получавшими суспензию НЦ [53]. В исследованиях Weihua Luo с соавт. показали, что каркасы из нанокомпозита с НЦ улучшили прикрепление клеток и усилили пролиферацию клеток *in situ*, что указывает на низкую цитотоксичность и хорошую цитосовместимость. Также результаты данной работы продемонстрировали, что НЦ имеет превосходные механические свойства, биосовместимость, способность к биоминерализации и биоактивность по сравнению с полимолочными скаффолдами [95]. Ряд ученых фиксирует высокий хондрогенный потенциал НЦ для 3D-биопечати хрящевой ткани: при оценке биосовместимости данные показали увеличение количества клеток и метаболизма в течение 21 дня. Установлено, что стимуляция экспрессии хондрогенных генов и интенсификация синтеза компонентов внеклеточного матрикса открывают широкие возможности для биоинженерного получения хрящевых имплантатов для реконструкции ушной раковины и носовой перегородки [69]. Биочернила на основе наноцеллюлозы-альгината с добавлением гидроксиапатита и оксида графена продемонстрировали хорошую биосовместимость и высокую экспрессию остеогенных маркеров, что говорит нам об остеоиндуктивных свойствах НЦ [96].

Таким образом, наноцеллюлоза считается биосовместимым наноматериалом и относительно безопасным для биомедицинских применений. Однако для доказательства этой гипотезы необходимы дополнительные исследования, в том числе те, которые связаны с хроническим воздействием наноцеллюлозы. Данная научная работа направлена на всестороннее изучение взаимодействия БНЦ с живым организмом с длительным сроком наблюдения, также на оценку возможности применения БНЦ при инфекционном хроническом отягощении, таком как остеомиелит. На данный момент нет ни одного исследования об использовании БНЦ в модели хронического остеомиелита *in vivo*.

2МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В данной диссертационной работе материалом исследования выступил БНЦ, разработанный и предоставленный кафедрой физической и коллоидной химии ФГАОУ ВО «РГУ нефти и газа (национальный исследовательский университет) имени И. М. Губкина» (г. Москва) под руководством зав. кафедрой, д. х. н., проф. Винокурова В. А.

Изучено влияние БНЦ *in vitro* на микроорганизмы и на макроорганизм при интрамедуллярной имплантации без и с инфекционным агентом. Использовались следующие методы: хирургический, микробиологический, гистологический, лабораторный, статистический.

Исследование проводилось в НАО «Карагандинский медицинский университет» на базе кафедры травматологии и нейрохирургии, микробиологическая часть осуществлена на каф. молекулярной биологии, биохимии и микробиологии под руководством профессора кафедры, к. м. н. Ахметовой С. Б. Гистологическое исследование проводилось в патологоанатомическом блоке клиники НАО КМУ под руководством заведующего ПАБ, PhD, Камышанского Е. К. Часть лабораторных исследований проводилась в научно-исследовательской лаборатории под руководством заведующей НИЛ, PhD, ассоциированного профессора Лавриненко А. В. Экспериментальная часть была выполнена в виварии медицинского университета.

2.1 Биокомпозит и животные

Биокомпозит

Исследование посвящено биокомпозиту на основе нанофибриллярной целлюлозы и дигидрата дикальцийфосфата. НЦ, обладающая развитой удельной поверхностью (100–200 м²/г) и сочетающая аморфные и кристаллические области, была получена путем восьмикратной механической обработки отбеленной целлюлозы на коллайдере Masuko MKCA. Полученные нановолокна имели средние параметры: диаметр 12 нм, длина 1,5 мкм. Синтез композита осуществлялся путем взаимодействия 0,05 моль $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ (в суспензии НЦ) и 0,05 моль $Ca(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$. Второй раствор вводился в первый по каплям при постоянном контроле pH (6–6,5, аммиак) и перемешивании (400 об/мин). После часовой выдержки при комнатной температуре продукт выделяли вакуумной фильтрацией, промывали деионизированной водой и высушивали при 40 °C до постоянной массы.

Лабораторные животные

Эксперимент проводился на 80 беспородных крысах-самцах массой 200-250 граммов, содержавшихся в виварии НАО КМУ. Животным был обеспечен свободный доступ к корму и воде (ad libitum). Ежедневно проводилась текущая уборка клеток. Еженедельно осуществлялась генеральная уборка клеток с применением дезинфицирующих средств. Все манипуляции, связанные с содержанием животных, проведением процедур и анализом

полученных данных, соответствовали установленным стандартам ГОСТ ISO 10993-11— 2021, ГОСТ ISO 10993-6— 2021, ГОСТ ISO 10993-2— 2025.

Расчет численности животных в экспериментальных группах определяли с использованием метода Mead (resource equation), рекомендуемого для доклинических исследований при отсутствии достаточных предварительных данных о величине ожидаемого эффекта и дисперсии показателей.

$$\mathbf{E=N-G}$$

Формула № 1. Метод Mead, где **N** — общее число животных, **G** — число групп, **E** — число степеней свободы ошибки.

При включении 8 животных в каждую группу и двух сравниваемых группах общее число животных составило 16, а значение ресурса ошибки — $E = N - G = 16 - 2 = 14$, что соответствует рекомендуемому диапазону 10–20. Выбор 8 животных на группу обеспечивает достаточную статистическую чувствительность для выявления межгрупповых различий по морфологическим, микробиологическим, гематологическим и биохимическим показателям при исследовании токсичности и модели экспериментального остеомиелита у крыс. Одновременно такой объем выборки соответствует принципу сокращения числа лабораторных животных (Reduction), исключая как недостаточную мощность исследования, так и неоправданное увеличение численности животных.

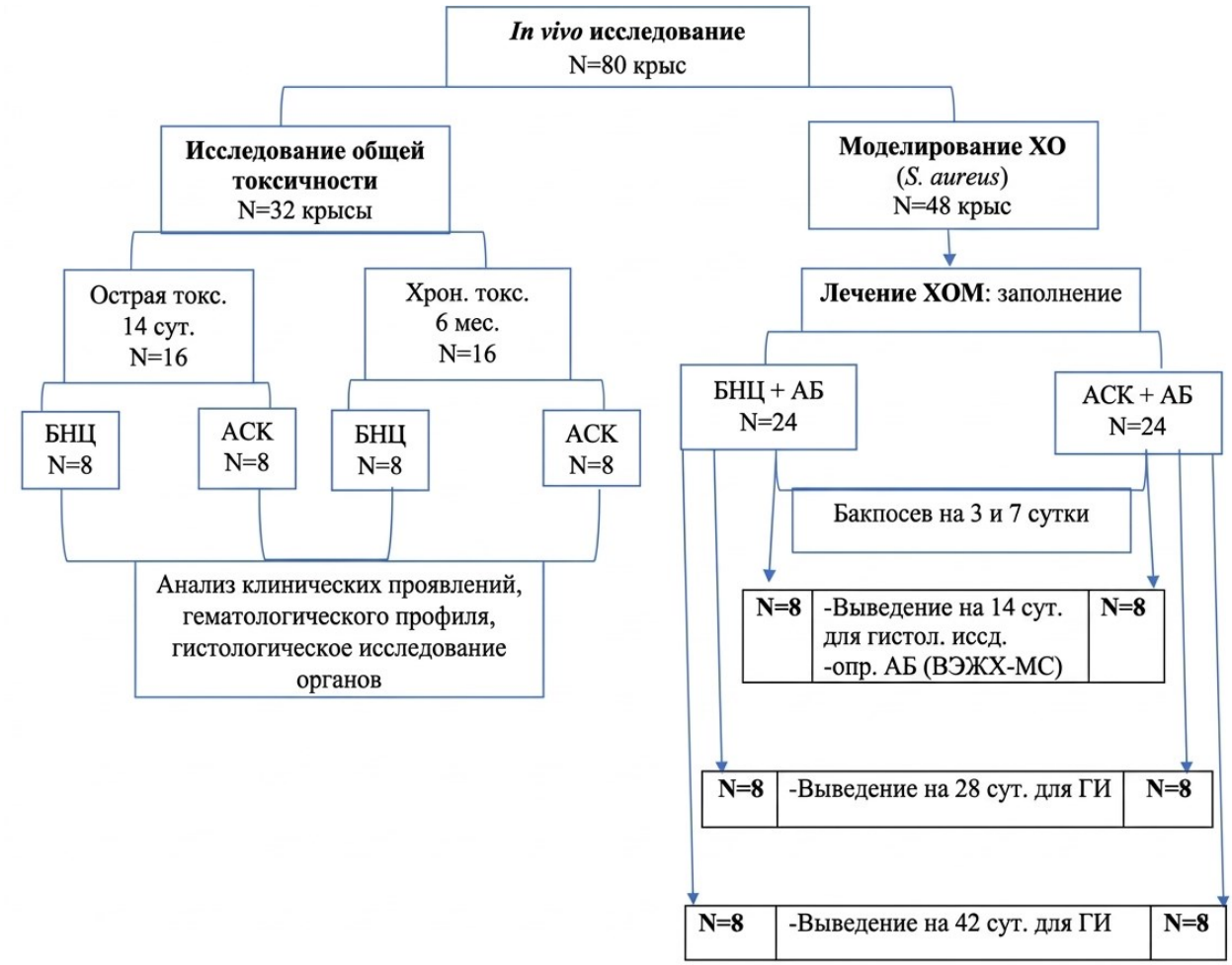
В ходе исследования животные были разделены на следующие группы: основную и контрольную. В основной дефект заполнялся наноцеллюлозным биокомпозитом, а в контрольной – аутологическим сгустком крови.

При проведении экспериментов соблюдали принципы гуманного обращения с лабораторными животными [97, 98]. Экспериментальный дизайн разрабатывали с соблюдением принципов 3R — replacement (замещение), reduction (сокращение) и refinement (совершенствование), предусматривающих минимизацию числа животных, уменьшение болевого синдрома, стресса и иных факторов, способных ухудшать их состояние.

Эксперимент *in vitro*

Оценка антимикробной эффективности БНЦ с антибиотиком ***in vitro***

Эксперимент *in vivo*



Сокращения:
ХО – хронический остеомиелит
БНЦ – биокомпозит на основе НЦ
АСК – аутологичный сгусток крови
АБ – антибиотик (гентамицин)
ГИ – гистологическое исследование
ВЭЖХ – МС - высокоэффективная жидкостная хроматография с масс-спектрометрией

Рисунок 4 – Дизайн исследования

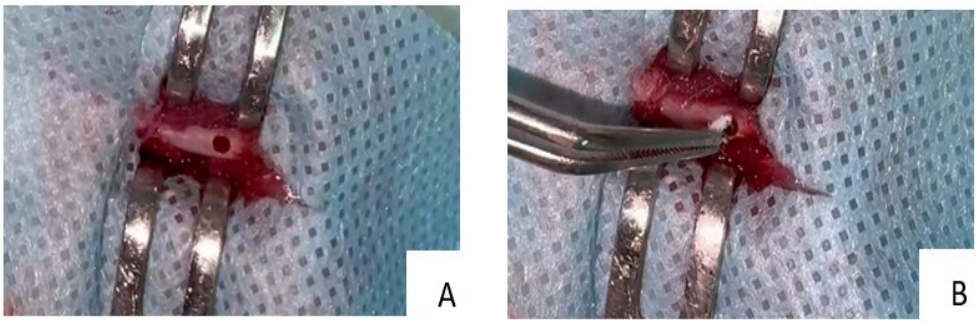
Как видно из Рисунка 4, животные были разделены на следующие группы:

1. Для оценки острой токсичности:
   1.1. Имплантация БНЦ в бедренную кость – 8 крыс.
   1.2. Имплантация АСК в бедренную кость – 8 крыс.
2. Для оценки хронической токсичности:
   2.1. Имплантация БНЦ в бедренную кость – 8 крыс.
   2.2. Имплантация АСК в бедренную кость – 8 крыс.
3. Для моделирования и лечения хронического остеомиелита с выведением:
   3.1. На 14 сутки – 8 крыс с имплантацией БНЦ в бедренную кость с антибиотиком.
   3.2. На 14 сутки – 8 крыс с имплантацией АСК в бедренную кость с антибиотиком.
   3.3. На 28 сутки – 8 крыс с имплантацией БНЦ в бедренную кость с антибиотиком.
   3.4. На 28 сутки – 8 крыс с имплантацией АСК в бедренную кость с антибиотиком.
   3.5. На 42 сутки – 8 крыс с имплантацией БНЦ в бедренную кость с антибиотиком.
   3.6. На 42 сутки – 8 крыс с имплантацией АСК в бедренную кость с антибиотиком.

2.2 Оценка общей токсичности

Оценка общей токсичности проводилась экспериментально путем имплантации в бедренную кость, что связано с дальнейшим потенциалом применения в травматологии и ортопедии. В основной группе костный дефект замещали БНЦ, тогда как в контрольной группе использовали аутологичный кровяной сгусток. Период наблюдения зависел от модели исследования и составлял 14 суток при оценке острой токсичности и до 6 месяцев при изучении хронической токсичности.

Оперативное вмешательство по имплантации БНЦ проводилось по следующей схеме. С целью введения животного в наркоз проводилось введение Золетила (международное непатентованное наименование действующих веществ: тилетамин, золазепам; «Virbac S.A.», Франция; 0,1 мг/кг). Перед хирургическим вмешательством проводили подготовку операционного поля путем удаления шерсти в области левого бедра. Для последующей имплантации на передней поверхности бедра формировали кожный разрез протяженностью 10 мм.



А – создание феморального костного дефекта; В – имплантация БНЦ

Рисунок 5 – Имплантация БНЦ

Локализация костного дефекта в средней трети диафиза бедренной кости, показанная на Рисунке 5, была выполнена с использованием круглого сверла, создающего отверстие диаметром 2 мм и глубиной 1,5 мм. Образованный дефект заполнялся либо биокомпозитным материалом на основе наноцеллюлозы, либо аутологичным сгустком крови с последующим ушиванием раны.
Получение АСК – во время хирургического вмешательства осуществляли забор крови, полученной в ходе разреза или после формирования костного дефекта, в шприц, после чего к образцу крови добавляли тромбин для стимуляции образования сгустка, и образовавшийся сгусток вносили в костный дефект.

2.2.1 Клинические проявления

Ежедневно проводили мониторинг состояния экспериментальных животных, включая оценку их поведения и двигательной активности, выявление судорожных реакций и их характеристик, а также осмотр кожных покровов, шерсти и видимых слизистых оболочек, положение хвоста, потребление корма и воды. Измерение температуры осуществлялось ежедневно в течение 14 суток (в группе острой токсичности) и ежемесячно в течение 6 месяцев для оценки хронической токсичности бесконтактным термометром. Также производилось трехкратное взвешивание в группе острой токсичности (до операции, на 7 сутки, на 14 сутки) и ежемесячное взвешивание в течение полугода в группе хронической токсичности для оценки динамики изменения массы тела.

Для комплексной оценки нейротоксичности и объективизации результатов поведенческих реакций проводили тест «открытое поле», который был предложен американским психологом Келвином Холлом в 1936 г. для изучения эмоциональности, уровня тревожности и исследовательского поведения животных.

Данный тест выполняли однократно в группе острой токсичности (за сутки до выведения) и троекратно в группе хронической токсичности (в конце 1, 3 и 6 месяца наблюдения).

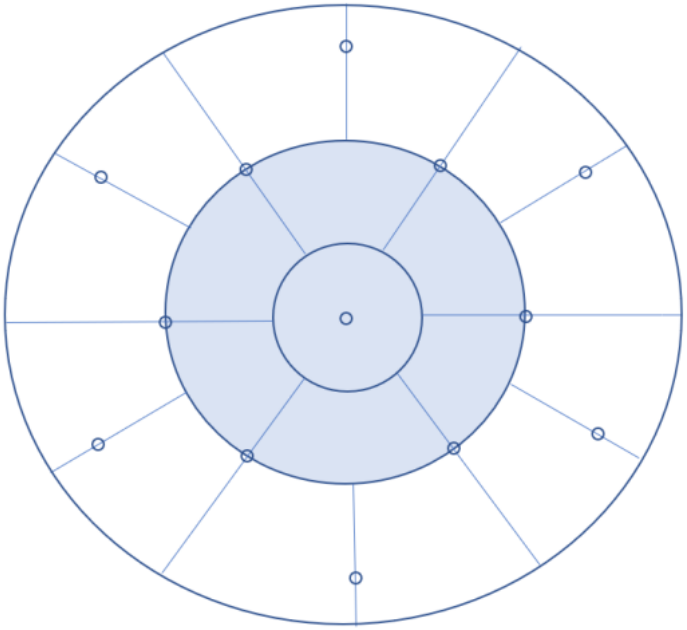


Рисунок 6 – Основание арены теста «открытое поле»

Как видно из Рисунка 6, поле представляет из себя круглую арену белого цвета диметром 97 см, высотой стенок в 42 см и отверстиями в полу диаметром 2 см. Пол размечен на 7 центральных (отмечены синей заливкой на Рисунке 6) и 12 периферических секторов. В площадке имеется 12 отверстий, моделирующих норки. Крысу помещали в середину арены на центральный сектор, видеонаблюдение осуществлялось в течение 5 минут камерой Canon. Перед каждым тестом поле очищали от болюсов и протирали спиртом. Камера устанавливалась таким образом, чтобы полностью охватить поле. Перед началом видеозаписи фиксировались данные животного через демонстрацию карточки с указанием группы и номера крысы.

Тест «открытое поле» был использован для анализа поведенческих реакций грызунов в условиях «новизны», выступающих в качестве стрессового фактора. Данный тест позволил количественно оценить 22 поведенческих паттерна, определить уровень эмоционально-поведенческой реактивности (баланс процессов седации и ажитации), а также охарактеризовать стратегии исследовательского и оборонительного поведения. Кроме того, были проанализированы процессы привыкания, формирования памяти на обстановочные стимулы, наличие неврологического дефицита и проявления локомоторной стереотипии. При видеоанализе заполнялась этограмма [99], состоящая из нескольких частей: регистрационной (дата проведения теста, дата операции, данные животного – группа исследования), далее приводится Таблица для внесения результатов регистрируемых параметров (параметральная – Таблица 2) и заключительной.

Таблица 2 - Параметры, регистрируемые в тесте «открытое поле»

Параметр	Количество	Время
Латентный период первого перемещения, сек		
1.Двигательная активность: горизонтальная (кол-во пересеченных квадратов, шт.), из них: 1а) число пересеченных периферических квадратов, шт. (ПК) 1б) число пересеченных центральных квадратов, шт. (ЦК)	1- 1а)- 1б)-	
2.ДА вертикальная (количество вертикальных стоек грызуна на задних лапах), из них: 2а) число периферических стоек, шт. (ПС) 2б) число центральных стоек, шт. (ЦС)	2- 2а)- 2б)-	
ОА = ПК+ЦК+ПС+ЦС, где ОА – основная активность, шт.		
Исследовательская активность (количество обследованных отверстий), шт		
Груминг (умывание) короткий (кол-во), шт.		
Груминг длительный (кол-во), шт.		
Длительность груминга, с		
Акты дефекации (кол-во болюсов), шт.		
Выход в центр через сколько секунд		
Время, проведенное в центральной зоне, с		
Время, проведенное в периферийной зоне, с		

Заключительная часть этограммы представлена схемой основания арены, где вручную исследователь отмечает «путь» – траекторию передвижения животного по полу арены во время эксперимента (Рисунок 7).

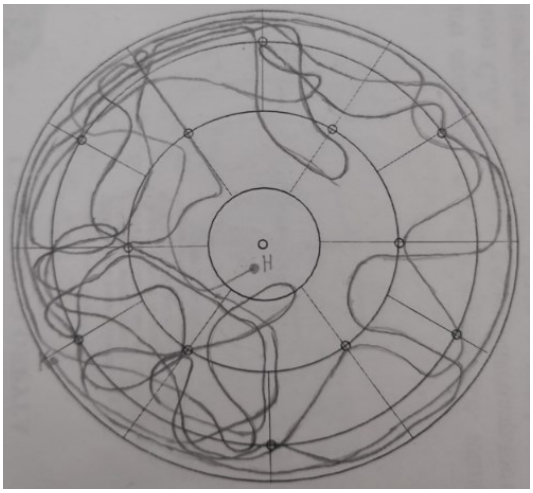


Рисунок 7 – Пример пройденного «пути» животным в тесте ОП

Как следует из Рисунка 7, траектория передвижения животного представлена в виде произвольных движений.

2.2.2 Гематологический профиль

Выведение животных производилось путем передозировки наркозного препарата (Золетил, «Virbac», Франция). Перед выведением для оценки общей токсичности выполняли забор крови для оценки гематологического профиля. При исследовании общего анализа крови оценивались: количество

эритроцитов и тромбоцитов, концентрация гемоглобина, гематокрит, средний объем эритроцита, среднее содержание гемоглобина в эритроците, средняя концентрация гемоглобина в эритроцитах, ширина распределения эритроцитов, а также абсолютное и относительное содержание лейкоцитов, лимфоцитов, моноцитов и др. Оценивались параметры биохимического анализа крови: общий белок, общий билирубин, креатинин, мочевина, АЛТ, АСТ, ГГТ, ЩФ, альбумин, фосфор, калий, глюкоза, A/G, амилаза, триглицериды, магний, холестерин, желчные кислоты, АСТ/АЛТ, глобулины, креатинкиназа, BUN/CREA (азот мочевины крови к креатинину), CA+P, tCO_2. Использовались следующие аппараты: ветеринарный гематологический анализатор URIT-2900Vet Plus (Китай) и автоматический ветеринарный биохимический анализатор MNCHIP Celercare V5 (Китай). С целью контроля изменений в гематологических параметрах представлены референсные значения в Приложениях С и Т.

2.2.3 Гистологическое исследование органов

После одновременного выведения животных из эксперимента каждое животное подвергалось аутопсии с извлечением ряда органов (Рисунок 8).



1-головной мозг, 2-легкие, 3-сердце, 4-печень, 5-поджелудочная железа, 6-селезенка, 7-тонкая кишка, 8-толстая кишка, 9-почки, 10-семенники, 11-бедренная кость

Рисунок 8 – Органы и ткани, отобранные для гистологического исследования

Как видно из Рисунка 8, в ходе процедуры были отобраны фрагменты следующих органов и тканей: головного мозга, легких, сердца, печени, поджелудочной железы, селезенки, отделов кишечника (тонкого и толстого), почек, семенников, а также образец бедренной кости.

Подготовка биоматериала: образцы тканей помещали в 10 % нейтральный забуференный раствор формалина (Biovitrum, Италия) и фиксировали при температуре +4 °C в течение 24 часов. Вырезку тканей производили по стандартному протоколу, разработанному в ветеринарной диагностической лаборатории Вашингтонского университета с целью обеспечения однородности срезов для всех животных [100].

Головной мозг: рутинное исследование семи отделов мозга, включающих такие нейроанатомические области и подобласти, как обонятельная луковица, верхние холмики четверохолмия, медиальное коленчатое тело, нижние холмики четверохолмия, черная субстанция [100].

Сердце: продольный разрез через оба желудочка, от основания к верхушке сердца через основание, перегородку, верхушку, сосочковую мышцу и магистральные сосуды сердца.

Легкие: срезы согласно руководству по отбору и обработке органов у крыс и мышей [101]. Во избежание коллапса трахею немедленно перевязывали, а неповрежденные легкие удаляли и погружали в 10 % нейтральный забуференный формалин на 24 часа. Срезы включали главные бронхи каждой доли, доли обеих лёгких и висцеральную плевру [104].

Печень: поперечный разрез левой и правой медиальной доли печени.

Почка: продольный разрез через ворота и синус почки, включая корковый и мозговой слои.

Поджелудочная железа: поперечный срез через среднюю часть органа.

Селезенка*:* поперечный разрез по наибольшему выступу селезенки.

Кишечник: один поперечный срез из каждого сегмента (тощая кишка, подвздошная и т. д.).

Семенники: поперечный разрез через оба семенника в средней трети органа.

Придатки яичка: продольный разрез, включающий головку, тело и хвост придатка.

После фиксации образцы тканей промывали дистиллированной водой, подвергали дегидратации в спиртах восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в парафиновые блоки. Срезы толщиной 3–4 мкм, полученные на микротоме, переносили на предметные стекла. После депарафинизации препараты окрашивали гематоксилином и эозином. Далее срезы заключали под покровные стекла с использованием монтажной среды. Готовые препараты анализировали с помощью световой микроскопии. Окрашенные срезы исследовали методом световой микроскопии. Микроскопирование препаратов производилось на микроскопе Zeiss AxioLab 4.0 увеличениями ×40, ×100, ×200 и ×400. Для фотографирования изображений была использована программа ImageJ (версия: 1.54p) для Windows.

Морфометрическое исследование

Поражения, обнаруженные в каждом органе крыс, были идентифицированы и описаны в соответствии с International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND) [101].

Головной мозг. Острая нейротоксичность оценивалась в соответствии с международным стандартом для оценки нейротоксичности химических веществ [105, 106].

Критерии для нейротоксичности:

(1) ***Некроз / дегенерация нейронов***: 1 балл - единичные «отечные» нейроны, без глиоза; 2 балла - очаги (десятки клеток), редкий микроглиоз; 3 балла - множественные/ламинарные очаги, выраженный микроглиоз; 4 балла - обширный некроз, размягчение.

(2) ***Отёк мозга (цито/вазоргенный):*** 1 балл - тонкий периваскулярный/перинейрональный «ореол»; 2 балла - очаговый; 3 балла - обширный, деформирует слои; 4 балла - диффузный, с грубой дезорганизацией.

(3) ***Геморрагии***: 1 балл - единичные периваскулярные экстравазаты; 2 балла - небольшие очаги; 3 бала - множественные/сливающиеся; 4 балла - крупные диффузные.

(4) ***Острое воспаление оболочек:*** 1 балл - единичные клетки; 2 балла - 1-2 слоя, мультфокально; небольшое количество нейтрофилов; 3 балла - 2-4 слоя, возможен фибрин/микрокровоизлияния; 4 балла - массивный экссудат, васкулит/тромбоз.

(5) ***Сосудистое повреждение/васкулит***: 1 балл - гипертрофия эндотелия отдельных сосудов; 2 балла - очаговый васкулит без фибриноидного некроза; 3 балла - множественные сосуды, фибриноидный некроз; 4 балла - диффузное поражение, тромбозы, инфаркты.

(6) ***Аксонопатия***: 1 балл - единичные шары; 2 балла - множественные шары/миелиновые овалы; 3 балла - обширные участки с потерей волокон; 4 балла - диффузная демиелинизация.

(7) ***Спонгиоз***: 1 балл - редкие вакуоли; 2 балла - очаговый спонгиоз; 3 балла - сливающиеся поля, дезорганизация; 4 балла - диффузный спонгиоз.

Также для исследования хронической нейротоксичности использовались следующие критерии:

(8) ***Глиоз:*** 1 балл - глиальные клетки с нормальной морфологией, распределены равномерно; 2 балла - легкая гиперплазия астроцитов (реактивная глиозная реакция); 3 балла - очаговый глиоз; 4 балла - диффузный глиоз.

(9) ***Лимфоцитарная инфильтрация:*** 1 балл – инфильтрации нет; 2 балла - определяются единичные лимфоциты или макрофаги, преимущественно в периваскулярных пространствах; 3 балла - очаговые небольшие инфильтраты (1–2 слоя клеток) вокруг сосудов; 4 балла - множественные периваскулярные и диффузные инфильтраты, распространяющиеся в паренхиму.

(10) ***Гемосидероз/микрокальцинаты:*** 1 балл – отсутствует; 2 балла - единичные микрокальцинаты или гемосидерофаги; 3 балла - очаговые участки кальцификации и/или очаговый гемосидероз; 4 балла - множественные/сливающиеся кальцинаты, дифузный гемосидероз.

Итоговая интерпретация (по самому тяжёлому поражению):
1 балл - нейротоксичность отсутствует (поражений нет),
2 балла - низкая нейротоксичность (лёгкие изменения),
3 балла - подтверждённая нейротоксичность (умеренные изменения),
4 балла - тяжёлая нейротоксичность (выраженные тяжелые изменения).

Оценку общей токсичности, а также возможных признаков кардио-, нефро-, гепато-, сплено-, панкреато- и интестинотоксичности проводили в соответствии с рекомендациями OECD Test Guideline 407 и OECD Guidance Document № 116 [102, 103].

Сердце. Критерии кардиотоксичности:

(1) ***Некроз кардиомиоцитов***: 1 балл - отсутствует или единичные кардиомиоциты с набуханием, вакуолизацией саркоплазмы или гиперхромией ядер; 2 балла - очаги (десятки клеток) с коагуляционным некрозом; 3 балла - множественные очаги некроза, фрагментация волокон, выраженный кариопикноз/кариорексис; 4 балла - обширный коагуляционный или колликвационный некроз.

(2) ***Отёк интерстиция:*** 1 балл - отсутствует или легкий периваскулярный отек; 2 балла - очаговый интерстициальный отёк; 3 балла - выраженный отёк с компрессией капилляров; 4 балла - диффузный отёк.

Дополнительно бинарной (дихотомической) оценке подвергались следующие морфологические признаки: гидропическая и вакуольная дистрофия, гипертрофия кардиомиоцитов, очаговая гиперэозинофилия, увеличение размера ядер кардиомиоцитов/появление многоядерных кардиомиоцитов, клеточный инфильтрат и венозное полнокровие. Наличие обозначалось баллом «1», отсутствие - «0».

Также для оценки хронической кардиотоксичности использовались такие параметры:

(3) ***Дистрофические изменения кардиомиоцитов*** (зернистая, гидропическая, вакуольная, жировая): 1 балл - отсутствуют или единичные клетки с умеренным помутнением цитоплазмы; 2 балла - очаговые изменения (до 30 % клеток), мелковакуольная дистрофия, частичное исчезновение исчерченности; 3 балла - выраженная дистрофия (30–60 % клеток), крупновакуольная и гидропическая форма, умеренная деформация волокон, 4 балла - массивные изменения (>60 % клеток), вакуолизация.

(4) ***Сосудистые нарушения*** (венозное полнокровие, стаз, кровоизлияния): 1 балл - сосуды без существенных патологических изменений, незначительное полнокровие; 2 балла - умеренно выраженное венозное полнокровие; 3 балла - выраженное полнокровие венул, очаговые кровоизлияния, умеренный интерстициальный отёк; 4 балла - резко выраженное венозное полнокровие, множественные кровоизлияния, плазморрагия, выраженные застойные изменения.

(5) ***Клеточная инфильтрация***: 1 балл - отсутствует или единичные лимфоциты и макрофаги, 2 балла - слабая периваскулярная инфильтрация, 3

балла - очаговая интерстициальная инфильтрация, преобладают лимфоциты и макрофаги, 4 балла – диффузная инфильтрация.

(6) ***Регенераторно-гипертрофические изменения кардиомиоцитов*** (увеличение ядер, многоядерность, гипертрофия клеток): 1 балл - отсутствуют; 2 балла - единичные кардиомиоциты с увеличенными ядрами; 3 балла - множественные гипертрофированные клетки с крупными гиперхромными ядрами, отдельные двуядерные формы; 4 балла - выраженная гипертрофия и многоядерность, сочетание с участками регенерации и компенсаторными изменениями.

(7) ***Кардиосклероз*** (интерстициальный и периваскулярный фиброз): 1 балл - отсутствует или единичные волокна соединительной ткани вокруг сосудов; 2 балла - очаговый интерстициальный фиброз; 3 балла – умеренный фиброз; 4 балла - выраженный кардиосклероз, перестройка архитектоники миокарда.

(8) ***Гранулематозное воспаление:*** 1 балл – отсутствует; 2 – единичные, 3 – множественные, 4 - наличие эпителиоидно-клеточных гранулём.

Лёгкие. Бинарной (дихотомической) оценке подвергались следующие морфологические признаки: некроз/деструкция альвеолярного эпителия/эпителия бронхиол, отек интерстициальный/альвеолярный, ателектазы/эмфизема, клеточный инфильтрат, многоядерные гигантские клетки/гранулемы, венозное полнокровие и геморрагии/микротромбы. Наличие обозначалось баллом «1», отсутствие - «0». Также для оценки хронической пневмотоксичности использовались:

(1) ***Гиперплазия бронхиального эпителия***: 1 балл - эпителий нормальной толщины или слабо утолщён; 2 балла - умеренное многослойное утолщение; 3 балла - выраженная пролиферация с утратой упорядоченности; 4 балла - тяжёлая гиперплазия с признаками метаплазии и нарушением базальной мембраны.

(2) ***Метаплазия эпителия бронхов***: 1 балл – отсутствует; 2 балла - единичные очаги пролиферации клеток; 3 балла - множественные очаги метаплазии бокаловидного или плоского типа; 4 балла - диффузная метаплазия, утрата нормальной эпителиальной структуры.

(3) ***Лимфоидные фолликулы (лимфоидная гиперплазия):*** 1 балл – отсутствует; 2 балла - единичные лимфоидные скопления без фолликулярной структуры; 3 балла - чёткие фолликулы с герминативными центрами; 4 балла - множественные сливающиеся лимфоидные фолликулы

(4) ***Фиброз***: 1 балл - единичные волокна соединительной ткани в интерстиции; 2 балла - очаговое утолщение межальвеолярных перегородок; 3 балла - диффузный фиброз с утолщением сосудистых стенок; 4 балла - обширный фиброз с деформацией архитектоники легочной ткани.

(5) ***Гранулёматозная реакция***: 1 балл - редкие макрофаги в ткани; 2 балла - единичные мелкие гранулёмы; 3 балла - множественные гранулёмы с гигантскими многоядерными клетками; 4 балла - обширные сливающиеся гранулёмы.

Печень. Для гистопатологического анализа печеночных структур была применена адаптированная оценочная шкала, описанная в литературе [107].

Критерии гепатотоксичности:

(1) ***Некроз гепатоцитов:*** 1 балл - отсутствует или единичные некротические клетки, локальные очаги ≤1-2 клеток; 2 балла - очаговый некроз (несколько групп клеток), преимущественно центролобулярный или перипортальный; 3 балла - множественные очаги некроза; 4 балла - массивный или панлобулярный некроз.

(2) ***Дистрофия гепатоцитов***: 1 балл - отсутствует или гидропическая дистрофия единичных клеток; 2 балла - лёгкая/очаговая (микро- или макровезикулярная) или гидропическая дистрофия; 3 балла - распространённая дистрофия с вовлечением значительной части печени; 4 балла - тотальная дистрофия гепатоцитов.

(3) ***Воспалительная инфильтрация***: 1 балл - отсутствует или единичные лимфоциты/макрофаги в портальных трактах; 2 балла - очаговая перипортальная инфильтрация, редкие нейтрофилы; 3 балла - выраженная инфильтрация в портальных трактах и междольково; 4 балла - диффузная воспалительная реакция с некрозом и деструкцией ткани.

(4) ***Сосудистые изменения (полнокровие, стаз, геморрагии):*** 1 балл - отсутствует или минимальное расширение синусоидов; 2 балла - легкое полнокровие, стаз, мелкие периваскулярные геморрагии; 3 балла - умеренные геморрагии, застойные явления; 4 балла - массивные кровоизлияния, тромбозы, ишемические очаги.

(5) ***Купферовские клетки и макрофаги:*** 1 балл - отсутствие или слабая гиперплазия; 2 балла - умеренная гиперплазия, очаги фагоцитоза; 3 балла - выраженная гиперплазия, формирование скоплений в синусоидах; 4 балла - массивная инфильтрация, замещающая нормальную структуру синусоидов.

(6) ***Холестаз:*** 1 балл - отсутствует или минимальный; 2 балла - очаговый холестаз; 3 балла - множественные очаги; 4 балла - выраженный холестаз.

Итоговая интерпретация (по самому тяжёлому поражению):

1 балл - гепатотоксичность отсутствует (острых поражений нет),

2 балла - низкая гепатотоксичность (лёгкие острые изменения),

3 балла - подтверждённая гепатотоксичность (умеренные изменения),

4 балла - тяжёлая гепатотоксичность (выраженные тяжёлые изменения).

Также для оценки хронической гепатотоксичности использовались:

(7) ***Гиперплазия (пролиферация) желчных протоков***: 1 балл - отсутствует или минимальная; 2 балла - очаговая; 3 балла - множественные очаги; 4 балла - выраженная гиперплазия/пролиферация.

(8) ***Фиброз:*** 1 балл - отсутствует или минимальный фиброз (соединительная ткань ограничена портальными трактами, без септ) (<3 %); 2 балла - очаговый (портальный или перицентральный) фиброз (расширение отдельных портальных трактов или центролобулярных зон, возможны короткие септы, не соединяющие структуры) (4-10 %); 3 балла - мостовидный фиброз (многочисленные портально-портальные и портально-центральные

септы, но структура долек ещё сохранена, цирроза нет) (11-30 %); 4 балла - цирроз (тотальный фиброз) (формирование ложных долек, массивные септы, деформация архитектоники печени, узловая регенерация) (>30 %).

(9) ***Гранулематозное воспаление:*** 1 балл – отсутствует; 4 - наличие эпителиоидно-клеточных гранулём.

Почка. Критерии нефротоксичности:

(1) ***Некроз/деструкция канальцевого эпителия:*** 1 балл - отсутствие или единичные клетки с пикнозом/кариорексисом, без десквамации; 2 балла - очаговый некроз эпителия проксимальных или дистальных канальцев; 3 - множественный некроз, десквамация; 4 балла - массивный некроз эпителия, утрата архитектоники канальцев.

(2) ***Дистрофия эпителия канальцев:*** 1 - отсутствие или лёгкая вакуолизация цитоплазмы единичных клеток; 2 балла - очаговая зернистая или гидропическая дистрофия; 3 балла – умеренная; 4 балла - тотальная дистрофия.

(3) ***Отёк интерстиция***: 1 балл - отсутствует или ограниченный; 2 балла - очаговый с расширением интерстиция; 3 балла - обширный, деформация канальцев; 4 балла - диффузный отёк.

(4) ***Воспалительная инфильтрация***: 1 балл - отсутствует или единичные лимфоциты или макрофаги в интерстиции; 2 балла - очаговые скопления лимфоцитов/нейтрофилов; 3 балла - выраженная инфильтрация в нескольких полях зрения; 4 балла - диффузная воспалительная реакция с некрозом и деструкцией ткани.

(5) ***Гломерулопатия:*** 1 балл - отсутствует или единичные клубочки с лёгкой гиперемией; 2 балла - очаговая гиперемия и лёгкая пролиферация мезангия; 3 балла - множественные клубочки с выраженной гиперемией, пролиферацией, отёком капсулы; 4 балла - некроз/склероз клубочков.

(6) ***Сосудистые изменения (венозное полнокровие, стазы, геморрагии)***: 1 балл - отсутствует или лёгкое венозное полнокровие; 2 балла - стаз крови в капиллярах и венулах; 3 балла - мелкие геморрагии; 4 балла - массивные кровоизлияния, тромбозы, ишемические зоны.

(7) ***Белковые цилиндры и экссудат в канальцах***: 1 балл - отсуствует или единичные цилиндры в просвете канальцев; 2 балла - очаговое накопление белковых масс; 3 балла - распространённые цилиндры, обтурирующие просветы; 4 балла - массивные белковые пробки, обширный некроз эпителия. Также для оценки хронической нефротоксичности использовались критерии:

(8) ***Фиброз интерстиция:*** 1 балл - минимальный, ограниченный периваскулярно; 2 балла - очаговый, до 10 % площади; 3 балла - умеренно выраженный, 11-30 %; 4 балла – диффузный, >30 %, с деформацией паренхимы.

(9) ***Склероз и/или гиалиноз сосудов:*** 1 балл - стенки артерий и артериол без выраженных изменений; 2 балла - очаговое утолщение стенок мелких артериол и венул, лёгкий гиалиноз интимы или медии, умеренное сужение просвета; 3 балла - множественные участки гиалиноза и склероза сосудов,

выраженное утолщение стенки, значительное сужение просвета, отдельные признаки фибриноидной дегенерации; 4 балла - диффузный гиалиноз и склероз сосудов с выраженным сужением или облитерацией просвета, фибриноидный некроз стенок, ишемические и атрофические изменения окружающих канальцев.

(10) ***Гранулематозное воспаление:*** 1 балл - отсутствует; 4 - наличие эпителиоидно-клеточных гранулём.

Поджелудочная железа. Критерии оценки:

(1) ***Некроз ацинарных клеток***: 1 балл - отсутствует или единичные ацинарные клетки с кариопикнозом или эозинофилией цитоплазмы; 2 балла - очаговый некроз (небольшие группы клеток, без разрушения архитектоники дольки); 3 балла - очаги коагуляционного или колликвационного некроза, сопровождающиеся разрушением долек; 4 балла - массивный панлобулярный некроз.

(2) ***Дистрофия ацинарных клеток***: 1 балл - отсутствует или лёгкая вакуолизация цитоплазмы единичных клеток; 2 балла - очаговая зернистая или гидропическая дистрофия; 3 балла - распространённая дистрофия с вовлечением значительной части ацинарных отделов; 4 балла - тотальная дистрофия.

(3) ***Воспалительная инфильтрация (интерстициальная и периацинарная):*** 1 балл - отсутствует или единичные лимфоциты или макрофаги в интерстиции; 2 балла - очаговые лимфо-макрофагальные инфильтраты, единичные нейтрофилы; 3 балла - выраженная инфильтрация в междольковой или межацинарной строме; 4 балла - диффузная воспалительная реакция, сопровождающаяся некрозом ткани.

(4) ***Отёк интерстиция:*** 1 балл - отсутствует или лёгкий периваскулярный или периацинарный отёк; 2 балла - очаговый; 3 балла - обширный; 4 балла - диффузный.

(5) ***Сосудистые изменения (полнокровие, стаз, геморрагии):*** 1 - лёгкое полнокровие капилляров и венул; 2 балла - стаз крови, мелкие периваскулярные геморрагии; 3 балла - множественные кровоизлияния, застойные явления; 4 балла - массивные кровоизлияния, тромбозы, ишемические очаги.

(6) ***Изменения островков Лангерганса***: 1 балл - единичные клетки с набуханием или вакуолизацией цитоплазмы; 2 балла - очаговые дистрофические изменения, уменьшение числа β-клеток; 3 - выраженная дистрофия; 4 - некроз.

Также для оценки хронической панкреатотоксичности использовались:

(7) Фиброз интерстиция: 1 балл – минимальный; 2 балла - очаговый, до 10 % площади; 3 балла - умеренно выраженный (11-30 %); 4 балла – диффузный (>30 %), с деформацией паренхимы.

(8) ***Склероз и/или гиалиноз сосудов***: 1 балл - стенки артерий и артериол без выраженных изменений; 2 балла - очаговое утолщение стенок мелких артериол и венул, лёгкий гиалиноз интимы или медии, умеренное сужение

просвета; 3 балла - множественные участки гиалиноза и склероза сосудов, выраженное утолщение стенки, значительное сужение просвета, отдельные признаки фибриноидной дегенерации; 4 балла - диффузный гиалиноз и склероз сосудов с выраженным сужением или облитерацией просвета, фибриноидный некроз стенок, ишемические и атрофические изменения окружающих канальцев.

(9) ***Гранулематозное воспаление:*** 1 балл – отсутствует; 4 - наличие эпителиоидно-клеточных гранулём.

Селезенка. Критерии оценки:

(1) ***Некроз***: 1 балл - отсутствует или единичные некротизированные клетки в белой или красной пульпе; 2 балла - очаговый некроз фолликулов; 3 балла - множественные очаги некроза, в том числе в красной пульпе; 4 балла - массивный некроз, утрата архитектоники селезёночной ткани.

(2) ***Воспалительная инфильтрация***: 1 балл - единичные лимфоциты или макрофаги в синусах; 2 балла - очаговые скопления нейтрофилов/лимфоцитов; 3 балла - выраженные инфильтраты в белой и красной пульпе; 4 балла - диффузная воспалительная реакция с разрушением ткани.

(3) ***Отёк стромы и синусов***: 1 балл - лёгкий периваскулярный отёк; 2 балла - очаговый отёк с расширением синусов; 3 балла - обширный отёк, деформация фолликулов; 4 балла - диффузный отёк, коллапс архитектоники.

(4) ***Сосудистые изменения (полнокровие, стаз, кровоизлияния):*** 1 балл - лёгкое полнокровие красной пульпы; 2 балла - венозный стаз, единичные микрогеморрагии; 3 балла - множественные мелкие кровоизлияния; 4 балла - массивные геморрагии, ишемические очаги.

