

DOI: <https://doi.org/10.17816/vto622849>

Определение эффективности протокола децеллюляризации ксеногенного костного матрикса в исследованиях *in vitro* и *in vivo*

Д.В. Смоленцев¹, Ю.С. Лукина¹, Л.Л. Бионышев-Абрамов¹, Н.Б. Серезникова²,
А.В. Ковалёв¹, Г.Н. Берченко¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, Москва, Россия;

² Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Задачи восстановления целостности тканей, в том числе костной, на текущий момент являются крайне актуальными — как из-за возрастания высокоэнергетических травм, сопровождающихся тяжёлыми повреждениями скелета, так и из-за растущего числа ревизионных эндопротезирований, требующих применения костно-пластических материалов.

Цель. Определение эффективности разработанного протокола децеллюляризации ксеногенного костного матрикса в доклинических исследованиях *in vitro*, направленных на определение степени очистки матрикса, на основе гистологической, микротомографической оценок, методом клеточных культур, и в исследованиях *in vivo*, направленных на определение биосовместимости и остеогенных свойств материалов.

Методы. Ксеногенную спонгиозную ткань бедренных костей крупного рогатого скота фрагментировали до размеров 10×10×10 мм и обрабатывали водой, гипотоническим раствором и 3% раствором перекиси водорода, применяли глубоковую очистку методом сверхкритической флюидной экстракции. Эффективность оптимального протокола проверялась *in vitro* методом клеточных культур и *in vivo*.

Результаты. Выявлено идеальное взаимодействие клеточной культуры с костно-пластическим материалом, что может быть связано с отсутствием цитотоксических веществ в матриксе, оптимальной шероховатостью и хорошими адгезивными свойствами поверхности, пригодной для формирования стромальными клетками костного мозга фокальных контактов, их адгезии, распластывания и пролиферации. Определяется выраженная костная мозоль со сформированными костными мостиками, проходящими по поверхности имплантированного материала, через 30 суток после имплантации. К данному сроку исследования дефект практически закрыт за счёт интермедиарной костной мозоли, имплантированный материал встречается в виде отдельных небольших безостеоцитных фрагментов.

Заключение. Очищенный по разработанному протоколу ксеногенный костный матрикс является био- и цитосовместимым, обладает выраженными остеокондуктивными свойствами, эффективно стимулирует регенеративный остеогенез в живом организме.

Ключевые слова: костная ткань; децеллюляризация; флюидная экстракция; микро-КТ; стромальные клетки; ксеногенная; имплантация.

Как цитировать:

Смоленцев Д.В., Лукина Ю.С., Бионышев-Абрамов Л.Л., Серезникова Н.Б., Ковалёв А.В., Берченко Г.Н. Определение эффективности протокола децеллюляризации ксеногенного костного матрикса в исследованиях *in vitro* и *in vivo* // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2023. Т. 30, № 4. С. 431–443. DOI: <https://doi.org/10.17816/vto622849>

DOI: <https://doi.org/10.17816/vto622849>

Determining the effectiveness of a xenogeneic bone matrix decellularization protocol in *in vitro* and *in vivo* studies

Dmitriy V. Smolentsev¹, Yulia S. Lukina¹, Leonid L. Bionyshev-Abramov¹,
Natalya B. Serezhnikova², Alexey V. Kovalev¹, Gennadiy N. Berchenko¹

¹ Priorov Central Institute for Trauma and Orthopedics, Moscow, Russia;

² Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: Restoration of tissue integrity, including bone tissue, is currently an extremely urgent task, both because of the increasing number of high-energy traumas accompanied by severe skeletal injuries and the growing number of revision endoprosthetics requiring the use of bone-plastic materials.

AIM: To determine the efficacy of the developed protocol for decellularization of xenogenic bone matrix in preclinical *in vitro* studies aimed at defining the purification matrix degree, on the basis of histological, microtomographic evaluation, cell culture method, and *in vivo* studies aimed at identifying the biocompatibility and osteogenic properties of the materials.

MATERIALS AND METHODS: Xenogenic spongiosis tissue of bovine femoral bones was fragmented to the size of 10×10×10 mm and treated with water, hypotonic solution and 3% hydrogen peroxide solution, deep purification by supercritical fluid extraction was applied. The efficiency of the optimal protocol was tested *in vitro* by cell culture method and *in vivo*.

RESULTS: The ideal interaction of cell culture with bone-plastic material was revealed, which may be associated with the absence of cytotoxic substances in the matrix, optimal roughness and good adhesive properties of the surface suitable for the formation of focal contacts by bone marrow stromal cells, their adhesion, spreading and proliferation. A pronounced bone callus with formed bone bridges running along the surface of the implanted material was determined 30 days after implantation. By this study period, the defect was practically closed due to the intermedial bone callus, the implanted material is found in the form of individual small osteocyte-free fragments.

CONCLUSIONS: The xenogenic bone matrix purified according to the developed protocol is bio- and cytocompatible, has pronounced osteoconductive properties, effectively stimulates regenerative osteogenesis in living organism.

Keywords: bone tissue; decellularization; fluid extraction; micro-CT; stromal cells; xenogenic; implantation.

To cite this article:

Smolentsev DV, Lukina YS, Bionyshev-Abramov LL, Serezhnikova NB, Kovalev AV, Berchenko GN. Determining the effectiveness of a xenogeneic bone matrix decellularization protocol in *in vitro* and *in vivo* studies. *N.N. Priorov Journal of Traumatology and Orthopedics*. 2023;30(4):431–443. DOI: <https://doi.org/10.17816/vto622849>

Received: 30.10.2023

Accepted: 31.10.2023

Published: 24.11.2023

обеспечения SkyScan. На основе полученных теневых проекций произведена реконструкция в программе NRecon по алгоритму Фельдкамп. При предварительном просмотре сечений были выбраны параметры реконструкции и динамический диапазон для достижения оптимальной контрастности изображения.

Изображения объёмных моделей образцов получены с помощью программы CTvox, входящей в пакет программного обеспечения для томографа. Для построения объёмных моделей использовался алгоритм Marching-Cube, который является алгоритмом построения поверхности на основе модели явного задания шестигранных вокселей, разработанной Лоренсенем и Клайном (1987).

Денситометрическое исследование матрикса

Денситометрическое исследование матрикса проведено на тех же образцах при выборе зоны интереса 5×5×5 мм, расположенной в центральной части образца, с помощью программы СТАп 1.20.3.0 (рис. 1).

Результаты денситометрического исследования представлены в виде соотношения веществ/биоткани в центральной части образцов объёмом 5×5×5 мм в процентах от общего объёма как средние значения по результатам трёх измерений.

Степень очистки ксеногенного костного матрикса представлена коэффициентом очистки, рассчитанным по формуле:

$$\text{коэффициент очистки} = \frac{V \text{ воздуха}}{V \text{ ткани межтрабекулярного пространства}}$$

Гистологическое исследование матрикса

Все образцы фиксировали в нейтральном формалине, декальцинировали, обезвоживали, заливали в парафин, получали срезы толщиной 4 микрона, окрашивали гематоксилином-эозином и пикросириусом красным.

