

DOI: <https://doi.org/10.17816/vto634164>

Сравнительный анализ эффективности протоколов очистки костного матрикса

Д.В. Смоленцев¹, Ю.С. Лукина^{1,2}, Л.Л. Бионышев-Абрамов¹, Н.Б. Сержникова^{1,3}, М.Г. Васильев¹

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

² Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, Москва, Россия;

³ Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия

АННОТАЦИЯ

Обоснование. Данная статья описывает протокол очистки ксеногенного костного матрикса, испытанный коллективом авторов в статье «Определение эффективности протокола децеллюляризации ксеногенного костного матрикса в исследованиях *in vitro* и *in vivo*» (результаты испытаний были описаны в журнале «Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова», 2023, том 30, № 4, с. 435–447, doi: <https://doi.org/10.17816/vto622849>).

Цель. Провести сравнительный анализ методов физической и химической очистки ксеногенной спонгиозной костной ткани посредством томографического, морфологического исследований.

Материалы и методы. Ксеногенную спонгиозную ткань бедренных костей крупного рогатого скота фрагментировали до размеров 10×10×10 мм и обрабатывали водой, гипертоническим, гипотоническим растворами и 3% или 6% раствором перекиси водорода в различных сочетаниях. Затем применяли глубокую вторичную очистку органическими растворителями или методом сверхкритической флюидной экстракции, после чего проводили ЯМР ¹H с целью определения следов реагентов. Эффективность оптимального протокола определяли с помощью гистологического и томографического исследований с расчётом коэффициента очистки по денситометрическим показателям.

Результаты. В соответствии с расчётным по денситометрическим показателям коэффициентом очистки, межтрабекулярное пространство костной ткани после воздействия проточной водой и гипо- и гипертоническими растворами с последующей очисткой 3% раствором H₂O₂ недостаточно очищено, гистологический анализ показал наличие от 0 до 60% остеоцитов для разных протоколов очистки. При замене на 6% раствор H₂O₂ коэффициент очистки выше, однако наблюдается деструкция костной ткани. Дополнительная глубокая очистка позволяет добиться высокой степени очистки при сохранности структуры, но при применении органических растворителей их следы обнаруживаются в матриксе, в связи с чем более эффективным является использование сверхкритической флюидной экстракции.

Заключение. Последовательное использование проточной воды, 0,5% раствора NaCl, 3% раствора H₂O₂ с последующей обработкой в ск-СО₂ является эффективным протоколом очистки ксеногенной спонгиозной костной ткани.

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

Как цитировать:

Смоленцев Д.В., Лукина Ю.С., Бионышев-Абрамов Л.Л., Сержникова Н.Б., Васильев М.Г. Сравнительный анализ эффективности протоколов очистки костного матрикса // Вестник травматологии и ортопедии им. Н.Н. Приорова. 2024. Т. 31, № 3. С. 367–380. DOI: <https://doi.org/10.17816/vto634164>

DOI: <https://doi.org/10.17816/vto634164>

Comparative analysis of the effectiveness of bone matrix purification protocols

Dmitriy V. Smolentsev¹, Yulia S. Lukina^{1,2}, Leonid L. Bionyshev-Abramov¹,
Natalya B. Serezhnikova^{1,3}, Maksim G. Vasiliev¹

¹ N.N. Priorov National Medical Research Center of Traumatology and Orthopedics, Moscow, Russia;

² Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia;

³ Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

ABSTRACT

BACKGROUND: This article describes the protocol for the purification of xenogenic bone matrix tested by a team of authors in the article «Determining the effectiveness of a xenogeneic bone matrix decellularization protocol in in vitro and in vivo studies» (the test results were described in the journal *N.N. Priorov Journal of Traumatology and Orthopedics*. 2023;30(4):431–443, doi: <https://doi.org/10.17816/vto622849>).

AIM: To conduct a comparative analysis of methods of physical and chemical purification of xenogeneic spongy bone tissue by tomographic and morphological studies.

MATERIALS AND METHODS: Xenogenic bovine femoral spongiosa tissue was fragmented to the size of 10×10×10 mm and treated with water, hypertonic, hypotonic, hypotonic solutions, and 3% or 6% hydrogen peroxide solution in various combinations. Deep secondary purification with organic solvents or supercritical fluid extraction was then applied, followed by ¹H NMR to determine traces of reagents. The efficiency of the optimal protocol was determined by histologic and tomographic studies with calculation of the purification factor by densitometric indices.