(5) ***Гиперплазия/гипоплазия лимфоидных фолликулов***: 1 балл - фолликулы с сохранёнными герминативными центрами, нормальная плотность лимфоцитов, соотношение белой и красной пульпы без отклонений/или слабое увеличение размеров отдельных фолликулов, умеренное расширение герминативных центров/единичные фолликулы с лёгкой редукцией лимфоцитов; 2 балла (умеренные изменения): отчётливое увеличение фолликулов, активация герминативных центров, повышение митотической активности/очаговое уменьшение числа и размеров фолликулов, редукция герминативных центров; 3 балла - выраженные изменения; 4 балла (тяжёлые изменения): массивная гиперплазия фолликулов с нарушением архитектоники белой пульпы, сдавление красной пульпы/тотальная атрофия белой пульпы, исчезновение фолликулов и герминативных центров, лимфоцитарная деструкция.

(6) ***Макрофагальная реакция/гемосидероз:*** 1 балл - единичные активированные макрофаги; 2 балла - очаговое накопление макрофагов и умеренный сидероз; 3 балла - выраженные скопления макрофагов с гемосидерином; 4 балла - массивный гемосидероз, замещение структуры селезёнки.

Также для оценки хронической спленотоксичности:

(7) ***Фиброз***: 1 балл - минимальный, ограниченный периваскулярно; 2 балла - утолщение отдельных трабекул, расширение коллагеновых волокон в периваскулярных зонах; 3 балла - уплотнение и разрастание соединительной ткани, частичное замещение пульпы; 4 балла - грубоволокнистый фиброз, деформация пульпарных пространств, сращения трабекул.

(8) ***Склероз и/или гиалиноз сосудов***: 1 балл - стенки артерий и артериол без выраженных изменений; 2 балла - очаговое утолщение стенок мелких артериол и венул, лёгкий гиалиноз интимы или медии, умеренное сужение просвета; 3 балла - множественные участки гиалиноза и склероза сосудов, выраженное утолщение стенки; 4 балла - диффузный гиалиноз и склероз сосудов.

(9) ***Гранулематозное воспаление:*** 1 балл - отсутствует; 4 - наличие эпителиоидно-клеточных гранулём.

Кишечник. Критерии оценки:

(1***) Некроз эпителия:*** 1 балл - отсутствует или единичные апоптотические или некротические клетки в криптах или ворсинках; 2 балла - очаговый некроз эпителия на ограниченных участках ворсинок/крипт; 3 балла - множественные очаги некроза, десквамация эпителия, обнажение базальной мембраны; 4 балла - диффузный некроз слизистой, утрата архитектоники ворсинок/крипт.

(2) ***Дистрофия эпителия***: 1 балл - отсутствие или минимальные изменения, включая лёгкую вакуолизацию цитоплазмы энтероцитов; 2 балла - очаговая легкая гидропическая или зернистая дистрофия; 3 балла - распространённая дистрофия с нарушением высоты и структуры эпителия; 4 балла - тотальная дистрофия слизистой с нарушением барьерной функции.

(3) ***Воспалительная инфильтрация слизистой/подслизистой:*** 1 балл - единичные лимфоциты и макрофаги в собственной пластинке слизистой; 2 балла - очаговые инфильтраты (лимфоциты, нейтрофилы) в слизистой или подслизистой; 3 балла - выраженная инфильтрация с вовлечением подслизистого слоя, очаговый криптит; 4 балла - диффузная воспалительная реакция с деструкцией крипт (крипт-абсцессы).

(4) ***Отёк слизистой и подслизистой***: 1 балл - лёгкий периваскулярный отёк; 2 балла - очаговый; 3 балла - выраженный; 4 балла - диффузный.

(5) ***Сосудистые изменения (полнокровие, стаз, кровоизлияния):*** 1 балл - лёгкое полнокровие; 2 балла - венозный стаз, единичные микрогеморрагии; 3 балла - множественные мелкие кровоизлияния, застой крови в капиллярах ворсинок; 4 балла - массивные кровоизлияния, ишемические некрозы слизистой.

(6) ***Лимфоидные структуры кишечника (Пейеровы бляшки, солитарные фолликулы):*** 1 балл - отсутствует или минимальная гиперплазия; 2 балла - лёгкая гиперплазия лимфоидных структур, расширение герминативных центров; 3 балла - умеренная гиперплазия; 4 балла - выраженная гиперплазия.

Также для исследования хронической токсичности использовали следующие критерии:

(7) ***Фиброз:*** 1 балл - отсутствует или минимальный периваскулярный; 2 балла - очаговый фиброз, утолщение отдельных коллагеновых волокон; 3 балла - умеренный фиброз 10-30 % площади, частично деформирующий слизистую; 4 балла - диффузный фиброз >30 %, деформация, сужение просвета.

(8) ***Гранулематозное воспаление:*** 1 балл - отсутствует; 4 - наличие эпителиоидно-клеточных гранулём.

Семенники. Критерии оценки были взяты из публикации «Морфологические проявления токсичности яичек и придатков яичка» [108, 109]:

(1) ***Дегенерация/некроз зародышевого эпителия*** (апоптоз/пикноз сперматоцитов, слущивание клеток в просвет, многоядерные гигантские клетки, ретенция удлинённых сперматид): 1 балл - отсутствует или единичные некротизированные клетки (пикноз, кариорексис), без слущивания; 2 балла - очаговый некроз эпителия в ≤25 % канальцев, с выпадением клеток в просвет; 3 балла - множественные очаги некроза (26-50 % канальцев), десквамация клеток, многоядерные гигантские клетки; 4 балла - диффузный некроз, коллапс архитектоники канальцев.

(2) ***Гипосперматогенез/задержка созревания*** (уменьшение числа слоёв герминативных клеток, «ступенчатое» исчезновение зрелых форм): 1 балл - отсутствует или <10 % канальцев, лёгкое уменьшение числа зрелых сперматозоидов, все стадии сохранены; 2 балла - 10-25 % канальцев, выпадение поздних сперматид, сохраняются сперматоциты; 3 балла - 26-50 % канальцев, исчезновение зрелых сперматозоидов, редукция до 1-2 рядов клеток; 4 балла - >50 % канальцев, пустые канальцы.

(3) ***Поражение клеток Сертоли*** (вакуолизация цитоплазмы, набухание, десквамация, нарушение прикрепления сперматид): 1 балл - отсутствует или вакуолизация цитоплазмы единичных клеток; 2 балла - очаговые изменения (набухание, дезорганизация цитоскелета); 3 балла - множественные очаги, потеря контакта с герминативными клетками, «синдром спермиационного сбоя»; 4 балла - диффузное поражение, коллапс сперматогенного эпителия.

(4) ***Атрофия/дистрофия семенных канальцев*** (снижение диаметра, истончение базальной мембраны/эпителия, коллапс просвета): 1 балл - лёгкое уменьшение диаметра отдельных канальцев; 2 балла - очаговое истончение эпителия; 3 балла - множественные канальцы с истончением эпителия, редукцией просвета; 4 балла - диффузная атрофия, коллапс и гиалинизация канальцев.

(5) ***Изменения интерстиция и клеток Лейдига*** (отёк, венозное полнокровие/стаз, кровоизлияния; реактивная гипертрофия/гиперплазия клеток Лейдига): 1 балл - лёгкая гиперемия, единичные активированные клетки Лейдига; 2 балла - очаговый интерстициальный отёк, умеренная

гиперплазия клеток Лейдига; 3 балла - множественные поля с отёком и гиперплазией клеток Лейдига; 4 балла - диффузный отёк, массивная гиперплазия/деструкция клеток Лейдига, сдавление канальцев.

(6) ***Воспалительная реакция*** (периваскулярные/интерстициальные скопления нейтрофилов/мононуклеаров): 1 балл - единичные лимфоциты в интерстиции; 2 балла - очаговые скопления лимфоцитов/нейтрофилов; 3 балла - множественные поля с выраженной инфильтрацией; 4 балла - диффузная реакция с некрозом ткани.

(7) ***Сосудистые изменения***: 1 балл - отсутствие/лёгкое венозное полнокровие; 2 балла - фокально стаз крови, расширение венул; 3 балла - множественные мелкие кровоизлияния; 4 балла - массивные геморрагии, тромбозы, ишемические зоны.

Также для оценки хронической токсичности:

(8) ***Фиброз интерстиция***: 1 балл - отсутствует или минимальный периваскулярный фиброз; 2 балла - очаговый фиброз (до 10 % площади); 3 балла - умеренный фиброз (11–30 %), частично деформирует канальцы; 4 балла - выраженный фиброз (>30 %), диффузный, с деформацией паренхимы.

(9) ***Гиалинизация базальной мембраны и канальцев***: 1 балл - отсутствует; 2 балла - очаговая, единичные участки утолщения; 3 балла - множественные канальцы с выраженным утолщением базальной мембраны; 4 балла - диффузная гиалинизация, склероз с деформацией структуры.

(10) ***Гранулематозное воспаление:*** 1 балл – отсутствует; 4 - наличие эпителиоидно-клеточных гранулём.

Придаток яичка. Критерии оценки [108]:

(1) ***Дистрофия/дегенерация эпителия эпидидимальных канальцев:*** 1 балл - отсутствует или вакуолизация цитоплазмы единичных эпителиоцитов, лёгкое уплощение клеток, сохранение целостности выстилки; 2 балла - очаговое истончение и дезорганизация эпителия в ≤25 % канальцев; единичная десквамация клеток в просвет; 3 балла - множественные очаги дегенерации (26-50 % канальцев); дезорганизация выстилки, появление десквамированных клеток и клеточных обломков в просвете; возможны многоядерные гигантские клетки; 4 балла - диффузная деструкция эпителия; коллапс стенки канальцев, выраженный некроз и потеря архитектоники.

(2) ***Изменения в просвете канальцев*** (норма – зрелые сперматозоиды в просветах, равномерно распределены): 1 балл - отсутствие или небольшое количество клеточного детрита; 2 балла - очаговое скопление сперматидных масс и клеточных обломков; 3 балла - выраженные поля с обильным детритом и сперматидными массами, частично обтурирующими просвет; 4 балла - канальцы заполнены детритом, отсутствует нормальное накопление сперматозоидов.

(3) ***Аспермия/снижение содержания сперматозоидов***: 1 балл - уменьшение сперматозоидов в отдельных канальцах; зрелые формы сохранены; 2 балла – легкое снижение числа сперматозоидов в 10-25 % канальцев; задержка созревания сперматид; 3 балла - редукция

сперматозоидов в 26-50 % канальцев; наличие пустых канальцев или только незрелых форм; 4 балл - аспермия в большинстве канальцев (>50 %).

(4) ***Интерстициальные изменения/воспаление***: 1 - единичные лимфоциты или макрофаги в интерстиции; 2 - очаговые скопления; 3 - изменения в нескольких полях зрения, смешанный клеточный состав; 4 - диффузная воспалительная реакция с деструкцией ткани, формированием грануляционной ткани или очагов фиброза.

(5) ***Сосудистые изменения (венозное полнокровие, стаз, кровоизлияния):*** 1 балл - расширение единичных посткапиллярных венул и капилляров; 2 балла - лёгкое венозное полнокровие, стаз крови в отдельных сосудах, периваскулярный отёк, мелкие геморрагии; 3 балла - множественные очаговые кровоизлияния, пропитывание интерстиция эритроцитами; 4 балла - массивные кровоизлияния, тромбозы и ишемические повреждения ткани. Также для оценки хронической токсичности:

(6) ***Фиброз интерстиция***: 1 балл - отсутствует или минимальный периваскулярный фиброз; 2 балла - очаговый фиброз (до 10 % площади); 3 балла - умеренный фиброз (11–30 %), частично деформирует канальцы; 4 балла - выраженный фиброз (>30 %), диффузный, с деформацией паренхимы.

(7) ***Эозинофильная инфильтрация:*** 1 - отсутствует; 2 - очаговая; 3 - множественные скопления; 4 - диффузная.

(8) ***Гранулематозное воспаление:*** 1 балл – отсутствует; 4 - наличие эпителиоидно-клеточных гранулём.

2.3 Моделирование и лечение хронического остеомиелита

Моделирование хронического остеомиелита осуществлялось согласно данным свидетельства о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом № 13857 от 11.12.2020 г.: в диафизарной области бедра формируется костный дефект с вскрытием костно-мозгового канала, в который укладывают кусочек заранее приготовленной аллокости. Данный кусочек кости имеет соответствующие размеры полости и в течение суток находится в чашке Петри с питательной средой, содержащей штаммы *S. aureus* (это время необходимо для инфузии микроба в толщу костной ткани). После введения кусочка кости рану послойно ушивают [110].

Лечение хронического остеомиелита

После истечения 14 суток выполнялось оперативное лечение ХО. Ход операции был следующим: после подготовки операционного поля выполняли ревизию области вмешательства с доступом к зоне послеоперационного рубца. В ходе хирургической обработки удаляли рубцово-изменённые ткани, костные секвестры и участки тканей с признаками некроза. Дебридмент осуществляли до визуально и макроскопически жизнеспособных тканей. После завершения иссечения операционную рану тщательно санировали путём многократного промывания растворами антисептических средств, включая перекись водорода и хлоргексидин.

Дефект в основной группе заполнялся БНЦ с гентамицином (импрегнация осуществлялась в 4%-ном растворе), в контрольной – аутологичным сгустком крови с антибиотиком (во время хирургического вмешательства забирают кровь в шприц, полученную в ходе разреза или после формирования костного дефекта, после чего к образцу крови добавляют тромбин для стимуляции образования сгустка и образовавшийся сгусток вносят в костный дефект).

Клиническое наблюдение за животными включало анализ их общего самочувствия, аппетита и жажды, а также осмотр слизистых оболочек, кожи и шерсти. В рамках изучения локальных проявлений оценивались степень и наличие отечности, болезненность при пальпации, окраска кожи и локальная температура в зоне поражения. Также фиксировалось наличие или отсутствие свищевых ходов и гнойных выделений, с подробным описанием их объема, консистенции, цвета и запаха.

Макроскопическая и микроскопическая оценка проводилась согласно свидетельству о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом № 9335 от 20.04.2020 г. [111]. Шкала представлена в Приложении У.

2.4 Микробиологическое исследование

2.4.1 Микробиологическая чистота

Микробиологическая чистота биокомпозита на основе наноцеллюлозы оценивалась путем прямого посева: 1 г вещества смешивался с 9 мл физиологического раствора, далее были приготовлены серии из не менее 3 серийных десятикратных разведений испытуемых образцов, из которых в последующем дозатором производился забор 1 мл полученной смеси. Посев производился в стерильные чашки Петри. В качестве питательных сред использовались: желточно-солевой агар (идентификация *Staphylococcus aureus*), агар МакКонки в целях выделения Гр- микроорганизмов, тиогликолевая среда для анаэробов (инкубирование в анаэростате (Германия), Сабуро – для грибов. Инкубация чашек производилась в термостате при 36±1 ºС в течение 24 – 48 ч (5 суток при 22,5 ± 2,5 °С для грибов) [112].

2.4.2 Определение антимикробной активности биокомпозита на основе наноцеллюлозы в отношении музейных тест-штаммов *in vitro*

Изучение антимикробной и противогрибковой активностей биокомпозита на основе наноцеллюлозы определялось в отношении *Staphylococcus aureus (ATCC 6538, ATCC 29213), Escherichia coli (ATCC 25922), Bacillus subtilis (ATCC 6633), Candida albicans (ATCC 10231),* согласно Государственной фармакопее РК [112].

В качестве антибактериального агента был использован гентамицин — антибиотик группы аминогликозидов, обладающий выраженным бактерицидным действием против широкого спектра грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Из-за сохранности чувствительности

клинических штаммов в предыдущих исследованиях, термостабильности, высокой гидрофильности гентамицин был выбран в качестве локальной этиотропной терапии [3]. Нистатин – полиеновый макролид, был использован как фунгистатический и фунгицидный препарат в отношении дрожжей и дрожжеподобных грибов, в т. ч. *Candida albicans,* что регламентировано ГФ РК [112].

Для оценки антимикробной активности исследуемых образцов использовали метод лунок [112]. Тест-культуру предварительно суспендировали в стерильном физиологическом растворе с доведением плотности микробной взвеси до 0,5 по стандарту МакФарланда. Подготовленную суспензию наносили на поверхность агара Мюллера–Хинтона и распределяли по всей площади питательной среды с последующим подсушиванием посевов. Образцы биокомпозита массой в 0,006 г располагали на поверхность агара, а массой в 0,05 г размещали в сформированных углублениях размером 0,6 × 0,5 см («лунках»). Для импрегнации БНЦ была определена минимальная ингибирующая концентрация гентамицина в отношении *S. aureus,* которая составила 2 мкг/мл, что согласуется с данными European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2 мг/л)[149]. Использовали 4%-ный раствор гентамицина (40 мг вещества на 1 мл). V=2 мг:40мг/мл=0,05 мл. Для импрегнации 0,006 г БНЦ (средний вес одной изолированной «единицы» БНЦ, имплантируемой в дефект) использовали 0,05 мл 4%-ного гентамицина, а навеску в 0,05 г исследуемого вещества импрегнировали 0,4 мл 4%-ного раствора гентамицина.

Инкубацию проводили при температуре 36±1 °С в течение 24 часов, а при исследовании *Candida albicans* — при 24±1 °С на протяжении 5 суток. Антимикробный эффект определяли по формированию зоны ингибирования роста микроорганизма вокруг исследуемого образца. Для количественной оценки измеряли диаметр образовавшейся зоны задержки роста от границы образца до внешнего края зоны с использованием специализированного измерительного шаблона HiMedia PW297 (Индия).

Составы исследуемых образцов представлены в Таблице 3.

Таблица 3 - Составы исследуемых образцов с обозначениями

№ п/п	Состав исследуемого образца	Обозначение
1	БНЦ	I
2	БНЦ + гентамицин	I + G
3	БНЦ + нистатин	I + Ns

2.4.3 Динамическая оценка микробного состава послеоперационной раны

Антимикробное действие биокомпозита оценивали по результатам динамического микробиологического исследования содержимого послеоперационной раны [151]. Материал отбирали на 3 и 7 сутки после

вмешательства и высевали на универсальную питательную среду (кровяной агар), на элективные питательные среды: маннит-солевой и желточно-солевой агар. После инкубации при 36±1 °С в течение 18–24 ч проводили оценку характера роста колоний микроорганизмов. Из сформировавшихся колоний выделяли чистые культуры, видовую принадлежность которых устанавливали методом масс-спектрометрии MALDI-TOF MS (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry) с использованием системы Bruker (Германия). Идентификацию микроорганизмов считали достоверной при значении score ≥ 2,0, что соответствовало видовой идентификации согласно критериям интерпретации MALDI Biotyper [150].

2.5 ВЭЖХ-МС

Забор крови для проведения ВЭЖХ-МС у крыс осуществлялся на 14 сутки после лечение ХО путем внутрисердечной пункции в стерильную пробирку. Для подготовки плазмы использовали центрифугу ОПн 3-02 (ОАО «ТНК «Дастан», Киргизия) 2 000 об/мин. Использовалась хроматографическая система Agilent 1260 Infinity (Насос - G 1311 1260 Pump VL; автоматический пробоотборник – G 1329B 1260 ALS; термостат для колонки G 1316A 1260 TCC; УФ-детектор - G 1314C 1260 VWD VL+, масс-селективный детектор - G6130A Quadrupole LC/MC) (Agilent Technologies, США). Колонка: ZORBAX Eclipse Pluse C18 100 x 4,6 мм; 3,5 мкм (Agilent Technologies, США), защитная предколонка: Analutical Guard Column XDB C-18 4,6 x 12,5 мм; 3,5 мкм (Agilent Technologies, США).

2.6 Статистическая обработка материалов

Количественные показатели представлены в виде медианы (Me) и интерквартильного размаха (Q1; Q3). С учетом характера распределения и объема выборки для межгруппового сравнения применяли непараметрические методы статистического анализа. Расчеты выполняли с использованием программ Statistica 6.0 и Microsoft Excel (Microsoft Office 2010). Количественные показатели представлены в виде медианы и интерквартильного размаха — Me (Q1; Q3). Для сравнения двух независимых выборок применяли U-критерий Манна–Уитни. Для качественных данных использовали критерий Фишера. Различия между сравниваемыми показателями расценивали как статистически значимые при $p < 0,05$. Для контроля ложного уровня обнаружений при множественных межгрупповых сравнениях применяли поправку Бенджамини–Хохберга (Benjamini–Hochberg) с контролируемым уровнем FDR (False Discovery Rate) 5%.

3 РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1 Результаты оценки общей токсичности

Оценка общей токсичности включала анализ клинических симптомов, лабораторных исследований, гистологической картины изменений со стороны внутренних органов

3.1.1 Анализ клинической картины

Из клинических параметров оценивались путем термометрии, взвешивания и анализа поведенческих реакций.

Термометрия

Измерение температуры тела крыс при исследовании острой токсичности производилось ежедневно в течение 14 суток при помощи бесконтактного термометра.

Таблица 4 - Результаты измерения температуры тела крыс при исследовании острой токсичности (°С)

Сроки измерения	Контрольная группа (АСК) n=8 Me [Q1; Q3]	Основная группа (БНЦ) n=8 Me [Q1; Q3]	p-уровень*
Исходное (до операции)	36,1 [35,9; 36,4]	36,2 [36,1; 36,4]	0,2831
1 сутки после операции (п/о)	36,1 [36,0; 36,4]	36,4 [36,3; 36,6]	0,01342*
2 сутки п/о	36,3 [36,2; 36,5]	36,4 [36,4; 36,5]	0,247
3 сутки п/о	36,2 [36,0; 36,4]	36,2 [36,2; 36,3]	0,788
4 сутки п/о	36,1 [36,0; 36,3]	36,2 [36,2; 36,3]	0,1524
5 сутки п/о	35,9 [35,8; 36,0]	36,4 [36,3; 36,7]	0,0002319*
6 сутки п/о	36,1 [36,0; 36,4]	36,3 [36,2; 36,6]	0,06024
7 сутки п/о	36,5 [36,1; 36,6]	36,0 [36,0; 36,2]	0,00629*
8 сутки п/о	36,25 [36,0; 36,5]	36,1 [36,0; 36,3]	0,4007
9 сутки п/о	36,3 [36,2; 36,5]	36,0 [36,0; 36,0]	0.005574*
10 сутки п/о	36,3 [36,0; 36,5]	36,1 [36,0; 36,6]	1
11 сутки п/о	36,1 [36,1; 36,3]	36,05 [36,0; 36,3]	0,4199
12 сутки п/о	36,2 [36,1; 36,5]	36,3 [36,0; 36,5]	0,969
13 сутки п/о	36,2 [36,0; 36,4]	36,2 [36,0; 36,4]	1
14 сутки п/о	36,2 [36,2; 36,4]	36,05 [36,0; 36,2]	0,03374*
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.			

Как видно из Таблицы 4, исходно (до операции) статистически значимых различий температуры между контрольной и основной группами не выявлено ($p = 0,2831$), что свидетельствует о сопоставимости групп перед началом эксперимента. В послеоперационном периоде выявлены отдельные временные

точки со статистически значимыми межгрупповыми различиями температуры тела: 1-е сутки (p = 0,0134); 5-е сутки (p = 0,0002319); 7-е сутки (p = 0,00629); 9-е сутки (p = 0,005574); 14-е сутки (p = 0,03374). Пик межгрупповых различий по температурному показателю зафиксирован на 5-е сутки: в основной группе медианное значение было статистически значимо выше, чем в контрольной. В остальные дни (2–4, 6, 8, 10–13 сутки) статистически значимых различий не зарегистрировано (p > 0,05), что свидетельствует об отсутствии устойчивого межгруппового температурного расхождения.

Для лучшей визуализации и восприятия полученных параметров, результаты термометрии оформлены в виде диаграммы, где точки измерения представлены в виде медианы (Рисунок 9).

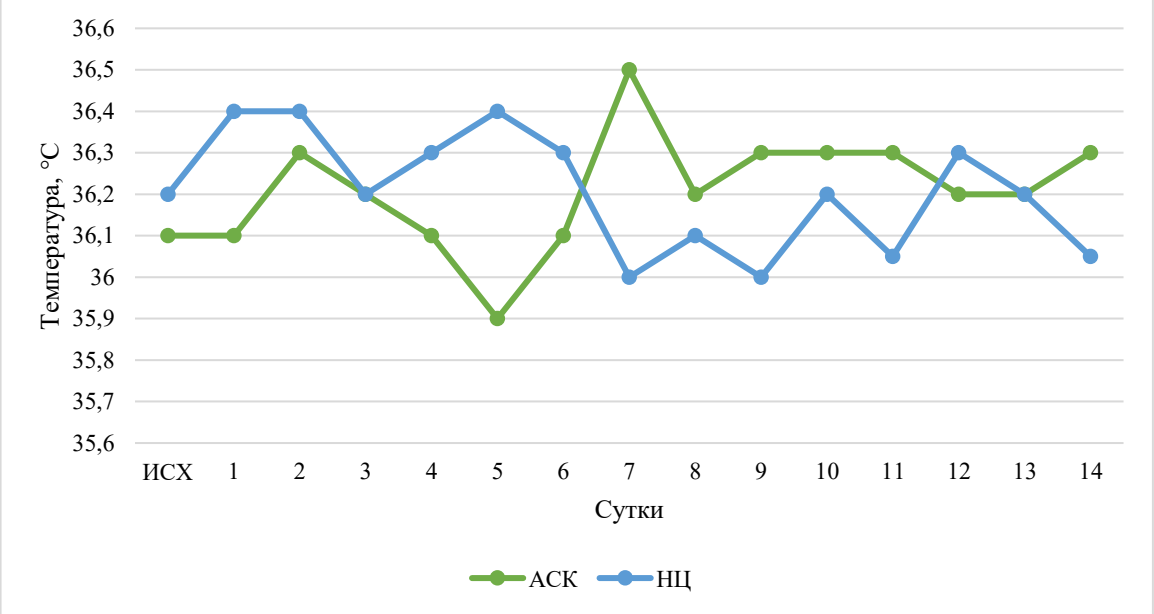


Рисунок 9 – Динамика изменения температурной кривой при исследовании острой токсичности

Как следует из диаграммы на Рисунке 9, температурные колебания носят эпизодический характер и не демонстрируют линейной или прогрессирующей динамики. Разница между медианными значениями незначительна и укладывается в рамки физиологической нормы, характерной для данного вида грызунов. Клинически значимой гипертермии не зарегистрировано в обеих группах. К 10–13 суткам показатели полностью нивелируются между группами. Анализ полученных результатов свидетельствует об отсутствии выраженной токсической или воспалительной температурной реакции у пациентов основной группы. Выявленные различия могут отражать транзиторную адаптационную реакцию на хирургическое вмешательство.

Поскольку сравнение проводилось по 14 временным точкам, возникает риск накопления ошибки I рода (множественные сравнения). При применении коррекции (Bonferroni: 0,05/14 ≈ 0,0036) статистически значимым останется только показатель 5-х суток.

Далее в Таблице 5 мы представляем результаты изменения температурных показателей в группах исследуемых хроническую токсичность.

Таблица 5 - Результаты измерения температуры тела крыс при исследовании хронической токсичности (°C)

Сроки измерения	Контрольная группа (АСК) n=8 Me [Q1; Q3]	Основная группа (БНЦ) n=8 Me [Q1; Q3]	p-уровень*
Исходное	36,0 [36,0; 36,0]	36,3 [36,1; 36,3]	0,9637
1 месяц	36,1 [36,0; 36,1]	36,0 [36,0; 36,0]	0,8223
2 месяц	36,1 [36,0; 36,2]	36,1 [36,1; 36,2]	0,5542
3 месяц	35,9 [35,8; 36,0]	36,2 [36,1; 36,2]	0,6794
4 месяц	36,0 [36,0; 36,2]	36,0 [35,9; 36,0]	0,9502
5 месяц	36,2 [36,1; 36,4]	36,3 [36,2; 36,4]	0,9836
6 месяц	36,1 [35,9; 36,2]	36,1 [36,0; 36,3]	0,5314
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.			

По данным Таблицы 5, исходная температура тела в контрольной группе составила 36,0 °C [36,0; 36,0], в основной — 36,3 °C [36,1; 36,3], при этом различия статистически незначимы ($p = 0,9637$), что свидетельствует о сопоставимости групп перед началом эксперимента. Во всех временных точках (1–6 месяцев) значения температуры тела находились в пределах физиологической нормы для лабораторных крыс. Колебания температуры носили минимальный характер (в пределах 0,2–0,4 °C). На протяжении всего периода наблюдения межгрупповые различия не достигали статистической значимости ($p > 0,05$).

Мониторинг температурных изменений в рамках исследования хронической токсичности представлен на Рисунке 10.

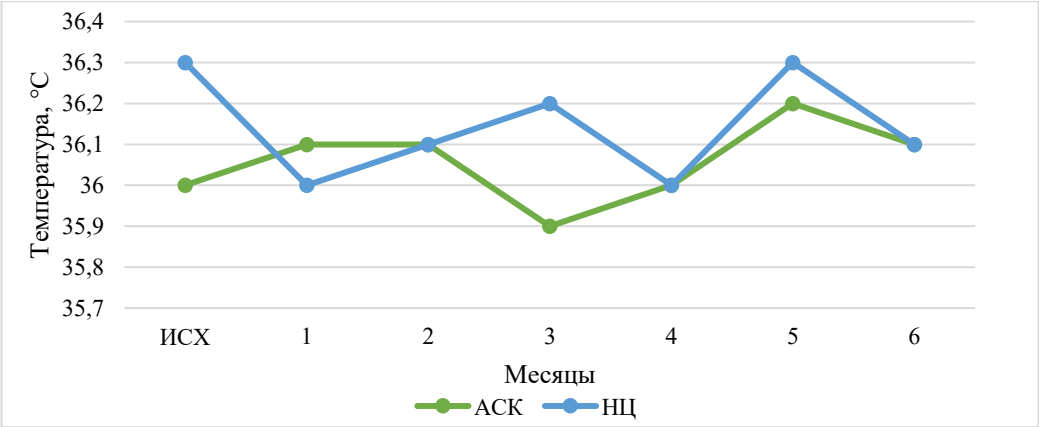


Рисунок 10 – Динамика изменения температурной кривой при исследовании хронической токсичности

Как видно из диаграммы на Рисунке 10, наиболее низкие значения зарегистрированы на 3-м месяце в контрольной группе (35,9 °C), однако различия не достигли статистической значимости ($p = 0,6794$). Максимальные значения в основной группе отмечены на 5-м месяце наблюдения (до 36,3 °C), также без статистической значимости ($p = 0,9836$).

Отсутствие статистически значимых различий (все $p > 0,05$) говорит о том, что имплантация исследуемого вещества (БНЦ) не оказывает влияния на терморегуляцию животных при долгосрочном наблюдении.

Измерение массы тела

Для объективизации измерения массы тела лабораторных животных мы проводили трехкратное **взвешивание (до операции, после операции на 7-е и 14-е сутки)** на электронных весах. Данные взвешивания животных при анализе острой токсичности представлены в Таблице 6.

Таблица 6 - Результаты измерения массы тела крыс при исследовании острой токсичности (г)

Сроки измерения	Контрольная группа (АСК) n=8 Me [Q1; Q3]	Основная группа (БНЦ) n=8 Me [Q1; Q3]	p-уровень*
Исходное (до операции)	225,1 [204; 230]	221 [216; 239]	1
Через 1 неделю после имплантации	225 [207; 247]	224 [214; 249]	0,5699
Через 2 недели после имплантации	237 [216; 252]	232 [224; 252]	0,9096
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.			

Как следует из Таблицы 6, отсутствие достоверных межгрупповых различий на всех этапах исследования ($p > 0,05$) свидетельствует о том, что имплантация БНЦ не оказывает токсического влияния на их метаболический статус и не нарушает общее состояние в виде потери массы тела.

Рассмотрим результаты взвешивания при длительном сроке наблюдения, представленные в Таблице 7, при исследовании хронической токсичности (6 месяцев).

Таблица 7 - Результаты измерения массы тела крыс при исследовании хронической токсичности в отдаленном периоде (г)

Сроки измерения	Контрольная группа (АСК) n=8 Me [Q1; Q3]	Основная группа (БНЦ) n=8 Me [Q1; Q3]	p-уровень*
Исходное (до операции)	243 [230; 250]	239 [223; 243]	0,4574
1 месяц	255 [241; 263]	273 [269; 277]	0,03534*
2 месяц	263 [251; 275]	287 [284; 292]	0,0758
3 месяц	284 [267; 289]	299 [299; 307]	0,03815*
4 месяц	295 [280; 305]	303 [300; 313]	0,1996
5 месяц	306 [290; 315]	311 [307; 328]	0,2772
6 месяц	316 [299; 327]	319 [316; 349]	0,3238
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.			

Из Таблицы 7 можно определить, что исходно (до операции) межгрупповых различий не выявлено ($p = 0,4574$). Полученные данные свидетельствует о сопоставимости животных по массе тела на начальном этапе эксперимента. Через 1 месяц наблюдения масса тела крыс основной группы была статистически значимо выше по сравнению с контрольной группой ($p = 0,03534$). На втором месяце наблюдения прирост массы тела в основной группе был более выраженным, однако статистической значимости различия не достигали ($p = 0,0758$). Через 3 месяца после начала эксперимента вновь выявлено достоверное превышение массы тела в основной группе относительно контроля ($p = 0,03815$). На 4-м, 5-м и 6-м месяцах наблюдения статистически значимых различий между группами не установлено ($p > 0,05$).

В течение 6 месяцев наблюдения в обеих группах крыс регистрировалось достоверное увеличение массы тела, соответствующее физиологическому росту животных. При этом в основной группе отмечался более выраженный абсолютный и относительный прирост массы тела по сравнению с

контрольной группой (+80 г против +73 г; 39,8 % против 33 %). Полученные данные свидетельствуют об отсутствии устойчивого токсического влияния исследуемого материала (БНЦ) на динамику изменения массы тела животных.

В тесте «открытое поле» проведена оценка двигательной и ориентировочно-исследовательской активности крыс. Результаты представлены в Таблице 8.

Таблица 8 - Показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности крыс в тесте «открытое поле» при исследовании острой токсичности

Параметр	Контр. группа (АСК) n=8 Me [Q1; Q3]	Основная группа (БНЦ) n=8 Me [Q1; Q3]	p-уровень *
Латентный период первого перемещения, с	0	0	0
1.ДА горизонтальная, шт., из них:	50 [43; 62]	63 [51; 95]	0,1116
1а) число пересеченных периферических квадратов, шт. (ПК)	47 [36; 54]	56 [46; 86]	0,1847
1б) число пересеченных центральных квадратов, шт. (ЦК)	6 [5; 9]	7 [7; 11]	0,2863
2.ДА вертикальная, шт., из них:	5 [4;7]	12 [4; 14]	0,2536
2а) число периферических стоек, шт.	5 [4; 6]	12 [4; 14]	0,1959
2б) число центральных стоек, шт.	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0,6704
ОА = ПК+ЦК+ПС+ЦС, где ОА – основная активность, шт.	58 [50; 60]	74 [70; 98]	0,06
Исследовательская активность (кол-во обследованных отверстий), шт.	7 [6; 9]	11 [4; 12]	0,5949
Груминг короткий (кол-во),шт.	0 [0; 1]	2 [0; 5]	0,2289
Груминг длительный (кол-во), шт.	1 [0; 3]	1 [1; 2]	0,6106
Длительность груминга, с	9 [6; 16]	3 [0; 16]	0,3798
Акты дефекации (кол-во болюсов), шт.	1,5 [0; 5]	1 [1; 5]	0,969
Выход в центр через сколько секунд	44 [38; 129]	108 [51; 173]	0,1857
Время, проведенное в центральной зоне, с	20 [15; 30]	24 [24; 34]	0,2879
Время, проведенное в периф. зоне, с	277 [267; 285]	276 [266; 276]	0,4943
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.			

В соответствии с данными Таблицы 8, получены нижеперечисленные результаты: горизонтальная активность (общее число пересечённых квадратов) в группе БНЦ имела тенденцию к более высоким значениям по сравнению с АСК, однако попарное сравнение по критерию Манна–Уитни не показало достоверных различий между группами ($p > 0,05$). Вертикальная активность (стойки, в том числе периферические и центральные) также не продемонстрировала достоверных межгрупповых различий, что свидетельствует об отсутствии выраженного влияния БНЦ на общий уровень спонтанной моторной активности животных.

Показатель исследовательской активности (число обследованных отверстий) не различался между группами ($p > 0,05$), что указывает на сопоставимый уровень ориентировочно-исследовательского поведения. Отсутствие различий в эмоционально-аффективной сфере (частота и длительность груминга, количество актов дефекации, время пребывания в центральной и периферической зонах) указывает на сопоставимый уровень тревожности и эмоционального напряжения у животных обеих групп. Полученные данные указывают на отсутствие нейротоксического воздействия исследуемого материала в условиях острого эксперимента. Не было выявлено угнетения двигательной активности, снижения исследовательского поведения, повышения тревожности, выраженных стресс-реакций. Таким образом, тест «открытое поле» не выявил признаков острой токсичности наноцеллюлозы со стороны центральной нервной системы и поведенческих реакций животных при сравнении с контрольной группой.

При исследовании хронической токсичности тест «открытое поле» проводился троекратно — через 1, 3 и 6 месяцев после имплантации. Проведем анализ показателей двигательной и ориентировочно-исследовательской активности крыс по результатам, представленным в Таблице 9.

Таблица 9 - Показатели двигательной и ориентировочно-исследовательской активности крыс в тесте «открытое поле» при исследовании ХТ

Параметр	1 месяц Me [Q1; Q3]		p-уровень*	3 месяц Me [Q1; Q3]		p-уровень*	6 месяц Me [Q1; Q3]		p-уровень*
	АСК	БНЦ		АСК	БНЦ		АСК	БНЦ	
Латентный период первого перемещения, сек	0	0		0	0		0	0	
1.Двигательная активность: горизонтальная (количество пересеченных квадратов, шт.), из них:	51 [43; 58]	58 [50; 74]	0,3209	35 [26; 42]	54 [28; 65]	0,06	23 [19; 31]	42 [36; 54]	0,5941
1а) число пересеченных периферических квадратов, шт. (ПК)	43 [33; 52]	51 [40; 59]	0,2824	32 [22; 33]	46 [27; 60]	0,5911	21 [17; 30]	40 [28; 51]	0,4963
1б) число пересеченных центральных квадратов, шт. (ЦК)	8 [6; 9]	7 [6; 10]	0,8673	4 [2; 8]	4 [1; 5]	0,06	2 [1; 4]	5 [2; 8]	0,5242
2.ДА вертикальная (количество вертикальных стоек грызуна на задних лапах) шт., из них:	7 [6; 12]	8 [3; 13]	0,709	4 [2; 7]	7 [4; 17]	0,1655	5 [3; 7]	7 [2; 17]	0,15
2а) число периферических стоек, шт. (ПС)	7 [6; 11]	8 [3; 13]	0,8357	4 [2; 7]	7 [4; 17]	0,1655	5 [3; 7]	7 [2; 17]	0,15
2б) число центральных стоек, шт. (ЦС)	0 [0; 1]	0 [0; 0]	0,3645	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0,5186	0 [0; 0]	0 [0; 0]	0,4047
ОА = ПК+ЦК+ПС+ЦС, где ОА – основная активность, шт.	60 [53; 65]	72 [68; 78]	0,06	39 [33; 48]	69 [35; 72]	0,5612	29 [24; 37]	48 [41; 66]	0,5941
Исследовательская активность (количество обследованных отверстий), шт.	8 [7; 10]	11 [3; 12]	0,6192	5 [4; 6]	4 [3; 5]	0,1307	3 [1; 4]	4 [2; 5]	0,4064
Груминг (умывание) короткий (кол-во), шт.	0 [0; 0]	0 [0; 1]	0,3623	0 [0; 0,5]	1 [0; 1]	0,29	0 [0; 1]	1 [0; 2]	0,4061
Груминг длительный (кол-во), шт.	1 [0; 1]	0,5 [0; 3]	0,7242	3 [2; 4]	3 [3; 4]	0,8005	2 [0; 3]	5 [2; 6]	0,526
Длительность груминга, с	5 [0; 12]	3 [0; 13]	0,9315	10 [8; 20]	21 [21; 35]	0,8231	12 [6; 19]	27 [16; 39]	0,9228
Акты дефекации (кол-во болюсов), шт.	1 [0; 3]	2 [1; 5]	0.2026	4 [1,5; 6]	2 [0; 3]	0,095	2 [0; 4]	4 [4; 5]	0,5885
Выход в центр через сколько секунд	73 [43; 144]	141 [86; 200]	0.4598	17 [0; 27]	21 [0; 236]	0.7612	17 [14; 24]	29 [17; 38]	1
Время, проведенное в центральной зоне, сек	33 [25; 58]	24 [22; 36]	0.265	24 [14; 34]	10 [9; 15]	0,1288	8 [3; 13]	12 [9; 18]	0,4666
Время, проведенное в периферийной зоне, сек	267 [241; 269]	276 [271; 280]	0.1406	276 [266; 285]	291 [282; 293]	0,4237	292 [287; 297]	288 [264; 289]	0,4666

*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Ниже приведен анализ данных из Таблицы 9: латентный период первого перемещения во всех исследуемых группах на протяжении всего эксперимента составлял 0 секунд, что свидетельствует об отсутствии выраженного торможения двигательной активности у животных.

Через **1 месяц** наблюдения медианное значение горизонтальной двигательной активности (общее количество пересечённых квадратов) составило 51 [43; 58] в группе АСК и 58 [50; 74] в группе БНЦ. При этом основная доля перемещений приходилась на периферические квадраты: 43 [33; 52] и 51 [40; 59] соответственно. Число пересечений центральных квадратов было существенно ниже и составляло 8 [6; 9] в группе АСК и 7 [6; 10] в группе БНЦ. Вертикальная двигательная активность (число стоек на задних лапах) составляла 7 [6; 12] и 8 [3; 13] соответственно. Показатель основной активности (суммарный показатель ПК + ЦК + ПС + ЦС) составил 60 [53; 65] в группе АСК и 72 [68; 78] в группе БНЦ.

Показатели исследовательской активности (число обследованных отверстий) составили 8 [7; 10] и 11 [3; 12] соответственно. Параметры груминга и дефекации находились на низком уровне, что может свидетельствовать об отсутствии выраженных признаков стрессовой реакции. Медианное время выхода в центральную зону составило 73 [43; 144] с в группе АСК и 141 [86; 200] с в группе БНЦ. Основную часть времени животные проводили в периферической зоне арены (267 [241; 269] и 276 [271; 280] соответственно).

Через **3 месяца** наблюдалось некоторое снижение горизонтальной двигательной активности в группе АСК до 35 [26; 42] пересечённых квадратов, тогда как в группе БНЦ данный показатель составил 54 [28; 65]. Аналогичная тенденция отмечалась и для числа пересечений периферических квадратов (32 [22; 33] и 46 [27; 60] соответственно). Количество пересечений центральных квадратов оставалось низким и составляло 4 [2; 8] в группе АСК и 4 [1; 5] в группе БНЦ. Вертикальная активность составила 4 [2; 7] и 7 [4; 17] соответственно. Суммарный показатель основной активности составил 39 [33; 48] в группе АСК и 69 [35; 72] в группе БНЦ. Исследовательская активность оставалась умеренной и составляла 5 [4; 6] и 4 [3; 5] соответственно. Время выхода в центральную зону арены уменьшилось и составило 17 [0; 27] с и 21 [0; 236] с соответственно.

Через **6 месяцев** наблюдения горизонтальная двигательная активность составила 23 [19; 31] пересечённых квадрата в группе АСК и 42 [36; 54] — в группе БНЦ. Количество пересечённых периферических квадратов составило 21 [17; 30] и 40 [28; 51] соответственно, тогда как пересечения центральных квадратов оставались редкими — 2 [1; 4] и 5 [2; 8]. Вертикальная активность составила 5 [3; 7] в группе АСК и 7 [2; 17] в группе БНЦ. Суммарный показатель основной активности составил 29 [24; 37] и 48 [41; 66] соответственно. Исследовательская активность несколько снижалась и составляла 3 [1; 4] и 4 [2; 5].

Показатели груминга и дефекации в течение полугода оставались низкими и не демонстрировали выраженной динамики. Время, проводимое животными в центральной зоне, было значительно меньше, чем в периферической зоне, что соответствует типичному поведенческому паттерну для грызунов в тесте «открытое поле».