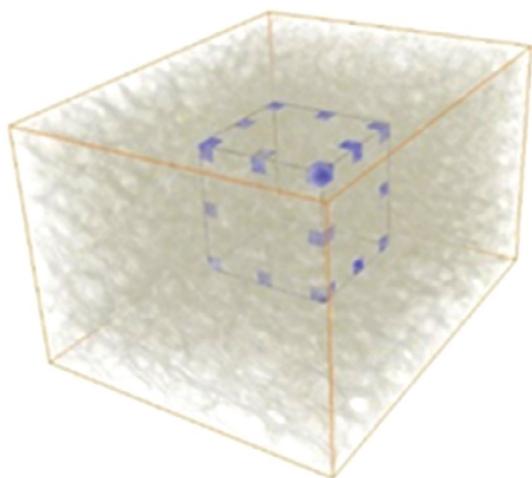


Рис. 1. Зона интереса для расчёта денситометрических показателей.

Fig. 1. Area of interest for calculating densitometric indicators.

Изучали при стандартной световой, фазово-контрастной и поляризационной микроскопиях в микроскопе Leica DM 4000 B LED (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Германия) с камерой Leica DFC 7000 T.

Культура клеток

Стромальные клетки костного мозга (СККМ) кролика получены из коллекции клеточных культур Национального медицинского исследовательского центра травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова, Москва, Россия. После размораживания и отмывания от среды для криоконсервации клеток их выращивали в культуральной среде DMEM (Gibco, США), содержащей 10% фетальной телячьей сыворотки (Gibco, США), 1% антибиотика/антимикотика (Gibco, США) и 2 мМ L-глутамин («ПанЭко», Россия) во флаконах T25 (TPP, Швейцария) при температуре 37 °С во влажной атмосфере с 5% содержанием CO₂ в воздушной смеси. Формирование конфлюэнтного монослоя контролировали визуально с помощью инвертированного микроскопа NICON (Япония). При достижении 75% покрытия поверхности флакона клетками последние снимали со дна 0,25% раствором трипсина с добавлением этилендиаминтетрауксусной кислоты («ПанЭко», Россия).

Культивирование клеток на поверхности костного матрикса

После снятия адгезивной культуры стромальных клеток костного мозга кролика с поверхности флакона, диспергирования и извлечения взвеси жизнеспособных клеток из культурального флакона клетки отмывались в среде DMEM (Gibco, США). Образцы костного матрикса размещали на дне чашек Петри. Клетки в виде суспензии высевались на верхнюю поверхность образцов ксеногенного костного матрикса в количестве 5×10⁵ клеток на 1 см² поверхности, далее чашки Петри заполнялись свежей культуральной питательной средой того же состава, а сами чашки Петри переносились в CO₂-инкубатор для дальнейшего культивирования в абактериальной атмосфере с 5% количеством углекислого газа в течение 4 суток. Причём верхняя поверхность образцов матрикса вместе с клетками находилась строго под слоем культуральной питательной среды.

За 4 суток клетки взаимодействовали с поверхностью костного матрикса, за счёт фокальных контактов происходило связывание клеток с матриксом, клетки распластывались на поверхности матрикса.

В исследовании использовали клеточные линии стромальных клеток костного мозга кроликов четвёртого пассажа. Отсутствие микоплазменного заражения культуры стромальных клеток подтверждали по протоколу окрашивания Hoechst 33258 (Sigma, США).

Сканирующая электронная микроскопия

Образцы костного матрикса с прикрепленными стромальными клетками были извлечены из чашек Петри,

промыты 0,1 М фосфатно-солевым буфером (PBS) с pH 7,4 при температуре 37 °С, после чего клетки фиксировали в течение 2 часов 2% раствором глутарового альдегида в PBS при 37 °С. Далее проводилась дофиксация в 1% растворе OsO₄ в PBS на протяжении 2 ч, после которой их дегидратировали в серии спиртов возрастающей концентрации, ацетоне. Дегидратированные образцы высушивали в аппарате для замещения жидкости переходом критической точки (HCP-2, Hitachi, Япония) и подвергали напылению золотом с помощью установки ионного напыления IB-3 (EIKO, Япония). Поверхность образцов с клетками при напылении находилась строго сверху. Затем образцы монтировались на столики из сплава алюминия для электронного микроскопа и исследовались с помощью сканирующего электронного микроскопа Hitachi S-3400N (Япония).

Этическая экспертиза

Проведение исследования одобрено решением локального этического комитета ФГБУ «НМИЦ ТО им. Н.Н. Приорова» Минздрава России на заседании № 3 от 22 марта 2023 года.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Объекты исследования

Объектом исследования выступала ксеногенная ткань бедренных костей крупного рогатого скота в возрасте 24 месяцев. Исходный материал был приобретён на мясокомбинате «Останкино» (Москва, Россия). После транспортировки в охлаждённом виде кости хранили при температуре –20 °С в морозильной камере MDF-794 (Sanyo, Япония) для поддержания остеоиндуктивного потенциала. Перед очисткой кости были разморожены, спонгиозная кость отобрана и фрагментирована до размеров 10×10×10 мм с использованием ленточной пилы КТ-210 («КТ Сервис», Россия).

Протокол очистки состоял из двух этапов:

1) первичная очистка:

- воздействие проточной водой (H₂O прот.) в течение 4 часов в орбитальном шейкере PSU-20i (BioSan, Латвия) при 120 оборотах в минуту в вакууме; соотношение объёма жидкости и объёма материала (V жидкости/V материала) — 10:1;
- воздействие гипотоническим раствором (0,5% раствор хлорида натрия (NaCl)) в течение 2 часов на встряхивающем столе при 120 оборотах в минуту в вакууме;
- воздействие 3% раствором перекиси водорода медицинской (H₂O₂) (ОАО «Самарамедпром», Россия) в ультразвуковой ванне (УЗ) ПСБ-12035-05 («ПСБ-Галс», Россия) при температуре 40 °С в течение 8 часов;

2) вторичная очистка:

- сверхкритическая флюидная экстракция на установке Water-5000 (Waters, США) при давлении

450 бар, температуре +35 °С, скорости потока (с-СО₂) 2±0,5 мл/мин в течение 8 часов.

После проведённого протокола очистки образцы ксеноматрикса исследовались с применением микротомографического, денситометрического, гистологического методов, сканирующей электронной микроскопии; в экспериментах *in vitro* на клеточной культуре и *in vivo* на лабораторных животных.

Описание медицинского вмешательства

В качестве медицинского вмешательства выступает эксперимент *in vivo*.

Доклиническую оценку биосовместимости и резорбции ксеногенных костных матриксов проводили в исследованиях *in vivo* на крысах линии Вистар (масса тела 250–300 г) с использованием модели костной перфорации критического размера (2/3 диаметра) большеберцовой кости и модели подкожной имплантации. Все хирургические процедуры и содержание животных осуществлялись в соответствии с этическими правилами проведения экспериментов на животных, включая европейскую директиву FELASA 2010/63/EU. Животных анестезировали последовательным внутримышечным введением 7 мг/кг тилетамина/золазепам (Zoletil®, лаборатории Virbac, Каррос, Франция) и 13 мг/кг ксилазина гидрохлорида (Merck, Дармштадт, Германия), операционное поле было выбрито и продезинфицировано антисептиком.

Биологический ответ на границе «ксеногенный костный матрикс/мягкие ткани» изучали при использовании модели подкожной имплантации. Вдоль позвоночника был сделан разрез. В подкожной клетчатке путём раздвигания тканей образовали пять карманов, в которые были имплантированы матриксы. Период имплантации составил 14 дней (3 животных) и 1 месяц (3 животных).

При использовании модели костной перфорации критического размера материал имплантировался точно в область дефекта с подгонкой размеров матрикса под дефект. Период имплантации составил 14 дней (3 животных) и 1 месяц (3 животных). Оценка резорбции и биосовместимости проводилась с помощью томографического и гистологического исследований.