RESULTS: In accordance with the purification coefficient calculated by densitometric indicators, the intertrabecular space of bone tissue after exposure to flowing water and hypo- and hypertonic solutions followed by cleaning with a 3% H₂O₂ solution is not sufficiently purified; histological analysis showed the presence of 0 to 60% osteocytes for different cleaning protocols. When replaced with a 6% H₂O₂ solution, the purification coefficient was higher, but bone destruction was observed. Additional deep purification allows a high purification rate while preserving the structure, but when organic solvents are used, their traces are detected in the matrix; therefore, the use of supercritical fluid extraction is more effective.

CONCLUSION: The sequential use of flowing water, 0.5% NaCl solution, 3% H₂O₂ solution followed by sc-CO₂ treatment is an effective protocol for the purification of xenogeneic spongy bone tissue.

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

To cite this article:

Smolentsev DV, Lukina YS, Bionyshev-Abramov LL, Serezhnikova NB, Vasiliev MG. Comparative analysis of the effectiveness of bone matrix purification protocols. *N.N. Priorov Journal of Traumatology and Orthopedics*. 2024;31(3):367–380. DOI: <https://doi.org/10.17816/vto634164>

Received: 09.07.2024

Accepted: 16.07.2024

Published online: 08.08.2024

ОБОСНОВАНИЕ

Применение остеопластических материалов, направленных на увеличение объёма собственной кости и на закрытие костных дефектов, уже давно вошло в ежедневную практику ортопедов, нейрохирургов, челюстно-лицевых хирургов и стоматологов. До 5% переломов, 20% высокоэнергетических травм и зачастую плановые ортопедические процедуры, например, спондилодез, приводят к несращениям [1, 2]. Текущий золотой стандарт лечения костных дефектов — аутогенная кость, полученная прежде всего из подвздошного гребня пациента или иных локализаций, таких как вертельная зона бедра, бугристая большеберцовой кости [3–5]. Несмотря на свою иммуносовместимость, костный аутоотрансплантат может быть взят в ограниченном количестве и вызывать сопутствующую заболеваемость (болезненность) донорского участка [6–8]. Аллогенная и ксеногенная костная ткань — альтернативные биологические материалы для лечения костной ткани [3, 8, 9].

Для достижения биосовместимости материала, отсутствия отторжений при получении костного матрикса необходимо решить проблему полного удаления антигенов из исходного материала. Однако грубая обработка снижает и потенциальные положительные свойства имплантатов. Для сохранения одного из важнейших свойств костных имплантатов, остеокондукции, необходимо сохранение микроархитектоники кости, заряда её поверхности, шероховатости и полного удаления клеток костного мозга и жира (чужеродных клеток, включая клетки красного и жёлтого костного мозга животных). Нативная структура создаёт подходящую среду для клеточного функционирования и дифференцировки [10]. Децеллюляризация — это техника удаления клеток и иммуногенных веществ из тканей, сохраняя при этом естественный внеклеточный матрикс [11, 12], в процессе которой используется химическое, ферментативное или механическое разрушение. Протоколы децеллюляризации разрабатываются с учётом таких факторов, как плотность ткани, клеточность и наличие липидов, что особенно важно для костной ткани, содержащей жиры, для которой децеллюляризация сочетается со стадией делипидизации [13, 14]. Децеллюляризованный костный матрикс содержит факторы роста, фибронектин, гепаринсульфат, хондроитинсульфат и гиалуроновую кислоту, которые индуцируют дифференцировку мезенхимальных стволовых клеток в остеобласты [15].

В процессе децеллюляризации происходит некоторое нарушение структуры костного матрикса. Для создания идеальных материалов необходимо стабильное состояние между поддержанием структуры матрикса и удалением клеточного компонента [16], что является основной проблемой.

Точная и полная децеллюляризация невозможна, поэтому эффективная децеллюляризация должна максимизировать изъятие клеточных компонентов

и генетического материала, сводя к минимуму разрушение структуры матрикса, что позволит сохранить биологическую активность и специфические биомеханические характеристики [17].