Во все исследуемые сроки при межгрупповом сравнении показателей двигательной, исследовательской активности и эмоциональной реактивности межгрупповых различий по критерию Манна–Уитни выявлено не было ($p > 0,05$). Данные свидетельствуют о сопоставимости поведенческих реакций между исследуемыми группами в течение 6-месячного периода наблюдения. Выраженных изменений двигательной активности, исследовательского поведения и эмоциональной реактивности, связанных с воздействием исследуемого материала, не выявлено.

3.1.2 Анализ гематологического профиля

Перед эвтаназией всем животным осуществлялся забор крови для проведения общего и биохимического анализа крови. Результаты исследования общего анализа крови острой токсичности представлены в Таблице 10.

Таблица 10 - Результаты ОАК при исследовании острой токсичности

ПАРАМЕТР	Ед. изм	Контрольная группа (АСК) n=8 Me [Q1; Q3]	Основная группа (БНЦ) n=8 Me [Q1; Q3]	p-уровень*
Лейкоциты	$x10^9$ кл/л	3,4 [2,8; 3,7]	5,5 [3,8; 7,3]	0,232
Лимфоциты	%	48 [38; 52]	49,8 [38,2; 51,2]	1
Моноциты	%	11 [10; 11]	10,2 [9,9; 10,9]	0,8472
Гранулоциты	%	42 [36; 51]	40 [38; 52]	0,9697
Лимфоциты	$x10^9$ кл/л	0,9 [0,7; 1,2]	2 [1; 3]	0,2661
Моноциты	$x10^9$ кл/л	0,2 [0,1; 0,3]	0,5 [0,3; 0,7]	0,4196
Гранулоциты	$x10^9$ кл/л	0,6 [0,6; 1,9]	2,2 [2,2; 2,6]	0,5845
Эритроциты	$x10^{12}$ кл/л	5,6 [4,9; 5,8]	5,8 [5,6; 5,8]	0,703
Концентрация гемоглобина	г/л	112 [103; 114]	123 [119; 135]	0,1412
Гематокрит	%	33 [31; 37]	36 [34; 36]	0,9094

Продолжение таблицы 10

1	2	3	4	5
Ср. объем эритроцитов	fL	62,7 [60,8; 63,9]	62 [60; 62,7]	0,8941
Ср. сод. гемоглобина в эритроците	pg	20,7 [20,2; 22,4]	21 [21; 22,4]	0,4557
Ср. конц. клет. гемоглобина	г/л	342 [342; 358]	355 [348; 358]	0,6733
Точн. повыш. р-я эритроцитов	%	13 [12,3; 14,1]	14,1 [13,2; 14,2]	0,9226
Число тромбоцитов	$x10^9$ кл/л	101 [71; 478]	157 [101; 399]	1
Ср. объем тромбоцита	fL	8,5 [8,3; 9,3]	7,7 [7; 9]	0,6792
Ширина р-я тромбоцитов по объему	fL	14,3 [13,1; 15,4]	12,2 [11,3; 15,4]	0,8196
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.				

Из представленной Таблицы 10 сравнение показателей общего анализа крови между контрольной группой (АСК) и основной группой (БНЦ) не выявило статистически значимых различий по большинству исследуемых параметров ($p > 0,05$), что свидетельствует об отсутствии выраженного токсического воздействия исследуемого вещества на систему кроветворения.

Количество лейкоцитов в основной группе составило 5,5 [3,8; 7,3] $\times10^9$/л, при этом в контрольной — 3,4 [2,8; 3,7] $\times10^9$/л ($p=0,232$). Несмотря на некоторое увеличение показателя в основной группе, статистически значимых различий выявлено не было. Относительное содержание лимфоцитов составило 49,8 [38,2; 51,2] % в основной группе и 48 [38; 52] % в контрольной группе ($p = 1$), что указывает на сопоставимость показателей. Аналогичная тенденция отмечена для моноцитов (10,2 % против 11 %, $p = 0,8472$) и гранулоцитов (40 % против 42 %, $p = 0,9697$). Абсолютное количество лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов также не имело достоверных межгрупповых различий ($p > 0,05$), что свидетельствует об отсутствии выраженных изменений иммунологического ответа. Показатели красной крови также находились на сопоставимом уровне. Количество эритроцитов составило 5,8 [5,6; 5,8] $\times10^{12}$/л в основной группе и 5,6 [4,9; 5,8] $\times10^{12}$/л в контрольной ($p = 0,703$). Концентрация гемоглобина была несколько выше в основной группе — 123 [119; 135] г/л против 112 [103; 114] г/л, однако статистически значимых различий не выявлено ($p = 0,1412$). Гематологические индексы эритроцитов также не показали достоверных различий между

группами (p > 0,05), что указывает на отсутствие влияния исследуемого вещества на морфологические характеристики эритроцитов. Количество тромбоцитов в основной группе составило 157 [101; 399] ×10⁹/л, в контрольной — 101 [71; 478] ×10⁹/л (p = 1). Показатели среднего объема тромбоцитов и ширины их распределения также не различались статистически значимо (p > 0,05).

Таким образом, результаты общего анализа крови свидетельствуют о том, что интрамедуллярная имплантация БНЦ не вызывает выраженных гематологических нарушений и не оказывает острого токсического воздействия на систему кроветворения.

Далее представлены результаты общего анализа крови при исследовании хронической токсичности в Таблице 11.

Таблица 11 - Результаты ОАК при исследовании хронической токсичности

ПАРАМЕТР	Ед. изм	Контрольная группа (АСК) n=8 Me [Q1; Q3]	Основная группа (НЦ) n=8 Me [Q1; Q3]	p-уровень*
Лейкоциты	x10^9 кл/л	5,7 [4,6; 6,3]	5,4 [3,7; 6,4]	0,9435
Лимфоциты	%	30 [24; 42]	29 [26; 41]	0,9039
Моноциты	%	8 [7; 9]	8,9 [7,3; 10,3]	0,9659
Гранулоциты	%	62 [48; 69]	61,5 [49; 66]	0,8321
Лимфоциты	x10^9 кл/л	1,7 [1,4; 2]	1,6 [1,3; 2,2]	0,9378
Моноциты	x10^9 кл/л	0,4 [0,4; 0,5]	0,4 [0,3; 0,6]	0,9399
Гранулоциты	x10^9 кл/л	3 [2,4; 4,3]	2,9 [2; 4,6]	0,9431
Эритроциты	x10^{12}кл/л	8 [7,5; 8,2]	7,9 [7,1; 8]	0,6077
Конц. гемоглобина	г/л	165 [139;168]	158 [127; 166]	0,9219
Гематокрит	%	45,5 [45; 48]	46 [44,7; 49]	0,8251
Ср. объем эриртроцитов	fL	56 [55; 60]	57 [54,6; 58]	0,9153
Ср. сод. гемоглобина	pg	20 [18; 21]	19 [17; 20]	1
Ср. конц. клет. гемоглобина	г/л	336 [335; 349]	338 [334; 345]	0,9219
Точн. повыш.р-я эритроцитов	%	15,05 [14,6; 15,7]	15,1 [14,6; 16]	0,6295
Число тромбоцитов	x10^9 кл/л	287 [196;737]	273 [148; 765]	0,8446
Ср. объем тромбоцита	fL	7,6 [7,5; 7,7]	7,5 [7,3; 8]	0,8595
Ширина р-я тромбоцитов по объему (PDW)	fL	11 [11; 11,4]	10,5 [10,5; 12]	0,8001

*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при p < 0,05.

Как видно из Таблицы 11, количество лейкоцитов в контрольной группе составило 5,7×10⁹/л [4,6; 6,3], тогда как в основной группе — 5,4×10⁹/л [3,7; 6,4] (p = 0,9435). Данные значения находятся в пределах физиологической нормы, что указывает на отсутствие выраженных воспалительных или иммунных реакций.

Относительное содержание лимфоцитов также не продемонстрировало статистически значимых различий: 30 % [24; 42] в контрольной группе и 29 % [26; 41] в основной группе (p = 0,9039). Аналогичная тенденция наблюдалась и для моноцитов — 8 % [7; 9] и 8,9 % [7,3; 10,3] соответственно (p = 0,9659). Доля гранулоцитов в группах составила 62 % [48; 69] и 61,5 % [49; 66] (p = 0,8321). Полученные значения также соответствуют физиологическим диапазонам.

Абсолютные показатели лейкоцитарной формулы (лимфоциты, моноциты и гранулоциты) между группами статистически не различались (p > 0,05), что свидетельствует об отсутствии влияния исследуемого вещества на клеточное звено иммунной системы.

Анализ эритроцитарных показателей также не выявил достоверных различий. Количество эритроцитов составило 8×10¹²/л [7,5; 8,2] в контрольной группе и 7,9×10¹²/л [7,1; 8] в основной группе (p = 0,6077). Концентрация гемоглобина составила 165 г/л [139; 168] и 158 г/л [127; 166] соответственно (p = 0,9219). Значения гематокрита также были сопоставимыми — 45,5 % [45; 48] в контрольной группе и 46 % [44,7; 49] в основной (p = 0,8251). Все показатели находились в пределах физиологических значений. Эритроцитарные индексы также не демонстрировали достоверных межгрупповых отклонений (p > 0,05). Это указывает на отсутствие признаков анемических состояний или нарушений эритропоэза.

Показатели тромбоцитарного звена крови также не различались между группами. Количество тромбоцитов составило 287×10⁹/л [196; 737] в контрольной группе и 273×10⁹/л [148; 765] в основной группе (p = 0,8446). Средний объем тромбоцитов (MPV) и ширина распределения тромбоцитов (PDW) также не показали достоверных различий (p > 0,05).

Таким образом, анализ гематологических данных показал, что при исследовании хронической токсичности изучаемого вещества не выявил статистически значимых изменений показателей периферической крови в сравнении с контрольной выборкой. Все исследуемые параметры находились в пределах физиологической нормы, что свидетельствует об отсутствии выраженного токсического воздействия на систему кроветворения.

Далее в Таблице 12 приведены результаты биохимического анализа исследования острой токсичности в контрольной и основной группах. Оценка биохимических показателей проводилась для выявления возможных изменений функционального состояния внутренних органов и обменных процессов. Сопоставление полученных данных между группами позволило оценить системное воздействие имплантации БНЦ в условиях эксперимента.

Таблица 12 - Результаты биохимического анализа крови при исследовании острой токсичности

ПАРАМЕТР	Контрольная группа (АСК) n=8 Me [Q1; Q3]	Основная группа (БНЦ) n=8 Me [Q1; Q3]	p-уровень*
Общий белок, г/л	60,9 [60,7; 63,8]	63,7 [62,5; 64,8]	0,9643
Общий билирубин, мкмоль/л	2,99 [2,5; 4,3]	4,7 [3,8; 5,8]	0,7889
Креатинин, ммоль/л	44 [41; 47]	47 [45,2; 48,2]	0,5556
Мочевина, ммоль/л	7,1 [6,9; 7,3]	6,8 [6,4; 7]	0,2821
АЛТ (АЛаТ) ед/л	60 [55; 70]	40 [39; 46]	0,0837
АСТ (АСаТ), ед/л	140 [139; 148]	99 [95; 118]	0,2857
ГГТ , ед/л	1 [1; 1,3]	0,85 [0,67; 1,12]	0,9522
Щелочная фосфатаза, ед/л	158 [148; 165]	174 [161; 199]	0,1905
Альбумин, г/л	38,2 [33,3; 38,2]	32,7 [32; 33,3]	0,9644
Кальций, ммоль/л	1,8 [1,8; 2,2]	2,5 [2,1; 2,6]	0,6856
Фосфор, ммоль/л	2,3 [2,2; 2,4]	2,4 [2,3; 2,5]	0,3287
Глюкоза, ммоль/л	6 [5; 7]	6,8 [6,4; 7,5]	0,1201
A/G	1,7 [1,1; 1,7]	1,05 [1; 1,1]	0,1514
Амилаза, ммоль/л	358 [355; 359]	398 [342,3; 441]	0,7302
Триглицериды, ммоль/л	1,08 [1; 1,8]	0,9 [0,9; 1,2]	0,9607
Магний, ммоль/л	1,12 [1,04; 1,14]	0,94 [0,91; 0,95]	0,8923
Холестерин, ммоль/л	3,1 [2,6; 3,13]	1,9 [1,7; 1,96]	0,8926
Желчные кислоты, мкмоль/л	18 [17; 20]	35 [19; 51]	0,9416
Глобулины, г/л	22,5 [22,2; 30, 5]	30,9 [30,2; 31,7]	0,6238
Креатинкиназа, мкмоль/л	397 [393; 432]	384 [300; 450]	0,4127
TCO_2, ммоль/л	22 [20; 22]	22,5 [21; 23]	0,8016

*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

По всем представленным биохимическим показателям из Таблицы 12 статистически значимых различий между контрольной и основной группами не выявлено: во всех случаях $p > 0,05$

Уровень общего белка в основной группе сопоставим с контролем (63,7 г/л [62,5; 64,8] против 60,9 г/л [60,7; 63,8]). Значимых различий не выявлено ($p = 0,9643$), что указывает на отсутствие негативного влияния на белковый обмен (нет выраженной дегидратации, гиперкатаболизма, нарушения синтетической функции печени). Несмотря на некоторое снижение медианы альбумина в основной группе (32,7 г/л [32; 33,3] против 38,2 г/л [33,3; 38,2]), статистической значимости не зарегистрировано ($p = 0,9644$). Это позволяет расценивать выявленную тенденцию как вариабельность выборки, а не как проявление токсического воздействия. С учетом короткого периода наблюдения отсутствие выраженного снижения альбумина является косвенным подтверждением сохранности белоксинтетической функции печени. Индекс A/G в основной группе имеет тенденцию к снижению (1,05 [1; 1,1]), однако различия не достигли статистической значимости ($p = 0,1514$), что может указывать на слабовыраженную перестройку белковых фракций, но не позволяет говорить о развитии воспалительной или токсико-метаболической диспротеинемии. Незначительное увеличение билирубина в группе БНЦ (4,7 мкмоль/л [3,8; 5,8] против 2,99 мкмоль/л [2,5; 4,3]) не имеет статистической значимости ($p = 0,7889$), что говорит об отсутствии выраженного нарушения пигментного обмена, гемолиза или холестаза в ответ на имплантацию исследуемого материала. Комплексная оценка ферментов печени показывает: АЛТ и АСТ не повышены, а напротив, имеют тенденцию к снижению в основной группе; ГГТ остается стабильной; щелочная фосфатаза умеренно выше в группе БНЦ, но без статистической значимости. Анализ данных говорит об отсутствии цитолитического повреждения гепатоцитов и не формирует достоверных признаков холестатического синдрома.

Показатели функции почек остаются стабильными и не отличаются между группами. Отсутствие роста креатинина и мочевины свидетельствует о том, что исследуемый материал не оказывает нефротоксического действия в условиях двухнедельного наблюдения. Минеральный обмен не демонстрирует статистически значимых отклонений, что говорит об отсутствии системного нарушения электролитного/минерального баланса. Глюкоза в основной группе несколько выше (6,8 ммоль/л [6,4; 7,5]), однако статистически значимого различия нет ($p = 0,1201$). В условиях острого эксперимента такие колебания могут быть обусловлены стресс-реакцией, особенностями забора крови или индивидуальной вариабельностью, а не прямым токсическим действием исследуемого материала. Параметры липидного обмена и гепатобилиарного транспорта не демонстрируют достоверных изменений. Несмотря на рост желчных кислот в основной группе (35 мкмоль/л [19; 51]), отсутствие статистической значимости не позволяет интерпретировать это как признак холестаза или нарушения экскреторной функции печени. Отсутствие

значимых изменений амилазы исключает выраженное токсическое воздействие на поджелудочную железу. Стабильность креатинкиназы свидетельствует об отсутствии значимого мышечного или общего тканевого повреждения, которое могло бы возникать при системной токсической реакции. Показатель общего CO_2 остается стабильным, что свидетельствует об отсутствии выраженных метаболических нарушений кислотно-основного состояния на фоне воздействия БНЦ.

Совокупность биохимических параметров показывает, что исследуемый материал не вызвал достоверных нарушений функции печени, функции почек, углеводного обмена, липидного обмена, минерального обмена, ферментативной активности поджелудочной железы, кислотно-основного равновесия. Нет лабораторных признаков органоспецифического повреждения (нет роста АЛТ/АСТ – нет выраженного цитолиза; нет значимого повышения билирубина, ГГТ, ЩФ – нет холестаза; нет роста креатинина и мочевины – нет нефротоксичности; нет роста креатинкиназы – нет генерализованного тканевого повреждения).

Забор крови для биохимического анализа при исследовании хронической токсичности проводился через 6 месяцев после имплантации, результаты представлены в Таблице 13.

Таблица 13 - Результаты биохимического анализа крови при исследовании хронической токсичности

ПАРАМЕТР	Контрольная группа (АСК) n=8 Me [Q1; Q3]	Основная группа (БНЦ) n=8 Me [Q1; Q3]	p-уровень*
Общий белок, г/л	77,9 [75,9; 82,6]	74,5 [72,5; 76,2]	0,6233
Общий билирубин, мкмоль/л	4,27 [3,74; 4,63]	5,87 [5,02; 5,92]	0,9697
Креатинин, ммоль/л	52 [44; 55]	49 [49; 50]	0,6752
Мочевина, ммоль/л	4,22 [3,87; 5,8]	5,25 [4,68; 6,05]	0,7327
АЛТ (АЛаТ) ед/л	52 [48; 64]	43 [41; 52]	0,6004
АСТ (АСаТ), ед/л	120 [104; 157]	124 [113; 128]	1
ГГТ, ед/л	0,3 [0,3; 1]	1,2 [0,9; 1,5]	0,2755
Щелочная фосфатаза, ед/л	93 [84; 99]	95 [59; 140]	1
Альбумин, г/л	34 [31,8; 34,1]	33,2 [30,8; 35,5]	0,8699
Фосфор, ммоль/л	1,91 [1,84; 2,14]	1,67 [1,58; 1,8]	0,7327
Глюкоза, ммоль/л	6,31 [6,22; 6,92]	5,08 [4,47; 5,66]	0,676

Продолжение таблицы 13

1	2	3	4
A/G	0,7 [0,6; 0,8]	0,8 [0,7; 0,9]	0,6033
Амилаза, ммоль/л	271 [231; 305]	256 [235; 280]	0,7302
Триглицериды, ммоль/л	0,67 [0,56; 0,77]	0,6 [0,56; 0,7]	0,9607
Магний, ммоль/л	0,89 [0,8; 0,93]	0,85 [0,78; 0,92]	0,8923
Холестерин, ммоль/л	2,07 [1,98; 2,1]	2,04 [1,99; 2,34]	0,8926
Желчные кислоты, мкмоль/л	25,9 [20,9; 27,8]	21,2 [14,3; 41,8]	0,9416
ALT/AST	2,31 [1,59; 3,15]	2,41 [2,38; 2,63]	0,3688
Глобулины г/л	46,5 [43,8; 48,5]	33,2 [30,8; 35,5]	0,6238
Креатинкиназа мкмоль/л	670 [612; 699]	563 [500; 676]	0,4127
TCO_2, ммоль/л	22 [20; 22]	21 [21; 22]	0,8016
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.			

По данным Таблицы 13, при оценке биохимических показателей крови животных контрольной группы (АСК) и основной группы (БНЦ) в условиях исследования хронической токсичности установлено, что статистически значимых межгрупповых различий по всем исследуемым параметрам не выявлено ($p > 0,05$). Длительное воздействие исследуемого материала не сопровождалось развитием выраженных нарушений со стороны основных органов-мишеней и не вызывало существенной метаболической дестабилизации.

Анализ показателей белкового обмена показал, что уровень общего белка в контрольной группе составил 77,9 [75,9; 82,6] г/л, тогда как в основной группе — 74,5 [72,5; 76,2] г/л ($p = 0,6233$). Концентрация альбумина также была сопоставимой между группами: 34 [31,8; 34,1] г/л в контроле и 33,2 [30,8; 35,5] г/л в основной группе ($p = 0,8699$). Значения альбумин/глобулинового коэффициента (A/G) составили 0,7 [0,6; 0,8] и 0,8 [0,7; 0,9] соответственно ($p = 0,6033$). Уровень глобулинов также статистически значимо не различался (46,5 г/л [43,8; 48,5] против 33,2 г/л [30,8; 35,5], $p = 0,6238$). Эти данные указывают на отсутствие выраженного влияния исследуемого материала на белковосинтетическую функцию печени.

При анализе пигментного обмена установлено, что уровень общего билирубина в контрольной группе составил 4,27 [3,74; 4,63] мкмоль/л, в основной группе — 5,87 [5,02; 5,92] мкмоль/л ($p = 0,9697$). Концентрация

желчных кислот также не отличалась статистически значимо и составила 25,9 [20,9; 27,8] мкмоль/л в контроле против 21,2 [14,3; 41,8] мкмоль/л в основной группе (p = 0,9416). Отсутствие достоверных различий по этим показателям свидетельствует о сохранности процессов билирубинового обмена и желчеобразования.

Исследование ферментативных маркеров функции печени показало отсутствие статистически значимых различий по активности аланинаминотрансферазы (АЛТ), аспартатаминотрансферазы (АСТ), гамма-глутамилтрансферазы (ГГТ) и щелочной фосфатазы. Так, уровень АЛТ составил 52 [48; 64] ед/л в контрольной группе и 43 [41; 52] ед/л в основной (p = 0,6004), активность АСТ — 120 [104; 157] ед/л и 124 [113; 128] ед/л соответственно (p = 1,0). Значения ГГТ составили 0,3 [0,3; 1] ед/л в контроле и 1,2 [0,9; 1,5] ед/л в основной группе (p = 0,2755), а щелочной фосфатазы — 93 [84; 99] ед/л и 95 [59; 140] ед/л соответственно (p = 1,0). Соотношение ALT/AST также не отличалось между группами (2,31 [1,59; 3,15] против 2,41 [2,38; 2,63], p = 0,3688). Совокупность данных свидетельствует об отсутствии биохимических признаков цитолитического или холестатического синдрома.

Оценка азотистого обмена и функции почек показала, что концентрация креатинина в контрольной группе составила 52 [44; 55] ммоль/л, в основной группе — 49 [49; 50] ммоль/л (p = 0,6752). Уровень мочевины составил 4,22 [3,87; 5,8] ммоль/л в контроле и 5,25 [4,68; 6,05] ммоль/л в основной группе (p = 0,7327). Отсутствие статистически значимых различий по данным показателям указывает на сохранность выделительной функции почек и отсутствие нефротоксического эффекта исследуемого материала. Показатели углеводного обмена также не демонстрировали значимых межгрупповых различий. Уровень глюкозы в контрольной группе составил 6,31 [6,22; 6,92] ммоль/л, тогда как в основной группе — 5,08 [4,47; 5,66] ммоль/л (p = 0,676). Несмотря на тенденцию к снижению медианы в основной группе, статистически значимых различий не выявлено, что свидетельствует об отсутствии выраженного влияния на углеводный обмен. При анализе липидного обмена установлено, что уровень триглицеридов в контрольной группе составил 0,67 [0,56; 0,77] ммоль/л, в основной группе — 0,6 [0,56; 0,7] ммоль/л (p = 0,9607). Концентрация холестерина была сопоставимой: 2,07 [1,98; 2,1] ммоль/л в контроле и 2,04 [1,99; 2,34] ммоль/л в основной группе (p = 0,8926). Эти результаты свидетельствуют об отсутствии влияния исследуемого материала на липидный профиль. Оценка ферментативной активности поджелудочной железы показала, что уровень амилазы в контрольной группе составил 271 [231; 305] ммоль/л, а в основной группе — 256 [235; 280] ммоль/л (p = 0,7302). Данные указывают на отсутствие значимого воздействия исследуемого материала на экзокринную функцию поджелудочной железы. Показатели минерального обмена также оставались стабильными. Уровень фосфора составил 1,91 [1,84; 2,14] ммоль/л в контрольной группе и 1,67 [1,58; 1,8] ммоль/л в основной (p = 0,7327), уровень магния — 0,89 [0,8; 0,93] ммоль/л и 0,85 [0,78; 0,92] ммоль/л соответственно

(p = 0,8925). Значения TCO_2 составили 22 [20; 22] ммоль/л в контроле и 21 [21; 22] ммоль/л в основной группе (p = 0,8016). Полученные данные свидетельствуют об отсутствии выраженных нарушений электролитного и кислотно-основного равновесия. При оценке неспецифических маркеров тканевого повреждения установлено, что уровень креатинкиназы в контрольной группе составил 670 [612; 699] мкмоль/л, в основной группе — 563 [500; 676] мкмоль/л (p = 0,4127). Отсутствие достоверного повышения данного показателя свидетельствует об отсутствии признаков системной миотоксичности или выраженного тканевого повреждения.

Таким образом, результаты исследования 21 параметра биохимического анализа крови при изучении хронической токсичности показали, что все рассмотренные показатели в основной группе были сопоставимы с контрольными значениями, а достоверных межгрупповых различий не выявлено. Отсутствие достоверных изменений со стороны белкового, пигментного, азотистого, углеводного, липидного и минерального обмена, а также ферментативных маркеров функции печени, почек, поджелудочной железы и мышечной ткани свидетельствует о том, что исследуемый материал не вызывал биохимически значимой хронической токсичности в условиях проведенного эксперимента.

3.1.3 Гистологическое исследование органов (острой токсичности)

В данном разделе представлены результаты гистологического исследования острой и хронической токсичности.

Головной мозг

Сравнительная гистоморфометрическая характеристика изменений ткани головного мозга при исследовании острой токсичности в исследуемых группах при окраске гематоксилином и эозином представлена в Таблице 14.

Таблица 14 - Гистопатологическая оценка нейротоксичности имплантата в группах исследования

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Некроз / дегенерация нейронов	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Отёк мозга (цито/вазоргенный)	1	8 (100)	6 (75)	0,17
		2	-	2 (25)	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 14

1	2	3	4	5	6
3	Геморрагии	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
4	Острое воспаление оболочек	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
5	Сосудистое повреждение/васкулит	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Аксонопатия	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
7	Спонгиоз	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.					

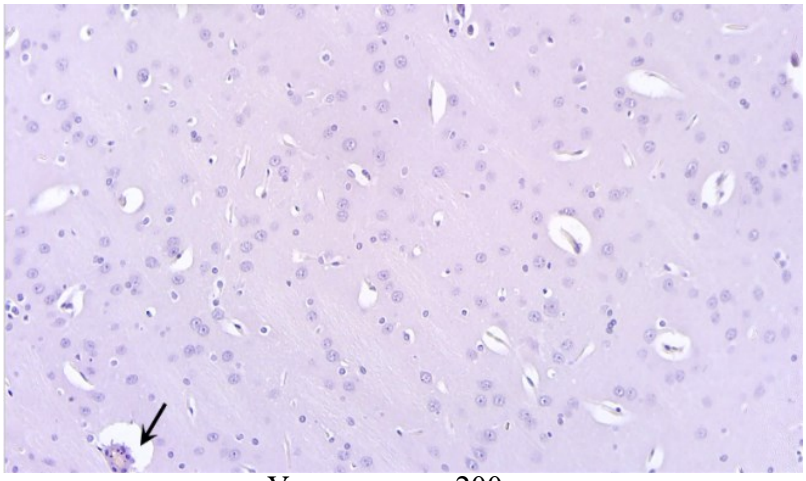
По данным Таблицы 14, в ***контрольной группе*** гистологическая картина головного мозга крыс соответствовала нормальной морфологии. Парасагиттальные срезы префронтальной коры выявили нормальную гистологическую структуру префронтальной коры, которая была организована в шесть последовательных слоев: снаружи внутрь шли наружный молекулярный, наружный зернистый, наружный пирамидальный, внутренний зернистый, внутренний пирамидальный и полиморфный слой (самый внутренний, граничащий с белым веществом большого мозга). Во всех исследованных полях зрения отмечались тела нейронов с чёткими контурами, ядра с равномерным распределением хроматина и различимыми ядрышками. Патоморфологических признаков острой нейрональной деструкции (карипикноз, кариорексис, кариолизис) или цитоплазматической вакуолизации не выявлено. Интерстициального или цитотоксического отёка, очагов кровоизлияний, сидерофагов, гемосидерина или эритроцитарных инфильтратов не выявлено. Мягкие мозговые оболочки интактны.

Миелиновые волокна сохранны, признаков демиелинизации или аксонального набухания не наблюдается. Таким образом, патологических изменений в мозге крыс при интрамедуллярной имплантации БНЦ не выявлено: гистоархитектоника слоёв, нейрональные и глиальные элементы, сосудистое русло и мягкие мозговые оболочки соответствуют нормальной морфологии.

В основной группе во всех микропрепаратах выявлялись отдельные нейроны с признаками лёгкого набухания или гиперхромии ядер. Общая архитектоника коры и подкорковых структур соответствовала гистологической норме. У большинства животных 6 (75 %) отмечался слабовыраженный перинейрональный и/или периваскулярный отёк, проявлявшийся тонким просветлением («ореолом») вокруг отдельных клеток, без компрессии сосудов и деформации слоёв (балл 1).

У меньшей части животных 2 (25 %) регистрировались более отчётливые очаговые отёчные изменения с частичным сдавлением капилляров, что соответствовало баллу 2. В ряде случаев выявлялись единичные периваскулярные экстравазаты эритроцитов, ограниченные отдельными сосудами, без тенденции к распространению, признаков коагулопатии или васкулита не установлено. В мягких мозговых оболочках присутствовали только единичные лимфоциты. Были обнаружены расширенные полнокровные кровеносные капилляры. Спонгиоз отсутствовал: в отдельных препаратах определялись мелкие вакуоли в белом веществе, не нарушавшие слоистость ткани и не влияющие на её архитектонику.

Таким образом, гистологическое исследование головного мозга крыс, проведённое в рамках оценки острой нейротоксичности имплантата не выявило патологических изменений нервной ткани. Структурная организация ткани головного мозга соответствовала гистологической норме. Во всех исследованных случаях были зафиксированы лишь минимальные изменения, соответствующие 1 баллу. Умеренные и тяжёлые повреждения не выявлены ни в одном случае.



Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение х200

Рисунок 11 – Гистологический микропрепарат головного мозга основной группы (БНЦ)

Как представлено на Рисунке 11: морфологическая картина соответствует слабому периваскулярному (стрелка) и перинейрональному отеку без признаков деформации ткани, некроза или геморрагий.

При оценке нейротоксичности комплексная гистологическая оценка показала, что БНЦ не вызывает морфологически верифицируемой острой нейротоксичности. Выявленные изменения носят минимальный, неспецифический и потенциально обратимый характер, соответствуют 1 баллу (острых поражений нет) и, вероятнее всего, отражают адаптационно-компенсаторные процессы либо артефакты фиксации, а не истинное острое токсическое повреждение.

Сердце

Сравнительная гистопатологическая оценка острого повреждения миокарда у крыс в исследуемых группах представлена в Таблице 15.

Таблица 15 - Гистопатологическая оценка острой кардиотоксичности имплантата в группах исследования

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень***
1	Некроз кардиомиоцитов*	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Интерстициальный отёк*	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Гидропическая и вакуольная дистрофия**	0	8 (100)	8 (100)	1
		1	-	-	
4	Гипертрофия кардиомиоцитов**	0	8 (100)	8 (100)	1
		1	-	-	
5	Очаговая гиперэозинофилия**	0	8 (100)	6 (75)	0,2333
		1	-	2 (25)	
6	Увеличение размера ядер кардиомиоцитов(КМ)/появление многоядерных КМ**	0	8 (100)	8 (100)	1
		1	-	-	
7	Клеточный инфильтрат**	0	8 (100)	8 (100)	1
		1	-	-	
8	Венозное полнокровие**	0	8 (100)	6 (75)	0,2333
		1	-	2 (25)	

Продолжение таблицы 15

*Примечание - некроз кардиомиоцитов: 1 балл - единичные кардиомиоциты с набуханием, вакуолизацией саркоплазмы или гиперхромией ядер; 2 балла - очаги (десятки клеток) с коагуляционным некрозом; 3 балла - множественные очаги некроза, фрагментация волокон, выраженный кариопикноз/кариорексис; 4 балла - обширный коагуляционный или колликвационный некроз.

Интерстициальный отёк: 1 балл - периваскулярный отёк; 2 балла - очаговый интерстициальный отёк; 3 балла - выраженный отёк с компрессией капилляров; 4 балла - диффузный отёк.

** Примечание - «0» - отсутствие, «1» - наличие.

***Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни для количественных параметров, для качественных – критерий Фишера. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

По данным Таблицы 15, в ***контрольной группе*** (АСК) строение миокарда левого и правого желудочков соответствовало гистологической норме. При окраске гематоксилином и эозином гистоархитектоника сердечной мышцы во всех гистологических срезах всех животных была сохранена. Определялись ряды кардиомиоцитов без гипертрофии, выраженной эозинофилии или поперечной исчерченности, с расположенным в центре клетки базофильным овальным везикулярным ядром.

В ***основной группе*** гистоархитектоника миокарда сохранялась у всех животных. Во всех случаях (100 %) выявлялись единичные кардиомиоциты с набуханием и вакуолизацией цитоплазмы (1 балл). Лёгкий интерстициальный отёк не сопровождался выраженной компрессией сосудов. Очаговая гиперэозинофилия кардиомиоцитов определялась у 2 (25 %) животных. Гипертрофия кардиомиоцитов, увеличение размеров ядер с многоядерностью кардиомиоцитов и клеточные инфильтраты не отмечались ни в одном случае. Венозное полнокровие зафиксировано у 2 (25 %) животных.

Таким образом, острая гистопатологическая реакция миокарда в обеих экспериментальных группах характеризовалась отсутствием некроза, фибриноидного васкулита или выраженной воспалительной инфильтрации. Морфологическая картина в обеих экспериментальных группах соответствует минимальной степени острой кардиотоксичности (1 балл по ключевым параметрам) и указывает на биосовместимость исследуемого материала, проявляющуюся минимальной тканевой реакцией без признаков острого токсического повреждения.

Лёгкие

Сравнительная гистопатологическая оценка острого повреждения легких у крыс в исследуемых группах представлена в Таблице 16. Анализ включал изучение структурных изменений лёгочной ткани и степени их выраженности. Сопоставление морфологических показателей контрольной и основной групп проводилось для выявления возможных признаков повреждения лёгких при оценке острой токсичности биокомпозита.

Таблица 16 - Гистопатологическая оценка острой токсичности имплантата в ткани лёгких животных в группах

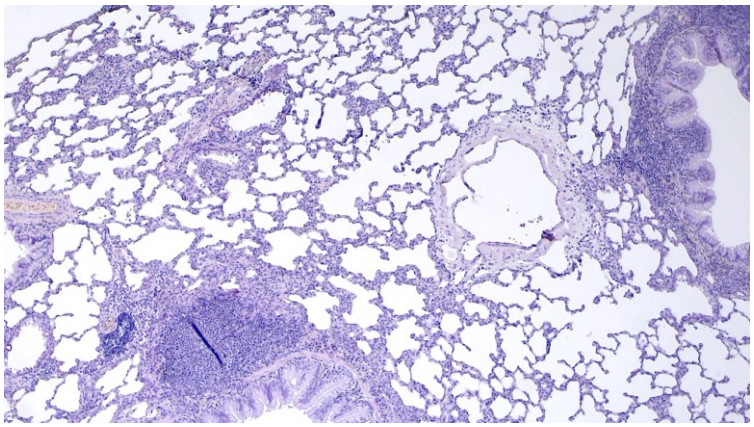
№ п/п	Гистологические критерии	Балл*	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень**
1	Некроз/деструкция альвеолярного эпителия/эпителия бронхиол	0	8 (100)	8 (100)	1
		1	-	-	
2	Отёк интерстициальный	0	8 (100)	8 (100)	1
		1	-	-	
3	Отёк альвеолярный	0	8 (100)	8 (100)	1
		1	-	-	
4	Ателектазы/эмфизема	0	8 (100)	8 (100)	1
		1	-	-	
5	Клеточный инфильтрат	0	8 (100)	6 (75)	0,2333
		1	-	2 (25)	
6	Многоядерные гигантские клетки/гранулемы	0	8 (100)	8 (100)	1
		1	-	-	
7	Венозное полнокровие	0	8 (100)	6 (75)	0,2333
		1	-	2 (25)	
8	Геморрагии/микротромбы	0	8 (100)	8 (100)	1
		1	-	-	

* - «0» - отсутствие, «1» - наличие.

**Примечание: статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Фишера. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Как следует из Таблицы 16, в ***контрольной группе (АСК)*** гистоархитектоника лёгочной ткани сохранена. Альвеолярные перегородки тонкие, без утолщения. Альвеолярные ходы и респираторные бронхиолы чётко различимы. Стенка респираторных и терминальных бронхиол выстлана однослойным кубическим эпителием, подслизистый слой без отёка, гладкомышечный слой нормальной толщины. Просветы бронхиол свободны. Артерии и венулы малого круга с ровными контурами, эндотелий интактный. Признаков полнокровия, стаза, тромбозов или васкулита не выявлено. Соединительнотканный каркас тонкий, лимфо-макрофагальной инфильтрации и фиброза не отмечено. Альвеолярные макрофаги единичные. Висцеральная плевра тонкая, мезотелий сохранён, воспалительных изменений нет.

Продолжая анализ Таблицы 16, получены следующие результаты: в ***основной группе (БНЦ)*** гистоархитектоника альвеолярного отдела также сохранена. Альвеолы имели правильную форму и свободные просветы, однако в 2 (25 %) случаях в межальвеолярных перегородках отмечалось лёгкое увеличение клеточной инфильтрации и пролиферации альвеолоцитов. В составе инфильтрата преобладали лимфоциты и макрофаги. В отдельных полях зрения выявлялись признаки лёгкого интерстициального отёка. Сосудистое русло демонстрировало умеренное полнокровие, без тромбозов или выраженных геморрагий. Эпителий бронхиол интактен, без гистопатологических признаков десквамации, некроза или гиперплазии. Многоядерные гигантские клетки и гранулематозные структуры не обнаружены.



Лёгкие. Окраска: гематоксилин и эозин. Увеличение х40

Рисунок 12 – Гистологический микропрепарат лёгочной ткани основной группы (БНЦ)

По данным Рисунка 12, морфологическая картина лёгочной ткани соответствует сохранённой структуре дыхательного отдела с очаговым венозным полнокровием. Признаков выраженного воспаления, альвеолярного отёка или токсического повреждения не выявлено.

Таким образом, в группе с интрамедуллярной имплантацией БНЦ в 2 (25 %) случаях выявлены очаговые изменения по типу лимфомакрофагальной инфильтрации и интерстициального отёка, однако эти проявления носили ограниченный характер и не сопровождались острым токсическим повреждением ткани. Сравнительный анализ показал, что в обеих группах архитектоника лёгких сохранена, выявленные лёгкие изменения характеризуются лёгким венозным полнокровием. Во всех случаях отсутствовали признаки острой токсичности (альвеолярного некроза, массивного отёка, выраженной воспалительной инфильтрации, гиалиновых мембран, тромбозов), что подтверждает биосовместимость имплантата.

Печень

Сравнительная гистопатологическая оценка острого повреждения печени у крыс в исследуемых группах представлена в Таблице 17.

Таблица 17 - Гистопатологическая оценка острой гепатотоксичности имплантата

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Некроз гепатоцитов	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Дистрофия гепатоцитов	1	8 (100)	5 (63)	0,07
		2	-	3 (37)	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Воспалительная инфильтрация	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
4	Сосудистые изменения (полнокровие, стаз, геморрагии)	1	8 (100)	5 (63)	0,07
		2	-	3 (37)	
		3	-	-	
		4	-	-	
5	Купферовские клетки и макрофаги	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Холестаз	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
*Примечание: статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.					

Как видно из Таблицы 17, в срезах печени ***контрольной группы (АСК)*** у всех животных строение печени соответствовало гистологической норме. При окраске гематоксилином и эозином печень состояла из многочисленных печеночных долек, образованных тяжами гепатоцитов, отходящих кнаружи от центральной вены к периферии дольки, разделеными синусоидами.

Гепатоциты имели полигональную форму с эозинофильной зернистой цитоплазмой и везикулярно-базофильными ядрами.

В ***основной группе (БНЦ)*** гистологическая структура печени сохранялась. У 3 (37 %) животных выявлялась лёгкая степень вакуолизации цитоплазмы гепатоцитов (2 балла). Сосудистые изменения проявлялись лёгким венозным полнокровием и стазом у 3 (37 %) животных. Активность купферовских клеток во всех случаях оставалась в пределах минимальной степени (1 балл). Холестаз отсутствовал.

Таким образом, при интрамедуллярной имплантации БНЦ морфологические изменения печени носили лёгкий характер за счёт дистрофических процессов и сосудистых нарушений, однако не сопровождались некрозом, выраженной воспалительной инфильтрацией или холестазом. Гистопатологические признаки соответствовали лёгкой степени гепатотоксичности.

Почки

Сравнительная гистопатологическая оценка острого повреждения почек у крыс в исследуемых группах представлена в Таблице 18.

Таблица 18 - Гистопатологическая оценка острой нефротоксичности имплантата в группах исследования

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Некроз эпителия канальцев	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Дистрофия эпителия канальцев	1	8 (100)	6 (75)	0,17
		2	-	2 (25)	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Отёк интерстиция	1	8 (100)	6 (75)	0,17
		2	-	2 (25)	
		3	-	-	
		4	-	-	
4	Воспалительный инфильтрат	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 18

1	2	3	4	5	6
5	Гломерулопатия	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Сосудистые изменения (венозное полнокровие, стазы, геморрагии)	1	8 (100)	5 (63)	0,07
		2	-	3 (37)	
		3	-	-	
		4	-	-	
7	Белковые цилиндры и экссудат в канальцах	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.					

Анализируя данные Таблицы 18, в ***контрольной группе (АСК)*** гистологическое строение почек у всех животных соответствовало анатомической норме. При окраске гематоксилином и эозином выявлена нормальная структура почки с мальпигиевыми тельцами, состоящими из клубочка, окруженного капсулой Боумена. Проксимальные извитые канальцы с узким просветом были выстланы пирамидальными эпителиальными клетками с ацидофильной цитоплазмой и базальными округлыми везикулярными ядрами. Дистальные извитые канальцы были выстланы относительно большим количеством кубовидных эпителиальных клеток со светлой ацидофильной цитоплазмой и центральными округлыми везикулярными ядрами. Эпителий проксимальных и дистальных канальцев был однородным, без признаков вакуолизации, гиперплазии или деструкции. Просветы канальцев не расширены. Интерстициальная ткань без клеточной инфильтрации, гиалиновая гломерулопатия и гипертрофия клубочков не отмечались.

В ***основной группе (БНЦ)*** гистоархитектоника клубочков оставалась интактной, капсула Боумена не утолщена, склероза и гиалиноза клубочков не отмечено. В эпителии проксимальных извитых канальцев у 2 (25 %) животных отмечались единичные вакуоли. В эпителии дистальных канальцев фокально отмечалась лёгкая цитоплазматическая вакуолизация. В интерстиции у 2 (25 %) животных отмечался лёгкий интерстициальный отёк. Воспалительная реакция отсутствовала, определялись только единичные лимфоциты. Сосудистые изменения выражались в виде венозного полнокровия: у 5 животных (63 %) лёгкой степени и стазов. Таким образом, при интрамедуллярной имплантации БНЦ изменения носили лёгкий

дистрофический характер, без некроза канальцевого эпителия или выраженной воспалительной реакции, что соответствует лёгкой степени обратимых изменений.

Поджелудочная железа

Сравнительная гистопатологическая оценка острого повреждения поджелудочной железы у крыс в исследуемых группах представлена в Таблице 19.

Таблица 19 - Гистопатологическая оценка острой панкреатотоксичности имплантата в поджелудочной железе в группах исследования

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Некроз ацинарных клеток	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Дистрофия ацинарных клеток	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Воспалительная инфильтрация (интерстициальная и периацинарная)	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
4	Отёк интерстиция	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
5	Сосудистые изменения (полнокровие, стаз, геморрагии)	1	8 (100)	6 (75)	0,17
		2	-	2 (25)	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Изменения островков Лангерганса	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.					