Микротомографическое исследование проводилось *in vivo* после операции и посмертно через 2 недели и 1 месяц после имплантации. Микрокомпьютерную томографию (микро-КТ) проводили на сканере Bruker SkyScan 1178 (Контитч, Бельгия) при напряжении 65 кВ и токе 615 мкА с фильтром А1 0,5 мм. Пространственное разрешение составляло 84 мкм/пиксель. Секции были реконструированы с использованием программного обеспечения NRecon, версия 1.6.10.4. 3D-реконструкции были выполнены с применением программы CT Vol 2.2.0.0.

Для гистологического исследования образцы фиксировали в 10% формалине с нейтральным буфером, декальцинировали в специальном кислом растворе (SoftyDek, Biovitrum, Стокгольм, Швеция), подвергали стандартной

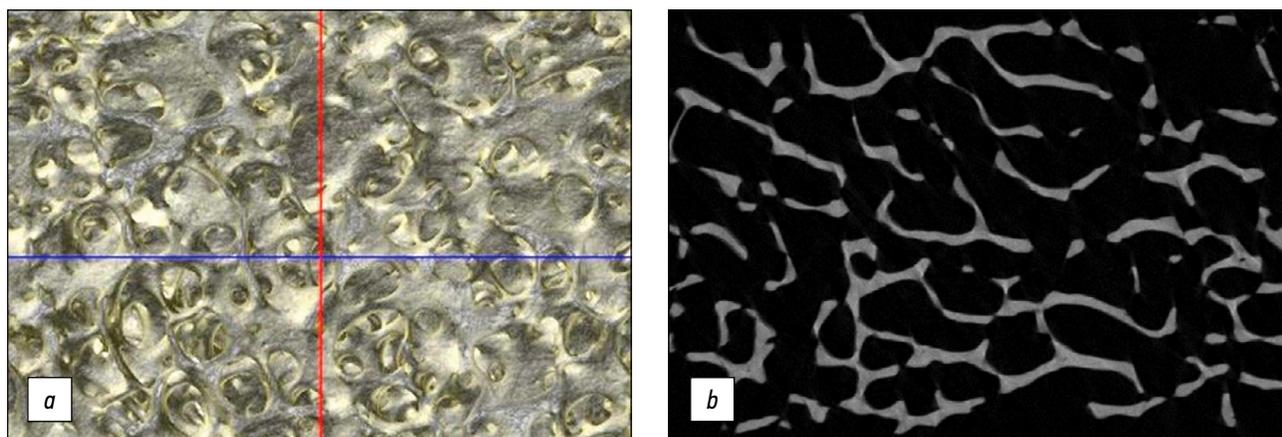


Рис. 2. Результаты томографического исследования: *a* — 3D-реконструкция, *b* — микро-КТ срез.

Fig. 2. Results of tomographic examination: *a* — 3D reconstruction, *b* — micro-CT slice.

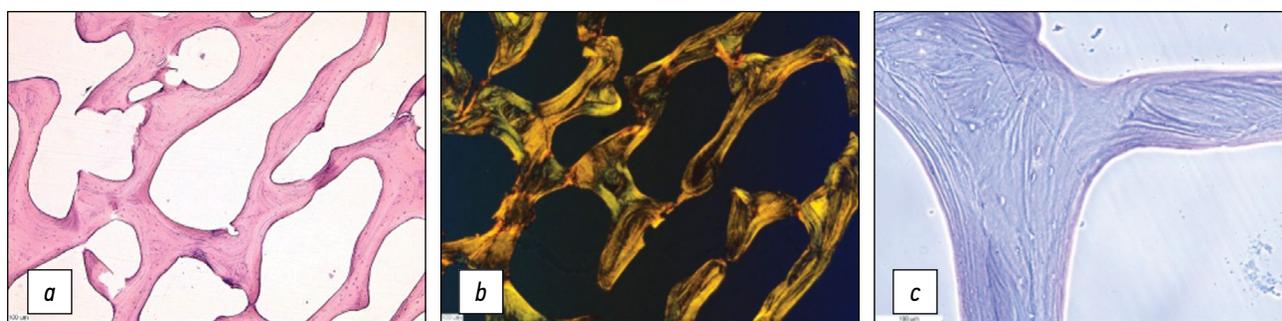


Рис. 3. Гистологическое исследование. Микроскопия: *a* — светлопольная, гематоксилин-эозин, увеличение $\times 50$; *b* — поляризационная, пикросириус красный, увеличение $\times 50$; *c* — фазово-контрастная, гематоксилин-эозин, увеличение $\times 100$.

Fig. 3. Histological examination. Microscopy: *a* — bright field, hematoxylin-eosin, magnification $\times 50$; *b* — polarized, picosirius red, magnification $\times 50$; *c* — phase contrast, hematoxylin-eosin, magnification $\times 100$.

спиртовой обработке и помещали в парафиновые блоки. Затем парафиновые срезы толщиной 4 мкм окрашивали гематоксилином и эозином в соответствии со стандартными протоколами. Полученные предметные стёкла исследовали с помощью универсального светодиодного микроскопа Leica DM4000 B, оснащённого цифровой видеокамерой Leica DFC7000 T (Leica Microsystems, Вецлар, Германия), стандартными методами световой и фазово-контрастной микроскопии.

Основные результаты исследования

Согласно результатам микротомографического и гистологического исследований, макроскопических изменений в трабекулярной костной структуре после воздействия в соответствии с нашим протоколом очистки не наблюдалось,

что подтверждается результатами томографического исследования (рис. 2): костные трабекулы формируют характерную для нормальной губчатой кости ячеистую сеть, по данным гистологического исследования (рис. 3), костный матрикс имеет нормальную тонковолокнистую структуру. Коэффициент очистки ксеногенного костного матрикса в соответствии с результатами томографического исследования (рис. 2) составил $\sim 0,91 \pm 0,05$. Предложенный скрининговый метод на основе микро-КТ по диапазону плотности для вещества/ткани (табл. 1) даёт возможность быстро оценить степень очистки межтрабекулярного пространства. Этот метод грубый и не может быть использован в качестве единственного метода контроля, однако он наименее трудоёмкий, наиболее быстрый и может быть применён для первичного скрининга в процессе очистки.

Таблица 1. Диапазон плотности для вещества/ткани

Table 1. Density range for substance/fabric

Вещество (ткань)	Диапазон плотности по шкале Хаунсфилда, HU
Воздух	-1000—-816
Ткань межтрабекулярного пространства	-816—+301
Минерализованная костная ткань	+314—+2487

Использование сочетания гипотонического раствора, проточной воды и перекиси водорода в комбинации с ультразвуком в рамках разработанного протокола приводит к эффективной очистке без нарушения структуры, что являлось одной из важнейших целей при разработке протокола. Воздействие проточной водой хорошо сохраняет костные трабекулы, оставляя наименьшее количество остеоцитов в межтрабекулярном пространстве. В соответствии с литературными данными гипотонические растворы могут легко вызывать лизис клеток с помощью простых осмотических эффектов с минимальными изменениями молекул матрикса и архитектуры [15]. Согласно нашим экспериментальным результатам, длительное воздействие гипотоническим раствором приводит к незначительным нарушениям структуры — тонкости костных трабекул, расположенных более рыхло и параллельно. Всё это в итоге может привести к снижению костной плотности, упругости и эластичности с последующим повышением ломкости кости. В соответствии с литературными данными гипотонические растворы эффективно лизируют клетки, но неэффективно удаляют клеточные остатки [16]. В связи с необходимостью удаления остаточных клеточных фрагментов необходимо дополнительное воздействие. Физические методы очистки ткани в определённой степени эффективны и обладают преимуществом перед другими методами в низких иммунных реакциях ткани после их применения за счёт отсутствия воздействия химических реагентов, которые могут оставаться в следовых количествах после использования в методике очистки. Они применяются для изменения физических характеристик ткани, разрушения клеточной мембраны, вызывания лизиса клеток и, наконец, удаления клеток и другого содержимого [17].