Конкретные процедуры децеллюляризации варьируют и могут включать комбинацию физических, ферментативных и химических процессов. Физическая децеллюляризация является наименее разрушительным её методом, при этом большинство компонентов и структуры внеклеточного матрикса остаются нетронутыми после воздействий [18]. В качестве физических методов воздействия применяются УЗ-воздействие (патент РФ № 2166252), воздействия центробежной силы (патент РФ № 2172104), воздействия магнитного поля (патент РФ № 2223104). Однако сама по себе физическая децеллюляризация не может полностью удалить клеточный детрит (фрагменты клеток) из ткани. Часто её используют в сочетании с дополнительными химическими или ферментативными методами [19]. Так, применение ферментных препаратов наряду с другими предлагается для депротенизации путём ферментации в 2–5% растворе трипсина (патент РФ № 2301633) или в 0,01% растворе хемотрипсина (патент РФ № 2223104). Среди химических растворителей наибольшей популярностью обладают 6–10% растворы перекиси водорода, спиртоэфирные растворы (патенты РФ № 2166252, № 2172104, № 2223104, № 2377959).

Для подтверждения эффективной децеллюляризации необходимо учитывать как минимум три характеристики в соответствии с Р.М. Сгаро и соавт. [20]:

- один миллиграмм обезвоженных децеллюляризованных тканей должен содержать менее 50 наногرامмов двухцепочечной ДНК;
- длину всех оставшихся фракций ДНК должны составлять менее 200 пар оснований;
- децеллюляризованные образцы не должны иметь ясного ядра при окрашивании гематоксилином и эозином, а также при окрашивании DAPI.

Помимо количественного определения оставшегося клеточного материала важна оценка макроскопических и микроскопических изменений в структуре, для чего могут быть использованы методы микроскопии [21], микрокомпьютерной томографии [22, 23].

В настоящее время в тканевых банках используют сочетание физических, химических и биологических методов для достижения наилучшего клеточного эффекта. В рамках нашей научной работы ставилась задача разработать эффективный протокол очистки ксеногенной костной ткани, используя сравнительный метод анализа по результатам комплексного исследования костного материала, включая гистологическую и микротомографическую (микро-КТ) оценки. Микротомографическое исследование является стандартным инструментом для визуализации структуры костной ткани. Однако микро-КТ может служить скрининговым инструментом оценки очистки костной ткани посредством расчёта денситометрических

показателей межтрабекулярного пространства. В работе предложен метод оценки чистоты межтрабекулярного пространства, что ранее не применялось другими исследователями, по крайней мере в известных нам литературных источниках.

Цель исследования — провести сравнительный анализ методов физической и химической очистки ксеногенной спонгиозной костной ткани посредством томографического, морфологического исследований.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объект исследования

Объектом исследования являлась ксеногенная ткань бедренных костей крупного рогатого скота в возрасте 24 месяцев, приобретённая на мясокомбинате «Останкино» (Москва, Россия). После транспортировки в охлаждённом виде кости хранили при температуре -20°C в морозильной камере MDF-794 (San'yo, Япония) для поддержания остеоиндуктивного потенциала. Перед очисткой кости были разморожены, спонгиозная кость отбрана и фрагментирована до размеров $10 \times 10 \times 10$ мм с использованием ленточной пилы КТ-210 («КТ Сервис», Россия).

Дизайн исследования

Исследование включало два этапа:

- сравнение методик первичной очистки (гипертонический, гипотонический растворы и растворы перекиси водорода разной концентрации в различных сочетаниях);
- сравнение методик глубокой (вторичной) очистки смесью органических растворителей (этанол-хлороформ, гексан-пропанол) с последующим удалением их вакуумированием в течение 5 часов и очистки с помощью технологии сверхкритической флюидной экстракции.

Режимы первичной очистки

Первичная очистка включала две стадии:

- воздействие гипертоническим (7% раствор хлорида натрия) («ЛенРеактив», хч, Россия), или гипотоническим раствором (0,5% раствор хлорида натрия), или проточной водой в течение 4 часов при комнатной температуре на орбитальном шейкере PSU-20i (BioSan, Латвия) при 120 оборотах в минуту в вакууме с использованием эксикатора и вакуумного насоса. Соотношение объёма жидкости к объёму материала (V жидкости/ V материала)=10:1;
- воздействие низкоконцентрированным (3%) или высококонцентрированным (6%) раствором перекиси водорода медицинской (ОАО «Самарамедпром», Россия) в ультразвуковой ванне ПСБ-12035-05 («ПСБ-Галс», Россия) при температуре 40°C в течение 8 часов.