На основании анализа Таблицы 19, в ***контрольной группе (АСК)*** гистопаттерн поджелудочной железы соответствовал гистологической норме. Ни у одного из животных в поджелудочной железе не было выявлено признаков гиперплазии или атрофии островков Лангерганса, кариопикноза, вакуолизации клеток, очагового некроза, апоптоза или фиброзно-воспалительных изменений.

В ***основной группе (БНЦ)*** гистологическая структура поджелудочной железы сохранена. Ацинарные клетки формируют компактные дольки с чётко выраженной полярностью цитоплазмы, округлые ядра, без признаков пикноза и кариолизиса. Вакуолизация цитоплазмы отсутствует во всех случаях. Воспалительная инфильтрация в интерстиции и периацинарных зонах не отмечалась. У двух животных (25 %) зафиксировано лёгкое сосудистое полнокровие: венулы и капилляры междольных перегородок были умеренно расширены, просветы заполнены форменными элементами крови без признаков стаза или тромбозов. Островки Лангерганса сохраняли нормальную архитектонику, их клетки были равномерно распределены, со светлой цитоплазмой и чёткими ядрами.

Таким образом, морфологическая картина поджелудочной железы в условиях интрамедуллярной имплантации также характеризовалась отсутствием выраженных патологических изменений, что свидетельствует об отсутствии признаков острой панкреатотоксичности БНЦ.

Селезёнка

Сравнительная гистопатологическая оценка острого повреждения селезёнки у крыс в исследуемых группах представлена в Таблице 20.

Таблица 20 - Гистопатологическая оценка острой токсичности имплантата в селезёнке в группах исследования

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Некроз	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Воспалительная инфильтрация	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Отёк стромы и синусов	1	8 (100)	6 (75)	0,17
		2	-	2 (25)	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 20

1	2	3	4	5	6
4	Сосудистые изменения (полнокровие, стаз и кровоизлияния)	1	8 (100)	6 (75)	0,17
		2	-	2 (25)	
		3	-	-	
		4	-	-	
5	Гиперплазия/гипоплазия лимфоидных фолликулов	1	8 (100)	5 (63)	0,07
		2	-	3 (37)	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Макрофагальная реакция/гемосидероз	1	8 (100)	6 (75)	0,17
		2	-	2 (25)	
		3	-	-	
		4	-	-	
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.					

Как видно из Таблицы 20, во всех исследуемых группах сохранялась общая архитектоника селезёнки с чётким разграничением белой и красной пульпы.

В селезёнке крыс ***контрольной группы (АСК)*** гистоархитектоника сохранена, белая пульпа представлена фолликулами преимущественно первичного типа, маргинальная зона очерчена, без реактивной гиперплазии. Красная пульпа сформирована равномерными тяжами и синусоидами с типичным палочковидным эндотелием, кровенаполнение умеренное, единичные гемосидерофаги допустимы. Признаков некроза, дистрофии, гранулематозных или гнойных изменений нет, активного экстрамедуллярного гемопоэза не отмечается.

В ***основной группе (БНЦ)*** сохранялась типичная структура селезёнки, однако изменения были более выраженными. Белая пульпа представлена увеличенными лимфоидными фолликулами, у части животных (37 %) наблюдалась умеренная гиперплазия с расширением герминативных центров и частичной редукцией мантийной зоны (2 балла). В красной пульпе прослеживались очаги умеренного стаза и полнокровия: у 6 животных (75 %) изменения были лёгкими (1 балл), у 2 (25 %) - умеренными (2 балла). Строма и синусы демонстрировали признаки лёгкого отёка, выражавшегося расширением просветов синусоидов и разрежением клеточных элементов. Воспалительная инфильтрация была минимальной и ограничивалась единичными лимфоцитами и макрофагами. У двух животных (25 %) - умеренная степень с фокусами внутриклеточного гемосидерина (2 балла).

Таким образом, при имплантации БНЦ селезёнка сохраняла основную архитектонику, некротические и воспалительные изменения ограничивались

минимальной степенью. Отличительной чертой группы с интрамедуллярной имплантацией являлась большая выраженность гиперпластических изменений лимфоидных фолликулов и активации макрофагальной системы, что отражает компенсаторно-адаптивный характер ответа иммунокомпетентного органа. Выявленные изменения не носили признаков выраженной острой токсичности и не сопровождались массивным некрозом, диффузной воспалительной реакцией или разрушением стромы.

Кишечник

Сравнительная гистопатологическая оценка острого повреждения кишечника у крыс в исследуемых группах представлена в Таблице 21.

Таблица 21 - Гистопатологическая оценка острой токсичности имплантата в микропрепаратах кишечника животных

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Некроз эпителия	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Дистрофия эпителия	1	8 (100)	5 (63)	0,07
		2	-	3 (37)	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Воспалительная инфильтрация слизистой/подслизистой	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
4	Отёк слизистой и подслизистой	1	8 (100)	6 (75)	0,17
		2	-	2 (25)	
		3	-	-	
		4	-	-	
5	Сосудистые изменения (полнокровие, стаз, кровоизлияния)	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Лимфоидные структуры кишечника (Пейеровы бляшки, солитарные фолликулы)	1	8 (100)	5 (63)	0,07
		2	-	3 (37)	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 21

*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Как следует из Таблицы 21, в ***контрольной группе (АСК)*** гистологическая структура стенки тонкого и толстого кишечника животных полностью соответствовала гистологической норме. У всех крыс отсутствовали признаки деструктивных изменений: эпителий был интактен, клеточная инфильтрация собственной пластинки не выявлена, крипты сохранены.

В ***основной группе (БНЦ)*** общая гистоархитектоника кишечной стенки сохранена. Эпителий слизистой сохранён: в 3 (37 %) микропрепаратах выявлена очаговая гидропическая или зернистая дистрофия (2 балла). Некротические изменения ограничивались единичными апоптотическими или некротическими клетками в криптах или ворсинках (1 балл у всех животных). Воспалительная инфильтрация оставалась минимальной, представлена лимфоцитами и единичными макрофагами (1 балл). У 2 (25 %) животных определялся очаговый отёк подслизистой с умеренным расширением межклеточного матрикса. Сосудистые изменения включали венозное полнокровие и признаки стаза у всех животных (1 балл). У 3 (37 %) животных отмечались признаки лёгкой гиперплазии лимфоидных структур с расширением герминативных центров.

Таким образом, в обеих группах выявленные изменения носят минимальный обратимый характер. В основной группе (интрамедуллярная имплантация БНЦ) отмечались более выраженные дистрофические изменения и отёк слизистой, а также реактивная гиперплазия лимфоидных структур. Признаков умеренной острой токсичности (некроза эпителия, воспаления или дистрофических/сосудистых повреждений) не выявлено.

Семенники

Сравнительная гистопатологическая оценка острого повреждения семенников крыс в исследуемых группах представлена в Таблице 22.

Таблица 22 - Гистопатологическая оценка острой токсичности имплантата в семенниках

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК	БНЦ	p-уровень*
			Контрольная группа n = 8	Основная группа n = 8	
1	Дегенерация/некроз зародышевого эпителия	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 22

1	2	3	4	5	6
2	Гипосперматогенез/задержка созревания	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Поражение клеток Сертоли	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
4	Атрофия/дистрофия семенных канальцев	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
5	Изменения интерстиция и клеток Лейдига	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Воспалительная реакция	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
7	Сосудистые изменения	1	8 (100)	6 (75)	0,17
		2	-	2 (25)	
		3	-	-	
		4	-	-	
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.					

Как видно из Таблицы 22, в ***контрольной группе (АСК)*** определяются множественные семенные канальцы округлой/овальной формы с тонкой ровной базальной мембраной и 1-2 рядами перитубулярных миоидных клеток. Клетки Сертоли прилежат к базальной мембране, ядра светлые, овальные, с заметным ядрышком. Интерстиций узкий, представлен рыхлой соединительной тканью с капиллярами и типичными лейдиговскими клетками (полигональные, эозинофильная цитоплазма), без гиперплазии; отёк и воспалительная инфильтрация отсутствуют. Гиалиноза, атрофии или десквамации эпителия не отмечается, сосуды без признаков стаза и васкулита. Морфологическая картина соответствует гистологической норме с сохранённым активным сперматогенезом.

В ***основной группе (БНЦ)*** также во всех случаях (100 %) были выявлены изменения, соответствующие 1-2 баллам, то есть минимальные или лёгкой степени. Герминативный эпителий в семенных канальцах сохранял правильную стратификацию, у отдельных животных отмечалась вакуолизация цитоплазмы сперматогоний и сперматоцитов, единичные пикнотические ядра. Некроз отсутствовал. Сперматогенез сохранен. Клетки Сертоли имели признаки лёгкой дистрофии: вакуолизация и гиперхромия ядер. Семенные канальцы частично демонстрировали истончение эпителия. Интерстициальная ткань имела признаки лёгкого отёка. Воспалительные изменения были представлены минимальной лимфоцитарной инфильтрацией в интерстиции. У 2 (25 %) животных отмечались фокально стаз крови и расширение венул (2 балла).

Таким образом, в основной группе признаков острой токсичности БНЦ в семенниках не выявлено.

Придатки яичка

Сравнительная гистопатологическая оценка острого повреждения придатков яичка крыс в исследуемых группах представлена в Таблице 23.

Таблица 23 - Гистопатологическая оценка острой токсичности имплантата в придатках яичка

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Дистрофия/дегенерация эпителия эпидидимальных канальцев	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Изменения в просвете канальцев	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Аспермия/снижение содержания сперматозоидов	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
4	Интерстициальные изменения/воспаление	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 23

1	2	3	4	5	6
5	Сосудистые изменения (венозное полнокровие, стаз, кровоизлияния)	1	8 (100)	5 (63)	0,07
		2	-	3 (37)	
		3	-	-	
		4	-	-	
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.					

По результатам Таблицы 23, в ***контрольной группе (АСК)*** у всех животных извитой выводной проток выстлан многорядным призматическим эпителием, полярность сохранена, атипии и патологических митозов нет. Базальная мембрана ровная, собственная пластинка тонкая, рыхлая. Мышечная оболочка представлена циркулярными пучками гладких миоцитов нормальной толщины, сосуды стромы без особенностей. Просветы отделов протока содержат скопления сперматозоидов в пределах физиологической нормы.

В ***основной группе (БНЦ)*** во всех случаях (100 %) изменения оценивались на уровне 1-2 баллов, что соответствует минимальной или лёгкой степени морфологических нарушений. Эпителий эпидидимальных канальцев сохранял целостность и правильную стратификацию, однако у части животных выявлялись признаки дистрофических изменений: вакуолизация цитоплазмы, лёгкая гиперхромия ядер, редукция высоты клеток и уплощение эпителиоцитов. В отдельных канальцах фиксировалась очаговая десквамация клеток в просвет, сопровождавшаяся появлением клеточных обломков. В просветах канальцев наряду с нормальными сперматозоидами определялись небольшие скопления клеточного детрита и сперматидного материала. Интерстициальная ткань сохраняла общую архитектонику, но в отдельных полях зрения выявлялся слабый отёк и единичные периваскулярные лимфоциты. У 3 (37 %) животных наблюдалось венозное полнокровие и стаз, сопровождавшиеся расширением венул и единичными мелкими периваскулярными геморрагиями.

Таким образом, при интрамедуллярной имплантации острой токсичности БНЦ не установлено. Морфологические изменения в придатках яичка во всех случаях были ограничены минимальной степенью, соответствующей адаптивным процессам.

Гистологическое исследование органов (хронической токсичности)

Для определения хронической токсичности проведено гистологическое исследование внутренних органов в контрольной и основной группах.

Головной мозг

Гистологическая оценка хронической нейротоксичности у крыс при интрамедуллярной имплантации БНЦ в сравнении с АСК представлена в Таблице 24.

Таблица 24 - Гистопатологическая оценка хронической нейротоксичности БНЦ в группах исследования

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Дистрофия/некроз нейронов	1	8 (100)	7 (87.5)	0,3816
		2	-	1 (12.5)	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Отёк мозга	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Геморрагии	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
4	Острое воспаление оболочек	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
5	Сосудистое повреждение/васкулит	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Аксонопатия	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
7	Глиоз	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
8	Лимфоцитарная инфильтрация	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
9	Гемосидероз/ микрокальцинаты	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 24

*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Как видно из Таблицы 24, в ***контрольной группе (АСК)*** гистологическая картина головного мозга крыс соответствовала норме. Парасагиттальные срезы префронтальной коры выявили нормальную гистологическую структуру префронтальной коры. Во всех исследованных полях зрения отмечались тела нейронов с чёткими контурами, ядра с равномерным распределением хроматина и различимыми ядрышками. Патоморфологических признаков нейрональной деструкции (карипикноз, кариорексис, кариолизис) или цитоплазматической вакуолизации не выявлено. Интерстициального или цитотоксического отёка, очагов кровоизлияний, сидерофагов, гемосидерина или эритроцитарных инфильтратов не выявлено. Мягкие мозговые оболочки интактны. Признаков демиелинизации или аксонального набухания не наблюдается, межклеточные промежутки не расширены. Гемосидероза, микрокальцинатов и лимфоцитарной инфильтрации не выявлено ни в одном случае.

В ***основной группе (БНЦ)*** во всех микропрепаратах гистологическая структура головного мозга крыс соответствовала нормальной морфологии. Архитектоника коры и подкорковых структур сохранена, слоистость отчётливо выражена. Нейроны распределены равномерно, ядра крупные, светлые, с равномерным хроматином и различимыми ядрышками.

В 1 (12,5 %) случае выявлялись единичные нейроны с признаками лёгкой дистрофии: слабое набухание цитоплазмы и лёгкая гиперхромия ядер без признаков некроза, кариопикноза или распада ядра. В ряде микропрепаратов определялись единичные периваскулярные эритроциты. Стенки сосудов интактны, фибриноидный некроз, воспалительная инфильтрация и тромбозы отсутствовали. Капилляры местами умеренно полнокровны и расширены. В мягких мозговых оболочках встречались единичные лимфоциты.

Гистологическая картина головного мозга крыс после интрамедуллярной имплантации БНЦ соответствовала нормальной морфологии. Единичные случаи лёгкого периваскулярного отёка и начальной дистрофии нейронов оценивались как минимальные, неспецифические изменения. Признаков воспаления, некроза или сосудистого повреждения не выявлено.

Таким образом, гистологическое исследование головного мозга крыс, проведённое в рамках оценки хронической нейротоксичности, не выявило патологических изменений нервной ткани, структурная организация головного мозга соответствовала гистологической норме. Повреждения умеренной и тяжёлой степени не выявлены ни в одном случае.

Таким образом, комплексная гистологическая оценка через 6 месяцев показала, что БНЦ не вызывает морфологически верифицируемой

хронической нейротоксичности. Выявленные изменения носят минимальный, неспецифический и потенциально обратимый характер и, вероятно, отражают адаптационно-компенсаторные процессы либо артефакты фиксации, а не истинное хроническое токсическое повреждение.

Сердце

Гистологическая оценка хронической кардиотоксичности у крыс при интрамедуллярной имплантации БНЦ в сравнении с контролем (АСК) представлена в Таблице 25.

Таблица 25 - Гистопатологическая оценка хронической кардиотоксичности БНЦ в группах исследования

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Дистрофия кардиомиоцитов	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Некроз кардиомиоцитов	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Сосудистые нарушения	1	8 (100)	7 (87.5)	0,3816
		2	-	1 (12.5)	
		3	-	-	
		4	-	-	
4	Интерстициальный отёк	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
5	Клеточная инфильтрация	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Регенераторно-гипертрофические изменения кардиомиоцитов	1	8 (100)	7 (87.5)	0,3816
		2	-	1 (12.5)	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 25

1	2	3	4	5	6
7	Интерстициальный и периваскулярный фиброз	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
8	Гранулематозное воспаление	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.					

Как следует из Таблицы 25, в ***контрольной группе (АСК)*** во всех гистологических препаратах строение миокарда левого и правого желудочков соответствовало гистологической норме. Гистоархитектоника сохранена: кардиомиоциты располагались упорядоченными продольными пучками с выражеными умеренно межмышечными прослойками соединительной ткани.

Кардиомиоциты характеризовались хорошо очерченными контурами, с равномерно окрашенной цитоплазмой. Признаки гипертрофии или атрофии не выявлены. В поперечных срезах кардиомиоциты имели полигональную форму, а в продольных срезах - вытянутую форму, с параллельным расположением волокон. Ядра кардиомиоцитов овальной формы, чётко контурированы, расположены центрально, хроматин распределён равномерно, ядрышки визуализируются отчётливо. Признаков гиперхромии, пикноза, кариорексиса или кариолиза не выявлено. Соединительная ткань представлена тонкими прослойками коллагеновых волокон без признаков фиброза. Сосуды микроциркуляторного русла полнокровны умеренно, эндотелий клеток не изменён, просветы не расширены, стаза и кровоизлияний нет. В межмышечных прослойках отсутствуют признаки воспалительной инфильтрации или жировой дегенерации.

Признаков дистрофических, некротических, воспалительных или сосудистых изменений в миокарде крыс не выявлено.

В ***основной группе (БНЦ)*** гистоархитектоника миокарда сохранялась у всех животных. Кардиомиоциты располагались параллельными рядами, с сохранением поперечнополосатой исчерченности, чётких контуров и равномерной эозинофильной окраски.

В каждом препарате (100 % случаев) отмечались единичные кардиомиоциты с признаками лёгкой гидропической или вакуольной дистрофии, проявлявшейся умеренным набуханием и просветлением цитоплазмы без разрушения структурных элементов. Эти изменения оценивались как минимальная степень некробиотических нарушений (1 балл).

Интерстициальный отёк, выявленный в отдельных зонах, был слабовыраженным и не сопровождался компрессией сосудов микроциркуляторного русла. Стенки капилляров и венул оставались интактными.

У 1 животного (12,5 %) наблюдались регенераторно-гипертрофические изменения кардиомиоцитов, проявлявшиеся увеличением размеров клеток и ядер, а также появлением многоядерных кардиомиоцитов. В этом же случае в интерстиции определялись единичные периваскулярные лимфоциты. Венозное полнокровие также отмечено у 1 животного (12,5 %) и характеризовалось умеренным расширением сосудов с застоем крови без признаков стаза, геморрагий или повреждения сосудистой стенки.

Гистологических признаков склероза, фиброза или гранулематозного воспаления не выявлено.

Морфологическая картина в обеих экспериментальных группах соответствует минимальной степени хронической кардиотоксичности (1 балл по ключевым параметрам), что указывает на биосовместимость БНЦ.

Лёгкие

Гистологическая оценка хронической токсичности в лёгких крыс при интрамедуллярной имплантации БНЦ в сравнении с конролем (АСК) представлена в Таблице 26.

Таблица 26 - Гистопатологическая оценка хронической токсичности БНЦ в ткани лёгких

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Дистрофия/некроз альвеолярного эпителия и/или эпителия бронхиол	1	8 (100)	7 (87.5)	0,3816
		2	-	1 (12.5)	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Интерстициальный/ альвеолярный отёк	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Сосудистые нарушения	1	8 (100)	6 (75.0)	0,17
		2	-	2 (25.0)	
		3	-	-	
		4	-	-	
4	Перибронхиальная инфильтрация	1	8 (100)	5 (63)	0,07
		2	-	3 (37)	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 26

1	2	3	4	5	6
5	Периваскулярная инфильтрация	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Макрофагальная инфильтрация	1	8 (100)	5 (63)	0,07
		2	-	3 (37)	
		3	-	-	
		4	-	-	
7	Эозинофильная инфильтрация	1	8 (100)	6 (75.0)	0,17
		2	-	2 (25.0)	
		3	-	-	
		4	-	-	
8	Гиперплазия бронхиального эпителия	1	8 (100)	6 (75.0)	0,17
		2	-	2 (25.0)	
		3	-	-	
		4	-	-	
9	Метаплазия эпителия бронхов	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
10	Лимфоидные фолликулы (лимфоидная гиперплазия)	1	8 (100)	6 (75.0)	0,17
		2	-	2 (25.0)	
		3	-	-	
		4	-	-	
11	Фиброз	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
12	Гранулематозная реакция	1	8 (100)	7 (87.5)	0,3816
		2	-	1 (12.5)	
		3	-	-	
		4	-	-	

*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Как следует из Таблицы 26, в ***контрольной группе (АСК)*** гистоархитектоника лёгочной ткани сохранена. Альвеолярные перегородки тонкие, без признаков утолщения или отёка, сосуды и альвеолы хорошо

различимы. Альвеолы и респираторные бронхиолы имеют типичное строение: стенка выстлана однослойным кубическим эпителием, подслизистый слой без признаков отёка. Просветы бронхиол свободны. Артерии и венулы с ровными контурами, эндотелий интактный, без признаков дистрофии, полнокровия, стаза или тромбоза. Перибронхиальные и периваскулярные зоны без воспалительной инфильтрации, соединительнотканный каркас тонкий, без признаков фиброза. Скоплений эозинофильных клеток, гранулём и лимфоидных фолликулов не наблюдается. Висцеральная плевра тонкая, мезотелий сохранён, фиброза нет.

В ***основной группе (БНЦ)*** гистологическое строение лёгочной ткани сохраняет типичную архитектонику респираторного отдела. Межальвеолярные перегородки тонкие, без признаков отёка или утолщения. Сосудистый рисунок выражен чётко, капилляры и мелкие венулы умеренно наполнены кровью. В 2 (25 %) случаях отмечалось лёгкое венозное полнокровие и умеренное расширение отдельных сосудов, без признаков стаза, тромбозов или плазморрагии.

В строме отмечалась очаговая лимфомакрофагальная инфильтрация без деструкции альвеолярной структуры. Просветы альвеол свободны, скоплений экссудата, фибрина и гиалиновых мембран не выявлено. Эпителий бронхиол и альвеолоциты сохранены, деструктивные и некротические изменения отсутствуют. Гиперплазия бронхиального эпителия отмечалась у 2 (25 %) животных в виде лёгкого многослойного утолщения без признаков метаплазии. У 2 (25 %) животных выявлялись единичные эозинофилы в перибронхиальной зоне. Перибронхиальная инфильтрация лимфоцитарными скоплениями в 1-2 слоя клеток встречалась у 3 (37 %) животных. В 2 (25 %) случаях отмечались обширные периваскулярные и перибронхиальные гранулематозные очаги с инфильтрацией лимфоцитами, макрофагами и гигантскими клетками.

Печень

Сравнительная гистопатологическая оценка хронической гепатотоксичности у крыс при интрамедуллярной имплантации БНЦ в сравнении с АСК представлена в Таблице 27.

Таблица 27 - Гистопатологическая оценка хронической гепатотоксичности композита

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Некроз гепатоцитов	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 27

1	2	3	4	5	6
2	Дистрофия (гидропическая и зернистая) гепатоцитов	1	8 (100)	5 (63)	0,07
		2	-	3 (37)	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Жировая дистрофия (стеатоз)	1	8 (100)	5 (63)	0,07
		2	-	2 (25)	
		3	-	1 (12)	
		4	-	-	
4	Воспалительная инфильтрация				
4.1	Полиморфноядерные гранулоциты	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
4.2	Лимфоциты и плазматические клетки	1	8 (100)	5 (63)	0,07
		2	-	3 (37)	
		3	-	-	
		4	-	-	
4.3	Эозинофилы	1	8 (100)	6 (75.0)	0,17
		2	-	2 (25.0)	
		3	-	-	
		4	-	-	
5	Сосудистые изменения (полнокровие, стаз, геморрагии)	1	8 (100)	7 (87.5)	0,3816
		2	-	1 (12.5)	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Купферовские клетки и макрофаги	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
7	Холестаз	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
8	Гиперплазия (пролиферация) желчных протоков	1	8 (100)	6 (75.0)	0,17
		2	-	2 (25.0)	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 27

1	2	3	4	5	6
9	Фиброз	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
10	Гранулематозное воспаление	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.					

Как видно из Таблицы 27, в срезах печени ***контрольной группы (АСК)*** у всех животных строение печени соответствовало гистологической норме. Гистоархитектоника органа сохраняла типичное строение. В препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином, чётко визуализировались многочисленные печёночные дольки. В центре каждой дольки определялась центральная вена, от которой радиально отходили печёночные балки, образованные одно- и двурядно расположенными гепатоцитами, направленными к периферии долек. Между балками располагались широкие синусоидные капилляры, выстланные эндотелиоцитами и клетками Купфера.

Гепатоциты имели типичное полигональное строение с умеренно эозинофильной, мелкозернистой цитоплазмой. Ядра клеток были округлыми или овальными, везикулярными, с равномерно распределённым хроматином и чётко различимыми ядрышками. В некоторых клетках отмечалось наличие двух ядер, что свидетельствует о нормальной регенераторной активности паренхимы. Контуры клеточных мембран чёткие, признаки вакуолизации или дистрофических изменений отсутствовали. Синусоиды умеренного кровенаполнения, просветы их свободны, эндотелиальный слой целостен. Клетки Купфера встречались в обычном количестве, без признаков гиперплазии. В портальных трактах определялись типичные элементы: междольковые вены, артерии и желчные протоки, выстланные кубическим эпителием без признаков пролиферации или воспалительной инфильтрации.

Таким образом, микроскопическая картина печени животных контрольной группы характеризовалась сохранением нормальной архитектоники долькового строения, неизменённой структурой гепатоцитов и сосудистого русла, отсутствием признаков воспаления, дистрофии и фиброзных изменений.

В ***основной группе (БНЦ)*** гистоархитектоника печени в целом сохранена. Дольковое строение органа чётко выражено: печёночные балки радиально ориентированы от центральной вены к периферии дольки, между которыми определялись синусоидные капилляры с умеренным

кровенаполнением. У пяти животных (63 %) отмечалась лёгкая степень вакуолизации цитоплазмы гепатоцитов. Изменения носили очаговый характер и локализовались преимущественно в центролобулярных и перипортальных зонах. Цитоплазма отдельных гепатоцитов была мелкозернистой, местами просветлённой, ядра клеток сохраняли везикулярную структуру с чётко выраженными ядрышками, признаков кариопикноза или кариорексиса не выявлено. Балочная структура дольки не нарушена.

Сосудистые изменения проявлялись лёгким венозным полнокровием и отдельными участками стаза в синусоидах, преимущественно центролобулярно, что наблюдалось у семи животных (87,5 %). Просветы синусоидов в целом сохранены, эндотелиальный покров целостен. Активность клеток Купфера во всех случаях соответствовала минимальной степени (1 балл). Клетки умеренно увеличены, с типичными морфологическими признаками фагоцитоза, без тенденции к скоплениям или формированию очагов гиперплазии. Признаков холестаза, воспалительной инфильтрации, некротических изменений, фиброза и гранулём не обнаружено. Эпителий желчных протоков и сосудистые стенки без признаков пролиферации или деструкции. Таким образом, в группе интрамедуллярной имплантации БНЦ гистологическая структура печени у всех животных сохранена. Выявленные изменения носили характер лёгкой дистрофии гепатоцитов и умеренных сосудистых нарушений без признаков цитолиза, холестаза или воспалительной реакции. Совокупность морфологических признаков соответствует минимальной и лёгкой степени хронической гепатотоксичности.

Почки

Сравнительная гистопатологическая оценка признаков хронической нефротоксичности у крыс при интрамедуллярной имплантации БНЦ в сравнении с АСК представлена в Таблице 28.

Таблица 28 - Гистопатологическая оценка хронической нефротоксичности в группах исследования

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Дистрофия эпителия канальцев	1	8 (100)	6 (75.0)	0,17
		2	-	2 (25.0)	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Некроз/деструкция эпителия канальцев	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 28

1	2	3	4	5	6
3	Гиалиновые, зернистые и пигментные цилиндры и экссудат в просвете канальцев	1	8 (100)	6 (75.0)	0,17
		2	-	2 (25.0)	
		3	-	-	
		4	-	-	
4	Атрофия канальцев	1	8 (100)	8 (100)	
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
5	Дилятация и кистозная трансформация канальцев	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Гломерулопатия	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
7	Отёк интерстиция	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
8	Сосудистые изменения (венозное полнокровие, стазы, геморрагии)	1	8 (100)	7 (87.5)	0,3816
		2	-	1 (12.5)	
		3	-		
		4	-		
9	Воспалительная инфильтрация				
9.1	Полиморфноядерные гранулоциты	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
9.2	Лимфоциты и плазматические клетки	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
9.3	Эозинофилы	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 28

1	2	3	4	5	6
10	Фиброз интерстиция	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
11	Склероз и/или гиалиноз сосудов	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
12	Гранулематозное воспаление	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.					

Как видно из Таблицы 28, в ***контрольной группе (АСК)*** гистологическое строение почек соответствовало анатомической и гистологической норме. При окраске гематоксилином и эозином во всех случаях наблюдалось типичное гистологическое строение почечной паренхимы с отчётливо выраженным делением на корковое и мозговое вещество. В корковом слое определялись многочисленные компактные клубочки. Петли капилляров равномерно расширены, просветы свободные, признаки гиперемии не выявлены. Проксимальные извитые канальцы имеют узкий просвет и выстланы высоким однослойным пирамидальным эпителием с эозинофильной зернистой цитоплазмой и базально расположенными округлыми везикулярными ядрами. Дистальные извитые канальцы отличаются более широким просветом и выстланы кубическим эпителием со светлой умеренно ацидофильной цитоплазмой, ядра крупные, округлые. Клетки эпителия без признаков вакуолизации, деструкции или гиперплазии. Просветы канальцев не расширены, содержимого не обнаружено. Интерстициальная строма представлена тонкими прослойками рыхлой соединительной ткани, без клеточной инфильтрации, отёка или фиброзных изменений. Гиалиновая гломерулопатия, гипертрофия клубочков, гранулематозное воспаление или венозный застой в просвете сосудов отсутствуют.

Таким образом, микроскопическая структура почек животных контрольной группы соответствует норме: гистоархитектоника сохранена, патологических изменений со стороны клубочкового аппарата, канальцев и интерстиция не выявлено.

В ***основной группе (БНЦ)*** гистоархитектоника клубочков оставалась интактной, капсула Боумена не утолщена, склероза и гиалиноза клубочков не

отмечено. Мезангиум не расширен, пролиферации мезангиальных клеток не наблюдается. Проксимальные извитые канальцы выстланы высоким однослойным эпителием с умеренно эозинофильной цитоплазмой. В 2 (25 %) наблюдениях отмечались единичные клетки с признаками лёгкой вакуолизации цитоплазмы без деструктивных изменений. Ядра округлые, расположены базально, структура хроматина однородная. Дистальные извитые канальцы выстланы однослойным кубическим эпителием со светлой цитоплазмой, местами с лёгкой вакуолизацией, не сопровождающейся десквамацией или некрозом. Просветы канальцев равномерные, не расширены. Гиалиновые и пигментные цилиндры не обнаружены. Интерстициальная строма представлена тонкими соединительнотканными прослойками. Отмечались единичные лимфоциты, без формирования очагов или инфильтратов. Сосудистые изменения проявлялись умеренным венозным полнокровием и стазом в межканальцевых капиллярах и венулах. В 1 случае (12,5 %) зарегистрировано лёгкое венозное полнокровие (2 балла), без признаков тромбозов или геморрагий. Гиалиноз стенок или гранулематозное воспаление не выявлены.

Таким образом, микроскопическая картина почечной ткани при интрамедуллярной имплантации БНЦ характеризуется сохранением архитектоники органа и минимальными проявлениями дистрофических и сосудистых изменений. Лёгкая вакуолизация цитоплазмы эпителия канальцев и умеренное венозное полнокровие носят очаговый, обратимый характер. Признаки некроза, выраженной воспалительной инфильтрации, фиброза и склероза отсутствуют. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии хронической нефротоксичности и подтверждают биосовместимость исследуемого материала.

Поджелудочная железа

Результаты сравнительного гистопатологического исследования поджелудочной железы крыс, подвергавшихся интрамедуллярной имплантации БНЦ, представлены в Таблице 29. Оценку проводили с целью выявления возможных морфологических изменений, характеризующих хроническое токсическое воздействие исследуемого вещества на ткань поджелудочной железы.

Таблица 29 - Гистопатологическая оценка хронической панкреатотоксичности

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
	Ацинарная часть				
1	Дистрофия ацинарных клеток	1	8 (100)	7 (87.5)	0,3816
		2	-	1 (12.5)	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 29

1	2	3	4	5	6
2	Некроз ацинарных клеток	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Атрофия ацинарных клеток	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
	Эндокринный отдел (островки Лангерганса)				
4	Атрофия/дегенерация островков	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
5	Гиперплазия островков	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
	Протоки		-	-	
6	Гиперплазия эпителия/дилатация выводных протоков	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
7	Стаз секрета/белковые пробки	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
	Интерстиций				
8	Отёк интерстиция	1	8 (100)	7 (87.5)	0,3816
		2	-	1 (12.5)	
		3	-	-	
		4	-	-	
9	Воспалительная инфильтрация				
9.1	Полиморфноядерные гранулоциты	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 29

1	2	3	4	5	6
9.2	Лимфоциты и плазматические клетки	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
9.3	Эозинофилы	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
10	Сосудистые изменения (полнокровие, стаз, геморрагии)	1	8 (100)	5 (63)	0,07
		2	-	3 (37)	
		3	-	-	
		4	-	-	
11	Фиброз интерстиция	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
12	Склероз и/или гиалиноз сосудов	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
13	Гранулематозное воспаление	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	

*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Как видно из Таблицы 29, в ***контрольной группе (АСК)*** гистопаттерн поджелудочной железы соответствовал гистологической норме. Ни у одного из животных в поджелудочной железе не было выявлено признаков гиперплазии или атрофии островков Лангерганса, кариопикноза, вакуолизации клеток, очагового некроза, апоптоза или фиброзно-воспалительных изменений

Гистоархитектоника поджелудочной железы у животных контрольной группы сохранена, структура органа соответствует норме. Экзокринная часть представлена правильными ацинусами, имеющими клетки с чёткими границами, базофильную цитоплазму и округлые ядра, расположенные преимущественно базально. Полярность клеток не нарушена, деструктивные и дистрофические изменения отсутствуют. Островки Лангерганса равномерно

распределены в толще паренхимы, имеют чёткие контуры и состоят из светлых эндокринных клеток с округлыми ядрами и умеренно выраженной цитоплазмой. Признаков гиперплазии, атрофии или апоптоза клеток не выявлено. Строма представлена тонкими соединительнотканными прослойками без признаков отёка, фиброза или воспалительной инфильтрации. Сосуды интактны, их просветы свободны, полнокровие минимальной степени.

Таким образом, гистологическая структура поджелудочной железы крыс контрольной группы соответствует норме. Признаки клеточной деструкции, вакуолизации, очагового некроза, апоптоза, фиброзных или воспалительных изменений отсутствуют.

В ***основной группе (БНЦ)*** гистологическая структура поджелудочной железы сохранена. Ацинарные структуры имели типичное дольковое строение и были сформированы из компактно расположенных экзокринных клеток с чётко выраженной базофильной цитоплазмой и округлыми ядрами. Во всех случаях полярность клеток сохранена, структура цитоплазмы однородная. Признаки деструктивных изменений, таких как пикноз, кариорексис или кариолизис, не выявлены ни в одном случае. Вакуолизация цитоплазмы лёгкой степени выявлена в одном (12,5 %) наблюдении. Межацинарная соединительная ткань тонкая, васкуляризация сохранена, в 1 (12,5 %) случае определялся лёгкий периваскулярный отек. Интерстициальная и периацинарная инфильтрация воспалительными клетками не определяется. У 3 (37,5 %) животных отмечалось лёгкое венозное полнокровие. Эндокринный отдел представлен островками Лангерганса нормальной морфологии. Клетки островков равномерно распределены, имеют светлую цитоплазму, чёткие контуры и центрально расположенные ядра с равномерной структурой хроматина. Признаков атрофии, гиперплазии или гранулематозного воспаления не обнаружено.

Таким образом, морфологическая картина поджелудочной железы при интрамедуллярной имплантации характеризуется сохранением нормальной дольковой архитектоники и клеточного состава. Дистрофические, некротические и воспалительные изменения отсутствуют. Лёгкие сосудистые реакции носят компенсаторный характер. Полученные данные свидетельствуют о хорошей морфофункциональной сохранности поджелудочной железы и отсутствии признаков хронического панкреатотоксического действия.

Селезёнка

Сравнительная гистопатологическая оценка признаков хронической токсичности в селезёнке у крыс в контрольной группе в сравнении с интрамедуллярной имплантацией БНЦ представлена в Таблице 30.

Таблица 30 - Гистопатологическая оценка хронической токсичности БНЦ в ткани селезёнки

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Гиперплазия лимфоидных фолликулов	1	8 (100)	.6 (75.0)	0,17
		2	-	2 (25.0)	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Атрофия лимфоидных фолликулов	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Некробиотические изменения лимфоидных клеток	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
4	Синусоиды и сосудистые пространства	1	8 (100)	5 (62.5)	0,07
		2	-	3 (37.5)	
		3	-	-	
		4	-	-	
5	Макрофагальная реакция/ гемосидероз	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Отёк стромы и синусов	1	8 (100)	7 (87.5)	0,38
		2	-	1 (12.5)	
		3	-	-	
		4	-	-	
7	Воспалительная инфильтрация	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
8	Фиброз	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
9	Склероз и/или гиалиноз сосудов	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 30

1	2	3	4	5	6
10	Гранулематозное воспаление	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.					

Как видно из Таблицы 30, в селезёнке крыс ***контрольной группы (АСК)*** отмечается сохранённая гистоархитектоника, соответствующая нормальной морфологии органа. Белая пульпа представлена фолликулами преимущественно первичного типа, маргинальная зона очерчена, без реактивной гиперплазии. Красная пульпа состоит из равномерно расположенных синусоидов, выстланных типичным эндотелием. Кровенаполнение синусоидов умеренное, признаков венозного застоя или геморрагий нет. Дистрофических, некротических и гранулематозных изменений не обнаружено. Признаков активного экстрамедуллярного кроветворения не отмечается.

В ***основной группе (БНЦ)*** строение селезёнки соответствует гистологической норме. Белая пульпа представлена лимфоидными фолликулами округлой или овальной формы с хорошо очерченными герминативными центрами и сохранением мантийной зоны. Капсула и трабекулы не утолщены, в их составе отмечались единичные сосуды с признаками лёгкого полнокровия. Красная пульпа представлена множеством синусоидов и клеточными элементами, среди которых преобладали лимфоциты, единичные макрофаги и плазматические клетки. Воспалительная инфильтрация была минимальной, представлена рассеянными лимфоцитами в строме. Отёк стромы и синусов в 1 (12,5 %) случае имел ограниченный характер, выявлялся как просветления между клеточными элементами и расширение отдельных синусоидов. Сосудистые изменения выражались преимущественно в виде лёгкого венозного полнокровия у 3 животных. В 2 (25 %) случаях в лимфоидных фолликулах отмечалась лёгкая гиперплазия. Макрофагальная реакция в красной пульпе характеризовалась единичными включениями гемосидерина. Признаков фиброза, склероза/гиалиноза сосудов или гранулематозного воспаления не выявлено.

Таким образом, при интрамедуллярной имплантации БНЦ морфологическая структура селезёнки сохранялась, а выявленные изменения носили умеренный и адаптационно-компенсаторный характер. В обеих группах наблюдалась интактность архитектоники белой и красной пульпы, отсутствие некротических, деструктивных и выраженных воспалительных изменений. Для интрамедуллярной имплантации характерны минимальные

сосудистые реакции (умеренное венозное полнокровие, слабый отёк стромы и синусоидов) и единичные проявления гиперплазии лимфоидных фолликулов.

Кишечник

Сравнительная оценка гистологических признаков хронической токсичности в ткани кишечника у крыс группы с интрамедуллярной имплантацией БНЦ относительно контрольной группы представлена в Таблице 31.

Таблица 31 - Гистопатологическая оценка хронической токсичности БНЦ в микропрепаратах кишечника животных

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Дистрофия эпителия	1	8 (100)	7 (75.0)	0,17
		2	-	1 (25.0)	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Некроз/деструкция эпителия	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Атрофия ворсинок/ крипт	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
4	Гиперплазия крипт (регенераторная активность)	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
5	Воспалительная инфильтрация слизистой/ подслизистой	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Эозинофильная инфильтрация	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
7	Отёк слизистой и подслизистой	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 31

1	2	3	4	5	6
8	Сосудистые изменения (полнокровие, стаз, кровоизлияния)	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
9	Фиброз	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
10	Лимфоидные структуры кишечника	1	8 (100)	7 (87.5)	0,386
		2	-	1 (12.5)	
		3	-	-	
		4	-	-	
11	Гранулематозное воспаление	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	

*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Анализ данных Таблицы 31 демонстрирует, что в ***контрольной группе (АСК)*** строение стенки тонкого и толстого кишечника характеризовалось сохранением всех структурных компонентов и соответствовало гистологической норме. Ворсинки тонкого кишечника были высокими, тонкими, выстланными однослойным призматическим эпителием с сохранением базальной ориентации ядер. Бокаловидные клетки равномерно распределены по поверхности ворсинок, ядра чёткие, признаков кариопикноза или кариорексиса не отмечалось. В подлежащей собственной пластинке выявлялись единичные лимфоциты и плазматические клетки в пределах физиологической нормы, воспалительная инфильтрация отсутствовала. Подслизистая основа во всех образцах рыхлая, без признаков отёка или фиброза.

В толстой кишке слизистая образовывала глубокие крипты, выстланные призматическим эпителием с множеством бокаловидных клеток. Эпителиальный пласт непрерывный, без дефектов, некротических или эрозивных изменений. Между криптами определялась соединительнотканная строма, сосуды не расширены, признаков стаза, кровоизлияний и лейкоцитарной инфильтрации не выявлено.

В ***основной группе (БНЦ)*** во всех исследованных случаях общая гистоархитектоника кишечной стенки сохранена. Слизистая оболочка имеет

типичное строение: ворсинки и крипты чётко очерчены, эпителиальный покров представлен однослойным цилиндрическим эпителием с выраженной полярностью клеток и сохранением щёточной каёмки. В 1 случае отмечались очаговые дистрофические изменения эпителиоцитов по типу гидропической и зернистой дистрофии лёгкой степени, преимущественно в верхней трети ворсинок. Некротические изменения носили единичный характер и ограничивались редкими апоптотическими или некротическими клетками в области крипт или апикальных отделов ворсинок. Клеточная инфильтрация представлена рассеянными лимфоцитами и единичными макрофагами в пределах собственной пластинки слизистой оболочки. В мышечной оболочке признаков инфильтрации не выявлено. Лимфоидные структуры кишечной стенки (солитарные фолликулы, элементы пейеровых бляшек) в большинстве случаев сохраняли типичную архитектонику; у одного (12,5 %) животного отмечены признаки умеренной гиперплазии лимфоидных элементов с расширением герминативных центров и лёгкой активацией пролиферативных зон, что расценивается как компенсаторно-адаптивная реакция. Фиброз и гранулематозное воспаление не выявлены.

Таким образом, в группах структура кишечной стенки соответствует физиологической норме. Признаков хронической токсичности не выявлено.

Семенники

Сравнительная оценка гистологических признаков хронической токсичности в ткани семенников у крыс группы с интрамедуллярной имплантацией БНЦ по сравнению с АСК представлена в Таблице 32.

Таблица 32 - Гистопатологическая оценка хронической токсичности БНЦ в ткани семенников

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Дистрофия/некроз зародышевого эпителия	1	8 (100)	6 (75.0)	0,17
		2	-	2 (25.0)	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Атрофия семенных канальцев	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Гипосперматогенез/ задержка созревания	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	

Продолжение таблицы 32

1	2	3	4	5	6
4	Клетки Сертоли	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
5	Клетки Лейдига	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Воспалительная инфильтрация	1	8 (100)	7 (87.5)	0,386
		2	-	1 (12.5)	
		3	-	-	
		4	-	-	
7	Эозинофильная инфильтрация	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
8	Фиброз интерстиция	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
9	Сосудистые изменения	1	8 (100)	7 (87.5)	0,386
		2	-	1 (12.5)	
		3	-	-	
		4	-	-	
10	Гиалинизация базальной мембраны и канальцев	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
11	Гранулематозное воспаление	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.					

Как видно из Таблицы 32, в ***контрольной группе (АСК)*** гистологическая картина соответствует норме для семенников половозрелой крысы с активным сперматогенезом. Определяются множественные семенные канальцы

округлой/овальной формы с тонкой ровной базальной мембраной и 1-2 рядами перитубулярных миоидных клеток.