Ультразвуковое воздействие может привести к лизису клеток, но чаще используется для облегчения химического воздействия и удаления клеточного материала. Известно, что перекись водорода, взаимодействуя с липидами клеточных мембран, повреждает их, инактивирует и устраняет широкий спектр микроорганизмов. Совместное взаимодействие перекиси водорода и ультразвука увеличивает эффективность очистки, которая зависит от концентрации перекиси водорода. Обработка ультразвуком приводит к нарушению целостности клеточной мембраны, образованию пор и лизису клеток. Как следствие, увеличивается проницаемость мембраны, что способствует проникновению перекиси вглубь матрикса и облегчает его. В нашей работе очистка костного матрикса флюидной экстракцией является эффективной завершающей стадией протокола очистки.

При полной очистке межтрабекулярного пространства костной ткани от клеточных компонентов с сохранностью микро- и макроструктуры ксеногенный костный матрикс является безопасным и эффективным, что подтверждается в экспериментах *in vitro* в клеточных исследованиях и *in vivo* на экспериментальных животных.

Оценка цитотоксичности и прогностическая оценка биосовместимости ксеногенного костного матрикса и способности индуцировать клеточный ответ, полученный по разработанному протоколу, а также жизнеспособности, адгезивной и пролиферативной активности СККМ кролика при культивировании клеток на ксеногенном костном матриксе были исследованы в экспериментах методом клеточных культур с последующей сканирующей электронной микроскопией образцов матрикса с пересаженными на их поверхности адгезивными стромальными клетками костного мозга.

По результатам сканирующей электронной микроскопии на ксеногенном костном матриксе идентифицирован конфлюэнтный монослой адгезивных клеток СККМ кролика, пересаженных в виде суспензии, осевших на исследуемую поверхность костнопластического материала под действием гравитации удалённых друг от друга округлых клеток (рис. 4). Клетки после 4-суточного периода культивирования на поверхности матрикса имеют вытянутую в продольном направлении форму, распластаны на поверхности, плотно прилежат друг к другу. Между краями клеток и подлежащим матриксом видны единичные вновь синтезированные коллагеновые волокна. Размер клеток — около 80 мкм в продольном направлении, в поперечнике — 10–12 мкм. Формирование конфлюэнтного монослоя за 6 суток свидетельствует об идеальном взаимодействии клеточной культуры с костнопластическим материалом, что может быть связано с отсутствием цитотоксических веществ в матриксе, оптимальной шероховатостью и хорошими адгезивными свойствами поверхности матрикса, пригодной для формирования стромальными клетками костного мозга фокальных контактов, их адгезии, распластывания и пролиферации. Распластывание клеток на подложке является одним

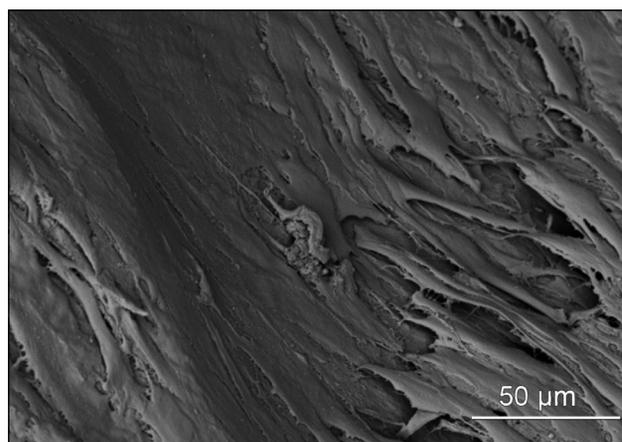


Рис. 4. Внешний вид стромальных клеток костного мозга кролика при культивировании на поверхности ксеногенного костного матрикса на 6-е сутки после посева (исследование методом сканирующей электронной микроскопии).

Fig. 4. Appearance of rabbit BMSCs when cultivated on the surface of a xenogeneic bone matrix on the 6th day after seeding (SEM study).

из механобиологических факторов, стимулирующих деление клеток в адгезивных культурах. Можно предположить наличие положительного заряда на несущей поверхности матрикса.

По данным компьютерной томографии, при использовании модели костной перфорации в экспериментах *in vivo* в обоих случаях после имплантации материал определяется в зоне костного дефекта, плотно прилегая к стенкам кости, погружённый в костномозговой канал, без миграции (рис. 5). Через 14 суток после имплантации материал наблюдается в проекции дефекта, видна частичная резорбция материала, площадь дефекта сократилась, отмечается образование регенерата от краёв кости. Рентгенологических признаков воспаления нет. Через 30 суток после имплантации материал наблюдается в проекции дефекта, определяется большая резорбция материала, в основном он сохранён в костномозговом канале (рис. 6). Площадь дефекта значительно сокращена. Определяется выраженная костная мозоль со сформированными костными мостиками, проходящими по поверхности имплантированного материала. Рентгенологических признаков воспаления не наблюдается.

При морфологическом исследовании выявлено, что к 14-м суткам после подкожной имплантации

материала определяется незрелая соединительнотканная капсула, в которой можно выделить два слоя — внутренний, прилежащий к имплантату, и наружный, граничащий с волокнами поперечнополосатых мышц. Во внутреннем слое отсутствуют нейтрофильные лейкоциты, видны рыхло расположенные клетки в виде гистиоцитов и малочисленных неориентированных фибробластов, тогда как в наружном слое число гистиоцитов уменьшается с одновременным увеличением количества фибробластов, часть из которых формирует пучки ориентированных фибробластов (рис. 7а).

К 30-м суткам после имплантации вокруг материала формируется соединительнотканная капсула с немногочисленными клеточными элементами, среди которых преобладают ориентированные фибробласты и немногочисленные гистиоциты, тогда как нейтрофильные лейкоциты и гигантские многоядерные клетки инородных тел не выявляются (рис. 7б). По сравнению с предыдущим сроком исследования определяются пучки коллагеновых волокон, имеющие наиболее развитый характер в наружных слоях сформированной соединительнотканной капсулы.

При имплантации матрикса в костный дефект к 14-м суткам определяются элементы имплантированного материала, частично подверженные клеточной резорбции.