Обозначение методики очистки с указанием воздействия приведено в табл. 1.

Режимы глубокой очистки

Глубокая очистка применялась к материалу, очищенному согласно протоколу, разработанному по результатам первого этапа исследования. Первичная очистка состояла из последовательного воздействия проточной водой (V воды/ V материала=10:1) в течение 4 часов и гипотонического раствора в течение 2 часов на встряхивающем столе при 120 оборотах в минуту в вакууме при комнатной температуре с последующей обработкой в 3% растворе перекиси водорода в ультразвуке при температуре 40°C в течение 8 часов. Для глубокой очистки использовались смеси органических растворителей (этанол-хлороформ, гексан-пропанол) с соотношением 50:50 по объёму при комнатной температуре в течение 24 часов с последующим удалением их вакуумированием в течение 5 часов или технология сверхкритической флюидной экстракции, проводимая на установке Waters-5000 (Waters, США)

Таблица 1. Методики очистки ксеногенного костного матрикса

Table 1. Methods of purification of xenogenic bone matrix

Номер методики \ Реагенты	7% раствор NaCl	0,5% раствор NaCl	H ₂ O прот.	3% раствор H ₂ O ₂ +УЗ	6% раствор H ₂ O ₂ +УЗ
1-1	+			+	
1-2	+				+
2-1		+		+	
2-2		+			+
3-1			+	+	
3-2			+		+

Примечание. H₂O прот. — проточная вода, H₂O₂ — перекись водорода медицинская, УЗ — ультразвуковая ванна.

Note. H₂O прот. — running water, H₂O₂ — hydrogen peroxide medical, УЗ — ultrasonic bath.

Таблица 2. Методики глубокой очистки ксеногенного костного матрикса**Table 2.** Methods of deep purification of xenogenic bone matrix

Номер методики	Реагенты	
	ск-СО ₂	Органические растворители
4-1	–	Этанол, хлороформ
4-2	–	Гексан, пропанол
4-3	+	–

при давлении 450 Бар, температуре +35 °С, скорости потока ск-СО₂ 2±0,5 мл/мин в течение 8 часов.

Обозначение методики очистки с реагентами воздействия указано в табл. 2.

Микротомографическое исследование

Сканирование образцов выполнено на рентгеновском микротомографе Bruker SkyScan 1172 (Bruker Belgium, Бельгия) в режиме, указанном с помощью программного 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 MarchingCube, который является алгоритмом построения поверхности на основе модели явного задания шестигранных вокселей, разработанной Лоренсенем и Клайном (1987).

Денситометрическое исследование

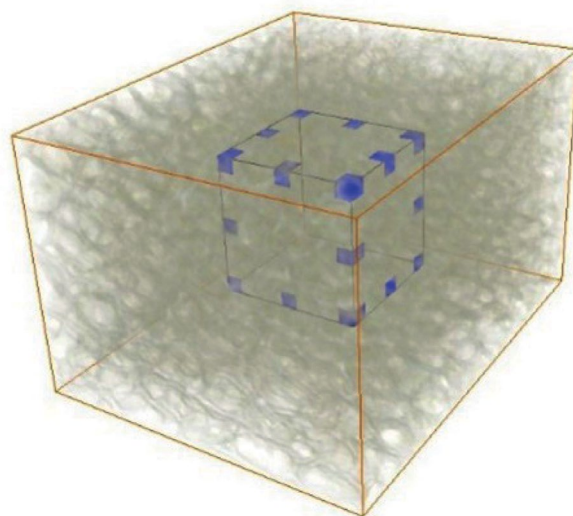
Денситометрическое исследование проведено на тех же образцах при выборе зоны интереса 5×5×5 мм, расположенной в центральной части образца, с помощью программы СТАп 1.20.3.0 (рис. 1).

Плотность по шкале Хаунсфилда (HU) была определена для объёма куба. Количество измерений на каждый метод очистки равно десяти. Результаты денситометрии оценивались в соответствии с табл. 3.