Клетки Сертоли прилежат к базальной мембране, ядра светлые, овальные, с заметным ядрышком. Интерстиций узкий, представлен рыхлой соединительной тканью с капиллярами и типичными лейдиговскими клетками (полигональные, эозинофильная цитоплазма), без гиперплазии; отёк и воспалительная инфильтрация отсутствуют. Гиалиноза, атрофии или десквамации эпителия не отмечается, сосуды без признаков стаза и васкулита. Гиалинизации базальной мембраны и канальцев, фиброза интерстиция или гранулематозного воспаления не выявлено. Морфологическая картина соответствует гистологической норме с сохранённым активным сперматогенезом.

В ***основной группе (БНЦ)*** во всех наблюдениях (100 %) отмечены изменения минимальной или лёгкой степени выраженности. Герминативный эпителий семенных канальцев сохранял правильную стратификацию и организацию слоёв.

В отдельных случаях выявлялась вакуолизация цитоплазмы сперматогоний и сперматоцитов, а также единичные пикнотические ядра, что расценивалось как признаки лёгкой дистрофии. Некротических изменений не наблюдалось, сперматогенез был сохранён на всех стадиях. Клетки Сертоли демонстрировали незначительные дистрофические изменения, проявлявшиеся вакуолизацией цитоплазмы и умеренной гиперхромией ядер, при сохранении целостности цитоплазматических мостиков. В отдельных канальцах отмечалось умеренное истончение сперматогенного эпителия без нарушения слоистости.

В интерстициальной ткани наблюдались признаки лёгкого отёка, структура клеточных элементов оставалась сохранённой. Воспалительная реакция выражена слабо: у 1 животного (12,5 %) отмечалась минимальная лимфоцитарная инфильтрация в межканальцевой строме. Также в 1 случае (12,5 %) зафиксированы признаки лёгких сосудистых изменений и фокальный стаз крови с расширением венул.

Таким образом, морфологическая картина семенников крыс во II группе свидетельствует об отсутствии признаков хронической токсичности исследуемого материала, обнаруженные изменения носят адаптационно-компенсаторный характер и соответствуют лёгким, неспецифическим реакциям тканей на имплантацию, не нарушающим строение сперматогенного эпителия.

Придатки яичка

Сравнительная оценка гистологических признаков хронической токсичности в ткани придатков яичка у крыс группы с интрамедуллярной имплантацией БНЦ в сравнении с АСК представлена в Таблице 33.

Таблица 33 - Гистопатологическая оценка хронической токсичности в ткани придатков яичка у крыс

№ п/п	Гистологические критерии	Балл	АСК Контрольная группа n = 8	БНЦ Основная группа n = 8	p-уровень*
1	Дистрофия/некроз эпителия эпидидимальных канальцев	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
2	Изменения в просвете канальцев	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
3	Аспермия/снижение содержания сперматозоидов	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
4	Воспалительная инфильтрация	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
5	Эозинофильная инфильтрация	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
6	Фиброз интерстиция	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	
7	Сосудистые изменения	1	8 (100)	7 (87.5)	0,17
		2	-	1 (12.5)	
		3	-	-	
		4	-	-	
8	Гранулематозное воспаление	1	8 (100)	8 (100)	1
		2	-	-	
		3	-	-	
		4	-	-	

*Примечание - статистическую значимость различий между группами оценивали с использованием критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.

Как видно из Таблицы 33, в ***контрольной группе (АСК)*** у всех животных придатки яичка имели нормальное гистологическое строение. Выводной проток выстлан многорядным призматическим эпителием, ядра клеток располагаются базально, их форма и величина однородны, полярность клеток сохранена. Признаков атипии, патологических митозов, а также дистрофических изменений эпителиоцитов не выявлено. Базальная мембрана ровная, чётко очерченная; собственная пластинка тонкая, рыхлая, без признаков воспалительной инфильтрации. Сосуды стромы без особенностей, полнокровие выражено слабо, признаков стаза или отёка не отмечается. Просветы канальцев содержат скопления зрелых сперматозоидов в пределах физиологической нормы. Морфологические изменения, характерные для хронической токсичности, во всех случаях отсутствовали.

В ***основной группе (БНЦ)*** во всех случаях (100 %) морфологические изменения в придатках яичка соответствовали лёгкой степени морфологических нарушений.

Эпителий эпидидимальных канальцев сохранял целостность и правильную стратификацию. У части животных наблюдались признаки лёгких дистрофических изменений, вакуолизации цитоплазмы, умеренной гиперхромии ядер, редукции высоты клеток и уплощения эпителиоцитов. В отдельных канальцах фиксировалась очаговая десквамация эпителиальных клеток в просвет, сопровождавшаяся скоплением единичных клеточных обломков. Просветы канальцев содержали преимущественно зрелые сперматозоиды, распределённые равномерно, наряду с ними отмечались мелкие скопления сперматидного материала и единичные элементы клеточного детрита. Интерстициальная ткань сохраняла общую архитектонику. В отдельных полях зрения выявлялись признаки слабого отёка и единичные периваскулярные лимфоциты, без формирования очагов выраженной воспалительной инфильтрации. У одного животного (12,5 %) наблюдались признаки венозного полнокровия и стаза, проявлявшиеся расширением венул и мелкими периваскулярными геморрагиями, не сопровождавшимися деструкцией стенок сосудов или ишемическими изменениями ткани. Таким образом, при интрамедуллярной имплантации БНЦ признаков хронического токсического воздействия не установлено. Обнаруженные изменения носили ограниченный, преимущественно адаптационно-компенсаторный характер и не сопровождались признаками дегенерации, некроза или воспалительной реакции, что свидетельствует о биосовместимости исследуемого материала и отсутствии репродуктивной токсичности.

Исходя из вышепредставленных данных, интрамедуллярная имплантация БНЦ в бедренную кость не оказывает пирогенного воздействия, также является метаболомно-инертным веществом, не оказывает статистически значимого влияния на локомоторную активность, исследовательское поведение, показатели тревожности. Нет отрицательного влияния на все виды обмена; при гистологическом и морфометрическом

анализе во всех органах доминируют минимальные, потенциально обратимые сдвиги без достижения порогов острого и хронического токсического поражения. Более заметные, но всё ещё лёгкие дистрофические и сосудистые изменения при интрамедуллярном введении согласуются с активным фагоцитарным клиренсом и умеренным иммунно-метаболическим напряжением высоко васкуляризированного костномозгового компартмента.

Отсутствие статистически значимых межгрупповых различий по ключевым биохимическим маркерам органной токсичности в сочетании с отсутствием согласованного патологического сдвига взаимосвязанных показателей позволяет интерпретировать полученные результаты как доказательство отсутствия общего токсического эффекта исследуемого материала при остром и хроническом воздействии. Совокупность данных свидетельствует об отсутствии общего токсического значимого эффекта в исследуемых условиях эксперимента.

3.2 Результаты экспериментальных исследований БНЦ

Результаты микробиологического исследования

В данном разделе представлены проведенные исследования по определению первичной чистоты биокомпозита, антимикробной активности в отношении музейных тест-штаммов, результаты микробиологического мониторинга послеоперационной раны. Данные исследования проведены на кафедре молекулярной биологии, биохимии и микробиологии под руководством к. м. н., профессора Ахметовой С. Б. Часть лабораторных исследований проводилась в научно-исследовательской лаборатории под руководством заведующей НИЛ, PhD, ассоциированного профессора Лавриненко А. В.

Результаты исследования микробиологической чистоты биокомпозита

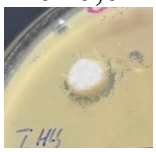
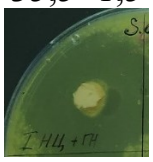
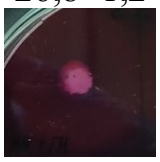
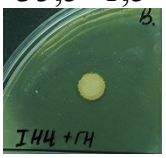
При трёхкратном прямом посеве десятикратных серийных разведений испытуемого вещества был получен отрицательный рост, что характеризуется как чистый микробиологический образец. Согласно Государственной Фармакопее РК, к имплантатам применяются требования как к лекарственным веществам для парентерального использования. Парентеральные лекарственные средства представляют собой стерильные препараты, предназначенные для введения в организм посредством инъекций, инфузий или имплантации. Исследуемый образец соответствует требованиям стерильности и рассматривается как перспективный материал для применения в качестве костного имплантата с целью заполнения и восстановления дефектов костной ткани [112].

3.2.1 Результаты определения антимикробной активности биокомпозита в отношении музейных тест-штаммов *in vitro*

Результаты исследования антибактериальной и противогрибковой активностей биокомпозита определялись в отношении *Staphylococcus aureus*

(ATCC 6538, ATCC 29213), Escherichia coli (ATCC 25922), Bacillus subtilis (ATCC 6633), Candida albicans (ATCC 10231) и представлены в Таблице 34.

Таблица 34 - Диаметр зоны задержки роста микроорганизмов при исследовании биокомпозита в отношении музейных тест-штаммов [153]

№ п/п	**Исследуемые образцы**	Диаметр зоны задержки роста, мм (M±m) *			
		S. aureus ATCC 6538, ATCC 29213	*E. coli ATCC 25922*	*B. subtilis ATCC 6633*	*C. albicans ATCC 10231*
1	**БНЦ**	0±0,0 	0±0,0 	0±0,0 	0±0,0 
2	**БНЦ + G**	35,5±1,5 	26,8±1,2 	35,5±1,5 	-
3	**БНЦ + Ns**	-	-	-	30±1,0 

*Примечание - интерпретацию результатов проводили в соответствии с критериями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing и Clinical and Laboratory Standards Institute, также Государственной Фармакопее РК с использованием установленных пороговых значений диаметров зон ингибирования для конкретных комбинаций микроорганизм–антимикробный препарат [149].

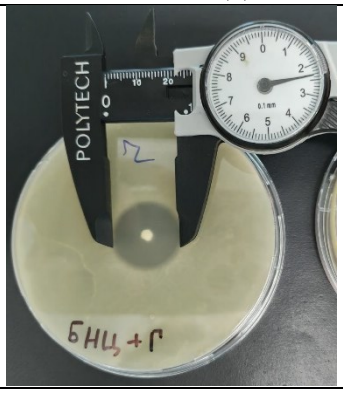
Согласно данным таблицы 34, при исследовании антимикробной активности БНЦ в отношении музейных тест-штаммов микроорганизмов установлено, что образец БНЦ без добавления антимикробного компонента не проявлял выраженной ингибирующей активности. Диаметр зон задержки роста для *S. aureus ATCC 6538, ATCC 29213; E. coli ATCC 25922, B. subtilis ATCC 6633* и *C. albicans ATCC 10231* составил 0±0,0 мм. При добавлении гентамицина (БНЦ + G) отмечалась выраженная антимикробная активность в отношении бактериальных тест-штаммов. Диаметр зоны задержки роста *S. aureus* составил 35,5±1,5 мм, *E. coli* — 26,8±1,2 мм, *B. subtilis* — 35,5±1,5 мм. Образец БНЦ + Ns демонстрировал активность в отношении *C. albicans*, для которого диаметр зоны задержки роста составил 30±1,0 мм.

Таким образом, испытуемый образец не обладает бактерицидным эффектом в качестве монокомпонента (без антибиотика) в отношении всех

изучаемых микроорганизмов (образцы № 1). Однако, биокомпозит, импрегнированный антибиотиком, показал высокий антибактериальный и антифунгицидный эффект (образцы № 2 и 3), при измерении диаметра зоны задержки роста получили во всех случаях более 26 мм.

В Таблице 35 представлены данные о навесках БНЦ, которые использовались в дефекте (образец А) и для метода лунок (образец В).

Таблица 35 - Данные о зонах задержки роста БНЦ с гентамицином против *S. aureus*

Характеристика образцов	Диаметр зоны задержки роста, мм (M±m)* против *S. aureus ATCC 6538, ATCC 29213*	
	А-дискодиффузионный метод	В-метод лунок
Фотографии		
Диаметр ЗЗР	23 ±1,0 мм	35 ±1,0 мм
БНЦ, г	0,006 г	0,05 г
4%-ный раствора гентамицина (сухого вещества)	0,05 мл 4 % G (2 мг)	0,4 мл 4 % G (16,6 мг)

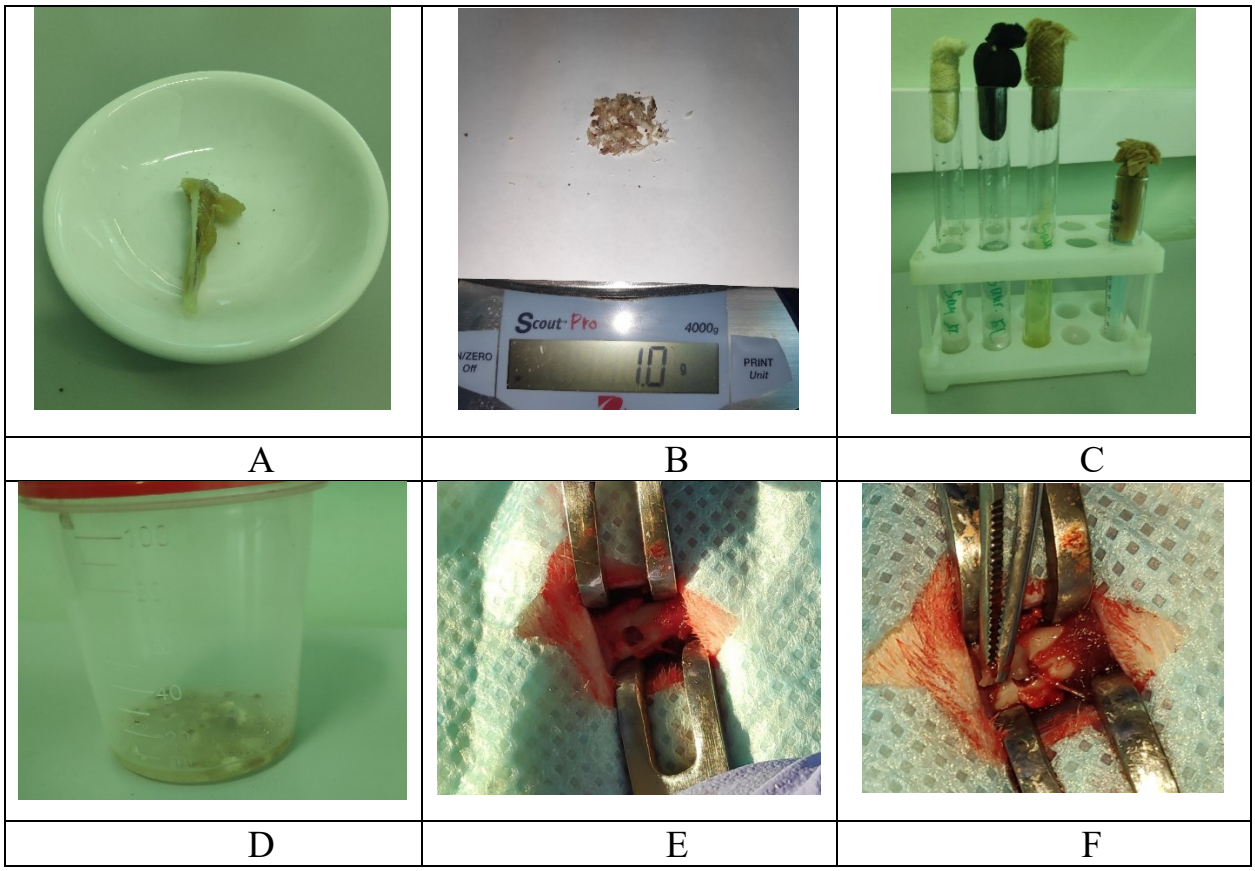
*Примечание - интерпретацию результатов проводили в соответствии с критериями European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing и Clinical and Laboratory Standards Institute с использованием установленных пороговых значений диаметров зон ингибирования для конкретных комбинаций микроорганизм–антимикробный препарат [149].

3.2.2 Результаты микробиологического мониторинга послеоперационной раны

Моделирование хронического остеомиелита

Моделирование ХО осуществлялось согласно свидетельству авторского права № 13857 от 11.12.2020 г. МЮ РК [110]. Извлечение аллокостей (бедренных и голени) для формирования хронического остеомиелита осуществлялось у здоровых крыс с интактной стороны (животные, у которых проводилось исследование токсичности), что представлено на Рисунке 13 (А). В дальнейшем производилось измельчение кусачками до костной стружки (В). Для проведения исследования из тест-культуры готовили стандартизированную микробную суспензию, используя физиологический

раствор в качестве диспергирующей среды; концентрацию микроорганизмов доводили до соответствия 0,5 стандарту МакФарланда (C). Смешивание микробной взвеси с костной стружкой производили в контейнере, который в дальнейшем помещался в термостат для инкубации в теч. 24 ч при 37 °C (D). В последующем в дефект, сформированный в с/3 левой бедренной кости, помещался кусочек кости, пропитанный бактериальной суспензией (E, F) с целью формирования хронического остеомиелита, что представлено на Рисунке 13.



A — извлечение аллокостей, B — измельчение костей до получения костной стружки, C — приготовление бактериальной суспензии, D — смешивание костной стружки с бактериальной суспензией и инкубация в течение 24 ч при 37 °C. E — формирование дефекта бедренной кости, F — внесение костной стружки в дефект

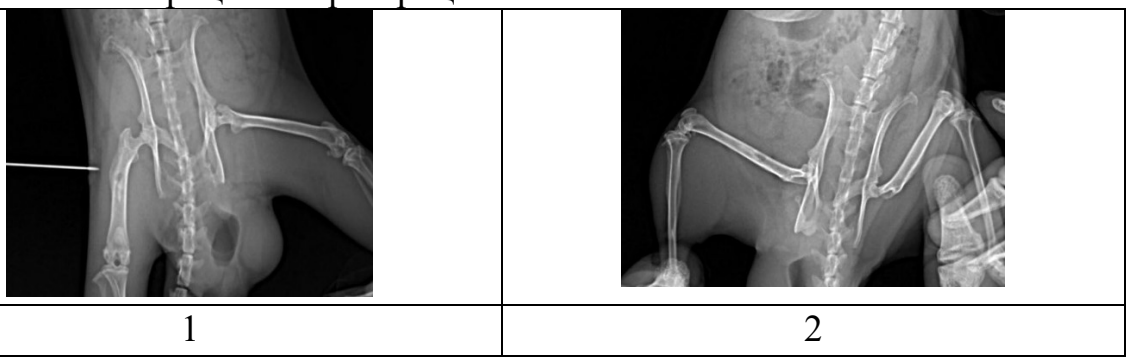
Рисунок 13 – Этапы моделирования хронического остеомиелита

На Рисунке 13 последовательно показаны действия по формированию хронического остеомиелита по вышеописанной методике.

Рентгенологическая характеристика (14-е сутки после моделирования остеомиелита)

При рентгенологическом исследовании области таза и проксимального отдела бедренной кости крысы в прямой и боковой проекциях на 14-е сутки после индукции экспериментального остеомиелита выявлены характерные

признаки воспалительно-деструктивного поражения костной ткани (Рисунок 14). В диафизарной области бедренной кости определяется очаг остеолиза, проявляющийся снижением рентгенологической плотности костной ткани и нарушением нормальной трабекулярной структуры. Отмечается нечёткость и частичное разрушение кортикального слоя, сопровождающееся участками его истончения и фокальной деструкции. Контуры патологического очага имеют неровный и размытый характер, что свидетельствует об активном воспалительном процессе и резорбции костной ткани.



1 — прямая проекция, 2 — боковая проекция

Рисунок 14 – Рентгенограммы бедренной кости крысы на 14-е сутки после моделирования остеомиелита

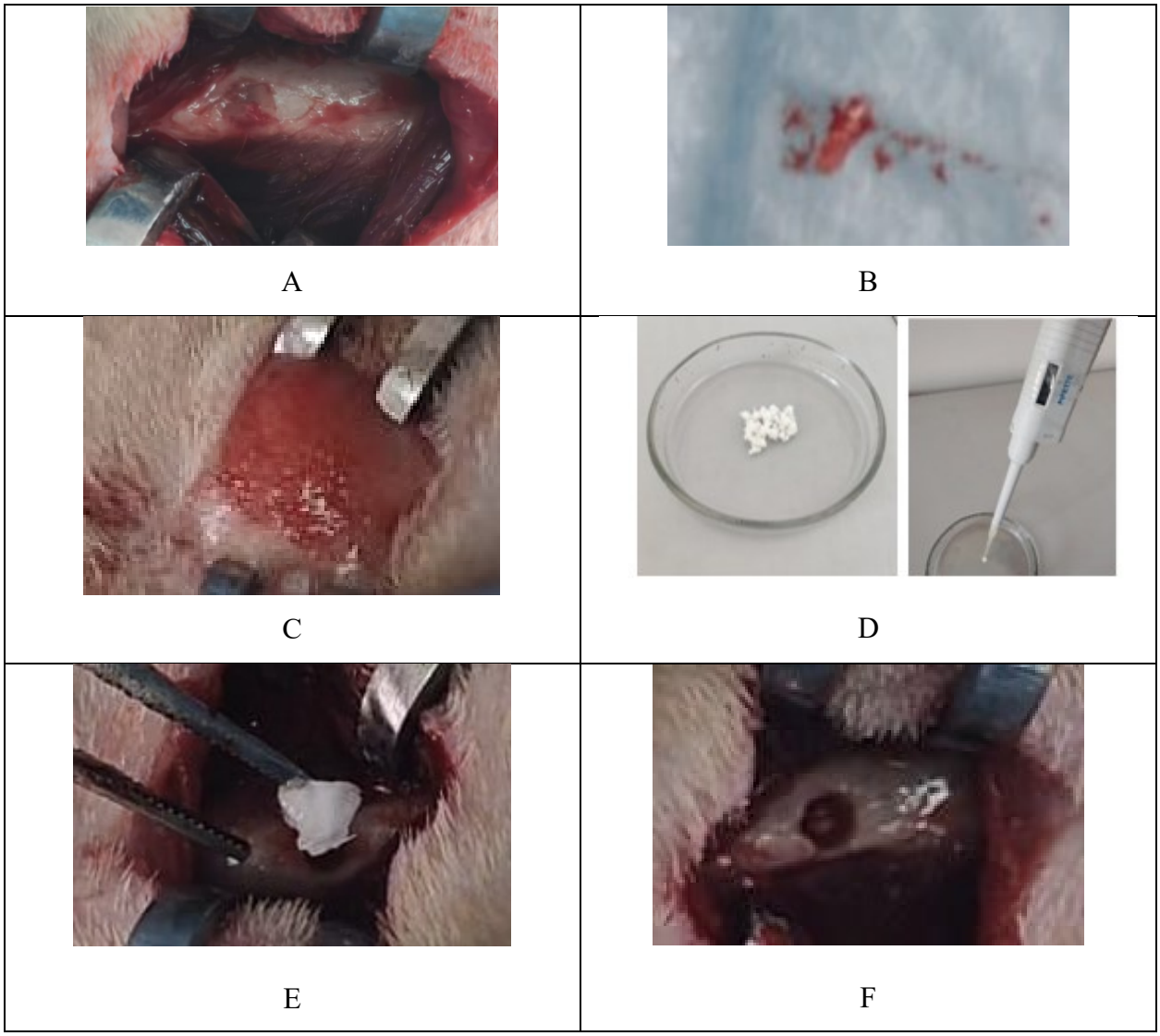
Как видно на Рисунке 14, костномозговой канал в зоне поражения расширен, его внутренние контуры неровные, что указывает на вовлечение интрамедуллярного пространства в воспалительный процесс. Вдоль кортикальной поверхности в области поражения определяется периостальная реакция, проявляющаяся локальным утолщением надкостницы. Со стороны окружающих мягких тканей отмечается умеренное увеличение их объёма, что может соответствовать воспалительной инфильтрации и перифокальному отёку. Совокупность выявленных рентгенологических изменений соответствует картине формирующегося экспериментального остеомиелита.

Лечение хронического остеомиелита

После истечения 14 суток выполнялось лечение ХО, этапность которого представлена на Рисунке 15. После предварительной подготовки операционного поля выполняли хирургическую ревизию области послеоперационного рубца с удалением рубцово-изменённых и нежизнеспособных тканей, а также костных секвестров (Рисунок 15-А). На следующем этапе извлекали ранее имплантированный аллокостный материал (В). Операционную рану подвергали тщательной санации с многократным орошением растворами антисептиков — перекисью водорода и хлоргексидином (С). После завершения хирургической обработки в костный дефект в основной группе имплантировали БНЦ, содержащий гентамицин (D–F), а в контрольной заполняли аутологичным сгустком крови также с гентамицином (во время хирургического вмешательства забирают кровь, полученную в ходе разреза или после формирования костного дефекта, в

полипропиленовый шприц без добавления антикоагулянта, после чего к образцу крови добавляют тромбин для стимуляции образования сгустка, и образовавшийся сгусток вносят в костный дефект).

Расчёт дозы антибиотика для импрегнации: была определена минимальная ингибирующая концентрация гентамицина в отношении музейного штамма *S. aureus,* которая составила 2 мкг/мл, что согласуется данными European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (2 мг/л) [149]. Использовали 4%-ный раствор гентамицина (40 мг вещества на 1 мл). V=2 мг:40мг/мл=0,05 мл. Таким образом, для импрегнации 0,006 гр БНЦ (средний вес одной изолированной «единицы» БНЦ) использовали 0,05 мл 4% гентамицина. В контрольной группе использовалась та же дозировка антибиотика.

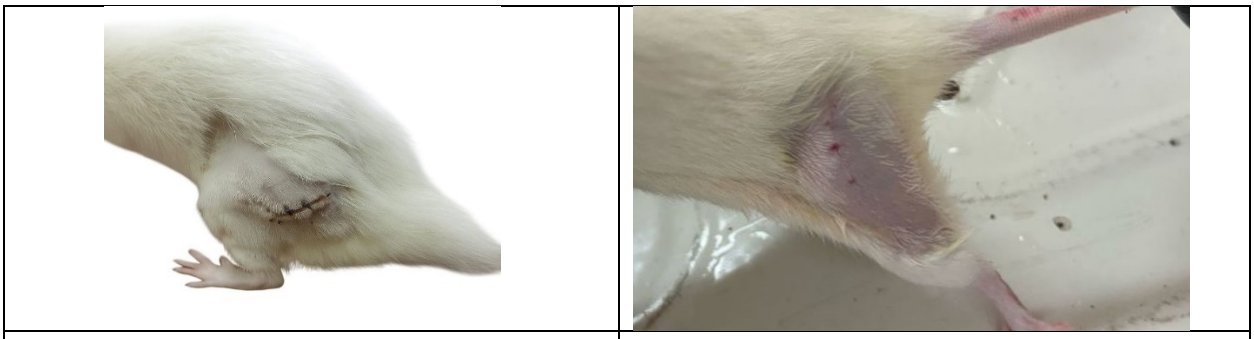


A – состояние костного дефекта после хирургического доступа; B – удаление ранее имплантированного аллокостного материала; C – промывание операционной раны антисептическими растворами; D – импрегнация биокомпозита на основе наноцеллюлозы гентамицином; E – заполнение костного дефекта биокомпозитом; F – вид костного дефекта после заполнения биокомпозитом.

Рисунок 15 – Этапы лечения остеомиелита

На Рисунке 15 показаны этапы последовательного проведения оперативного лечения хронического остеомиелита.

На третьи и седьмые сутки после лечения ХО был выполнен бакпосев с послеоперационной раны. Внешний вид ран представлен на Рисунке 16.

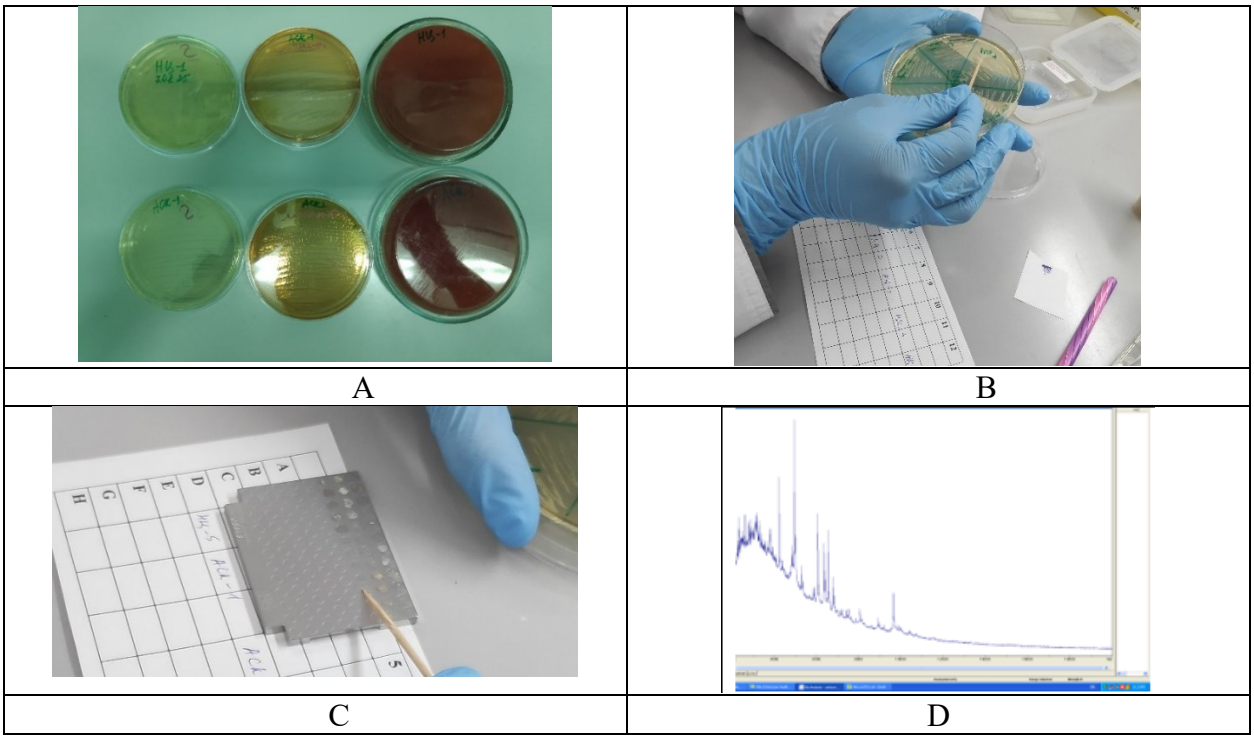


A – третьи сутки после операции, B – седьмые сутки после операции

Рисунок 16 – Вид послеоперационной раны на 3-и и 7-е сутки

На Рисунке 16 представлено состояние послеоперационной раны по латеральной поверхности левого бедра: чистая, отёка, отделяемого нет.

Методика микробиологического исследования представлена на Рис. 17.



A – бактериологический посев исследуемого материала на питательные среды; B – отбор бактериальных колоний из чистой культуры; C – нанесение бактериального материала на мишень (таргет-пластину) масс-спектрометра; D – видовая идентификация микроорганизмов методом MALDI-TOF MS.

Рисунок 17 – Микробиологическое исследование бакпосева с послеоперационных ран

Как представлено на Рисунке 17, после посева на питательные среды (A), осуществлялось выделение чистой культуры (B) с дальнейшей видовой MALDI-TOF MS идентификацией (C, D). При бактериологическом исследовании отделяемого послеоперационной раны в обеих группах на 3-и и 7-е сутки у крыс патогенная микрофлора не выявлена; выделялась только сапрофитная флора кожно-волосяного покрова животных: *S. xylosus, S. nepalenisis, S. gallinarum* и др., что характеризовалась как неэтиологический фактор вызванного хронического остеомиелита [152].

3.2.3 Результаты гистологического исследования ремоделирования биокомпозита в модели хронического остеомиелита

Гистологический анализ бедренной кости проводили на 14-е, 28-е и 42-е сутки эксперимента, исследуя по 8 животных из каждой группы. После эвтаназии выделяли фрагмент средней трети диафиза бедренной кости, включавший область дефекта и прилежащую интактную ткань.

Проведем сравнительный морфометрический анализ репарации остеомиелита (Таблица 36).

Таблица 36 - Сравнительный морфометрический анализ заживления остеомиелитического дефекта

Критерии	АСК n=8	БНЦ n=8	p-уровень*	АСК n=8	БНЦ n=8	p-уровень*	АСК n=8	БНЦ n=8	p-уровень*
	14-е сутки			**28-е сутки**			**42-е сутки**		
Остеонекроз	3 [3; 3]	0,5 [0; 1]	0,0003491*	2 [1,8;2,25]	0[0,0;0]	0,0003574*	1,5[0,75;2,25]	0[0,0;0]	0,004452*
Некроз мягких тканей	2,5 [2; 3]	0,5 [0; 1]	0,0006497*	2; [1,8; 2]	0[0,0;0]	0,000267*	1 [0,75; 1]	0[0,0;0]	0,00382*
Полиморфноядерные лейкоциты	3 [3; 3]	1 [1; 2]	0,0008288*	2 [2; 2,25]	0[0,0;0]	0,0004678*	1,5 [0,75;2]	0[0,0;0]	0,004375*
Лимфоциты и макрофаги, плазматические клетки	2 [1; 2]	2 [2;2,25]	0,1273	3 [2,8; 3]	2[1,8;2]	0,04284* 0,05967**	2 [1,75; 2,25]	2 [1,8;2,25]	0,9545
Эозинофилы	0	0	-	0	0	-	0	0	-
Восстановление костной пластинки									
Костная ткань	19 [15; 22]	24[21,5;28,25]	0,01951*	28,5[20,5;36,7]	56[49;63]	0,002271*	50[42,5;60,5]	80,8[78;87]	0,006208*
Хрящевая ткань	11[8,5;13,5]	10[5,8;12,5]	0,5274	8,5 [7;9,5]	9[7,8;9]	0,7463	6 [4;7,5]	6,5[3,8;8,25]	0,8229
Фиброзная ткань	27[23,8;27,5]	57,5[51;71]	0,0008989*	46,5[31,8;49,5]	34[27,8;42]	0,4306	34 [28;39,8]	12,8[9,3;16]	0,001874*
Некроз	43 [42; 50,3]	3,5[0; 8,25]	0,0003403*	11,5[9,8;27,3]	0[0,0;0]	0,0004054*	6,5 [3,8;11,5]	0[0,0;0]	0,004569*
Интрамедуллярное пространство									
Гемопломба	0 [0,0;0]	-	-	0[0,0;0]	-	-	0[0,0;0]	-	-
Композит	-	34,5 [28;38]	-	-	29,5 [28; 33]	-	-	28,5 [27,3;31]	-
Костная ткань	15 [12,8; 17,3]	34[31,8; 38,25]	0,0004426*	25 [22; 29]	32,5[28,5;35]	0,04928* 0,06627**	20,5[17,75;31,5]	31,6[25,8;36,5]	0,2265
Хрящевая ткань	6 [4,8; 9]	9 [7,8; 11]	0,07144	8,5 [7,8; 10,25]	10,5[8,8; 11]	0,2659	7,5 [6,75; 9,5]	11[8,8;11,75]	0,1239
Фиброзная ткань	26,5 [25; 29,3]	9 [8,8; 12]	0,002567*	28,5 [25,8; 33,5]	9,5[8; 11]	0,0009229*	25,5 [19,25; 34]	8,9[7;11,25]	0,005117
Костный мозг	11,5[7,8; 14,8]	47,5 [40,8; 48,25]	0,0006689*	19,5 [13,3; 28,25]	47 [44,8; 54]	0,001845*	30,5 [19,75;42,75]	48,5[44; 52,25]	0,02374*
Некроз	40,5 [37,3;42,8]	0 [0; 0,5]	0,003808*	13 [7,5; 20,75]	0 [0,0;0]	0,0004099*	1,5 [0; 11,75]	0[0,0;0]	0,03247*

*Примечание - Результаты представлены в формате Me [Q1; Q3]. АСК обозначает контрольную, БНЦ — основную группу. Межгрупповое сравнение проводили с применением U-критерия Манна–Уитни. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$.
** Значение p при применении поправки Бенджамина-Хохберга

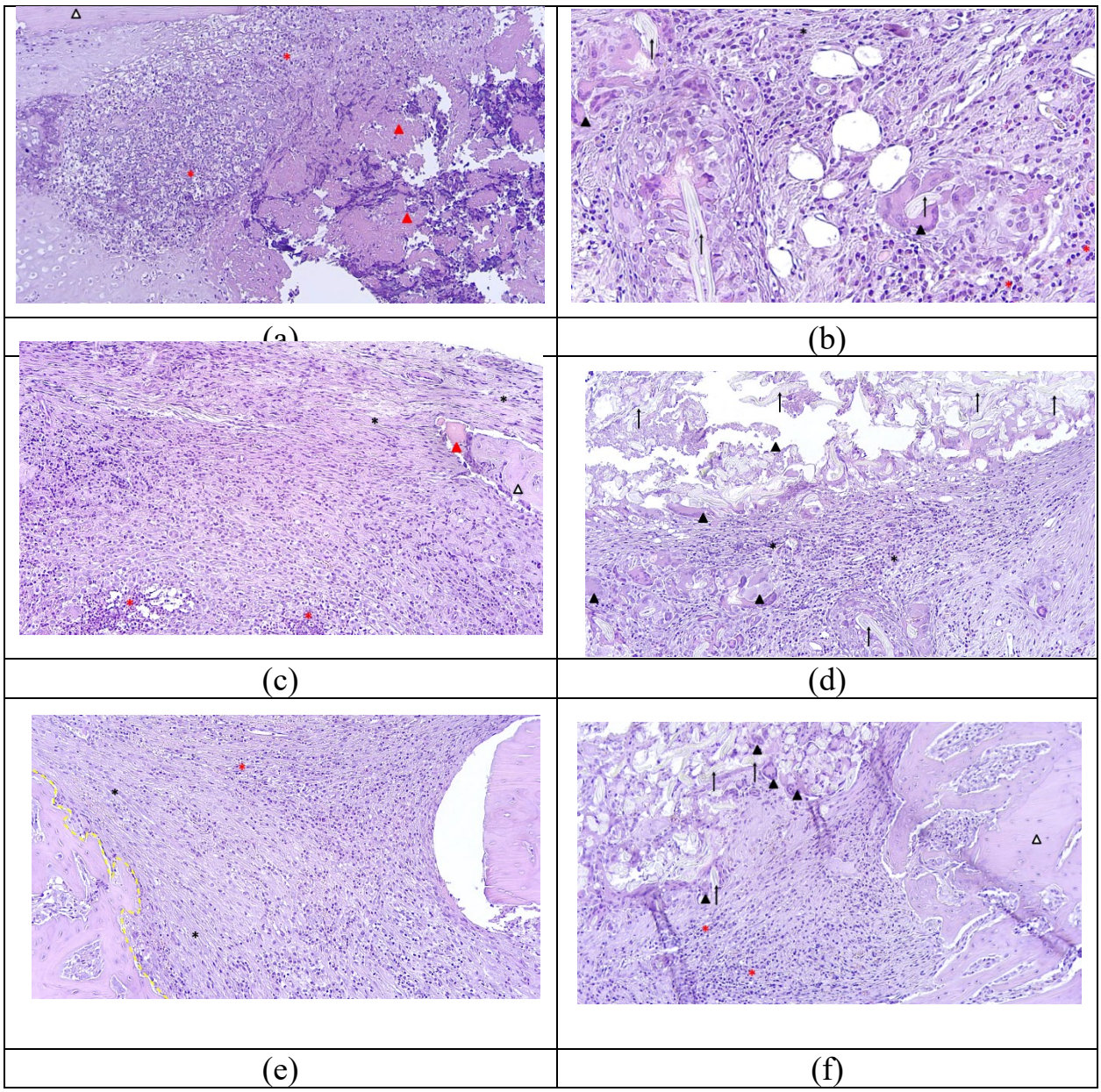
Образцы фиксировали в 10%-ном нейтральном забуференном формалине в соотношении 1:20, после чего проводили стандартную гистологическую обработку, парафиновую заливку и изготовление срезов. Микроскопию выполняли на Leica DM 1000 при увеличении × 100, × 200 и × 400 с последующей цифровой микрофотографией. Активность остеомиелита определяли по модифицированной шкале HOES на основании выраженности воспалительных изменений в 10 полях зрения при × 400 (Приложение У). Данный способ оценки активности остеомиелита был разработан коллективом авторов кафедры хирургических болезней с получением Свидетельства авторского права № 9335 от 20.04.2020 г.

Согласно данным Таблицы 36, на 14-е сутки в контрольной группе отмечены выраженные признаки активного воспаления и деструкции: остеонекроз (3 против 0,5 при p = 0,0003491), некроз мягких тканей (2,5 против 0,5 при p = 0,0006497) и полиморфноядерная лейкоцитарная инфильтрация (3 против 1, p = 0,0008288). Через две недели в основной группе (БНЦ) происходит существенное подавление острого воспалительного компонента и быстрое очищение дефекта от некротизированных тканей в 2 раза, что может указывать на более короткую воспалительную фазу. Рассмотрим гистологические микропрепараты, представленные на Рисунке 18, отражающие состояние остеомиелитического дефекта.

Как видно из Рисунка 18 (a), в препарате определяется частично некротизированный участок кости. Лакуны остеоцитов пусты, костные балки фрагментированы. Вокруг некротизированных масс - плотная гнойно-лейкоцитарная инфильтрация с явлениями деструкции и формированием полостей расплавления. Между зоной некроза и сохранённой костной тканью выражен демаркационный вал из клеток воспалительного характера.

Как видно из Рисунка 18 (b), фрагменты наноцеллюлозы представлены в виде светлоокрашенных волокнистых структур, окружённых многоядерными гигантскими клетками инородных тел (▲). Определяются поля клеточной инфильтрации (*), состоящие преимущественно из лимфоцитов и макрофагов.

Согласно данным Таблицы 36, к 28-м суткам в группе БНЦ практически полностью купируются признаки острого и подострого воспаления, тогда как в контрольной (АСК) сохраняется затяжной воспалительный очаг с остаточной клеточной реакцией и продолжающейся тканевой деструкцией (остеонекроз: АСК — 2 [1,8;2,25], БНЦ — 0 [0;0], p = 0,0003574; некроз мягких тканей: АСК — 2 [1,8;2], БНЦ — 0 [0;0], p=0,000267; лейкоцитарная инфильтрация: АСК — 2 [2;2,25], БНЦ — 0 [0;0], p = 0,0004678). Снижение лимфомакрофагальной инфильтрации в 2 раза в группе БНЦ также отражает более раннее завершение фазы санации и переход к стадии ремоделирования (3 [2,8;3] против 2 [1,8;2] в БНЦ, p = 0,04284, однако при применении поправки Бенджамина-Хохберга значения не достигли статистической значимости p=0,05967). Рассмотрим гистологические микропрепараты контрольной и основной группы на 28-е сутки (Рисунок 18-c и 18-d).



(a) – контрольная группа (АСК), 14-е сутки; (b) – основная группа (БНЦ), 14-е сутки; (c) – контрольная группа (АСК), 28-е сутки; (d) – основная группа (БНЦ), 28-е сутки; (e) – контрольная группа (АСК), 42-е сутки; (f) – основная группа (БНЦ), 42-е сутки. Окраска гематоксилином и эозином, ×100.

Обозначения: △ - новообразованная костная ткань; ▲ - некротизированнная ткань; * - полиморфноядерные гранулоциты; ▲ - многоядерные гигантские клетки; стрелка - наноцеллюлоза; * - клеточная инфильтрация

Рисунок 18 – Гистологические микропрепараты зоны дефекта

Рисунок 18 (c) демонстрирует, что в толще соединительной ткани видна умеренная клеточная инфильтрация (*). В исследуемых участках выявляли макрофагальную и плазмоцитарную инфильтрацию с присутствием нейтрофильных лейкоцитов. Вблизи поверхности формирующихся костных балок местами отмечались некротические изменения, проявлявшиеся однородностью цитоплазмы, исчезновением ядер и снижением интенсивности окрашивания тканевых структур. По данным Рисунка 18 (d), определяются

фрагменты лизируемой наноцеллюлозы, имеющие вид слабоокрашенных фрагментов (стрелки), окруженных гистиоцитами и единичными многоядерными гигантскими клетками инородных тел. По периферии зоны имплантата формируется слой зрелой фиброзной ткани с рассеянной клеточной инфильтрацией.