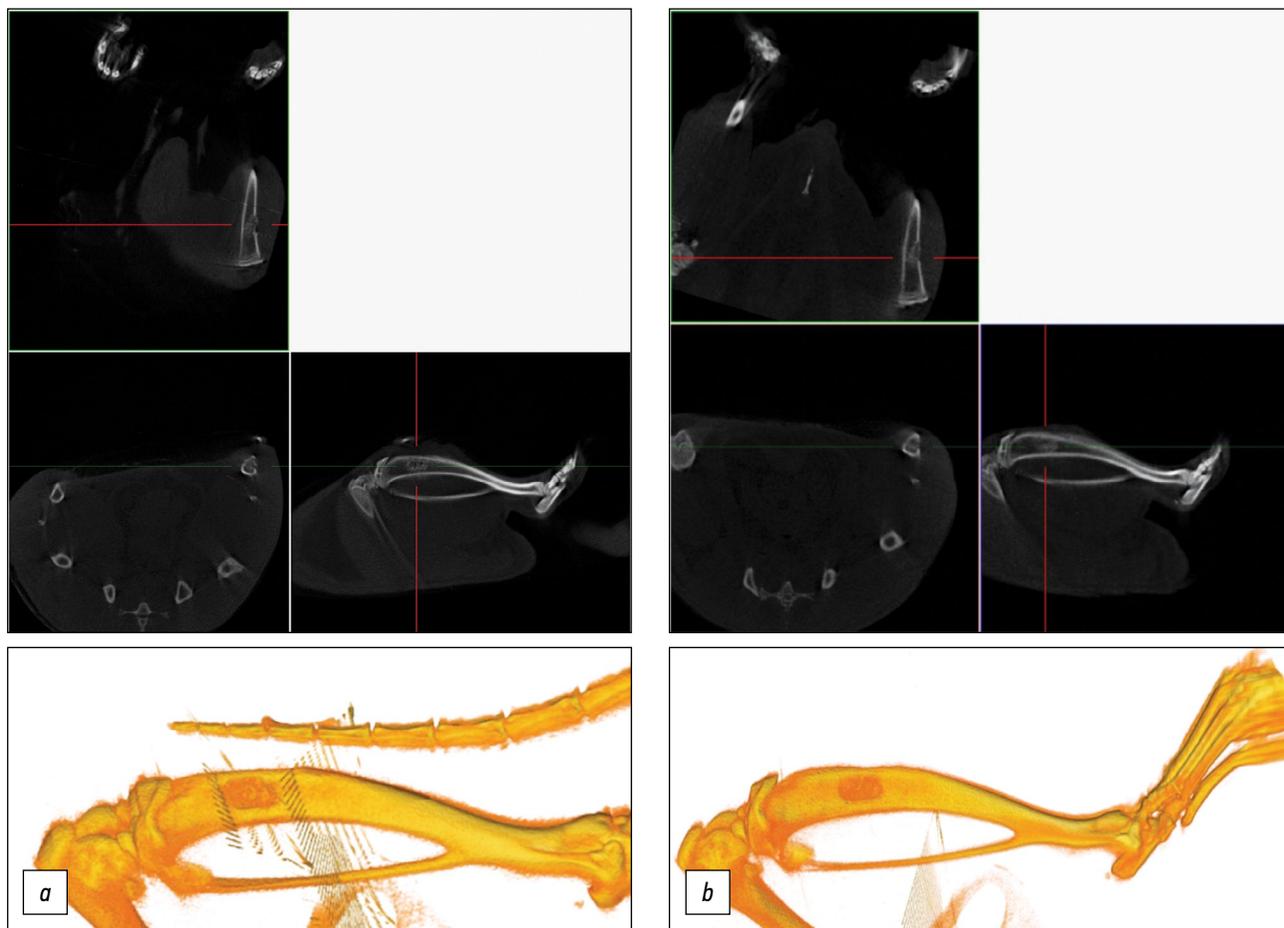


Рис. 5. Ортогональные проекции и 3D-модель большеберцовой кости крысы: *a* — на момент имплантации, *b* — через 14 суток.
Fig. 5. Orthogonal projections and 3D model of the rat tibia: *a* — at the time of implantation, *b* — after 14 days.

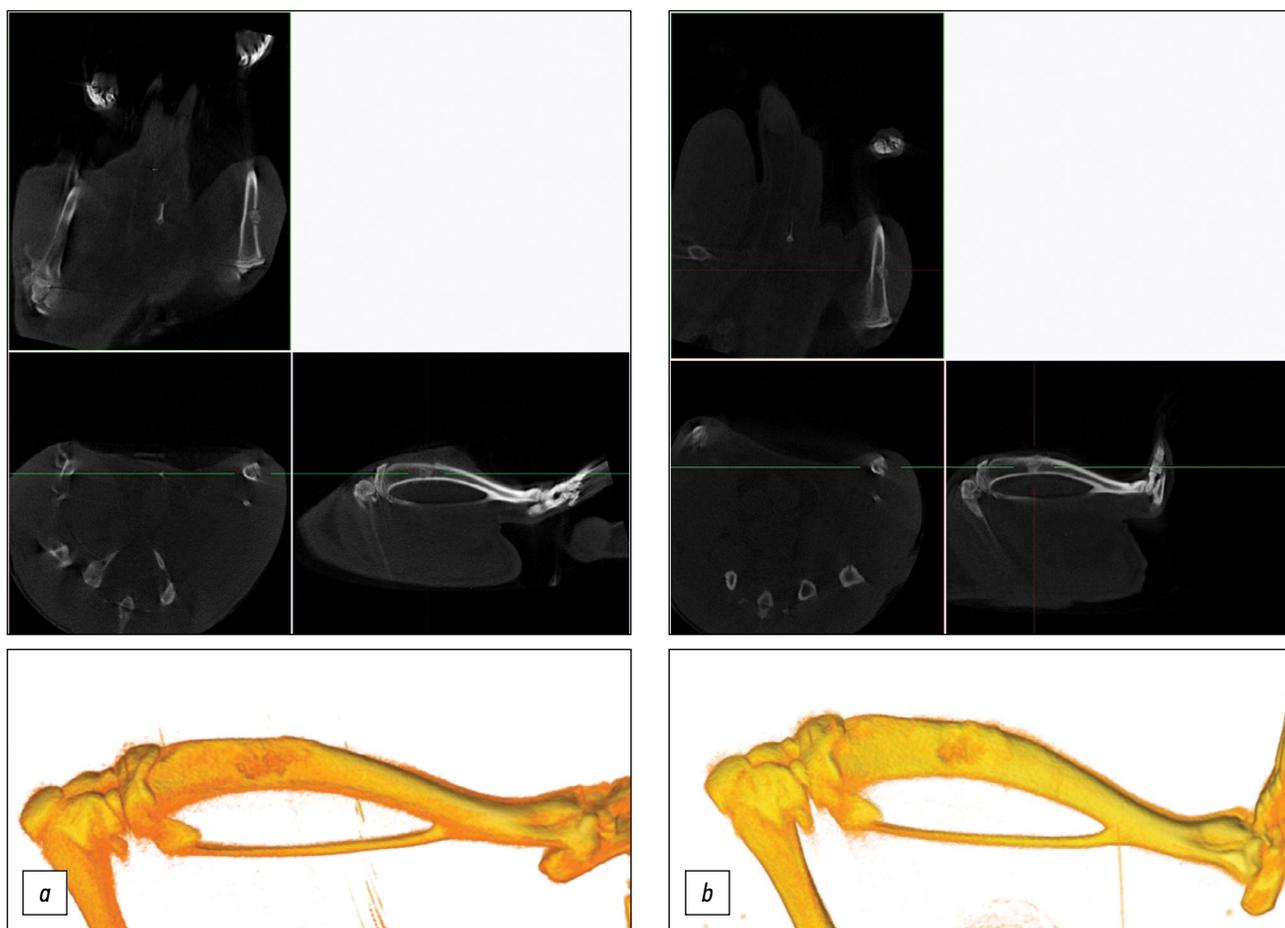


Рис. 6. Ортогональные проекции и 3D-модель большеберцовой кости крысы: *a* — на момент имплантации, *b* — через 30 суток.
Fig. 6. Orthogonal projections and 3D model of the rat tibia: *a* — at the time of implantation, *b* — after 30 days.