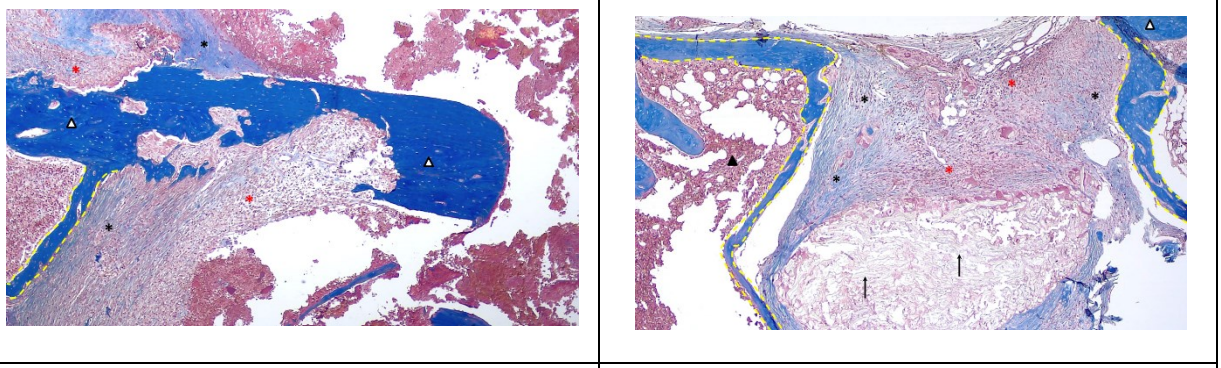
К 42-м суткам в группе БНЦ признаки воспалительно-некротического процесса **полностью купированы**, тогда как в контрольной (АСК) сохраняются остаточные деструктивные изменения (остеонекроз – 1,5 [0,75;2,25]; некроз МТ – 1 [0,75;1]; лейкоцитарная инфильтрация – 1,5 [0,75;2]). Отсутствие различий по хроническому клеточному инфильтрату (АСК — 2 [1,75;2,25], БНЦ — 2 [1,8;2,25], p = 0,9545 (различий нет)) при сохраняющихся различиях по некрозу и лейкоцитарной инфильтрации свидетельствует, что в обеих группах воспаление затухает, однако в группе БНЦ репарация проходит более физиологично и быстрее в 2 раза. Рассмотрим гистологические микропрепараты контрольной и основной группы на 42-е сутки (Рисунки 18-e и 18-f).

Согласно Рисунку 18 (e), в препарате определяется участок кости с зоной дефекта, частично замещённой волокнистой соединительной тканью (область, ограниченная пунктирной жёлтой линией). Фиброзная ткань (*) представлена плотными пучками коллагеновых волокон, ориентированных преимущественно параллельно поверхности кости. Между волокнами располагаются многочисленные активные фибробласты и фиброциты. В толще соединительной ткани выявляются очаги умеренной клеточной инфильтрации (*), состоящей преимущественно из лимфоцитов и макрофагов.

Рассмотрим морфологическое микроокружение в основной группе (БНЦ) на 42-е сутки (Рисунок 18 (f): по периферии имплантата видна зона фиброзной ткани с васкуляризацией и выраженным макрофагально-гистиоцитарным компонентом. На границе имплантата определяются фрагменты слабоокрашенных, гомогенных, волокнистых масс (указаны стрелками), представляющие собой остатки наноцеллюлозного композита, подвергающиеся лизису макрофагами и гигантскими многоядерными клетками инородных тел.

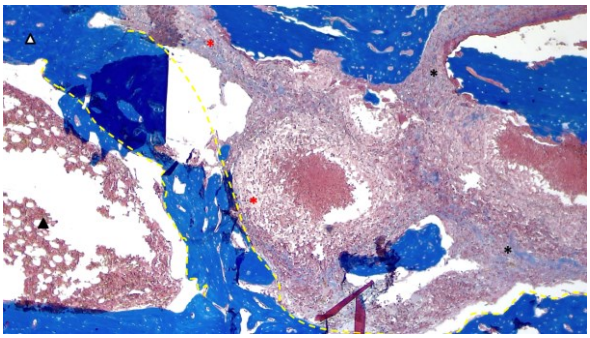
Восстановление костной пластинки отражает эффективность репаративного остеогенеза**.** Во все сроки в группе БНЦ наблюдается достоверно больший объём новообразованной костной ткани, с преимуществом в 2 раза на 28-е сутки (БНЦ – 56 [49;63] против 28,5 [20,5;36,7] при p = 0,002271) и 42-е сутки (80,8 [78;87] против 50 [42,5;60,5]). Данный процесс указывает на ускоренное созревание костного регенерата, активацию остеобластического звена, более ранний переход от грануляционно-фиброзной ткани к минерализованной костной структуре. К 42-м суткам в группе БНЦ формируется значительно более зрелая и морфологически полноценная костная пластинка, что свидетельствует о высокой эффективности исследуемого вещества.

Рассмотрим гистологический микропрепарат зоны дефекта на 14-е сутки в контрольной группе (Рисунок 19-а).

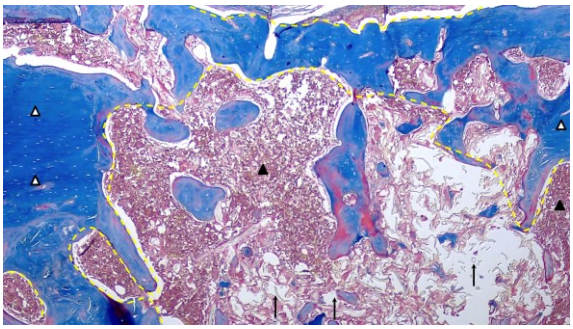


(a)

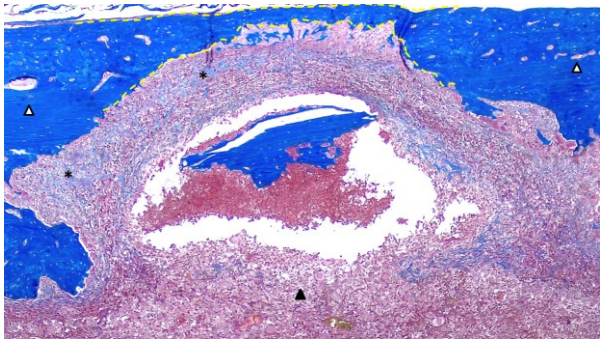
(b)



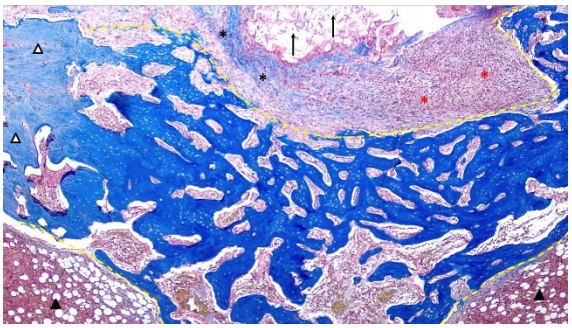
(c)



(d)



(e)



(f)

(a) – контрольная группа (АСК), 14-е сутки; (b) – основная группа (БНЦ), 14-е сутки; (c) – контрольная группа (АСК), 28-е сутки; (d) – основная группа (БНЦ), 28-е сутки; (e) – контрольная группа (АСК), 42-е сутки; (f) – основная группа (БНЦ), 42-е сутки. Окраска по Массону (Masson's trichrome), ×40

Обозначения:▲- костный мозг, △- кортикальная пластинка, - - - новообразованная кость, * - фиброзная ткань, стрелка - композит * - клеточная инфильтрация, стрелка - композит

Рисунок 19 – Гистологические микропрепараты восстановления костной пластинки в зоне дефекта. Masson's trichrome, × 40

Согласно Рисунку 19 (a), в препарате определяется участок костной ткани с признаками частичного некроза и гнойно-клеточной инфильтрации. Между фрагментами кости отмечаются скопления полиморфноядерных лейкоцитов и ядерного детрита, участки молодой грануляционно-фиброзной ткани.

Рассмотрим гистопрепарат зоны дефекта в основной группе на 14-е сутки после лечения ХО (Рисунок 19-b): дефект в кортикальной пластинке содержит наноцеллюлозу, которую циркулярно окружают распространяющиеся в интрамедуллярное пространство костные балки. По периферии композита видна зона новообразованной костной ткани (ограничена пунктирной линией), характеризующаяся постепенным переходом в зрелые костные балки кортикальной пластинки. В интрамедуллярном пространстве определяется костный мозг (▲) с признаками активного кроветворения. В зоне дефекта отмечается умеренно выраженная клеточная инфильтрация (*красные звёздочки) и участки молодой фиброзной ткани (*чёрные звёздочки), содержащие фибробласты и сосуды неоангиогенеза. В центральных отделах сохраняются фрагменты имплантата (указаны стрелками), подвергающиеся частичному лизису и замещению грануляционной тканью.

Далее рассмотрим гистопрепараты заживления в области костного дефекта **на 28-е сутки** в контрольной (Рисунок 19-c) и в основной (Рисунок 19-d) группах. Как видно из Рисунка 19 (c), в месте дефекта определяется формирующаяся фиброзная ткань, ограниченная от интрамедуллярного пространства костными балками, клеточная инфильтрация умеренная. На Рисунке 19 (d) показана зона репаративного остеогенеза, располагающаяся в области дефекта кортикальной пластинки, представленная новообразованными костными балками, интенсивно окрашенными в синий цвет. Между костными трабекулами располагаются участки костного мозга (▲), содержащие жировые клетки, гемопоэтические элементы и сосуды синусоидного типа. На границе между сформированной костью и участками регенерации определяется зона активного ремоделирования, характеризующаяся постепенным переходом к зрелой пластинчатой кости. В новообразованной кости определяются остеоциты, заключённые в лакунах, расположенные концентрически в толще костных балок.

Рассмотрим гистопрепараты заживления остеодефекта на 42-е сутки в контрольной и основной группах (Рисунки 19-e и 19-f). По Рисунку 19 (e) видно, что зона дефекта полностью закрыта новообразованной костной тканью (обозначено пунктиром), окрашенной в интенсивный сине-голубой цвет, что характерно для зрелого коллагенизированного костного матрикса. Костные балки имеют пластинчатое строение, с хорошо выраженными лакунами, содержащими остеоциты.

Как видно из Рисунка 19 (f), в центральной части (область, ограниченная пунктирной жёлтой линией) определяется зона новообразованной костной ткани на месте дефекта кортиальной пластинки, представленная

новообразованными трабекулами, интенсивно окрашенными в синий цвет. По периферии дефекта (Δ) отмечается зона фиброзной ткани (*), представленной пучками коллагеновых волокон, среди которых располагаются многочисленные фибробласты и новообразованные капилляры, а также клеточная инфильтрация. В верхней части микрофотографии определяется наноцеллюлоза (стрелки), представленная гомогенными, неокрашенными массами. В нижней части (▲) располагается нормальный костный мозг.

Согласно данным Таблицы 36, отсутствие значимых различий (все $p > 0,05$) по хрящевой ткани показывает, что репарация не смещается в сторону выраженного хондрогенеза. Следовательно, преимущество БНЦ больше реализуется через прямой остеогенез (интрамембранозный/остеобласт-опосредованный путь), а не через длительную хрящевую стадию.

На 14-е сутки более высокий показатель фиброзной ткани практически в 2 раза в группе БНЦ (57,5 [51;71] против 27 [23,8;27,5] при $p = 0,0003989$), вероятно, отражает активное раннее заполнение дефекта организующейся репаративной тканью, то есть быстрое формирование временного матрикса. Однако к 42-м суткам объём фиброзной ткани в группе БНЦ резко уменьшается и становится значительно ниже, чем в группе АСК, что указывает на успешную трансформацию временного фиброзного регенерата в костный, отсутствие «застревания» регенерации на стадии рубцевания, предотвращение фиброзной репарации как менее благоприятного исхода. В контрольной группе, напротив, сохранение значительного объёма фиброзной ткани практически в 2 раза на поздних сроках свидетельствует о замедленном или неполноценном остеогенезе (34 [28;39,8] против 12,8 [9,3;16], $p = 0,001874$**)**.

В группе БНЦ наблюдалось статистически значимое уменьшение некротических изменений в 5 раз в зоне костной пластинки (3,5 [0;8,25] против 43 [42;50,3] при $p = 0,0003403$). Также полное исчезновение некроза в группе БНЦ на 28-е сутки и отсутствие на 42-е сутки эксперимента демонстрирует эффективное воздействие на остеомиелитический очаг, быстрое заполнение костного дефекта и формирование условий для полноценного остеогенеза. Характеристика изменений в интрамедуллярном пространстве важна для оценки внутрикостной реконструкции и восстановления костномозговой архитектуры. В ранние сроки БНЦ обеспечивает более интенсивное формирование костных структур внутри интрамедуллярного пространства (34 [31,8;38,25] против 15 [12,8;17,3] при $p = 0,0004426$), что отражает активную реконструкцию дефекта «изнутри».
К 42-м суткам различия статистически нивелируются, однако медианные значения остаются выше в БНЦ, что может говорить о тенденции к более полной реконструкции при ограниченной мощности выборки (АСК — 20,5 [17,75;31,5], БНЦ — 31,6 [25,8;36,5] при $p = 0,2265$).

Во все сроки в группе БНЦ достоверно меньше фиброзной ткани в костномозговом канале, что свидетельствует о предотвращении склерозирующего/рубцового замещения костномозгового пространства,

сохранении условий для нормальной васкуляризации, более благоприятном течении внутрикостного ремоделирования. Достоверно больший объём костного мозга в группе БНЦ во все сроки (в 4 раза больше на 14-е сутки, чем в группе АСК; в два раза – на 28-е сутки) является показателем лучшего восстановления медуллярной полости, меньшего рубцевания, более физиологичного восстановления внутрикостной микроархитектоники. Полное или почти полное отсутствие некроза в интрамедуллярном пространстве у животных основной группы подтверждает высокую степень санации очага, сохранение жизнеспособности глубинных структур кости, создание условий для полноценной остеорепарации. Оценка гистологического исследования заживления остеомиелитического дефекта показала, что применение БНЦ в сравнении с традиционной методикой:

1. Способствует более быстрому купированию воспалительно-некротической фазы (отмечено на 14-е сутки уменьшение остеонекроза, некроза мягких тканей и воспалительной инфильтрации в 2 раза, чем в группе контроля).

2. Уменьшает выраженность остаточного тканевого повреждения.

3. Предотвращает затяжное фиброзное замещение: на 14-е сутки объём фиброзной ткани в зоне костной пластинки в группе БНЦ был выше (57,5 [51;71]), чем в контроле (27 [23,8;27,5]), тогда как к 42-м суткам — напротив, значительно ниже (12,8 [9,3;16] против 34 [28;39,8]). На ранних этапах после санации дефекта временный соединительнотканный матрикс играет роль организующего каркаса, обеспечивающего заполнение полости, неоангиогенез и миграцию клеток. При благоприятном течении регенерации этот ранний фиброзный компонент впоследствии подвергается ремоделированию и замещается костной тканью. Установлена последовательная динамика ремоделирования тканевых компонентов: раннее увеличение объёма фиброзной ткани в группе БНЦ сопровождалось её последующим выраженным сокращением при одновременном увеличении объёма костной ткани. Напротив, сохранение значительного объёма фиброзной ткани в контроле на поздних сроках можно рассматривать как признак неполноценной репарации с тенденцией к рубцовому замещению, а не к истинному остеогенезу.

4. Ускоряет формирование и созревание костного регенерата (достоверно больший объём новообразованной костной ткани в зоне восстановления костной пластинки в группе БНЦ на всех сроках наблюдения, особенно на 28-е в 2 раза (56 [49;63] против 28,5 [20,5;36,7]) и 42-е сутки (80,8 [78;87] против 50 [42,5;60,5]), что свидетельствует о том, что применение БНЦ не ограничивается только противовоспалительным эффектом, а в том числе и связано с активацией репаративного остеогенеза);

5. Обеспечивает более полноценное восстановление медуллярной архитектуры кости: в основной группе во все сроки определялся меньший объём фиброзной ткани и некроза, а также достоверно больший объём костного мозга, результаты указывают на более полноценное восстановление

медуллярной полости, что является одним из главных признаков качественной репарации. В хроническом остеомиелите костномозговой канал часто подвергается фиброзно-склеротической перестройке, что нарушает микроциркуляцию, клеточный обмен и снижает остеогенный потенциал. Сохранение или восстановление костного мозга, напротив, отражает сохранение функциональной архитектоники кости, адекватную васкуляризацию и более благоприятный долгосрочный прогноз. Следовательно, преимущества БНЦ выходят за рамки локального «закрытия дефекта» и затрагивают глубинную реконструкцию костной ткани.

Таким образом, по данным сравнительного морфометрического анализа заживления остеомиелитического дефекта установлено, что в основной группе (БНЦ) по сравнению с контрольной группой (АСК) наблюдается более благоприятная динамика репаративного остеогенеза, характеризующаяся значительно меньшей выраженностью воспалительно-деструктивных изменений, более ранним и более полным восстановлением костной пластинки, активным формированием зрелой костной ткани, снижением объёма фиброзной ткани и некротических масс, лучшей организацией интрамедуллярного пространства. Применение БНЦ ассоциировано с ускорением репаративной регенерации кости и более эффективным купированием хронического воспалительно-некротического процесса.

3.2.4 Результаты количественного определения гентамицина методом ВЭЖХ-МС *in vivo*

По результатам **ВЭЖХ-МС** на 14-е сутки после лечения хронического остеомиелита концентрация гентамицина в плазме крови животных сохранялась на низком уровне в обеих исследуемых группах. В группе аутологичного сгустка крови медиана концентрации составила 0,193 [0,158;0,202] мкг/мл, тогда как в группе БНЦ — 0,178 [0,171;0,253] мкг/мл. Существенных различий между группами не выявлено, что свидетельствует об отсутствии значимой системной аккумуляции антибиотика и подтверждает преимущественно локальный характер его высвобождения из имплантируемых материалов. Полученные данные позволяют предположить, что к 14-м суткам после лечения системное поступление гентамицина из зоны имплантации минимально, а использование наноцеллюлозного биокомпозита не сопровождается повышением уровня антибиотика в кровотоке по сравнению с традиционным носителем. Это косвенно указывает на локализованное высвобождение препарата в области костного дефекта и низкий риск системного токсического действия гентамицина при использовании биокомпозита.

4 ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В данном исследовании мы поставили целью оценить эффективность применения БНЦ в модели хронического остеомиелита, для чего исследовали общую токсичность вещества и потенциал в отношении репарации инфекционного поражения костной ткани.

Обсуждение полученных результатов по общей токсичности БНЦ

Оценка общей токсичности БНЦ включала анализ клинических симптомов, лабораторных исследований, гистологической картины изменений со стороны внутренних органов.

Температура тела - комплексный показатель теплового состояния организма животных [112]. Повышение или снижение температуры при исследовании токсичности является одним из индикаторов неблагополучия в организме, вызванного действием исследуемого вещества [114]. Золотым стандартом термометрии у животных, согласно данным литературы, является использование датчиков, имплантируемых в тело [115, 116, 117]. Высокая стоимость микрочипов и дополнительное вмешательство явились ограничивающими факторами для их применения. Как правило, температура животных регистрируется *per rectum*, однако, для ежедневного и нестрессогенного измерения мы выбрали простой, доступный и безопасный бесконтактный путь. Результаты ежедневной (при исследовании острой токсичности) и ежемесячной (при хронической) термометрии показали, что в экспериментальных группах температура тела животных оставалась в пределах физиологической нормы. Возможно сделать заключение об отсутствии пирогенного действия БНЦ. В большинстве *in vivo* исследований наноцеллюлозных имплантатов оценка биосовместимости проводится преимущественно по гистологическим и иммунологическим показателям, тогда как температурные изменения организма не демонстрируют высокой чувствительности и редко используются в качестве надёжного маркера воспалительной реакции [118,119].

Масса тела лабораторных животных является одним из интегральных показателей общего соматического состояния и чувствительным маркером общей токсичности [53]. В представленном исследовании динамика массы тела крыс в контрольной и основной группах характеризовалась стабильным увеличением показателей в течение всего эксперимента (14 дней и 6 месяцев). Отсутствие межгрупповых различий на исходном этапе подтверждает их сопоставимость и корректность рандомизации. В дальнейшем в основной группе отмечалось эпизодическое статистически значимое превышение массы тела по сравнению с АСК (на 1-м и 3-м месяцах наблюдения). При этом снижение массы тела или задержка прироста, которые могли бы свидетельствовать о развитии интоксикации или нарушении обменных процессов, не выявлены. Полученные результаты позволяют предположить, что интрамедуллярная имплантация БНЦ не оказывает негативного общего воздействия на организм животных. Более того, отсутствие угнетения

прироста массы тела косвенно свидетельствует о сохранности обменных процессов и отсутствии выраженной воспалительной или интоксикационной реакции острого или хронического характера. К шестому месяцу наблюдения различия между группами нивелировались, что может указывать на адаптационные механизмы организма к имплантированному материалу. Данные подтверждают биосовместимость исследуемого материала и отсутствие признаков хронической токсичности в условиях длительного эксперимента [53].

Оценка поведенческих реакций в тесте «открытое поле» является одним из ключевых этапов изучения общей токсичности и нейробиологической безопасности имплантируемых материалов. Тест является валидированным методом оценки функционального состояния центральной нервной системы, уровня тревожности, стресс-реактивности и ориентировочно-исследовательского поведения лабораторных животных [120, 121]. В условиях исследования острой и хронической токсичности анализ полученных данных не выявил статистически значимых межгрупповых различий ($p > 0,05$), что имеет принципиальное значение при оценке нейротоксического потенциала исследуемого материала. Тест отражает:

1. Функциональное состояние двигательной системы. Горизонтальная активность показывает общий уровень спонтанной моторики и интегративную активность корково-подкорковых структур. Отсутствие снижения количества пересечённых квадратов в основной группе свидетельствует о сохранности моторной координации, энергетического обмена, нейромедиаторной регуляции (дофаминергической и холинергической систем) [122]. Вертикальная активность (стойки) является показателем исследовательского поведения и функционирования лимбико-стриарных структур. Сохранность данного показателя указывает на отсутствие угнетающего воздействия на подкорковые центры и ретикулярную формацию [122].

2. Ориентировочно-исследовательская реакция. Суммарный показатель активности общей активности в основной группе демонстрировал тенденцию к увеличению, что может свидетельствовать об отсутствии седативного или депрессивного эффекта исследуемого материала. Количество обследованных отверстий (норковый рефлекс) отражает когнитивную составляющую поведения и уровень исследовательской мотивации. Отсутствие достоверных различий подтверждает сохранность познавательной активности [124].

3. Эмоционально-аффективные реакции. Показатели груминга и его длительности не демонстрировали статистически значимых изменений. Учитывая, что чрезмерный или резко сниженный груминг может быть индикатором стрессовой реакции или дисфункции ЦНС, стабильность данного параметра указывает на отсутствие выраженного стресс-индуцированного ответа. Количество актов дефекации и параметры пребывания в центральной зоне традиционно рассматриваются как индикаторы тревожности [123, 124, 124]. Отсутствие увеличения дефекации и

существенного сокращения времени нахождения в центре свидетельствует о неизменённом уровне тревожности у животных основной группы.

4. Нейротоксикологическая интерпретация. Острое токсическое воздействие часто сопровождается угнетением моторики, снижением исследовательской активности, повышением тревожности, вегетативными проявлениями стресса. В представленном исследовании подобные изменения не наблюдались, что свидетельствует об отсутствии острого и хронического нейротоксического действия, сохранности нейромедиаторных механизмов регуляции поведения.

Не найдено публикаций, описывающих применение теста «открытое поле» после имплантации вещества в костную ткань. Однако влияние самого оперативного вмешательства в данном тесте были оценены в работе Шариповой В. Х. с соавт.: отмечалось восстановление двигательной активности вне зависимости от типа трансплантации [125]. Комплексная оценка двигательной, ориентировочно-исследовательской и эмоциональной активности крыс в тесте «открытое поле» не выявила признаков нейротоксичности исследуемого материала в условиях острого и хронического эксперимента, что подтверждает его функциональную биосовместимость и безопасность со стороны центральной нервной системы [126].

Известно, что **система кроветворения** быстро реагирует на патологические изменения внутренней среды, ее показатели характеризуются высокой чувствительностью к воздействию экзогенных факторов, в том числе различных химических соединений. Изменения в параметрах периферической крови могут отражать как прямое токсическое воздействие на костный мозг, так и вторичные реакции организма, связанные с воспалительными, иммунными или адаптационными процессами. Анализ показателей общего анализа крови широко используется в токсикологических исследованиях для оценки безопасности и потенциальных гематотоксических эффектов исследуемых веществ [127].

В проведённом исследовании сравнительный анализ гематологических показателей между контрольной группой (АСК) и основной группой (БНЦ) показал отсутствие статистически значимых межгрупповых различий ($p > 0,05$) по всем исследуемым параметрам. Краткосрочное и длительное воздействие исследуемого вещества не вызывает выраженных нарушений в системе кроветворения и не приводит к развитию патологических изменений в клеточном составе периферической крови. Анализ эритроцитарных показателей продемонстрировал высокую степень стабильности параметров красной крови. Количество эритроцитов, уровень гемоглобина и показатели гематокрита в основной группе находились на сопоставимом уровне с контрольной группой и не выходили за пределы физиологических значений. Отсутствие статистически значимых изменений данных параметров свидетельствует о том, что исследуемое вещество не оказывает угнетающего

воздействия на процессы эритропоэза и не приводит к развитию анемических состояний [128].

Особое значение при оценке состояния эритроцитарного звена имеют эритроцитарные индексы, которые позволяют оценить морфофункциональные характеристики эритроцитов и выявить возможные нарушения синтеза гемоглобина или процессов созревания клеток. Все указанные индексы оставались стабильными и не демонстрировали достоверных различий между группами, что указывает на сохранность морфологической структуры эритроцитов [128].

Показатели лейкоцитарного звена крови являются важным индикатором иммунологического состояния организма и его реакции на токсическое воздействие. В настоящем исследовании уровень лейкоцитов в основной группе был сопоставим с контрольной группой и находился в пределах физиологических значений. Аналогичная тенденция наблюдалась и для показателей лейкоцитарной формулы. Относительное содержание лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов в основной группе не демонстрировало достоверных отклонений по сравнению с АСК. Стабильность данных показателей указывает на отсутствие выраженной иммунной активации, воспалительных процессов или угнетения иммунной системы. Кроме того, абсолютные значения лимфоцитов, моноцитов и гранулоцитов также не различались между группами, что свидетельствует об отсутствии влияния исследуемого вещества на клеточные механизмы врождённого и адаптивного иммунитета. Данные результаты позволяют предположить, что БНЦ не оказывает выраженного иммуномодулирующего или иммунотоксического действия при условиях острого и хронического воздействия [129, 130].

Не менее важным компонентом системы крови является тромбоцитарное звено, которое играет ключевую роль в поддержании гемостаза. При токсическом воздействии различных веществ могут наблюдаться изменения количества тромбоцитов, а также их морфофункциональных характеристик. Стабильность данных параметров в обеих группах указывает на отсутствие нарушений процессов тромбоцитопоэза и не свидетельствует о развитии дисфункции тромбоцитов, что позволяет предположить, что исследуемое вещество не оказывает негативного влияния на систему гемостаза и не вызывает изменений, связанных с повышенной или сниженной тромбоцитарной активностью [128].

Таким образом, совокупность полученных гематологических данных при остром и хроническом воздействии исследуемого вещества в условиях проведённого эксперимента не приводит к развитию выраженных нарушений в системе кроветворения. Все исследованные показатели периферической крови оставались в пределах физиологической нормы и не демонстрировали статистически значимых отклонений по сравнению с АСК. БНЦ не обладает гематотоксическим действием и не вызывает патологических изменений со стороны лейкоцитарного, эритроцитарного и тромбоцитарного звеньев крови.

Сохранность основных гематологических параметров указывает на адаптационный характер реакции организма и подтверждает безопасность БНЦ при интрамедуллярной имплантации.

Результаты биохимического анализа крови, полученные при исследовании острой и хронической токсичности, свидетельствуют о том, что применение БНЦ не сопровождалось развитием выраженных системных метаболических нарушений и не вызывало лабораторно значимого повреждения жизненно важных органов. Отсутствие статистически значимых различий между контрольной и основной группами по всем исследованным показателям ($p > 0,05$) указывает на благоприятный биохимический профиль безопасности материала в условиях острого и хронического эксперимента.

Одним из ключевых аспектов токсикологической оценки любого нового биоматериала является анализ состояния гепатобилиарной системы, поскольку печень выступает центральным органом биотрансформации и детоксикации экзогенных веществ [131, 131]. В настоящем исследовании не было выявлено достоверного повышения уровней АЛТ, АСТ, общего билирубина, ГГТ и щелочной фосфатазы, что имеет принципиальное значение для интерпретации результатов. Известно, что увеличение активности трансаминаз, прежде всего АЛТ и АСТ, традиционно рассматривается как ранний лабораторный маркер цитолитического синдрома и повреждения мембран гепатоцитов. Однако в данной работе активность указанных ферментов не только не возрастала, но по ряду позиций даже демонстрировала тенденцию к снижению в основной группе. Это позволяет предположить, что исследуемый материал не индуцирует острого и хронического цитотоксического воздействия на печеночную ткань. Отсутствие значимых изменений билирубина, ГГТ и щелочной фосфатазы дополнительно исключает развитие холестатического компонента, что особенно важно при оценке потенциальной биосовместимости материала.

Не менее значимым является отсутствие негативной динамики со стороны почечной функции. Концентрации креатинина и мочевины в основной группе оставались сопоставимыми с контролем, что свидетельствует об отсутствии выраженного нефротоксического действия. Почки являются одним из основных путей выведения продуктов деградации биоматериалов, стабильность этих показателей указывает на отсутствие острого и хронического нарушения клубочковой фильтрации или выраженного катаболического стресса, что имеет особое значение в контексте оценки общей безопасности материалов, потенциально способных к частичной резорбции, биодеградации или высвобождению низкомолекулярных фрагментов в кровоток [132].

Оценка показателей белкового обмена не выявила статистически значимых различий по уровням общего белка, альбумина и коэффициенту A/G между исследуемыми группами. Сохранение сопоставимых значений данных показателей свидетельствует о стабильности белкового гомеостаза и не

указывает на развитие выраженных нарушений белоксинтетической функции печени либо системной воспалительно-токсической реакции.

Отдельного внимания заслуживают показатели минерального обмена, прежде всего кальция, фосфора и магния, особенно если исследуемый материал применяется в условиях контакта с костной тканью или предназначен для костной регенерации. В представленных данных отсутствуют статистически значимые изменения указанных параметров, что свидетельствует об отсутствии системной дестабилизации минерального гомеостаза. При этом в основной группе отмечается тенденция к увеличению медианного уровня кальция. С токсикологической точки зрения данное наблюдение не сопровождается параллельным ухудшением других метаболических показателей и не может рассматриваться как патологический признак. Напротив, в контексте биоматериалов для костной инженерии подобная динамика может отражать адаптационную метаболическую реакцию, связанную с локальным взаимодействием материала с костной средой, ремоделированием минерального матрикса или особенностями ранней тканевой интеграции. Однако, учитывая отсутствие статистической значимости и ограниченный размер выборки, данное предположение требует осторожной интерпретации и нуждается в подтверждении на более поздних сроках наблюдения и при расширении экспериментальных групп.

Стабильность показателей углеводного и липидного обмена также подтверждает отсутствие выраженного общего стрессового или токсического ответа. Уровень глюкозы в основной группе имел тенденцию к умеренному повышению, однако не достиг статистической значимости. Подобные колебания вполне допустимы в рамках острого эксперимента и могут быть связаны с неспецифической стресс-реакцией на манипуляцию, анестезию, забор крови или индивидуальные особенности животных. Показатели триглицеридов, холестерина и желчных кислот также не выявили достоверных различий. Особенно важно, что даже при некотором увеличении желчных кислот в основной группе не наблюдалось параллельного роста билирубина, ГГТ и щелочной фосфатазы, что исключает трактовку этих изменений как маркера холестатического поражения печени. Следовательно, выявленные сдвиги носят вариабельный, а не патологический характер.

Отсутствие статистически значимых изменений активности амилазы позволяет исключить выраженное вовлечение поджелудочной железы в ответ на введение исследуемого материала. В свою очередь, стабильные значения креатинкиназы указывают на отсутствие генерализованного мышечного или тканевого повреждения, что также имеет значение при интерпретации общей токсичности. Аналогично, неизменность TCO_2 (общее содержание углекислого газа в крови) свидетельствует о сохранности кислотно-основного равновесия и отсутствии выраженных метаболических нарушений, что косвенно подтверждает стабильность общего физиологического состояния животных.

Следует отметить, БНЦ не вызывает лабораторно значимых признаков острой и хронической гепатотоксичности, нефротоксичности, метаболической дестабилизации или генерализованного повреждения тканей. Это особенно важно для биоматериалов, предназначенных для имплантации, поскольку ранняя и поздняя системная безопасность является одним из базовых критериев их доклинической оценки. Полученные данные согласуются с современной концепцией биосовместимости, согласно которой материал, контактирующий с тканями организма, не должен вызывать не только локального воспалительно-деструктивного ответа, но и системного нарушения метаболического гомеостаза.

Вместе с тем при интерпретации результатов необходимо учитывать ряд методологических ограничений. Прежде всего, объем выборки (n=8 в каждой группе) является относительно небольшим, что снижает статистическую мощность исследования и может ограничивать выявление слабовыраженных эффектов. Именно поэтому отдельные тенденции, наблюдавшиеся по показателям кальция, альбумина, A/G, желчных кислот и трансаминаз, не могут быть окончательно отвергнуты как биологически незначимые без проведения исследований на более крупной выборке.

Таким образом, представленные биохимические данные позволяют заключить, что исследуемый материал БНЦ в условиях острого и хронического эксперимента демонстрирует высокую степень биохимической безопасности и не индуцирует клинически значимых системных токсических изменений. Отсутствие достоверных отклонений со стороны печени, почек, белкового, минерального, липидного и углеводного обмена свидетельствует о хорошей переносимости БНЦ при интрамедуллярной имплантации. Полученные результаты создают экспериментальную основу для дальнейшего изучения БНЦ как потенциально биосовместимого материала для применения в регенеративной медицине и тканевой инженерии, в том числе в условиях взаимодействия с костной тканью.

Во всех исследованных органах (головном мозге, сердце, лёгких, печени, почках, поджелудочной железе, селезёнке, кишечнике, семенниках и придатках яичка) значимые пороги острого токсического поражения (по морфологическим критериям) не достигнуты, отмеченные локальные изменения были минимальными и потенциально обратимыми, что свидетельствует о хорошей биосовместимости БНЦ *in vivo.* Эти результаты согласуются с опубликованными научными данными, показавшими, что наноцеллюлоза не вызывает острой токсической реакции, иммунного ответа или воспаления [133].

Также установлено, что при интрамедуллярной имплантации БНЦ наблюдались более выраженные, но все еще единичные лёгкие и обратимые гистопатологические изменения (вакуолизация гепатоцитов, слабый интерстициальный отёк, умеренная лимфоидная гиперплазия, лёгкое венозное полнокровие и стазы), без признаков токсического повреждения (некроза паренхимы, фибриноидного васкулита/тромбозов, диффузной

воспалительной инфильтрации). Более явные, но все еще находящиеся в пределах минимальной и обратимой гистологической реакции изменения при интрамедуллярной имплантации наиболее вероятно отражают сочетание активного фагоцитоза и иммунно-метаболического (энергетического) напряжения в условиях большей системной экспозиции материала из высоко васкуляризированного костномозгового компартмента. Отсутствие некроза, васкулита/тромбозов и диффузного воспаления указывает, что в данном случае имеет место адаптационно-компенсаторный, а не токсический процесс.

При анализе острой токсичности по системам органов установлено, что в головном мозге гистопатологические признаки по всем критериям соответствовали минимальным изменениям: некроз/дегенерация нейронов, аксонопатия, васкулит, геморрагии не выявлены; перинейрональные/периваскулярные «ореолы» единичны, гистоархитектоника не нарушена. Патологические изменения интерпретируются как спектр неспецифических/артефактных изменений (фиксация, постмортальные сдвиги) либо транзиторные гемодинамические колебания без признаков острой нейротоксичности. В сердце гистоархитектоника миокарда сохранена, некроз, фибриноидный васкулит и клеточные инфильтраты отсутствуют. Единичные кардиомиоциты с набуханием/вакуолизацией и редкая очаговая гиперэозинофилия соответствуют обратимому стресс-паттерну без цитолиза. Венозное полнокровие встречается спорадически и трактуется как микрогемодинамическая реактивность, а не прямая кардиотоксичность. В лёгких гистоархитектоника респираторного отдела сохранена: отсутствуют некроз, диффузный отёк, гиалиновые мембраны и тромбозы. При интрамедуллярном введении у части животных наблюдается умеренное полнокровие, очаговая лимфомакрофагальная инфильтрация и лёгкий интерстициальный отёк без эпителиальной деструкции. В печени в основной группе наблюдается лёгкая вакуолизация гепатоцитов без некроза, выраженного воспаления и холестаза. Паттерн соответствует обратимой гидропической дистрофии/умеренному энергетическому напряжению, а не истинной гепатотоксичности. В почках клубочки интактны, в канальцевом эпителии отмечается редкая лёгкая вакуолизация, очаговый интерстициальный отёк и венозное полнокровие (слегка более выраженное при интрамедуллярной экспозиции). Некроз канальцев, белковые цилиндры и гломерулопатия отсутствуют. В поджелудочной железе экзокринный отдел и островки сохранны, некроз, дистрофия и воспаление не выявлены, сосудистые изменения минимальны. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии острых панкреатотоксических эффектов. В ткани селезёнки гистоархитектоника сохранена. При интрамедуллярной экспозиции чаще фиксируются умеренная гиперплазия белой пульпы и активация макрофагов/умеренный сидероз без деструкции стромы и некроза. В кишечнике эпителий и крипто-ворсинчатая архитектура сохранены. В интрамедуллярной группе фокально отмечается лёгкая

гидропическая/зернистая дистрофия, ограниченный отёк и умеренная лимфоидная гиперплазия; некроз, диффузное воспаление и кровоизлияния отсутствуют. В ткани семенников и придатков сперматогенез сохранён, герминативный эпителий стратифицирован; изменения ограничиваются единичной вакуолизацией и лёгкими сосудистыми сдвигами. Поражения клеток Сертоли/Лейдига, атрофия канальцев и выраженное воспаление отсутствуют. Гистопаттерн представлен на Рисунке 20.

	Контрольная группа АСК	Основная группа БНЦ
Головной мозг		
Сердце		
Легкие		
Печень		
Почки		
Поджелудочная железа		
Селезенка		
Кишечник		
Семенники		
Придатки яичка		

- отсутствует

- легкая степень

- умеренная степень

- тяжелая степень

Гистопаттерн повреждения внутренних органов определяли для каждой ткани. В качестве основного паттерна выбирали морфологический признак, который в данной ткани является ведущим и ранним проявлением острого клеточного повреждения. Результат оценивали по принципу «наихудшего признака»: если ключевой паттерн не достигал пороговой выраженности, орган считался интактным

Рисунок 20 – Гистопатологическая оценка пролонгированного дистрофического (метаболического) и васкулопатического (ишемического) паттерна повреждения/реакции в тканях

Как видно из Рисунка 20, во всех органах доминируют минимальные, потенциально обратимые сдвиги без достижения порогов острого токсического поражения. Более заметные, но всё ещё лёгкие дистрофические и сосудистые изменения при интрамедуллярном введении согласуются с активным фагоцитарным клиренсом и умеренным иммунно-метаболическим напряжением высоко васкуляризированного костномозгового компартмента.

При этом нельзя исключить, что часть наблюдаемых гистопатологических повреждений связана с хирургическим

вмешательством/перипроцедурными факторами и/или артефактами фиксации. Мы минимизировали эти риски за счёт наличия контрольной группы, одновременной эвтаназии, стандартизованной вырезки и фиксации, слепой оценки и унифицированных шкал, однако полностью исключить влияние перипроцедурного стресса (анестезия, кровопотеря/гемодилюция, микротромбоз, ишемия-реперфузия), технических нюансов доступа и артефактов проводки (перинейрональные/периваскулярные «ореолы», вакуолизация, мелкие экстравазаты) невозможно. В интерпретации мы рассматривали выявленные минимальные и потенциально обратимые сдвиги как возможный эффект имплантата для консервативной оценки биобезопасности имплантата. При интрамедуллярной имплантации БНЦ в сравнении с контрольной группой наблюдались единичные лёгкие и обратимые гистопатологические изменения (вакуолизация гепатоцитов, слабый интерстициальный отёк, умеренная лимфоидная гиперплазия, лёгкое венозное полнокровие и стазы), без признаков хронического токсического повреждения. Более явные, но все ещё находящиеся в пределах минимальной и обратимой гистологической реакции изменения при интрамедуллярной имплантации наиболее вероятно отражают сочетание активного фагоцитоза и иммунно-метаболического (энергетического) напряжения в условиях большей системной экспозиции материала из высоко васкуляризированного костномозгового компартмента. Отсутствие некроза, васкулита/тромбозов и диффузного воспаления указывает, что в данном случае имеет место адаптационно-компенсаторный, а не токсический процесс.

При анализе хронической токсичности по системам органов установлено, что в головном мозге гистопатологические признаки по всем критериям соответствовали минимальным изменениям: некроз/дегенерация нейронов, аксонопатия, васкулит, геморрагии не выявлены; перинейрональные/периваскулярные «ореолы» единичны, гистоархитектоника не нарушена. Патологические изменения интерпретируются как спектр неспецифических/артефактных изменений (фиксация, постмортальные сдвиги) либо транзиторные гемодинамические колебания без признаков хронической нейротоксичности. В сердце гистоархитектоника миокарда сохранена, фиброз и клеточные инфильтраты отсутствуют. Единичные кардиомиоциты с набуханием/вакуолизацией и редкая очаговая гиперэозинофилия соответствуют обратимому стресс-паттерну без цитолиза. Венозное полнокровие встречается спорадически и трактуется как микрогемодинамическая реактивность, а не прямая кардиотоксичность. В лёгких гистоархитектоника респираторного отдела сохранена: отсутствуют некроз, диффузный отёк, гиалиновые мембраны и тромбозы. При интрамедуллярном введении у части животных наблюдается умеренное полнокровие, очаговая лимфомакрофагальная инфильтрация и лёгкий интерстициальный отёк без эпителиальной деструкции. В печени при интрамедуллярном пути введения наблюдается стеатоз. Паттерн соответствует обратимой гидропической дистрофии/умеренному

энергетическому напряжению, а не истинной гепатотоксичности. В почках клубочки интактны, в канальцевом эпителии отмечается редкая лёгкая вакуолизация, очаговый интерстициальный отёк и венозное полнокровие. В поджелудочной железе экзокринный отдел и островки сохранны, некроз, дистрофия и воспаление не выявлены, сосудистые изменения минимальны. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии острых панкреатотоксических эффектов. В ткани селезёнки гистоархитектоника сохранена. При интрамедуллярной экспозиции чаще фиксируются умеренная гиперплазия белой пульпы и активация макрофагов/умеренный сидероз без деструкции стромы и некроза. В кишечнике эпителий и крипто-ворсинчатая архитектура сохранены. В интрамедуллярной группе фокально отмечается лёгкая гидропическая/зернистая дистрофия, ограниченный отёк и умеренная лимфоидная гиперплазия; некроз, диффузное воспаление и кровоизлияния отсутствуют. В ткани семенников и придатков сперматогенез сохранён, герминативный эпителий стратифицирован; изменения ограничиваются единичной вакуолизацией и лёгкими сосудистыми сдвигами. Поражения клеток Сертоли/Лейдига, атрофия канальцев и выраженное воспаление отсутствуют. Итоговая гистооценка по органам представлена на Рисунке 21.

	Контрольная группа АСК	Основная группа БНЦ
Головной мозг		
Сердце		
Легкие		
Печень		
Почки		
Поджелудочная железа		
Селезенка		
Кишечник		
Семенники		
Придатки яичка		

- отсутствует

- легкая степень

- умеренная степень

- тяжелая степень

Рисунок 21 – Гистопатологическая оценка пролонгированного дистрофического (метаболического) и васкулопатического (ишемического) паттерна повреждения/реакции в тканях

Как видно из Рисунка 21, при оценке хронической токсичности во всех органах доминируют минимальные, потенциально обратимые сдвиги без достижения порогов хронического токсического поражения. Более заметные, но всё ещё лёгкие дистрофические и сосудистые изменения при интрамедуллярном введении согласуются с активным фагоцитарным клиренсом и умеренным иммунно-метаболическим напряжением высоко васкуляризированного костномозгового компартмента.

Подводя итог проведенных исследований, можно сказать, что БНЦ является метаболомно-инертным веществом, не оказывает статистически значимого влияния на клинические параметры, локомоторную активность, исследовательское поведение, показатели тревожности, общего и биохимического анализов крови; при гистологическом и морфометрическом анализах во всех органах доминируют минимальные, потенциально обратимые сдвиги без достижения порогов острого и хронического токсического поражения.

Гистолого-микробиологическое обоснование использования биокомпозита на основе БНЦ в модели хронического остеомиелита

При исследовании микробиологической чистоты исследуемый образец был стерильным, что выражалось в отсутствии роста микроорганизмов на питательным средах. Стерильность образцов дает возможность применения их в операционной для заполнения остеодефектов *in vivo*. В качестве моновещества БНЦ не обладает бактерицидным свойством, что соответствует данным доступной литературы [134].

Как показали результаты нашего исследования, БНЦ, насыщенные антибиотиками, демонстрируют высокий антибактериальный и антифунгицидный потенциал, что подтверждается рядом научных публикаций. Исследования демонстрируют, что наноцеллюлоза в сочетании с различными компонентами обладает выраженными антимикробными свойствами. Например, композиты на основе поли(3-гидроксибутирата) и НЦ, модифицированные наночастицами оксида цинка (ZnO), показали улучшенные физические характеристики и активность против *Escherichia coli и Staphylococcus aureus.* Аналогично, комбинация наночастиц серебра с БНЦ эффективно подавляла рост *B. subtilis, E. coli* и *S. aureus,* а также *P. aeruginosa.* Пленки из хитозана и НЦ, обработанные плазмой, продемонстрировали значительное ингибирование роста *E. coli.* Кроме того, БНЦ в комплексе с аллицином и лизоцимом проявила антифунгицидные и антибактериальные свойства против *Aspergillus niger, C. albicans, S. aureus u E. coli.* Эти результаты подтверждают потенциал НЦ для использования в качестве носителя лекарственных средств [85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 134].

Полученные в настоящей работе результаты демонстрируют, что в основной группе (**БНЦ**) заживление остеомиелитического дефекта протекало более благоприятно, чем в контрольной группе (**АСК**), что проявлялось достоверным снижением воспалительно-некротических изменений, более ранним восстановлением костной пластинки, уменьшением объёма

фиброзной ткани и более полноценной реконструкцией интрамедуллярного пространства. Подобная направленность изменений соответствует современным представлениям о патогенезе хронического остеомиелита и закономерностях репаративного остеогенеза.

Хронический остеомиелит рассматривается как инфекционно-воспалительный процесс, при котором персистирующая микробная колонизация, нарушение микроциркуляции, формирование секвестров и «мёртвого пространства» поддерживают длительное воспаление, препятствуют санации очага и тормозят полноценную регенерацию костной ткани. В литературе подчёркивается, что для хронического остеомиелита характерны сочетание некроза кости, хронической воспалительной инфильтрации, фиброзной перестройки костномозгового пространства и замедленного остеогенеза. Именно поэтому уменьшение остеонекроза, некроза мягких тканей и воспалительной инфильтрации, выявленное в группе БНЦ уже на 14-е сутки, можно расценивать как морфологическое свидетельство ускоренного подавления деструктивной фазы процесса и более раннего перехода к репарации. Эти наблюдения согласуются с общепринятыми представлениями о том, что в лечении хронического остеомиелита ключевое значение имеет не только эрадикация инфекции, но и создание условий для восстановления локальной биологической среды кости [135, 154].

Особенно показательно, что в основной группе к 28-м суткам остеонекроз в зоне костной пластинки и интрамедуллярного пространства практически исчезал, тогда как в контроле сохранялся. С патоморфологической точки зрения это имеет принципиальное значение, поскольку сохранение некротических масс является не только маркером продолжающегося повреждения, но и субстратом для персистенции инфекции и хронического воспаления. Современные обзоры по хроническому остеомиелиту подчёркивают, что наличие нежизнеспособной кости и остаточного дефекта поддерживает «порочный круг» воспаления, снижает эффективность антибактериальной терапии и препятствует репарации. Следовательно, более быстрое исчезновение некроза в группе БНЦ может интерпретироваться как один из важнейших механизмов, обеспечивающих дальнейшее ускорение остеогенеза.

Ключевым результатом настоящего исследования является достоверно больший объём новообразованной костной ткани в зоне восстановления костной пластинки в группе БНЦ на всех сроках наблюдения, особенно на 28-е (в 2 раза) и 42-е сутки (в 1,6 раз), что говорит о том, что применение БНЦ не ограничивается только противовоспалительным эффектом, а связано с активацией репаративного остеогенеза. Современные исследования по тканевой инженерии кости показывают, что целлюлозные и особенно наноцеллюлозные матриксы способны выступать не только как инертный наполнитель, но и как биосовместимый структурный каркас, поддерживающий клеточную адгезию, миграцию и дифференцировку

остеогенных клеток. В ряде обзоров показано, что nanocellulose/cellulose nanocrystals (CNC/NCC) улучшают механические свойства матрикса, повышают стабильность конструкции, способствуют минерализации и создают благоприятную микросреду для остеобластической дифференцировки. Это позволяет интерпретировать выявленное у нас ускорение костеобразования как результат не только уменьшения воспаления, но и прямого остеокондуктивного/остеорегуляторного действия БНЦ [136, 137, 138, 139, 155].

Отдельного внимания заслуживает отсутствие достоверных различий по объёму хрящевой ткани между группами на всех сроках: преимущество БНЦ реализуется в основном не через усиление длительной хондрогенной фазы, а через более быстрый переход к формированию костного регенерата. В современной литературе по биоматериалам для регенерации кости отмечается, что благоприятные матриксы способны смещать репарацию в сторону более «прямого» остеогенеза за счёт оптимизации локального клеточного и иммунного микроокружения. Следовательно, отсутствие различий по хрящевой ткани при одновременном достоверном увеличении костной ткани в группе БНЦ можно трактовать как морфологический признак более эффективного и, вероятно, более физиологичного восстановления костного дефекта.

Интересным и методологически важным является факт, что на 14-е сутки объём фиброзной ткани в зоне костной пластинки в группе БНЦ был выше, чем в контроле, тогда как к 42-м суткам — напротив, значительно ниже, что может восприниматься как противоречивый результат, однако с позиций современной морфологии репарации он выглядит закономерным. На ранних этапах после санации дефекта временный соединительнотканный матрикс играет роль организующего каркаса, обеспечивающего заполнение полости, неоангиогенез и миграцию клеток. При благоприятном течении регенерации этот ранний фиброзный компонент впоследствии подвергается ремоделированию и замещается костной тканью. В группе БНЦ раннее увеличение фиброзной ткани сопровождалось её последующим уменьшением и нарастанием костного компонента. В контроле сохранение значительного объёма фиброзной ткани в поздние сроки указывало на замедленную репарацию с преимущественно рубцовым, а не остеогенным замещением. Подобные закономерности описаны и в экспериментальных моделях остеомиелитических дефектов при использовании клеточно-матриксных технологий, где уменьшение костномозгового и интертрабекулярного фиброза коррелировало с более зрелым формированием костных балок [143].

Особое значение имеют данные по интрамедуллярному пространству. В основной группе во все сроки определялся меньший объём фиброзной ткани и некроза, а также достоверно больший объём костного мозга. Результаты указывают на более полноценное восстановление медуллярной полости. В хроническом остеомиелите костномозговой канал часто подвергается фиброзно-склеротической перестройке, что нарушает микроциркуляцию,

клеточный обмен и снижает остеогенный потенциал. Сохранение или восстановление костного мозга, напротив, отражает сохранение функциональной архитектоники кости, адекватную васкуляризацию и более благоприятный долгосрочный прогноз. Следовательно, преимущества БНЦ выходят за рамки локального «закрытия дефекта» и затрагивают глубинную реконструкцию костной ткани [144, 145].

Современная концепция остеоиммунологии позволяет глубже интерпретировать выявленные различия. Сегодня доказано, что исход заживления костного дефекта определяется не только механическими и остеокондуктивными свойствами имплантируемого материала, но и его способностью модулировать локальный иммунный ответ. Для нормальной регенерации необходим своевременный переход от раннего провоспалительного ответа (M1-подобная активация) к противовоспалительному и репаративному профилю (M2-подобная активация). Если воспалительная фаза затягивается, это сопровождается усилением остеокластогенеза, торможением дифференцировки остеобластов, повышением продукции TNF-α, IL-1β, IL-6 и, как следствие, формированием фиброзно-деструктивного варианта заживления [142], на этом фоне результаты нашей работы — снижение нейтрофильной/лейкоцитарной инфильтрации, быстрое исчезновение некроза и более раннее увеличение объёма костной ткани (на 28-е сутки) — хорошо вписываются в модель, при которой БНЦ способствует более быстрому разрешению воспаления и формированию про-регенеративной иммунной микросреды. Эта интерпретация особенно актуальна для инфекционно-воспалительных дефектов, поскольку при остеомиелите именно персистирующее M1-доминирующее воспаление считается одним из ключевых механизмов несостоятельности регенерации. Современные обзоры по лечению инфицированных костных дефектов и остеомиелита подчёркивают, что перспективные биоматериалы должны сочетать антибактериальную активность, контроль воспаления и стимуляцию остеогенеза. Иными словами, сам по себе материал должен не только «заполнять полость», но и перестраивать патологическое микроокружение кости [140, 143]. Именно такая трёхкомпонентная модель — уменьшение воспаления, санация некроза, активация костеобразования — наблюдается в нашей работе для НЦ.

С точки зрения биоматериаловедения, целлюлозные и наноцеллюлозные системы привлекают внимание благодаря ряду преимуществ: доступность, биосовместимость, высокая удельная поверхность, возможность удержания воды, формирование пористой архитектуры, возможность функционализации и комбинирования с кальций-фосфатными и лекарственными компонентами [141]. В литературе показано, что целлюлозные матриксы могут улучшать клеточную колонизацию и минерализацию, а также использоваться как платформы для локальной доставки биоактивных молекул и антибиотиков. Это особенно важно для остеомиелита, где сочетание «мёртвого пространства», плохой васкуляризации и биоплёнок делает системную

терапию недостаточной [145]. Следовательно, полученные нами морфологические преимущества БНЦ имеют не только экспериментальное, но и высокое трансляционное значение, поскольку соответствуют современному вектору развития антиинфекционных и остеорегенераторных костных заменителей. Следует отметить, что полученные результаты соотносятся и с данными других экспериментальных работ по регенерации остеомиелитических дефектов. Так, в моделях с использованием коллагеновых матриксов и аутологичных мезенхимальных стромальных клеток было показано, что более успешная репарация сопровождается уменьшением костномозгового фиброза, меньшей выраженностью хондрогенеза и более зрелым формированием костных трабекул [43, 146]. В нашей работе аналогичный паттерн прослеживается в группе БНЦ: меньшая выраженность позднего фиброзного компонента, лучший костный компонент и более полноценная реконструкция костномозгового пространства. Это усиливает аргументацию в пользу того, что БНЦ формирует более благоприятный тип репарации, близкий к регенераторному, а не рубцово-заместительному.

Таким образом, совокупность полученных морфометрических данных и их сопоставление с литературой позволяют заключить, что применение БНЦ при остеомиелитическом дефекте оказывает комплексное патогенетически обоснованное действие: способствует более быстрому купированию воспалительно-некротической фазы в 2 раза; уменьшает выраженность остаточного тканевого повреждения; предотвращает затяжное фиброзное замещение; ускоряет формирование и созревание костного регенерата в 2 раза к 28-м суткам; обеспечивает более полноценное восстановление медуллярной архитектуры кости. Именно такое сочетание эффектов соответствует современным требованиям к перспективным остеопластическим и тканеинженерным материалам для лечения инфекционно-воспалительных костных дефектов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа посвящена эффективности применения БНЦ при хроническом остеомиелите. В рамках настоящего исследования было всесторонне изучено влияние наноцеллюлозного биокомпозита на макроорганизм. В процессе иследования проведена оценка общей токсичности: клинических признаков, поведенческих реакций, гематологических изменений и гистологических проявлений. В работе также проведено моделирование хронического остеомиелита, его лечение с применением БНЦ с изучением микробиологического спектра *in vitro* и *in vivo.* Все результаты исследования были подвергнуты статистическому анализу.

Анализ клинико-гематологических параметров продемонстрировал соответствие нормальным показателям термометрии, взвешивания и общего анализа крови. Отсутствие статистически значимых межгрупповых различий по ключевым биохимическим маркерам органной токсичности в сочетании с отсутствием согласованного патологического сдвига взаимосвязанных показателей позволяет интерпретировать полученные результаты как доказательство отсутствия общего токсического эффекта исследуемого материала при остром и хроническом воздействии.

Оценка поведенческих реакций в тесте «открытое поле» является одним из ключевых этапов изучения общей токсичности и нейробиологической безопасности имплантируемых материалов. Тест является валидированным методом оценки функционального состояния центральной нервной системы, уровня тревожности, стресс-реактивности и ориентировочно-исследовательского поведения лабораторных животных. В условиях исследования острой и хронической токсичности анализ полученных данных не выявил статистически значимых межгрупповых различий ($p > 0,05$), что имеет принципиальное значение при оценке нейротоксического потенциала исследуемого материала. Тест отражал функциональное состояние двигательной системы: горизонтальная активность показывает общий уровень спонтанной моторики и интегративную активность корково-подкорковых структур. Отсутствие снижения количества пересечённых квадратов в основной группе свидетельствует о сохранности моторной координации, энергетического обмена, нейромедиаторной регуляции (дофаминергической и холинергической систем). Вертикальная активность (стойки) является показателем исследовательского поведения и функционирования лимбико-стриарных структур. Сохранность данного показателя указывает на отсутствие угнетающего воздействия на подкорковые центры и ретикулярную формацию. Суммарный показатель активности в основной группе демонстрировал тенденцию к увеличению, что может свидетельствовать об отсутствии седативного или депрессивного эффекта исследуемого материала. Количество обследованных отверстий (норковый рефлекс) отражает когнитивную составляющую поведения и уровень исследовательской мотивации. Отсутствие достоверных различий подтверждает сохранность

познавательной активности. Показатели груминга и его длительности не демонстрировали статистически значимых изменений. Учитывая, что чрезмерный или резко сниженный груминг может быть индикатором стрессовой реакции или дисфункции ЦНС, стабильность данного параметра указывает на отсутствие выраженного стресс-индуцированного ответа. Количество актов дефекации и параметры пребывания в центральной зоне традиционно рассматриваются как индикаторы тревожности. Отсутствие увеличения дефекации и существенного сокращения времени нахождения в центре свидетельствует о неизменённом уровне тревожности у животных основной группы. Нейротоксикологическая интерпретация. Острое токсическое воздействие часто сопровождается угнетением моторики, снижением исследовательской активности, повышением тревожности, вегетативными проявлениями стресса. В представленном исследовании подобные изменения отсутствовали. Это позволяет сделать вывод о том, что исследуемый материал не оказывает острого и хронического нейротоксического действия, не нарушает нейромедиаторные механизмы регуляции поведения и не вызывает функциональных расстройств центральной нервной системы.

При анализе хронической токсичности по системам органов установлено, что в головном мозге гистопатологические признаки по всем критериям соответствовали минимальным изменениям: некроз/дегенерация нейронов, аксонопатия, васкулит, геморрагии не выявлены; перинейрональные/периваскулярные «ореолы» единичны, гистоархитектоника не нарушена. Патологические изменения интерпретируются как спектр неспецифических/артефактных изменений (фиксация, постмортальные сдвиги) либо транзиторные гемодинамические колебания без признаков хронической нейротоксичности.

В сердце гистоархитектоника миокарда сохранена, фиброз и клеточные инфильтраты отсутствуют. Единичные кардиомиоциты с набуханием/вакуолизацией и редкая очаговая гиперэозинофилия соответствуют обратимому стресс-паттерну без цитолиза. Венозное полнокровие встречается спорадически и трактуется как микрогемодинамическая реактивность, а не прямая кардиотоксичность. В лёгких гистоархитектоника респираторного отдела сохранена: отсутствуют некроз, диффузный отёк, гиалиновые мембраны и тромбозы. При интрамедуллярном введении БНЦ у части животных наблюдается умеренное полнокровие, очаговая лимфомакрофагальная инфильтрация и лёгкий интерстициальный отёк без эпителиальной деструкции. В печени при интрамедуллярном пути введения наблюдается стеатоз. Паттерн соответствует обратимой гидропической дистрофии/умеренному энергетическому напряжению, а не истинной гепатотоксичности. В почках клубочки интактны, в канальцевом эпителии отмечается редкая лёгкая вакуолизация, очаговый интерстициальный отёк и венозное полнокровие. В поджелудочной железе экзокринный отдел и островки сохранны, некроз,

дистрофия и воспаление не выявлены, сосудистые изменения минимальны. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии острых панкреатотоксических эффектов. В ткани селезёнки гистоархитектоника сохранена. При интрамедуллярной экспозиции БНЦ чаще фиксируются умеренная гиперплазия белой пульпы и активация макрофагов/умеренный сидероз без деструкции стромы и некроза. В кишечнике эпителий и крипто-ворсинчатая архитектура сохранены. В интрамедуллярной группе БНЦ фокально отмечается лёгкая гидропическая/зернистая дистрофия, ограниченный отёк и умеренная лимфоидная гиперплазия; некроз, диффузное воспаление и кровоизлияния отсутствуют. В ткани семенников и придатков сперматогенез сохранён, герминативный эпителий стратифицирован; изменения ограничиваются единичной вакуолизацией и лёгкими сосудистыми сдвигами. Поражения клеток Сертоли/Лейдига, атрофия канальцев и выраженное воспаление отсутствуют. При гистологическом и морфометрическом анализе во всех органах доминировали минимальные, потенциально обратимые сдвиги без достижения порогов острого и хронического токсического поражения. Более заметные, но всё ещё лёгкие дистрофические и сосудистые изменения при интрамедуллярном введении согласуются с активным фагоцитарным клиренсом и умеренным иммунно-метаболическим напряжением высоко васкуляризированного костномозгового компартмента.

Подводя итог проведенных исследований, интрамедуллярная имплантация БНЦ в бедренную кость не оказывает пирогенного воздействия, также биокомпозит является метаболомно-инертным веществом, не оказывает статистически значимого влияния на локомоторную активность, исследовательское поведение, показатели тревожности. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии общего токсического значимого эффекта в исследуемых условиях эксперимента.

Особое значение имеет выявленный потенциал биокомпозита в отношении остеомиелита. Благодаря своей структуре и свойствам, материал может служить эффективной платформой для локальной доставки лекарственных средств, включая антибиотики, что позволяет воздействовать непосредственно на очаг инфекции и повышать эффективность терапии. Проведённые гистологические исследования показали, что БНЦ имеет оптимальные функциональные характеристики, способствующие его применению в качестве матрикса для регенерации костной ткани. Материал демонстрирует способность поддерживать клеточную адгезию и пролиферацию, что является ключевым фактором в процессах восстановления повреждённых тканей.

Оценка гистологического исследования заживления остеомиелитического дефекта показала, что применение БНЦ в сравнении с традиционной методикой: способствует более быстрому купированию воспалительно-некротической фазы (отмечено на 14-е сутки уменьшение остеонекроза, некроза мягких тканей и воспалительной инфильтрации в 2 раза,

чем в группе контроля); уменьшает выраженность остаточного тканевого повреждения; предотвращает затяжное фиброзное замещение: на 14-е сутки объём фиброзной ткани в зоне костной пластинки в группе БНЦ был выше (57,5 [51;71]), чем в контроле (27 [23,8;27,5]), тогда как к 42-м суткам — напротив, значительно ниже (12,8 [9,3;16] против 34 [28;39,8]). На ранних этапах после санации дефекта временный соединительнотканный матрикс играет роль организующего каркаса, обеспечивающего заполнение полости, неоангиогенез и миграцию клеток. При благоприятном течении регенерации этот ранний фиброзный компонент впоследствии подвергается ремоделированию и замещается костной тканью. Полученные морфометрические данные указывают на направленное восстановление костной ткани в группе БНЦ: по мере эксперимента фиброзный компонент уменьшался, тогда как доля вновь образованной костной ткани возрастала. Напротив, сохранение значительного объёма фиброзной ткани в контроле на поздних сроках можно рассматривать как признак неполноценной репарации с тенденцией к рубцовому замещению, а не к истинному остеогенезу; ускоряет формирование и созревание костного регенерата (достоверно больший объём новообразованной костной ткани в зоне восстановления костной пластинки в группе БНЦ на всех сроках наблюдения, особенно на 28-е в 2 раза (56 [49; 63] против 28,5 [20,5; 36,7]) и 42-е сутки (80,8 [78; 87] против 50 [42,5; 60,5]), что свидетельствует о том, что применение БНЦ не ограничивается только противовоспалительным эффектом, а в том числе и связано с активацией репаративного остеогенеза); обеспечивает более полноценное восстановление медуллярной архитектуры кости: в основной группе во все сроки определялся меньший объём фиброзной ткани и некроза, а также достоверно больший объём костного мозга, результаты указывают на более полноценное восстановление медуллярной полости. В хроническом остеомиелите костномозговой канал часто подвергается фиброзно-склеротической перестройке, что нарушает микроциркуляцию, клеточный обмен и снижает остеогенный потенциал. Сохранение или восстановление костного мозга, напротив, отражает сохранение функциональной архитектоники кости, адекватную васкуляризацию и более благоприятный долгосрочный прогноз. Следовательно, преимущества БНЦ выходят за рамки локального «закрытия дефекта» и затрагивают глубинную реконструкцию костной ткани. По данным сравнительного морфометрического анализа заживления остеомиелитического дефекта установлено, что в основной группе (БНЦ) по сравнению с АСК наблюдается более благоприятная динамика репаративного остеогенеза, характеризующаяся значительно меньшей выраженностью воспалительно-деструктивных изменений, более ранним и более полным восстановлением костной пластинки, активным формированием зрелой костной ткани, снижением объёма фиброзной ткани и некротических масс, лучшей организацией интрамедуллярного пространства. Применение БНЦ ассоциировано с ускорением репаративной регенерации кости и более

эффективным купированием хронического воспалительно-некротического процесса.

Таким образом, проведенное нами экспериментальное исследование эффективности применения БНЦ при хроническом остеомиелите показало, что исследуемое вещество является перспективным и безопасным материалом в лечении хронического остеомиелита. Полученные результаты открывают возможности для дальнейших исследований, направленных на клиническую оценку и дальнейшее внедрение данного материала в медицинскую практику.

Выводы:

1. По результатам клинических, гематологических и гистологических исследований БНЦ не оказывает общего острого и хронического токсического воздействия в условиях *in vivo*: статистически значимых различий по исследуемым показателям между экспериментальной и контрольной группами не выявлено ($p>0,05$).

2. Гистологическая картина регенерации в модели хронического остеомиелита показала, что применение БНЦ снижает лейкоцитарную инфильтрацию в 2,0 раза ($p = 0,0008288$), также отмечается активное восстановление костной пластинки в 2,0 раза в сравнении с контрольной группой ($p = 0,002271$).

3. БНЦ с антибиотиком проявил антибактериальную активность *in vitro*, превышая стандарт на 5 мм, и обеспечил высвобождение гентамицина *in vivo*; его концентрация в плазме на 14-е сутки была на 7,8% ниже, чем в контрольной группе без статистически значимых различий ($p>0,05$), что говорит о преимущественно локальном характере его высвобождения в зоне костного дефекта.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ:

1 Bezstarosti H., van Lieshout E. M. M., Voskamp L. W., Kortram K., Obremskey W., McNally M. A., Metsemakers W. J. Insights into treatment and outcome of fracture-related infection: a systematic literature review // Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery. — 2019. — Vol. 139. — P. 61–72. — DOI: 10.1007/s00402-018-3048-0.

2 Миронов С. П., Цискарашвили А. В., Горбатюк Д. С. Хронический посттравматический остеомиелит как проблема современной травматологии и ортопедии: обзор литературы // Гений ортопедии. — 2019. — Т. 25, № 4. — С. 610–621. — DOI: 10.18019/1028-4427-2019-25-4-610-621.

3 Сагинова Д. А. Хирургическое лечение хронического посттравматического остеомиелита с использованием антибиотик-импрегнированного биоразлагаемого материала: дис. … PhD. – Караганда, 2018. – 108 с.

4 Haidari S. et al. Costs of fracture-related infection: the impact on direct hospital costs and healthcare utilisation // European Journal of Trauma and Emergency Surgery. — 2024. — Vol. 50, № 4. — P. 1701–1707.

5 Кошанова А. А. Разработка и экспериментально-морфологическое обоснование антибиотик-импрегнации костного аллотрансплантата по системе Марбурга на модели остеомиелита: дис. … PhD. – Караганда, 2022. – 85 с.

6 Su Y. et al. Analysis of risk factors for the recurrence of osteomyelitis of the limb after treatment with antibiotic-loaded calcium sulfate and autologous bone graft // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2024. – Т. 12. – С. 1368818.

7 Winkler E. et al. Foot osteomyelitis location and rates of primary or secondary major amputations in patients with diabetes // Foot & Ankle International. – 2022. – Т. 43. – №. 7. – С. 957-967.

8 Wickramasinghe M.L., Dias G.J., Premadasa K.M.G.P. A novel classification of bone graft materials // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2022. – Vol. 110, No. 7. – P. 1724–1749. – DOI: 10.1002/jbm.b.35029.

9 Wassif R. K. et al. et al. Recent advances in the local antibiotics delivery systems for management of osteomyelitis // Drug delivery. – 2021. – Т. 28. – №. 1. – С. 2392-2414.

10 Liu X. et al. Resistance mechanisms of bacterial biofilms on orthopedic implants and research progress on novel anti-biofilm coatings // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2026. – Т. 14. – С. 1707232

11 Abitbol T., Rivkin A., Cao Y., Nevo Y., Abraham E., Ben-Shalom T., Lapidot S., Shoseyov O. Nanocellulose, a tiny fiber with huge applications // Current Opinion in Biotechnology. – 2016. – Vol. 39. – P. 76–88. – DOI: 10.1016/j.copbio.2016.01.002.

12 Huo Y. et al. Nanocellulose-based composite materials used in drug delivery systems // Polymers. – 2022. – Т. 14. – №. 13. – С. 2648.

13 Park E. J. et al. Fibrous nanocellulose, crystalline nanocellulose, carbon nanotubes, and crocidolite asbestos elicit disparate immune responses upon pharyngeal aspiration in mice // Journal of immunotoxicology. – 2018. – Т. 15. – №. 1. – С. 12-23.

14 Panteli M., Giannoudis P. V. Chronic osteomyelitis: what the surgeon needs to know // EFORT open Reviews. – 2016. – Т. 1. – №. 5. – С. 128.

15 Zelmer A. R. et al. Can intracellular Staphylococcus aureus in osteomyelitis be treated using current antibiotics? A systematic review and narrative synthesis // Bone research. – 2022. – Т. 10. – №. 1. – С. 53.

16 Moriarty T. F., Schwarz E. M., Muthukrishnan G. Skeletal infections: microbial pathogenesis, immunity and clinical management // *Nature Reviews Microbiology*. – 2022. – Vol. 20, № 7. – P. 385–400. – DOI: 10.1038/s41579-022-00686-0.

17 Zhang K., Bai Y. Z., Liu C., Liu S. S., Lu X. X., Yang R. G. и др. Composition of pathogenic microorganism in chronic osteomyelitis based on metagenomic sequencing and its application value in etiological diagnosis // *BMC Microbiology*. – 2023. – Vol. 23. – Art. 313. – DOI: 10.1186/s12866-023-03046-x.

18 Kavanagh N., Ryan E. J., Widaa A., Sexton G., Fennell J., O'Rourke S. и др. Staphylococcal osteomyelitis: disease progression, treatment challenges, and future directions // *Clinical Microbiology Reviews*. – 2018. – Vol. 31, № 2. – e00084-17. – DOI: 10.1128/CMR.00084-17.

19 Solano C., Echeverz M., Lasa I. Biofilm dispersion and quorum sensing // Current Opinion in Microbiology. – 2014. – Vol. 18. – P. 96–104. – DOI: 10.1016/j.mib.2014.02.008.

20 Paharik A.E., Horswill A.R. The staphylococcal biofilm: adhesins, regulation, and host response // Microbiology Spectrum. – 2016. – Vol. 4, No. 2. – P. 529–566. – DOI: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0022-2015.

21 Costerton J.W., Cheng K.J., Geesey G.G. et al. Bacterial biofilms in nature and disease // Annual Review of Microbiology. – 1987. – Vol. 41. – P. 435–464.

22 Gristina A.G., Naylor P., Myrvik Q. Infections from biomaterials and implants: a race for the surface // Medical Progress Through Technology. – 1988. – Vol. 14, No. 3–4. – P. 205–224.

23 Rozis M., et al. Orthopedic implant-related biofilm pathophysiology: a review of the literature // Cureus. – 2021. – Vol. 13, No. 6. – e15634. – DOI: 10.7759/cureus.15634.

24 Schilcher K., Horswill A.R. Staphylococcal biofilm development: structure, regulation, and treatment strategies // Microbiology and Molecular Biology Reviews. – 2020. – Vol. 84, No. 3. – e00026-19. – DOI: 10.1128/MMBR.00026-19.

25 Bilgin M., Dosler S., Otuk G. Antibiotic adjuvant activities of quorum sensing signal molecules DSF and BDSF against mature biofilms of

Staphylococci // Journal of Chemotherapy. – 2024. – Vol. 36, No. 1. – P. 11–23. – DOI: 10.1080/1120009X.2023.2270743.

26 Yu S., Jiang B., Jia C. et al. Investigation of biofilm production and its association with genetic and phenotypic characteristics of OM (osteomyelitis) and non-OM orthopedic Staphylococcus aureus // Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. – 2020. – Vol. 19. – № 10.

27 Wu S., Huang F., Zhang H., Lei L. Staphylococcus aureus biofilm organization modulated by YycFG two-component regulatory pathway // Journal of Orthopaedic Surgery and Research. – 2019. – Vol. 14, No. 1. – P. 10. – DOI: 10.1186/s13018-018-1055-z.

28 Ronin D., et al. Current and novel diagnostics for orthopedic implant biofilm infections: a review // APMIS. – 2022. – Vol. 130, No. 2. – P. 59–81. – DOI: 10.1111/apm.13197.

29 Khan F., et al. Antibiotics application strategies to control biofilm formation in pathogenic bacteria // Current Pharmaceutical Biotechnology. – 2020. – Vol. 21, No. 4. – P. 270–286. – DOI: 10.2174/1389201020666191112155905.

30 Vollaro A., et al. PYED-1 inhibits biofilm formation and disrupts the preformed biofilm of Staphylococcus aureus // Antibiotics. – 2020. – Vol. 9, No. 5. – P. 240. – DOI: 10.3390/antibiotics9050240.

31 Ahn K.B., et al. Lipoteichoic acid inhibits Staphylococcus aureus biofilm formation // Frontiers in Microbiology. – 2018. – Vol. 9. – P. 327. – DOI: 10.3389/fmicb.2018.00327.

32 Ausbacher D., et al. α,α-disubstituted β-amino amides eliminate Staphylococcus aureus biofilms by membrane disruption and biomass removal // Biofilm. – 2023. – Vol. 6. – Art. 100151. – DOI: 10.1016/j.bioflm.2023.100151.

33 Paul P., et al. 1,4-Naphthoquinone accumulates reactive oxygen species in Staphylococcus aureus: a promising approach towards effective management of biofilm threat // Archives of Microbiology. – 2021. – Vol. 203, No. 3. – P. 1183–1193. – DOI: 10.1007/s00203-020-02117-1.

34 Frapwell C.J., et al. Antimicrobial activity of the quinoline derivative HT61 against Staphylococcus aureus biofilms // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2020. – Vol. 64, No. 5. – e02073-19. – DOI: 10.1128/AAC.02073-19.

35 Jordana F., Le Visage C., Weiss P. Substituts osseux // Médecine/Sciences. – 2017. – Vol. 33, No. 1. – P. 60–65. – DOI: 10.1051/medsci/20173301010.

36 Humm G., et al. Adjuvant treatment of chronic osteomyelitis of the tibia following exogenous trauma using OSTEOSET®-T: a review of 21 patients in a regional trauma centre // Strategies in Trauma and Limb Reconstruction. – 2014. – Vol. 9. – P. 157–161. – DOI: 10.1007/s11751-014-0206-y.

37 Mereddy P., Nallamilli S.R., Gowda V.P., et al. The use of Stimulan in bone and joint infections // Bone & Joint Open. – 2023. – Vol. 4, No. 7. – P. 516–522. – DOI: 10.1302/2633-1462.47.BJO-2023-0036.R1.

38 Niemann M., et al. Outcome analysis of the use of Cerament® in patients with chronic osteomyelitis and corticomedullary defects // Diagnostics. – 2022. – Vol. 12, No. 5. – P. 1207. – DOI: 10.3390/diagnostics12051207.

39 Sambri A., et al. Mid-term results of single-stage surgery for patients with chronic osteomyelitis using antibiotic-loaded resorbable PerOssal® beads // Microorganisms. – 2023. – Vol. 11, No. 7. – P. 1623. – DOI: 10.3390/microorganisms11071623.

40 Ene R., et al. Review of calcium-sulphate-based ceramics and synthetic bone substitutes used for antibiotic delivery in PJI and osteomyelitis treatment // EFORT Open Reviews. – 2021. – Vol. 6, No. 5. – P. 297–304. – DOI: 10.1302/2058-5241.6.200083.

41 Padrão T., et al. Combining local antibiotic delivery with heparinized nanohydroxyapatite/collagen bone substitute: a novel strategy for osteomyelitis treatment // Materials Science and Engineering: C. – 2021. – Vol. 119. – Art. 111329. – DOI: 10.1016/j.msec.2020.111329.

42 Alegrete N., et al. Vancomycin-loaded nanohydroxyapatite-based scaffold for osteomyelitis treatment: in vivo rabbit toxicological tests and in vivo efficacy tests in a sheep model // Bioengineering. – 2023. – Vol. 10, No. 2. – P. 206. – DOI: 10.3390/bioengineering10020206.

43 Mitrofanov V.N., et al. Technology for repairing osteomyelitic bone defects using autologous mesenchymal stromal cells on a collagen matrix in experiment // Modern Technologies in Medicine. – 2021. – Vol. 13, No. 1. – P. 42–49. – DOI: 10.17691/stm2021.13.1.05.

44 Wagner J.M., et al. Adipose-derived stromal cells are capable of restoring bone regeneration after post-traumatic osteomyelitis and modulate B-cell response // Stem Cells Translational Medicine. – 2019. – Vol. 8, No. 10. – P. 1084–1091. – DOI: 10.1002/sctm.18-0266.

45 Radwan N.H., et al. Chitosan-calcium phosphate composite scaffolds for control of post-operative osteomyelitis: fabrication, characterization, and in vitro–in vivo evaluation // Carbohydrate Polymers. – 2020. – Vol. 244. – Art. 116482. – DOI: 10.1016/j.carbpol.2020.116482.

46 Tao J., et al. Injectable chitosan-based thermosensitive hydrogel/nanoparticle-loaded system for local delivery of vancomycin in the treatment of osteomyelitis // International Journal of Nanomedicine. – 2020. – Vol. 15. – P. 5855–5871. – DOI: 10.2147/IJN.S247088.

47 McLemore R. CORR Insights®: Blended chitosan paste for infection prevention: preliminary and preclinical evaluations // Clinical Orthopaedics and Related Research. – 2017. – Vol. 475. – P. 1871–1873. – DOI: 10.1007/s11999-017-5231-y.

48 Pawar A.Y., Jadhav S.R., Derle D.V. Fabrication of chitosan-based antibacterial implant for multibacterial bone infection // Journal of Pharmaceutical Research International. – 2021. – Vol. 33, No. 46A. – P. 224–241. – DOI: 10.9734/jpri/2021/v33i46A32861.

49 Zhao X., Shen Y. Island perforator muscle flaps for chronic osteomyelitis of the lower extremities: a retrospective analysis of 21 consecutive cases // Plastic and Reconstructive Surgery. – 2023. – Vol. 152, No. 2. – P. 371e–372e. – DOI: 10.1097/PRS.0000000000010425.

50 Ruan W., et al. Gastrocnemius muscle flap with vancomycin/gentamicin-calcium sulfate and autogenous iliac bone graft for phase I treatment of localized osteomyelitis after tibial plateau fracture surgery // Journal of Orthopaedic Surgery and Research. – 2021. – Vol. 16, No. 1. – P. 341. – DOI: 10.1186/s13018-021-02496-1.

51 Hong J.P.J., et al. The efficacy of perforator flaps in the treatment of chronic osteomyelitis // Plastic and Reconstructive Surgery. – 2017. – Vol. 140, No. 1. – P. 179–188. – DOI: 10.1097/PRS.0000000000003460.

52 Thai D.Q., et al. Factors affecting the outcome of lower extremity osteomyelitis treated with microvascular free flaps: an analysis of 65 patients // Journal of Orthopaedic Surgery and Research. – 2021. – Vol. 16, No. 1. – P. 535. – DOI: 10.1186/s13018-021-02686-x.

53 DeLoid G.M., et al. Toxicological effects of ingested nanocellulose in in vitro intestinal epithelium and in vivo rat models // Environmental Science: Nano. – 2019. – Vol. 6, No. 7. – P. 2105–2115.

54 Paukkonen H., et al. Nanofibrillar cellulose hydrogels as matrices for controlled drug release // International Journal of Pharmaceutics. – 2017. – Vol. 532, No. 1. – P. 269–280.

55 Bundjaja V., et al. Aqueous sorption of tetracycline using rarasaponin-modified nanocrystalline cellulose // Journal of Molecular Liquids. – 2020. – Vol. 301. – Art. 112433.

56 Van Vugt T.A.G., Arts J.J., Geurts J.A.P. Antibiotic-loaded polymethylmethacrylate beads and spacers in treatment of orthopedic infections and the role of biofilm formation // Frontiers in Microbiology. – 2019. – Vol. 10. – P. 1626. – DOI: 10.3389/fmicb.2019.01626.

57 Patil T. V. et al. Nanocellulose, a versatile platform: From the delivery of active molecules to tissue engineering applications // Bioactive materials. – 2022. – Т. 9. – С. 566-589.

58 Pruß A. Wissenschaftliche Stellungnahme zu den Anforderungen im Rahmen der Herstellung des Arzneimittels «Human-Femurkopf, thermodesinfiziert, gefrierkonserviert» [Электронный ресурс]. – Режим доступа: URL.

59 Sirvio J. A. et al. Strong, self-standing oxygen barrier films from nanocelluloses modified with regioselective oxidative treatments // ACS applied materials & interfaces. – 2014. – Т. 6. – №. 16. – С. 14384-14390

60 Yang X. et al. Surface and interface engineering for nanocellulosic advanced materials // Advanced Materials. – 2021. – Т. 33. – №. 28. – С. 2002264

61 Halib N., Ahmad I. Nanocellulose: insight into health and medical applications // *Handbook of Ecomaterials*. Cham: Springer International Publishing, 2018. P. 1–19.

62 Hossain A. B. M. S. et al. Nano-cellulose based nano-coating biomaterial dataset using corn leaf biomass: An innovative biodegradable plant biomaterial // Data in Brief. – 2018. – Т. 17. – С. 162-168.

63 Rashad A. et al. Coating 3D printed polycaprolactone scaffolds with nanocellulose promotes growth and differentiation of mesenchymal stem cells // Biomacromolecules. – 2018. – Т. 19. – №. 11. – С. 4307-4319.

64 Medhi P. et al. Lidocaine-loaded fish scale-nanocellulose biopolymer composite microneedles // Aaps Pharmscitech. – 2017. – Т. 18. – №. 5. – С. 1488-1494.

65 Rocha I. et al. Blood compatibility of sulfonated cladophora nanocellulose beads // Molecules. – 2018. – Т. 23. – №. 3. – С. 601.

66 Ruan C. Q., Strømme M., Lindh J. Preparation of porous 2, 3-dialdehyde cellulose beads crosslinked with chitosan and their application in adsorption of Congo red dye // Carbohydrate polymers. – 2018. – Т. 181. – С. 200-207.

67 HPS A. K. et al. A review on chitosan-cellulose blends and nanocellulose reinforced chitosan biocomposites: Properties and their applications // Carbohydrate polymers. – 2016. – Т. 150. – С. 216-226.

68 Korhonen J. T. et al. Hydrophobic nanocellulose aerogels as floating, sustainable, reusable, and recyclable oil absorbents // ACS applied materials & interfaces. – 2011. – Т. 3. – №. 6. – С. 1813-1816.

69 Nguyen D. et al. Cartilage tissue engineering by the 3D bioprinting of iPS cells in a nanocellulose/alginate bioink // Scientific reports. – 2017. – Т. 7. – №. 1. – С. 658.

70 Рашова М. Г., Тулеубаев Б. Е., Кошанова А. А. и др. Иллюстрированные инфограммы источников происхождения, синтеза, свойств и областей применения наноцеллюлозы. Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом № 62619 от 02.10.25 МЮ РК.

71 Chanthathamrongsiri N. et al. The comparison of the properties of nanocellulose isolated from colonial and solitary marine tunicates // Heliyon. – 2021. – Т. 7. – №. 8.

72 Ghamari M. et al. Nanocellulose extraction from biomass waste: unlocking sustainable pathways for biomedical applications // The Chemical Record. – 2025. – Т. 25. – №. 5. – С. e202400249

73 Dutta S. D. et al. Isolation and characterization of cellulose nanocrystals from coffee grounds for tissue engineering // Materials Letters. – 2021. – Т. 287. – С. 129311

74 Zhang H. et al. Ginger residue-derived nanocellulose as a sustainable reinforcing agent for composite films // International Journal of Biological Macromolecules. – 2025. – Т. 308. – С. 142754

75 Pratiwi H. et al. Development and characterization of polyester/ramie fiber hybrid composites reinforced with crystalline nanocellulose extracted from durian peel waste // Journal of Materials Research and Technology. – 2025. – Т. 34. – С. 1201-1212.

76 Viet Phuong H., Thi Huong T. Development of antibacterial biodegradable materials based on starch–nanocellulose–lemongrass essential oil // EPJ Web of Conferences. – EDP Sciences, 2026. – Т. 345. – С. 01003.

77 Nagano T. et al. Improved physicochemical and functional properties of okara, a soybean residue, by nanocellulose technologies for food development–A review // Food Hydrocolloids. – 2020. – Т. 109. – С. 105964.

78 Terea H. et al. Characterization, biological, and antimicrobial properties of nanocellulose isolated from peanut shells (Arachis hypogaea L.) // Biomass Conversion and Biorefinery. – 2024. – Т. 14. – №. 23. – С. 30435-30445.

79 Almani F. S., Othman F. M., Abdul-Hameed A. A. Green syntheses and characterization of Phragmites australis nanofibers on sustainable concrete // Research on Engineering Structures and Materials. — 2026. — Т. 12. – №. 2. — P. 1039–1053.

80 Onkarappa H. S. et al. Hevea brasiliensis mediated synthesis of nanocellulose: effect of preparation methods on morphology and properties // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Т. 160. – С. 1021-1028.

81 Guo Y. et al. Isolation and characterization of nanocellulose crystals via acid hydrolysis from agricultural waste-tea stalk // International Journal of Biological Macromolecules. – 2020. – Т. 163. – С. 927-933.

82 Abba M. et al. Isolation and characterisation of locally isolated Gluconacetobacter xylinus BCZM sp. with nanocellulose producing potentials // Iet Nanobiotechnology. – 2018. – Т. 12. – №. 1. – С. 52-56.

83 Sandhya P. V., Naseeha Farsana M. N., Femina K. S. Nanocellulose from Cladophora: Applications // Handbook of Biopolymers. – Singapore: Springer Nature Singapore, 2023. – С. 877-90.

84 Valcarcel J. et al. Isolation and Characterization of Polysaccharides from the Ascidian Styela clava //Polymers. – 2021. – Т. 14. – №. 1. – С. 16

85 Panaitescu D. M. et al. Poly (3-hydroxybutyrate) modified by nanocellulose and plasma treatment for packaging applications // Polymers. – 2018. – Т. 10. – №. 11. – С. 1249.