В краевых, наиболее зрелых участках вблизи эндостальной поверхности кортикальной пластинки определяются элементы новообразованной незрелой остеонной кости, последняя имеет трабекулярное строение; пластинчатой

кости не выявлено. Также вблизи от реципиентного края выявляются клетки кровяного костного мозга. Ближе к центральной части дефекта новообразованная кость имеет менее зрелый характер по сравнению с краевой

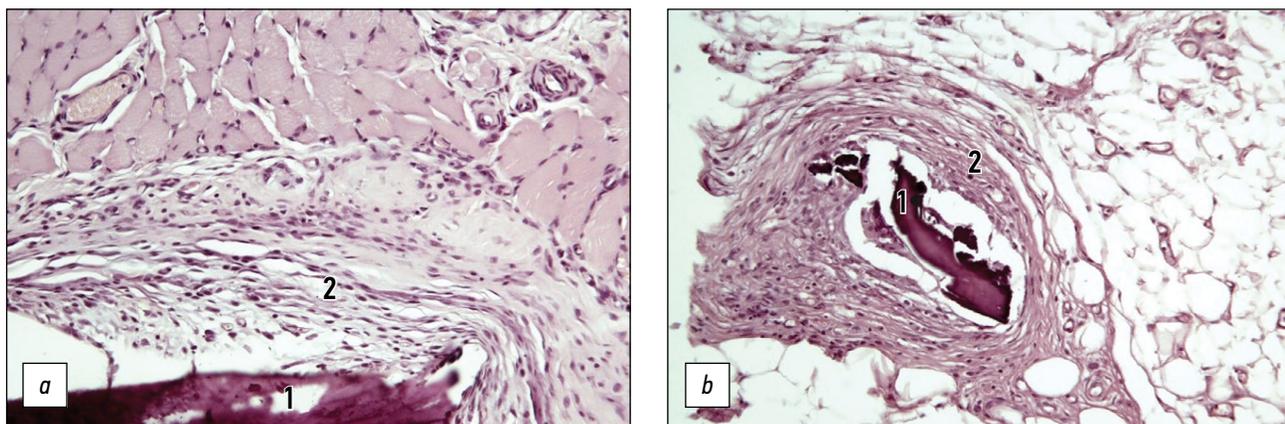


Рис. 7. Гистологическое исследование. Подкожная имплантация. Стандартная световая микроскопия. Увеличение $\times 200$. Окраска гематоксилином-эозином: *a* — на 14-е сутки (1 — фрагмент имплантата, 2 — формирующаяся соединительнотканная капсула, состоящая из двух слоёв); *b* — на 30-е сутки (1 — фрагмент имплантата, 2 — созревающая соединительнотканная капсула и формирующиеся пучки коллагеновых волокон).

Fig. 7. Histological examination. Subcutaneous implantation. Standard light microscopy. Magnification $\times 200$. Hematoxylin-eosin staining: *a* — on the 14th day (1 — implant fragment, 2 — forming connective tissue capsule, consisting of two layers); *b* — on day 30 (1 — implant fragment, 2 — maturing connective tissue capsule and forming bundles of collagen fibers).

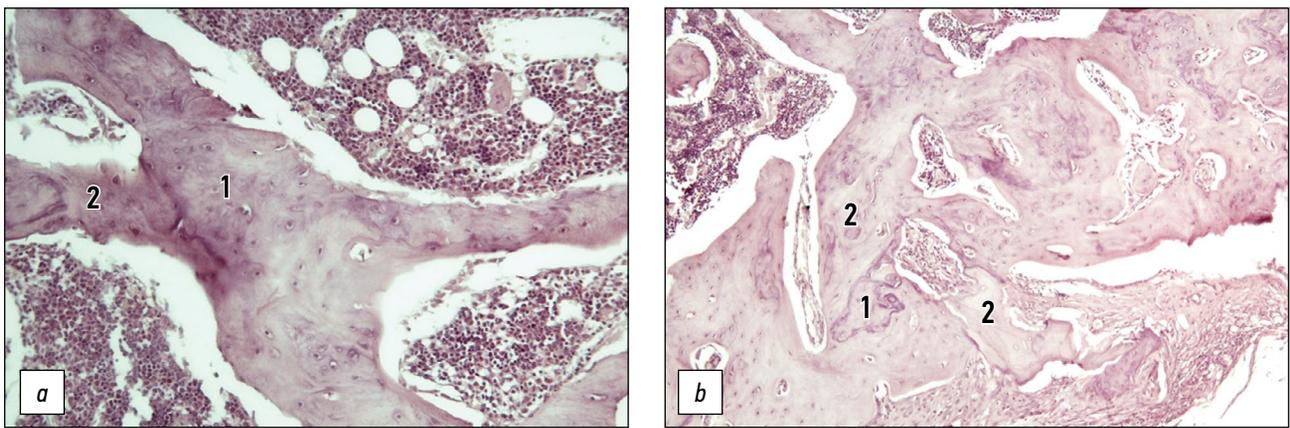


Рис. 8. Гистологическое исследование. Костная имплантация. Стандартная световая микроскопия. Увеличение $\times 200$. Окраска гематоксилином-эозином: *a* — на 14-е сутки (1 — фрагмент имплантата, 2 — новообразованная кость на поверхности имплантата); *b* — на 30-е сутки (1 — фрагмент имплантата, 2 — новообразованная кость).

Fig. 8. Histological examination. Bone implantation. Standard light microscopy. Magnification $\times 200$. Hematoxylin-eosin staining: *a* — on the 14th day (1 — fragment of the implant, 2 — newly formed bone on the surface of the implant); *b* — on day 30 (1 — implant fragment, 2 — newly formed bone).

зоной, фрагменты имплантата покрыты рыхлой соединительной тканью, содержащей гистиоциты и фибробласты, а также сосуды различного калибра. Нейтрофильные лейкоциты не обнаруживаются. Кортикальная пластинка не закрыта, наблюдается формирование интермедиарной костной мозоли (рис. 8*a*).

К 30-м суткам в области костного дефекта отмечаются постепенная резорбция имплантата и формирование относительно зрелых костных структур, постепенно приобретающих пластинчатое строение с формированием остеонов. Также определяется клеточный массив кроветворного костного мозга. К данному сроку исследования дефект практически закрыт за счёт интермедиарной костной мозоли, имплантированный материал встречается в виде отдельных небольших безостеоцитных фрагментов (рис. 8*b*).

Во всех случаях исследования на данных сроках не обнаруживаются признаки воспалительной реакции, не выявляется выраженная лейкоцитарная или гистиоцитарная реакция, отсутствует формирование гигантских многоядерных клеток инородных тел.

Нежелательные явления

В процессе выполнения исследования нежелательных явлений не обнаружено.

ОБСУЖДЕНИЕ

Резюме основного результата исследования

Разработанный протокол обработки ксеносырья подтверждает свою эффективность при различных методах оценки результатов, но использование монотехнологии оценки может не отразить истинное состояние материала. При проведении контроля необходимо применение нескольких методов проверки степени чистоты получаемого имплантата.

Обсуждение основного результата исследования

Предложенный протокол очистки костного матрикса позволяет проводить децеллюляризацию исходного сырья, тем самым снижая риски его отторжения и обеспечивая безопасность имплантации материала. Также установлено, что проведение щадящей очистки без подключения физических методов воздействия не является эффективным методом подготовки имплантатов. Полученные в экспериментах *in vitro* и *in vivo* данные позволяют надеяться на возможность получения изделий высокого качества при внедрении разработанной технологии.