86 Li J. et al. Nanocellulose-based antibacterial materials // Advanced healthcare materials. – 2018. – Т. 7. – №. 20. – С. 1800334.

87 Amini E. et al. Silver-nanoparticle-impregnated cellulose nanofiber coating for packaging paper // Cellulose. – 2016. – Т. 23. – №. 1. – С. 557-570.

88 Mohite B. V., Patil S. V. In situ development of nanosilver-impregnated bacterial cellulose for sustainable released antimicrobial wound dressing // Journal of applied biomaterials & functional materials. – 2016. – Т. 14. – №. 1. – С. 53-58.

89 Tyagi P. et al. High-strength antibacterial chitosan–cellulose nanocrystal composite tissue paper // Langmuir. – 2018. – Т. 35. – №. 1. – С. 104-112.

90 Patel M. Antimicrobial paper embedded with nanoparticles as spread-breaker for corona virus // J. Environ. Life Sci. – 2020. – Т. 6. – С. 001-012.

91 Jebali A. et al. Antimicrobial activity of nanocellulose conjugated with allicin and lysozyme // Cellulose. – 2013. – Т. 20. – №. 6. – С. 2897-2907.

92 Krishani M. et al. Development of scaffolds from bio-based natural materials for tissue regeneration applications: a review // Gels. – 2023. – Т. 9. – №. 2. – С. 100.

93 Thomas B. et al. Nanocellulose, a versatile green platform: from biosources to materials and their applications // Chemical reviews. – 2018. – Т. 118. – №. 24. – С. 11575-11625

94 Wang X., Wang Q., Xu C. Nanocellulose-based inks for 3d bioprinting: Key aspects in research development and challenging perspectives in applications—A mini review // Bioengineering. – 2020. – Т. 7. – №. 2. – С. 40.

95 Luo W. et al. Preparation, characterization and evaluation of cellulose nanocrystal/poly (lactic acid) in situ nanocomposite scaffolds for tissue engineering // International journal of biological macromolecules. – 2019. – Т. 134. – С. 469-479.

96 Lafuente-Merchan M. et al. 3D bioprinted hydroxyapatite or graphene oxide containing nanocellulose-based scaffolds for bone regeneration // Macromolecular Bioscience. – 2022. – Т. 22. – №. 11. – С. 2200236.

97 European Parliament, Council of the European Union. Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes // Official Journal of the European Union. — 2010. — Vol. 53. — L 276. — P. 33–79.

98 National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. — 8th ed. — Washington, DC: The National Academies Press, 2011. — 246 p. — DOI: 10.17226/12910.

99 Рашова М. Г., Тулеубаев Б. Е., Туребекова Д. М., Кошанова А. А. и др. Этограммы для оценки поведенческих реакций животных. Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом № 62565 от 30.09.25 МЮ РК.

100 Snyder J. M., Ward J. M., Treuting P. M. Cause-of-death analysis in rodent aging studies // Veterinary pathology. – 2016. – Т. 53. – №. 2. – С. 233-243.

101 Rao D. B., Little P. B., Sills R. C. Subsite awareness in neuropathology evaluation of National Toxicology Program (NTP) studies: a review of select neuroanatomical structures with their functional significance in rodents // Toxicologic pathology. – 2014. – Т. 42. – №. 3. – С. 487-509.

102 OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 4. Test No. 407: Repeated Dose 28-Day Oral Toxicity Study in Rodents. – Paris: OECD Publishing, 2008. – 13 p.

103 OECD. Guidance Document 116 on the Conduct and Design of Chronic Toxicity and Carcinogenicity Studies, Supporting Test Guidelines 451, 452 and 453. 2nd ed. // OECD Series on Testing and Assessment. No. 116. – Paris: OECD Publishing, 2014. – 156 p.

104 Kittel B. et al. Revised guides for organ sampling and trimming in rats and mice–Part 2: a joint publication of the RITA) and NACAD) groups // Experimental and Toxicologic Pathology. – 2004. – Т. 55. – №. 6. – С. 413-431

105 Keenan C. M. et al. International Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND) progress to date and future plans // Toxicologic pathology. – 2015. – Т. 43. – №. 5. – С. 730-732

106 OECD (1997), Test No. 424: Neurotoxicity Study in Rodents, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris, https://doi.org/10.1787/9789264071025-en.

107 Veteläinen RL, Bennink RJ, de Bruin K, van Vliet A, van Gulik TM. Hepatobiliary function assessed by 99mTc-mebrofenin cholescintigraphy in the evaluation of severity of steatosis in a rat model // European journal of nuclear medicine and molecular imaging. – 2006. – Т. 33. – №. 10. – С. 1107-1114.

108 Vidal J. D., Whitney K. M. Morphologic manifestations of testicular and epididymal toxicity // Spermatogenesis. – 2014. – Т. 4. – №. 2. – С. e979099.

109 Creasy D. et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse male reproductive system // Toxicologic pathology. – 2012. – Т. 40. – №. 6_suppl. – С. 40S-121S.

110 Тулеубаев Б. Е. с соавт. Способ моделирования хронического локализованного остеомиелита в диафизарной зоне с наличием секвестра // Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом № 13857 от 11.12.2020 г.

111 Тулеубаев Б. Е. с соавт. Алгоритм морфологической оценки остеомиелита в модели на животных // Свидетельство о внесении сведений в государственный реестр прав на объекты, охраняемые авторским правом № 9335 от 20.04.2020.

112 Государственная фармакопея Республики Казахстан. – 2-е изд. – Алматы: Жибек жолы, 2015. – Т. 1. – 720 с.

113 Chouchani E. T., Kazak L., Spiegelman B. M. New advances in adaptive thermogenesis: UCP1 and beyond // Cell metabolism. – 2019. – Т. 29. – №. 1. – С. 27-37

114 Butkeraitis C. B., Falla M. V. A., Lebrun I. Thermoregulation effects of Phoneutria nigriventer isolated toxins in rats // Toxins. – 2024. – Т. 16. – №. 9. – С. 398

115 Kaur S. et al. In Vivo Telemetry to Record Long-Term Cardiovascular Parameters, Temperature, and Activity in Spinal Cord Injury Rat Models // JoVE (Journal of Visualized Experiments). – 2026. – №. 227. – С. e69714

116 Chen Y. et al. A simple telemetry sensor system for monitoring body temperature in rabbits—A Brief Report // Animals. – 2023. – Т. 13. – №. 10. – С. 1677

117 Pato A. M. et al. Use of subcutaneous transponders to monitor body temperature in laboratory rats // Journal of pharmacological and toxicological methods. – 2022. – Т. 114. – С. 107145.

118 Shen T., Dong H., Wang P. Research progress on nanocellulose and its composite materials as orthopedic implant biomaterials // Alexandria Engineering Journal. – 2024. – Т. 87. – С. 575-590.

119 Koshy J. T. et al. Tissue engineered implants derived from sustainable nanocellulose and polyethylene glycol (PEG) loaded with polyphenols: An in vivo study on albino rats for wound dressing // International Journal of Biological Macromolecules. – 2025. – Т. 315. – С. 144415.

120 Kraeuter A. K., Guest P. C., Sarnyai Z. The open field test for measuring locomotor activity and anxiety-like behavior // Pre-clinical models: techniques and protocols. – New York, NY : Springer New York, 2018. – С. 99-103.

121 Rashova M, Akhmetova S, Tuleubaev B, Bolat Z, Mukhtarkhan U, Tazabekova K, et al. Impact of Nanocellulose-Based Biocomposite Implantation on Rodent Behavior in the Elevated Plus Maze Test. J CLIN MED KAZ. 2026;23(2):104-8. https://doi.org/10.23950/jcmk/18012

122 Çevik Ö. S. et al. Contribution of distinctive outcome measures to the assessment of anxiety in the open field: a meta-analysis of factors mediating open-field test variability in rodent models of anxiety // Behavioural Brain Research. – 2025. – Т. 490. – С. 115612.

123 Sturman O., Germain P. L., Bohacek J. Exploratory rearing: a context- and stress-sensitive behavior recorded in the open-field test // Stress. – 2018. – Т. 21. – №. 5. – С. 443-452.

124 Ferreira J. Factors contributing to the open-field test variability: Behavior // Lab Animal. – 2025. – Т. 54. – №. 6. – С. 135-135.

125 Шарипова В. Х. и др. Когнитивная дисфункция у лабораторных крыс после малых и больших операций // Вестник экстренной медицины. – 2020. – Т. 13. – №. 1-2. – С. 92-100.

126 Rashova M. et al. Assessment of clinical symptoms of acute toxicity following the implantation of a nanocellulose-based biocomposite //Georgian Medical News. – 2025. – №. 369. – С. 127-137.

127 Pfeffer M. A. et al. Psychological toxicity in classical hematology //European journal of haematology. – 2023. – Т. 111. – №. 4. – С. 516-527.

128 de la Harpe K. M. et al. The hemocompatibility of nanoparticles: a review of cell–nanoparticle interactions and hemostasis // Cells. – 2019. – Т. 8. – №. 10. – С. 1209

129 Čolić M., Tomić S., Bekić M. Immunological aspects of nanocellulose // Immunology letters. – 2020. – Т. 222. – С. 80-89

130 Souza S. F. et al. Cell interactions and cytotoxic studies of cellulose nanofibers from Curauá natural fibers // Carbohydrate polymers. – 2018. – Т. 201. – С. 87-95.

131 Nusse Y., Kubes P. Liver macrophages: development, dynamics, and functions // Cellular & Molecular Immunology. – 2025. – Т. 22. – №. 10. – С. 1178-1189.

132 Li H. et al. Lactate metabolism and acute kidney injury // Chinese Medical Journal. – 2025. – Т. 138. – №. 08. – С. 916-924.

133 Eslahi N. et al. Processing and properties of nanofibrous bacterial cellulose-containing polymer composites: a review of recent advances for biomedical applications // Polymer Reviews. – 2020. – Т. 60. – №. 1. – С. 144-170.

134 Norrrahim M. N. F. et al. Emerging development of nanocellulose as an antimicrobial material: An overview // Materials Advances. – 2021. – Т. 2. – №. 11. – С. 3538-3551

135 Римашевский Д. В. и др. Патогенетические особенности лечения хронического остеомиелита // Гений ортопедии. – 2021. – Т. 27. – №. 5. – С. 628-635.

136 Murizan N. I. S. et al. Review on nanocrystalline cellulose in bone tissue engineering applications // Polymers. – 2020. – Т. 12. – №. 12. – С. 2818.

137 Zhang Y. et al. Application of nanocellulose-based aerogels in bone tissue engineering: current trends and outlooks // Polymers. – 2023. – Т. 15. – №. 10. – С. 2323.

138 Jiao H. et al. In situ biomineralization reinforcing anisotropic nanocellulose scaffolds for guiding the differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells // International Journal of Biological Macromolecules. – 2024. – Т. 274. – С. 133515.

139 Ouyang L. et al. New insight of immuno-engineering in osteoimmunomodulation for bone regeneration // Regenerative Therapy. – 2021. – Т. 18. – С. 24-29.

140 Cheng P. et al. Prevascularization promotes endogenous cell-mediated angiogenesis by upregulating the expression of fibrinogen and connective tissue growth factor in tissue-engineered bone grafts // Stem cell research & therapy. – 2018. – Т. 9. – №. 1. – С. 176.

141 Krishnan A. G. et al. Biodegradable nanocomposite fibrous scaffold mediated local delivery of vancomycin for the treatment of MRSA infected experimental osteomyelitis // Biomaterials science. – 2020. – Т. 8. – №. 9. – С. 2653-2665.

142 Birt M. C. et al. Osteomyelitis: recent advances in pathophysiology and therapeutic strategies // Journal of orthopaedics. – 2017. – Т. 14. – №. 1. – С. 45-52.

143 Chen Z. et al. Osteoimmunomodulation for the development of advanced bone biomaterials // Materials today. – 2016. – Т. 19. – №. 6. – С. 304-321.

144 Wang H. et al. Biomaterials for bone infections: antibacterial mechanisms and immunomodulatory effects // Frontiers in cellular and infection microbiology. – 2025. – Т. 15. – С. 1589653.

145 Janmohammadi M. et al. Cellulose-based composite scaffolds for bone tissue engineering and localized drug delivery // Bioactive Materials. – 2023. – Т. 20. – С. 137-163.

146 Lin Z. et al. Positive effects of three-dimensional collagen-based matrices on the behavior of osteoprogenitors // Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. – 2021. – Т. 9. – С. 708830.

147 Patel J., Joharapurkar A., Jain M. et al. Age-related changes in hematological and biochemical profiles of Wistar rats // Laboratory Animal Research. – 2024. – Vol. 40. – Article 5. DOI: 10.1186/s42826-024-00194-7.

148 Cevlik T., Turkal R., Sirikci O. Determination of Complete Blood Count Reference Intervals by an Indirect Method for Newborns, Adults, and Geriatric Ages // Clinical Laboratory. – 2023. – Vol. 69, № 6.

149 Европейский комитет по определению чувствительности к антимикробным препаратам. Таблицы пограничных значений для интерпретации МПК и диаметров зон задержки роста. Версия 16.0 [Электронный ресурс] / EUCAST. – 2026. – URL: https://www.eucast.org/bacteria/document-archive/

150 Sibińska E., Arendowski A., Fijałkowski P., et al. Comparison of the Bruker Microflex LT and Zybio EXS2600 MALDI TOF MS systems for the identification of clinical microorganisms // Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. – 2024. – Vol. 108, No. 2. – Article 116150. – DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2023.116150.

151 Kishor C., Mishra R.R., Saraf S.K., Kumar M., Srivastav A.K., Nath G. Phage therapy of staphylococcal chronic osteomyelitis in experimental animal model // Indian Journal of Medical Research. – 2016. – Vol. 143, No. 1. – P. 87–94. – DOI: 10.4103/0971-5916.178615.

152 Battaglia M., Garrett-Sinha L.A. *Staphylococcus xylosus* and *Staphylococcus aureus* as commensals and pathogens on murine skin // Laboratory Animal Research. – 2023. – Vol. 39. – Article 18. – DOI: 10.1186/s42826-023-00169-0.

153 Rashova M, Amirkhanova Z, Akhmetova S, Tuleubaev B, Turebekova D, Koshanova A, et al. Assessment of Antibacterial and Antifungal Activity of a Biocomposite Based on Nanocellulose in Vitro. J CLIN MED KAZ. 2025;22(3):53-7. https://doi.org/10.23950/jcmk/16328

154 Рашова М. Г. и др. Инфекциялық этиологиялы сүйек ақауларын емдеу және толтыру мәселесі. әдебиетке шолу //TRAUMATOLOGY. – №. 1. – С. 4-14.

155 Akhmetova S. et al. Comparative Assessment of the Microbiological and Histopathological Picture of the Implantation Zone of a Nanocellulose-based Biocomposite In Vivo //In Vivo. – 2026. – Т. 40. – №. 4. – С. 2003-2013.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Выписка из протокола заседания Локальной комиссии по биоэтике

ЛОКАЛЬНАЯ КОМИССИЯ ПО БИОЭТИКЕ
НАО «МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ КАРАГАНДЫ»

100000, Караганда, Гоголь көшесі, 40
тел.: +7 (7212) 50-39-30 (1744)
E-mail: lkbioetmuk@gmail.com

100000, город Караганда, улица Гоголь, 40
тел.: +7 (7212) 50-39-30 (1744)
E-mail: lkbioetmuk@gmail.com

Письмо-заключение ЛКБ НАО МУК
по заявке Косиловой Е.Ю.,
(присвоенный № 18 от 20. 09 .2022 г.)

Выписка из протокола № 2
Заседания Локальной Комиссии по биоэтике
при Медицинском университете Караганды
от 11 октября 2022 года

г. Караганда, НАО «Медицинский университет Караганды»

Председатель заседания: Вистерничан Ольга Александровна.

Повестка заседания

5.1. Рассмотрение первичной заявки на проведение исследования по протоколу **«Исследование взаимодействия биокомпозита на основе наноцеллюлозы в модели костного дефекта трубчатой кости в эксперименте in vivo»**

Спонсор исследования – *отсутствует.*
Заявитель – Косилова Екатерина Юрьевна, докторант ОП 8D10100 «Медицина», НАО «Медицинский университет Караганды»

Слушали: Заключение эксперта по этической экспертизе касательно предоставленных документов.

Для рассмотрения представлены следующие документы:
1. Заявление на одобрение - Сопроводительное письмо;
2. Форма заявки на первичную экспертизу от 20.09.2022г.
3. Заявление для этического одобрения биомедицинского исследования с вовлечением животных в качестве объекта исследования, версия 1.0 от 20.09.2022г., на русском языке;
4. Декларация о конфликте интересов главного исследователя от 20.09.2022г.
5. Резюме исследователя от 20.09.2022г.

Заключение

Одобрить проведение исследования по протоколу **«Исследование взаимодействия биокомпозита на основе наноцеллюлозы в модели костного дефекта трубчатой кости в эксперименте in vivo»**.

Главный исследователь: Косилова Екатерина Юрьевна, докторант ОП 8D10100 «Медицина», НАО «Медицинский университет Караганды»

База исследования:
1. НАО «Медицинский университет Караганды», ул. Гоголя, 40, г. Караганды.

Спонсор исследования – *отсутствует.*

Представлять промежуточные отчеты каждые 12 месяцев с момента начала исследования, а также заключительный отчет после завершения исследования.

Заявитель – Косилова Екатерина Юрьевна.

Председатель **О. А. Вистерничан**

Дата: 11.10.2022 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ Б

Выписка из протокола заседания Локальной комиссии по биоэтике

ЛОКАЛЬНАЯ КОМИССИЯ ПО БИОЭТИКЕ
НАО «КАРАГАНДИНСКИЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»
100000, город Караганда, улица Гоголь, 40
E-mail: LKBAomuk@gmail.com

Письмо-заключение ЛКБ НАО КМУ
По заявке Рашовой М. Г.,
(присвоенный №13-1 от 17.12.2025 г.)

Выписка из протокола № 22
Заседания Локальной Комиссии по биоэтике
при Карагандинском Медицинском университете
от 30 декабря 2025 года

г. Караганда, НАО «Карагандинский Медицинский университет»
Председатель заседания: Вистерничан Ольга Александровна.

Повестка заседания

Рассмотрение первичной заявки на проведение исследования по протоколу: «**Эффективность применения биокомпозита на основе наноцеллюлозы с антибиотиком в модели хронического остеомиелита *in vivo***»

Спонсор исследования – *отсутствует*

Главный исследователь: докторант по профилю «Медицина» 8D10100 Рашова Мадина Ганиккызы

Руководитель исследования: профессор кафедры биомедицины НАО «КМУ», к.м.н., Ахметова Сауле Балтабаевна

Слушали: Заключение эксперта по этической экспертизе касательно предоставленных документов.

Для рассмотрения представлены следующие документы:

1. Заявление на поправки к протоколу исследования;
2. Заявка на первичную экспертизу (версия 1 от 17.12.2025 г.);
3. Протокол исследования (версия 1 от 17.12.2025 г.);
4. Декларация о конфликте интересов главного исследователя (версия 1 от 17.12.2025 г.);
5. Резюме исследователя (CV) (версия 1 от 17.12.2025 г.);
6. Форма информированного согласия (версия 1 от 17.12.2025 г.);
7. Формы по оценке.

Заключение

Разрешить проведение исследования по протоколу: «**Эффективность применения биокомпозита на основе наноцеллюлозы с антибиотиком в модели хронического остеомиелита *in vivo***»

Главный исследователь: докторант по профилю «Медицина» 8D10100 Рашова Мадина Ганиккызы

Руководитель исследования: профессор кафедры биомедицины НАО «КМУ», к.м.н., Ахметова Сауле Балтабаевна

База исследования:
НАО «Карагандинский Медицинский университет», г.Караганда, Гоголя 40

Спонсор исследования – *отсутствует*

Представлять промежуточные отчеты каждые 12 месяцев с момента начала исследования, а также заключительный отчет после завершения исследования.

Председатель **О. А. Вистерничан**

Секретарь **Э. К. Кәлібаева**

Дата: 30.12.2025 г.

ПРИЛОЖЕНИЕ В

Патент на изобретение

ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 37833

ӨНЕРТАБЫСҚА / НА ИЗОБРЕТЕНИЕ / FOR INVENTION

(21) 2025/0002.1

(22) 04.01.2025

(45) 20.02.2026

(54) Микроағзалардың морфологиясын және дақылдық қасиеттерін зерттеуге арналған оқу құралы-тренажеры
Пособие-тренажер для изучения морфологии и культуральных свойств микроорганизмов
The training manual- simulator for studying the morphology and cultural properties of microorganisms

(73) Рашова Мадина Ганикызы (KZ)
Rashova Madina Ganikyzy (KZ)

(72) Рашова Мадина Ганикызы (KZ) Rashova Madina Ganikyzy (KZ)

ЭЦҚ қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed with EDS

С. Ахметов
С. Ахметов
S. Akhmetov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE

ПРИЛОЖЕНИЕ Г

Патент на изобретение



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 37697

ӨНЕРТАБЫСҚА / НА ИЗОБРЕТЕНИЕ / FOR INVENTION

(21) 2024/0840.1

(22) 12.10.2024

(45) 19.12.2025

(54) Жұқпалы ауруларды зерттеуге арналған үстел ойыны
Настольная игра для изучения инфекционных болезней
A board game for studying infectious diseases

(73) Рашова Мадина Ганикызы (KZ)
Rashova Madina Ganikyzy (KZ)

(72) Рашова Мадина Ганикызы (KZ) Rashova Madina Ganikyzy (KZ)

ЭЦҚ қол қойылды
Подписано ЭЦП
Signed with EDS

С. Ахметов
С. Ахметов
S. Akhmetov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE

ПРИЛОЖЕНИЕ Д

Патент на полезную модель



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 11922

ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL

(21) 2025/1660.2

(22) 30.10.2025

(45) 20.03.2026

(54) Биоүлбірді үйренуге арналған оқу құралы-тренажер
Пособие-тренажер для изучения биопленок
The training manual-simulator for studying the biofilms

(73) Рашова Мадина Ганикызы (KZ)
Rashova Madina Ganikyzy (KZ)

(72) Рашова Мадина Ганикызы (KZ) — Rashova Madina Ganikyzy (KZ)
Серікберлі Гүлжан Нұрдосқызы (KZ) — Serikberli Gulzhan Nurdoskyzy (KZ)
Феоктистов Виталий Александрович (KZ) — Feoktistov Vitaliy Alexsandrovich (KZ)
Ахметова Сауле Балтабаевна (KZ) — Akhmetova Saule Baltabaevna (KZ)
Лавриненко Иван Иванович (KZ) — Lavrinenko Ivan Ivanovich (KZ)
Молдашева Мөлдір Илиясқызы (KZ) — Moldasheva Moldir Iliasqyzy (KZ)

ЭЦҚ қол қойылды — С. Ахметов
Подписано ЭЦП — С. Ахметов
Signed with EDS — S. Akhmetov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE

ПРИЛОЖЕНИЕ Е

Патент на полезную модель



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 11774

ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL

(21) 2025/1501.2

(22) 04.10.2025

(45) 13.02.2026

(54) Үлттық егу кестесін үйренуге арналған үстел ойыны
Настольная игра для изучения национального календаря вакцинации
A board game for learning the national vaccination schedule

(73) Рашова Мадина Ганикызы (KZ)
Rashova Madina Ganikyzy (KZ)

(72) Рашова Мадина Ганикызы (KZ) Rashova Madina Ganikyzy (KZ)

ЭЦҚ қол қойылды С. Ахметов
Подписано ЭЦП С. Ахметов
Signed with EDS S. Akhmetov

«Үлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE

ПРИЛОЖЕНИЕ Ж

Патент на полезную модель



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

REPUBLIC OF KAZAKHSTAN

ПАТЕНТ
PATENT

№ 11577

ПАЙДАЛЫ МОДЕЛЬГЕ / НА ПОЛЕЗНУЮ МОДЕЛЬ / FOR UTILITY MODEL

(21) 2025/1557.2

(22) 13.10.2025

(45) 19.12.2025

(54) Нейромедиаторларды зерттеуге арналған үстел ойыны
Настольная игра для изучения нейромедиаторов
Board game for learning about neurotransmitters

(73) Рашова Мадина Ганикызы (KZ)
Rashova Madina Ganikyzy (KZ)

(72) Рашова Мадина Ганикызы (KZ)
Rashova Madina Ganikyzy (KZ)
Туребекова Динара Мейрамовна (KZ)
Turebekova Dinara Meiramovna (KZ)
Серікберлі Гүлжан Нұрдоскызы (KZ)
Serikberli Gulzhan Nurdoskyzy (KZ)
Болат Жанерке Мирамгаликызы (KZ)
Bolat Zhanerke Miramgalikyzy (KZ)
Лавриненко Иван Иванович (KZ)
Lavrinenko Ivan Ivanovich (KZ)
Өмеков Әділет Өмірсерікұлы (KZ)
Omenov Adilet Omirserikuly (KZ)
Қамбыл Бақдәулет Бауржанұлы (KZ)
Kambyl Bakdaulet Baurzhanuly (KZ)
Тазабекова Камила Куанышқызы (KZ)
Tazabekova Kamila Kuanyshkyzy (KZ)
Ходжабаева Айнура Мырзабайқызы (KZ)
Khojabayeva Ainura Myrzabaykyzy (KZ)
Мұхтархан Ұлжалғас Ғалымжанқызы (KZ)
Mukhtarkhan Ulzhalgas Galymzhankyzy (KZ)
Жанабергенқ Жайна Ерболқызы (KZ)
Zhangabergen Zhaina Yerbolkyzy (KZ)

ЭЦҚ қол қойылды С. Ахметов
Подписано ЭЦП С. Ахметов
Signed with EDS S. Akhmetov

«Ұлттық зияткерлік меншік институты» РМК директоры
Директор РГП «Национальный институт интеллектуальной собственности»
Director of the «National Institute of Intellectual Property» RSE

ПРИЛОЖЕНИЕ И

Свидетельство о регистрации прав на объекты авторского права



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

АВТОРЛЫҚ ҚҰҚЫҚПЕН ҚОРҒАЛАТЫН ОБЪЕКТІЛЕРГЕ ҚҰҚЫҚТАРДЫҢ МЕМЛЕКЕТТІК ТІЗІЛІМГЕ МӘЛІМЕТТЕРДІ ЕНГІЗУ ТУРАЛЫ

КУӘЛІК

2025 жылғы «2» қазан № 62619

Автордың (авторлардың) жөні, аты, әкесінің аты (егер ол жеке басын куәландыратын құжатта көрсетілсе):
РАШОВА МАДИНА ГАНИКЫЗЫ, ТУЛЕУБАЕВ БЕРИК ЕРКЕБУЛАНОВИЧ, КОШАНОВА АМИНА АМАНТАЙКЫЗЫ, ЛАВРИНЕНКО ИВАН ИВАНОВИЧ, СЕРІКБЕРДІ ГҰЛЖАН НҰРДОСҚЫЗЫ, БОЛАТ ЖАНЕРКЕ МИРАМҒАЛИҚЫЗЫ, ХОДЖАБАЕВА АЙНУРА МЫРЗАБАЙҚЫЗЫ, ӨМЕНОВ ӘДІЛЕТ ӨМІРСЕРІКҰЛЫ, МУХТАРХАН ҰЛЖАЛҒАС ҒАЛЫМЖАНҚЫЗЫ, ҚАМБЫЛ БАҚДӘУЛЕТ БАУРЖАНҰЛЫ

Авторлық құқық объектісі: әдеби туынды

Объектінің атауы: ИЛЛЮСТРИРОВАННЫЕ ИНФОГРАММЫ ИСТОЧНИКОВ ПРОИСХОЖДЕНИЯ, СИНТЕЗА, СВОЙСТВ И ОБЛАСТЕЙ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЦЕЛЛЮЛОЗЫ

Объектінің жасалған күні: 01.09.2025

Құжат тиісінше "Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады https://copyright.kazpatent.kz

Подлинность документа возможно проверить на сайте kazpatent.kz в разделе «Авторское право» https://copyright.kazpatent.kz

ЭЦҚ қол қойылды

С. Ахметов

ПРИЛОЖЕНИЕ К

Свидетельство о регистрации прав на объекты авторского права



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

АВТОРЛЫҚ ҚҰҚЫҚПЕН ҚОРҒАЛАТЫН ОБЪЕКТІЛЕРГЕ ҚҰҚЫҚТАРДЫҢ МЕМЛЕКЕТТІК ТІЗІЛІМГЕ МӘЛІМЕТТЕРДІ ЕНГІЗУ ТУРАЛЫ

КУӘЛІК

2025 жылғы «30» қыркүйек № 62565

Автордың (лардың) жөні, аты, әкесінің аты (егер ол жеке басын куәландыратын құжатта көрсетілсе):
РАШОВА МАДИНА ГАНИКЫЗЫ, ТУЛЕУБАЕВ БЕРИК ЕРКЕБУЛАНОВИЧ, ТУРЕБЕКОВА ДИНАРА МЕЙРАМОВНА, КОШАНОВА АМИНА АМАНТАЙКЫЗЫ, ӨМЕНОВ ӘДІЛЕТ ӨМІРСЕРІКҰЛЫ, КАМБЫЛ БАҚДӘУЛЕТ БАУРЖАНҰЛЫ, ТАЗАБЕКОВА КАМИЛА КУАНЫШКЫЗЫ, ЛАВРИНЕНКО ИВАН ИВАНОВИЧ, БОЛАТ ЖАНЕРКЕ МИРАМҒАЛИҚЫЗЫ

Авторлық құқық объектісі: **әдеби туынды**

Объектінің атауы: **ЭТОГРАММЫ ДЛЯ ОЦЕНКИ ПОВЕДЕНЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ ЖИВОТНЫХ**

Объектіні жасаған күні: **26.08.2025**

Құжат түпнұсқалығын http://www.kazpatent.kz/ru сайтының "Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады https://copyright.kazpatent.kz

Подлинность документа возможно проверить на сайте kazpatent.kz в разделе «Авторское право» https://copyright.kazpatent.kz

ЭЦҚ қол қойылды

г. Амреев

ПРИЛОЖЕНИЕ Л

Свидетельство о регистрации прав на объекты авторского права



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

АВТОРЛЫҚ ҚҰҚЫҚПЕН ҚОРҒАЛАТЫН ОБЪЕКТІЛЕРГЕ ҚҰҚЫҚТАРДЫҢ МЕМЛЕКЕТТІК ТІЗІЛІМГЕ МӘЛІМЕТТЕРДІ ЕНГІЗУ ТУРАЛЫ

КУӘЛІК

2024 жылғы «22» тамыз № 49199

Авторлың (дарлың) жөні, аты, әкесінің аты (егер ол жеке басын куәландыратын құжатта көрсетілсе):
РАШОВА МАДИНА ГАНИКЫЗЫ, ТУЛЕУБАЕВ БЕРИК ЕРКЕБУЛАНОВИЧ

Авторлық құқық объектісі: **әдеби туынды**

Объектінің атауы: **ОРТОПЕДИЧЕСКИЙ АЛЬМАНАХ КОСТНЫХ МЕЛЬНИЦ**

Объектіні жасаған күні: **25.06.2024**

ЭЦҚ қол қойылды

А. Артыкова

ПРИЛОЖЕНИЕ М

Свидетельство о регистрации прав на объекты авторского права



ҚАЗАҚСТАН РЕСПУБЛИКАСЫ

РЕСПУБЛИКА КАЗАХСТАН

АВТОРЛЫҚ ҚҰҚЫҚПЕН ҚОРҒАЛАТЫН ОБЪЕКТІЛЕРГЕ ҚҰҚЫҚТАРДЫҢ МЕМЛЕКЕТТІК ТІЗІЛІМГЕ МӘЛІМЕТТЕРДІ ЕНГІЗУ ТУРАЛЫ

КУӘЛІК

2024 жылғы «3» сәуір № 43782-1

Автордың (лардың) жөні, аты, әкесінің аты (егер ол жеке басын куәландыратын құжатта көрсетілсе):
РАШОВА МАДИНА ГАНИКЫЗЫ, ТУЛЕУБАЕВ БЕРИК ЕРКЕБУЛАНОВИЧ

Авторлық құқық объектісі: әдеби туынды

Объектінің атауы: Классификация устройств медицинского назначения для измельчения костей с интерпретацией

Объектіні жасаған күні: 28.02.2024

Құжат түпнұсқалығын http://www.kazpatent.kz/ru сайтының "Авторлық құқық" бөлімінде тексеруге болады https://copyright.kazpatent.kz

Подлинность документа возможно проверить на сайте kazpatent.kz в разделе «Авторское право» https://copyright.kazpatent.kz

ЭЦҚ қол қойылды

Е. Оспанов

ПРИЛОЖЕНИЕ Н

Акт внедрения результатов научно-исследовательской работы

Ф КМУ 6-03/01

УТВЕРЖДАЮ
Директор Института наук о Жизни НАО КМУ
(должность руководителя организации (куда внедряются результаты)
Кадырова Ирина Адильевна

АКТ внедрения
результатов научно-исследовательских, научно-технических работ (или) результатов научной и (или) научно-технической деятельности

1. Наименование: «Способ пробоподготовки для изучения морфологии микроорганизмов и их биопленкообразующих свойств с помощью лазерной захватывающей микродиссекции»

2. Краткая аннотация:
Разработан и внедрён способ пробоподготовки для изучения морфологии микроорганизмов и их биопленкообразующих свойств с применением метода лазерной захватывающей микродиссекции. Методика обеспечивает селективное выделение участков бактериальных скоплений и фрагментов биоплёнки из исследуемого материала с последующей подготовкой образцов для морфологического анализа. Применение данного подхода позволяет сохранять структурную организацию биоплёнки, улучшает визуализацию клеточных элементов и повышает воспроизводимость результатов исследования.

3. Эффект от внедрения (экономический, **социальный,** экологический). Эффект: внедрение способа позволило повысить точность морфологической оценки микроорганизмов, обеспечить более надёжное выявление особенностей пространственной организации биоплёнок и снизить вероятность артефактов на этапе подготовки материала. Практическое использование методики способствует стандартизации лабораторного протокола, сокращению времени пробоподготовки и повышению информативности получаемых данных при экспериментальных и микробиологических исследованиях.

4. Место и дата внедрения: НАО КМУ, 05.01.26 Работа включена из диссертации на соискание степени доктора философии (PhD) 8D10100 «Медицина» на тему: «Эффективность применения биокомпозита на основе наноцеллюлозы с антибиотиком в модели хронического остеомиелита *in vivo*»

5. Форма внедрения: применение в учебном процессе научно-исследовательской деятельности

Представители заявителя

проф. каф. биомедицины НАО КМУ
к.м.н. Ахметова С. Б. _____

Исполнитель Рашова М.Г. _____

Представители организации, в которую внедряются результаты НИР
Директор ИНоЖ НАО КМУ
Кадырова И. А. _____

Зав. НИЛ НАО КМУ
Лавриненко А. В. _____

ПРИЛОЖЕНИЕ П

Акт внедрения результатов научно-исследовательской работы

Ф КМУ 6-03/01

УТВЕРЖДАЮ
Директор Института наук о Жизни НАО КМУ
Должность руководителя организации (куда внедряются результаты)
Кадырова Ирина Адильевна

АКТ внедрения
результатов научно-исследовательских, научно-технических работ (или) результатов научной и (или) научно-технической деятельности

1. Наименование: **«Настольная игра для изучения инфекционных болезней (Патент РК на изобретение № 37697)»**

2. Краткая аннотация:
Техническим результатом изобретения является создание игры, состоящей из игрового поля, разделенного на части: центральную с характерологическими критериями заболевания и этиофактора; среднюю – игровую, где размещаются карточки, на обратной стороне которых имеется название «SIGMA» (medical game (G) for studying (S) infectious (I) diseases and their microbiological (M) agents (A)), а на лицевой – информация двух типов: первая – представлена художественным произведением, а именно картиной или гравюр й, иллюстрирующим или относящимся к какому-либо заболеванию инфекционной или паразитарной природы; вторая – представлена изображением этиологического фактора.

3. Эффект от внедрения (экономический, **социальный,** экологический). Эффект от изобретения – относится к обучающим настольным играм медицинской направленности и преследует цель активного обучения, развития памяти, логического мышления, эмоционального интеллекта, повышения общей эрудированности, эмпатии. Знакомство с произведениями мировых художников, повышение общей эрудированности, формирование новых нейронных связей, студентцентрированный подход, обучение путем повторения и закрепления сложных фундаментальных знаний через «SIGMA», задействование визуально-аудиально тактильной модальностей, отсутствие аналогов на рынке.

4. Место и дата внедрения: НАО КМУ, 05.01.2026. Работа включена из диссертации на соискание степени доктора философии (PhD) 8D10100 «Медицина» на тему: «Эффективность применения биокомпозита на основе наноцеллюлозы с антибиотиком в модели хронического остеомиелита *in vivo*»

5. Форма внедрения: применение игры в учебном процессе при преподавании дисциплины «Микробиология» на кафедре биомедицины ОП «Общая медицина», «Педиатрия».

Представители заявителя

проф. каф. биомедицины НАО КМУ
к.м.н. Ахметова С. Б.

Исполнитель Рашова М.Г.

Представители организации, в которую внедряются результаты НИР
Директор ИНоЖ НАО КМУ
Кадырова И. А.

Зав. каф. биомедицины НАО КМУ
Понамарева О. А.

ПРИЛОЖЕНИЕ Р

Акт внедрения результатов научно-исследовательской работы

Ф КМУ 6-03/01

УТВЕРЖДАЮ
Директор Института наук о Жизни НАО КМУ
Должность руководителя организации (куда внедряются результаты)
Кадырова Ирина Адильевна

АКТ внедрения
результатов научно-исследовательских, научно-технических работ (или) результатов научной и (или) научно-технической деятельности

1. Наименование: **Настольная игра для изучения национального календаря вакцинации (Патент РК на полезную модель № 11774)**

2. Краткая аннотация:
Техническим результатом изобретения является создание игры, состоящей из игрового поля, разделенного на сектора, в первом из которых размещаются жетоны со сроками вакцинации, во втором – карточка с изображением «Известной личности», в третьем – создатели вакцины, в четвертом – контурные карты стран-производителей. активное обучение происходит за счет задействования визуально-аудиально-тактильной модальностей и эмоционально-эмпатичной вовлеченности через погружение в личностно-исторический аспект вакцинологии.

3. Эффект от внедрения (экономический, **социальный,** экологический). Эффект: развитие эмоционального интеллекта, повышение общей эрудированности, формирование новых нейронных связей, студентцентрированный подход, активное обучение путем повторения и закрепления сложных фундаментальных знаний, задействование визуально-аудиально-тактильной модальностей, развитие эмпатии, знакомство с создателями вакцин и личными историями, переболевших людей обсуждаемыми инфекциями, в полном объеме погружают в тематику вакцинопрофилактики, а также отсутствие аналогов на рынке.

4. Место и дата внедрения: НАО КМУ, 15.02.2026. Работа включена из диссертации на соискание степени доктора философии (PhD) 8D10100 «Медицина» на тему: «Эффективность применения биокомпозита на основе наноцеллюлозы с антибиотиком в модели хронического остеомиелита *in vivo*»

5. Форма внедрения: применение игры в учебном процессе при преподавании дисциплины «Микробиология» на кафедре биомедицины ОП «Общая медицина», «Педиатрия».

Представители заявителя

проф. каф. биомедицины НАО КМУ
к.м.н. Ахметова С. Б.

Исполнитель Рашова М.Г.

Представители организации, в которую внедряются результаты НИР
Директор ИНоЖ НАО КМУ
Кадырова И. А.

Зав. каф. биомедицины НАО КМУ
Понамарева О. А.

ПРИЛОЖЕНИЕ С

Нормы параметров общего анализа крови [147,148]

ПАРАМЕТР	Ед. изм	Норма крыс	Норма человек
Лейкоциты (WBC)	$x10^9$ кл/л	2,6–14,0	4,0–10,0
Лимфоциты % (Lym%)	%	40–85	20–40
Моноциты % (MID %)	%	0–10	2–10
Гранулоциты % (GRAN %)	%	10–45	50–75
Лимфоциты # (Lym#)	$x10^9$ кл/л	1,3–10,0	1,0–4,0
Моноциты# (Mon#)	$x10^9$ кл/л	0–0,8	0,2–0,8
Гранулоциты (GRAN#)	$x10^9$ кл/л	0,5–5,5	2,0–7,5
Эритроциты (RBC)	$x10^{12}$ кл/л	5,5–10,0	3,8–5,8
Концентрация гемоглобина (HGB)	г/л	110–180	120–170
Гематокрит (HCT)	%	33–55	36–50
Ср. объем эритроцитов (MCV)	fL	50–70	80–100
Ср. сод. гемоглобина в эритроците (MCH)	pg	17–23	27–33
Ср. конц. клет. гемоглобина (MCHC)	г/л	300–370	320–360
Точн. повыш.р-я эритроцитов (RDW_CV)	%	11–18	11,5–14,5
Число тромбоцитов (PLT)	x10^9 кл/л	500–1300	150–400
Ср. объем тромбоцита (MPV)	fL	5–9	7,5–11,5
Ширина р-я тромбоцитов по объему (PDW)	fL	8–18	9–17

ПРИЛОЖЕНИЕ Т

Нормы параметров биохимического анализа крови [147,148]

ПАРАМЕТР	Норма крыс	Норма человек
Общий белок, г/л	55–80	64–83
Общий билирубин, мкмоль/л	0–7	5–21
Креатинин, мкмоль/л	25–80	45–110
Мочевина, ммоль/л	3,3–8,3	2,5–8,3
АЛТ (АЛаТ) ед/л	17–80	0–45
АСТ (АСаТ), ед/л	45–200	0–40
ГГТ, ед/л	0–5	0–55
Щелочная фосфатаза, ед/л	50–400	40–130
Альбумин, г/л	30–45	35–50
Кальций, ммоль/л	2,0–3,0	2,15–2,55
Фосфор, ммоль/л	1,6–3,0	0,81–1,45
Глюкоза, ммоль/л	4,5–11,0	3,9–5,6
A/G, усл. ед.	0,7–2,0	1,1–2,2
Амилаза, ед/л	300–1500	28–100
Триглицериды, ммоль/л	0,3–2,0	0,4–1,7
Магний, ммоль/л	0,7–1,3	0,66–1,07
Холестерин, ммоль/л	1,0–3,0	<5,2
Желчные кислоты, мкмоль/л	0–60	0–10
Глобулины, г/л	20–40	20–35
Креатинкиназа, мкмоль/л	100–1000	26–308
TCO_2, ммоль/л	15–30	22–29

ПРИЛОЖЕНИЕ У

Шкала для оценки активности остеомиелита [111]

Наименование	Морфометрический подсчет
Остеонекроз и некроз мягких тканей	«0 баллов» - отсутствует, «1 балл» - минимальный (единичные апоптотические клетки, очаговые некрозы менее 10 %), «2 балла» - очаговый (фокальные некротические поля, занимающие 11-30 % от площади дефекта), «3 балла» - диффузный (обширные поля некроза, занимающие более 30 % площади дефекта)
Полиморфно-ядерные лейкоциты	«0 баллов» - отсутствует, «1 балл» - от 1 до 5 клеток, «2 балла» - очаговая (фокальная) инфильтрация, «3 балла» - диффузная инфильтрация
Лимфоциты и макрофаги	«0 баллов» - отсутствует, «1 балл» - от 1 до 5 клеток, «2 балла» - очаговая (фокальная) инфильтрация, «3 балла» - диффузная инфильтрация
Эозинофилы	«0 баллов» - отсутствует, «1 балл» - от 1 до 5 клеток, «2 балла» - очаговая (фокальная) инфильтрация, «3 балла» - диффузная инфил.
Репаративное реактивное лимфомакрофагальное окружение в зоне дефекта	активное – лимфоциты и макрофаги окружают более 30 % фрагментов графта и более 30 % периметра графта; умеренное – паттерн репаративного микроокружения отличный от паттерна активного; минимальное – реактивное репаративное микроокружение окружают менее 10 % фрагментов и периметра графта
Костная ткань	% площади, занимаемой тканью, как % от общей площади зоны дефекта
Хрящевая ткань	% площади, занимаемой тканью, как % от общей площади зоны дефекта
Фиброзная ткань	% площади, занимаемой тканью, как % от общей площади зоны дефекта