Ограничения исследования

Основным ограничивающим исследование фактором мы считаем небольшое количество включённых в исследование животных, что не позволяет говорить о статистически значимых результатах, что, в свою очередь, негативно сказывается на оценке эффективности имплантатов. Расширение исследований планируется при дальнейшей разработке данной тематики.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы была исследована эффективность протокола очистки ксеногенной спонгиозной костной ткани с использованием сочетания физического и химического воздействий в экспериментах *in vitro* и *in vivo*. Полная очистка межтрабекулярного пространства от кровеносных сосудов, клеточных элементов и сохранение микроархитектоники нативной костной ткани подтверждаются гистологическим и томографическим исследованиями матриксов.

Полученные данные свидетельствуют о том, что очищенный по разработанному протоколу ксеногенный костный матрикс пригоден для адгезии и распластывания

стромальных клеток костного мозга *in vitro*, является био- и цитосовместимым, что наряду со способностью обеспечить пролиферацию и механическую поддержку клеток, объединение их в клеточный пласт в условиях клеточной культуры является важным прогностическим признаком эффективной стимуляции регенеративного остеогенеза в живом организме. Это подтверждают данные гистологического исследования после эксперимента *in vivo*, о чём свидетельствует отсутствие воспалительной реакции в случае имплантации и в мягкие ткани, и в сформированный костный дефект. Образование регенерата происходит от краёв кости, что подтверждает выраженные остеокондуктивные свойства материала; наличие зрелой кости в регенерате и практически полное закрытие дефекта к 30-м суткам говорит о хорошем регенераторном потенциале.

ДОПОЛНИТЕЛЬНО

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства международным критериям ICMJE (все авторы внесли существенный вклад в разработку концепции, проведение исследования и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию перед публикацией). Наибольший вклад распределён следующим образом: Д.В. Смоленцев — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, написание текста и редактирование статьи, оперирование лабораторных животных, проведение микрофотографии; Ю.С. Лукина — обзор литературы, сбор и анализ литературных источников, подготовка и написание текста статьи, проведение микрофотографии;

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pelegrine A.A., Teixeira M.L., Sperandio M., et al. Can bone marrow aspirate concentrate change the mineralization pattern of the anterior maxilla treated with xenografts? A preliminary study // *Contemp Clin Dent*. 2016. Vol. 7, № 1. P. 21–6. doi: 10.4103/0976-237X.177112
2. Barone A., Aldini N.N., Fini M., et al. Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and histomorphometric study // *J Periodontol*. 2008. Vol. 79, № 8. P. 1370–7. doi: 10.1902/jop.2008.070628
3. Brugnami F., Then P.R., Moroi H., et al. GBR in human extraction sockets and ridge defects prior to implant placement: clinical results and histologic evidence of osteoblastic and osteoclastic activities in DFDBA // *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1999. Vol. 19, № 3. P. 259–67.
4. Esposito M., Grusovin M.G., Felice P., et al. The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants — a Cochrane systematic review // *Eur J Oral Implantol*. 2009. Vol. 2, № 3. P. 167–84.
5. Vo T.N., Kasper F.K., Mikos A.G. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration // *Advanced*

Drug Delivery Reviews. 2012. Vol. 64, № 12. P. 1292–1309. doi: 10.1016/j.addr.2012.01.016

6. Belthur M.V., Conway J.D., Jindal G., Ranade A., Herzenberg J.E. Bone graft harvest using a new intramedullary system // *Clin Orthop*. 2008. Vol. 466, № 12. P. 2973–2980. doi: 10.1007/s11999-008-0538-3

Л.Л. Бионышев-Абрамов — сбор и анализ литературных источников, оперирование лабораторных животных, проведение микрофотографии; Н.Б. Сережникова, Г.Н. Берченко — гистологические исследования; А.В. Ковалёв — клеточные испытания.

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования и подготовке публикации.

ADDITIONAL INFO

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с проведённым исследованием и публикацией настоящей статьи.

Author contribution. All authors made a substantial contribution to the conception of the work, acquisition, analysis, interpretation of data for the work, drafting and revising the work, final approval of the version to be published and agree to be accountable for all aspects of the work. D.V. Smolentsev — literature review, collection and analysis of literary sources, writing and editing the article, operating on laboratory animals, conducting microtomography; Yu.S. Lukina — literature review, collection and analysis of literary sources, preparation and writing of the article, conducting microtomography; L.L. Bionyshev-Abramov — collection and analysis of literary sources, operating on laboratory animals, conducting microtomography; N.B. Serezhnikova, G.N. Berchenko — histological studies; A.V. Kovalev — cell tests.

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests.

Drug Delivery Reviews. 2012. Vol. 64, № 12. P. 1292–1309. doi: 10.1016/j.addr.2012.01.016

7. Conway J.D. Autograft and nonunions: morbidity with intramedullary bone graft versus iliac crest bone graft // *Orthop Clin North Am*. 2010. Vol. 41, № 1. P. 75–84. doi: 10.1016/j.ocl.2009.07.006

8. Schwartz C.E., Martha J.F., Kowalski P., Wang D.A., Bode R., Li L., Kim D.H. Prospective evaluation of chronic pain associated with posterior autologous iliac crest bone graft harvest and its effect on postoperative outcome // *Health Qual Life Outcomes*. 2009. Vol. 7. P. 49. doi: 10.1186/1477-7525-7-49

9. Bigham A.S., Dehghani S.N., Shafiei Z., Torabi Nezhad S. Xenogenic demineralized bone matrix and fresh autogenous cortical bone effects on experimental bone healing: radiological, histopathological and biomechanical evaluation // *J Orthop Traumatol*. 2008. Vol. 9, № 2. P. 73–80. doi: 10.1007/s10195-008-0006-6

10. Erkhova L.V., Panov Y.M., Gavryushenko N.S., et al. Supercritical Treatment of Xenogenic Bone Matrix in the Manufacture of Implants for Osteosynthesis // *Russ J Phys Chem B*. 2020. Vol. 14, № 7. P. 1158–1162. doi: 10.1134/S1990793120070064
11. Brydone A.S., Meek D., Maclaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering // *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*. 2010. Vol. 224, № 12. P. 1329–1343. doi: 10.1243/09544119jeim770
12. Thangarajah T., Shahbazi S., Pendegrass C.J., Lambert S., Alexander S., Blunn G.W. Tendon Reattachment to Bone in an Ovine Tendon Defect Model of Retraction Using Allogenic and Xenogenic Demineralised Bone Matrix Incorporated with Mesenchymal Stem Cells // *PLoS One*. 2016. Vol. 11, № 9. P. e0161473. doi: 10.1371/journal.pone.0161473
13. Sackett S.D., Tremmel D.M., Ma F., Feeney A.K., Maguire R.M., Brown M.E., et al. Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived

- from decellularized and delipidized human pancreas // *Sci Rep*. 2018. Vol. 8, № 1. P. 1–16. doi: 10.1038/s41598-018-28857-1
14. Hussey G.S., Dziki J.L., Badylak S.F. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine // *Nat Rev Mater*. 2018. Vol. 3, № 7. P. 159–73. doi: 10.1038/s41578-018-0023-x
15. Keane T.J., Swinehart I.T., Badylak S.F. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance // *Methods*. 2015. Vol. 84. P. 25–34. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.03.005
16. Hillebrandt K.H., Everwien H., Haep N., Keshi E., Pratschke J., Sauer I.M. Strategies based on organ decellularization and recellularization // *Transpl Int*. 2019. Vol. 32, № 6. P. 571–85. doi: 10.1111/tri.13462
17. Nonaka P.N., Campillo N., Uriarte J.J., et al. Effects of freezing/thawing on the mechanical properties of decellularized lungs // *J Biomed Mater Res — Part A*. 2014. Vol. 102, № 2. P. 413–419. doi: 10.1002/jbm.a.34708

REFERENCES

1. Pelegrine AA, Teixeira ML, Sperandio M, et al. Can bone marrow aspirate concentrate change the mineralization pattern of the anterior maxilla treated with xenografts? A preliminary study. *Contemp Clin Dent*. 2016;7(1):21–6. doi: 10.4103/0976-237X.177112
2. Barone A, Aldini NN, Fini M, et al. Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and histomorphometric study. *J Periodontol*. 2008;79(8):1370–7. doi: 10.1902/jop.2008.070628
3. Brugnami F, Then PR, Moroi H, et al. GBR in human extraction sockets and ridge defects prior to implant placement: clinical results and histologic evidence of osteoblastic and osteoclastic activities in DFDBA. *Int J Periodontics Restorative Dent*. 1999;19(3):259–67.
4. Esposito M, Grusovin MG, Felice P, et al. The efficacy of horizontal and vertical bone augmentation procedures for dental implants — a Cochrane systematic review. *Eur J Oral Implantol*. 2009;2(3):167–84.
5. Vo TN, Kasper FK, Mikos AG. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 2012;64(12):1292–1309. doi: 10.1016/j.addr.2012.01.016
6. Belthur MV, Conway JD, Jindal G, Ranade A, Herzenberg JE. Bone graft harvest using a new intramedullary system. *Clin Orthop*. 2008;466(12):2973–2980. doi: 10.1007/s11999-008-0538-3
7. Conway JD. Autograft and nonunions: morbidity with intramedullary bone graft versus iliac crest bone graft. *Orthop Clin North Am*. 2010;41(1):75–84. doi: 10.1016/j.ocl.2009.07.006
8. Schwartz CE, Martha JF, Kowalski P, Wang DA, Bode R, Li L, Kim DH. Prospective evaluation of chronic pain associated with posterior autologous iliac crest bone graft harvest and its effect on postoperative outcome. *Health Qual Life Outcomes*. 2009;7:49. doi: 10.1186/1477-7525-7-49
9. Bigham AS, Dehghani SN, Shafiei Z, Torabi Nezhad S. Xenogenic demineralized bone matrix and fresh autogenous cortical bone effects on experimental bone healing: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *J Orthop Traumatol*. 2008;9(2):73–80. doi: 10.1007/s10195-008-0006-6
10. Erkhova LV, Panov YM, Gavryushenko NS, et al. Supercritical Treatment of Xenogenic Bone Matrix in the Manufacture of Implants for Osteosynthesis. *Russ J Phys Chem B*. 2020;14(7):1158–1162. doi: 10.1134/S1990793120070064
11. Brydone AS, Meek D, Maclaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*. 2010;224(12):1329–1343. doi: 10.1243/09544119jeim770
12. Thangarajah T, Shahbazi S, Pendegrass CJ, Lambert S, Alexander S, Blunn GW. Tendon Reattachment to Bone in an Ovine Tendon Defect Model of Retraction Using Allogenic and Xenogenic Demineralised Bone Matrix Incorporated with Mesenchymal Stem Cells. *PLoS One*. 2016;11(9):e0161473. doi: 10.1371/journal.pone.0161473
13. Sackett SD, Tremmel DM, Ma F, Feeney AK, Maguire RM, Brown ME, et al. Extracellular matrix scaffold and hydrogel derived from decellularized and delipidized human pancreas. *Sci Rep*. 2018;8(1):1–16. doi: 10.1038/s41598-018-28857-1
14. Hussey GS, Dziki JL, Badylak SF. Extracellular matrix-based materials for regenerative medicine. *Nat Rev Mater*. 2018;3(7):159–73. doi: 10.1038/s41578-018-0023-x
15. Keane TJ, Swinehart IT, Badylak SF. Methods of tissue decellularization used for preparation of biologic scaffolds and in vivo relevance. *Methods*. 2015;84:25–34. doi: 10.1016/j.ymeth.2015.03.005
16. Hillebrandt KH, Everwien H, Haep N, Keshi E, Pratschke J, Sauer IM. Strategies based on organ decellularization and recellularization. *Transpl Int*. 2019;32(6):571–85. doi: 10.1111/tri.13462.
17. Nonaka PN, Campillo N, Uriarte JJ, et al. Effects of freezing/thawing on the mechanical properties of decellularized lungs. *J Biomed Mater Res — Part A*. 2014;102(2):413–419. doi: 10.1002/jbm.a.34708

ОБ АВТОРАХ

*** Смоленцев Дмитрий Владимирович;**

адрес: Россия, 127299, г. Москва, ул. Приорова, д. 10;
ORCID: 0000-0001-5386-1929;
eLibrary SPIN: 3702-1955;
e-mail: smolentsevdv@cito-priorov.ru

Лукина Юлия Сергеевна, канд. тех. наук;

ORCID: 0000-0003-0121-1232;
eLibrary SPIN: 2814-7745;
e-mail: lukina_rctu@mail.ru

Бионышев-Абрамов Леонид Львович;

ORCID: 0000-0002-1326-6794;
e-mail: sity-x@bk.ru

Сережникова Наталья Борисовна, канд. биол. наук;

ORCID: 0000-0002-4097-1552;
eLibrary SPIN: 2249-9762;
e-mail: natalia.serj@yandex.ru

Ковалёв Алексей Вячеславович, канд. мед. наук;

ORCID: 0000-0003-1277-5228;
eLibrary SPIN: 2413-5980;
e-mail: kovalevav@cito-priorov.ru

Берченко Геннадий Николаевич, д-р мед. наук;

ORCID: 0000-0002-7920-0552;
eLibrary SPIN: 3367-2493;
e-mail: berchenkogn@cito-priorov.ru

AUTHORS' INFO

*** Dmitriy V. Smolentsev;**

address: 10 Priorova str., 127299, Moscow, Russia;
ORCID: 0000-0001-5386-1929;
eLibrary SPIN: 3702-1955;
e-mail: smolentsevdv@cito-priorov.ru

Yulia S. Lukina, Cand. Sci. (Tech.);

ORCID: 0000-0003-0121-1232;
eLibrary SPIN: 2814-7745;
e-mail: lukina_rctu@mail.ru

Leonid L. Bionyshev-Abramov;

ORCID: 0000-0002-1326-6794;
e-mail: sity-x@bk.ru

Natalya B. Serejnikova, Cand. Sci. (Biol.);

ORCID: 0000-0002-4097-1552;
eLibrary SPIN: 2249-9762;
e-mail: natalia.serj@yandex.ru

Alexey V. Kovalev, MD, Cand. Sci. (Med.);

ORCID: 0000-0003-1277-5228;
eLibrary SPIN: 2413-5980;
e-mail: kovalevav@cito-priorov.ru

Gennadiy N. Berchenko, MD, Dr. Sci. (Med.);

ORCID: 0000-0002-7920-0552;
eLibrary SPIN: 3367-2493;
e-mail: berchenkogn@cito-priorov.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author