Результаты денситометрического исследования представлены в виде соотношения веществ/биоткани

Таблица 3. Диапазон плотности для вещества/ткани**Table 3.** 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

**Рис. 1.** Зона интереса для расчёта денситометрических показателей.**Fig. 1.** Area of interest for the calculation of densitometric parameters.

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:

$$K_{оч.} = \frac{V_{\text{воздуха}}}{V_{\text{ткани межтрабекулярного пространства}}}$$

Гистологическое исследование

Все образцы фиксировали в нейтральном формалине, декальцинировали, обезвоживали, заливали в парафин, получали срезы толщиной 4 микрона, окрашивали гематоксилином-эозином и пикросириусом красным. Изучали при стандартной световой, фазово-контрастной и поляризационной микроскопии в микроскопе Leica DM 4000 B LED (Leica Microsystems Wetzlar GmbH, Германия) с камерой Leica DFC 7000 T.

Морфологический анализ содержания остеоцитов в костной ткани был основан на характерных морфологических особенностях этих клеток и их специфическом расположении и не требовал дополнительного иммуногистохимического исследования. Остеоциты — основные клетки костной ткани овальной формы, с уплощёнными

ядрами и многочисленными отростками, лежащие в особых полостях межклеточного вещества — костных лакунах.

Морфометрический анализ содержания костных лакун с оставшимися после обработки клеточными ядрами остеоцитов был выполнен на 100 тыс. мкм² площади образцов ксенокости в программе ImageJ при увеличении $\times 200$ в 10 полях зрения для каждого образца. Данные представлены в виде средних значений и ошибок среднего. Статистический анализ проводился с использованием программного обеспечения GraphPadPrism 9.0.0. Значимость различий оценивали с помощью однофакторного анализа ANOVA с тестом множественного сравнения Тьюки. Значения $p \leq 0,05$ считались статистически значимыми.

Спектроскопия ядерного магнитного резонанса

Качественное определение остаточных количеств растворителей после финального обезжиривания проводили методом ядерного магнитного резонанса (ЯМР ¹H), используя в качестве внутреннего стандарта бензол (спектры ЯМР ¹H зарегистрированы на спектрометре Bruker Advance-400 (BrukerBioSpin GmbH, Германия), рабочая частота 400 МГц, в C₆D₅H). Образцы для ЯМР готовили путём экстракции матрикса размером 10×7×3 мм в 3 мл бензола

в закупоренных виалах в шейкере-инкубаторе без нагревания при скорости вращения 120 rpm в течение 10 суток, центрифугирования и упаривания экстракта в вакууме. Остаток растворяли в 0,6 мл C₆D₅H. В пробирку для ЯМР, содержащую приблизительно 0,4 мл дейтерированного растворителя, добавляли 3 мкл образца экстрагированного раствора.

Статистический анализ

Применялся для анализа остеоцитов и указан в разделе статьи «Гистологическое исследование».

Этическая экспертиза

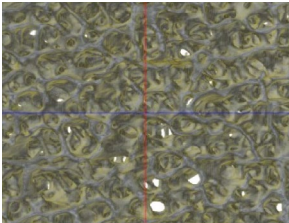
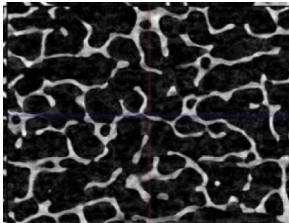
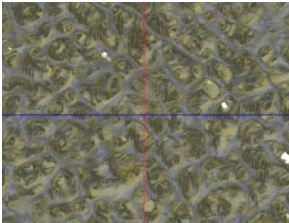
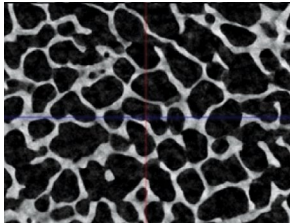
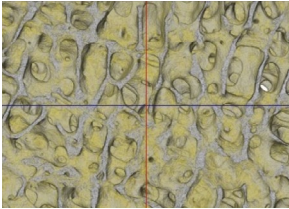
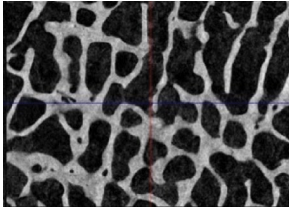
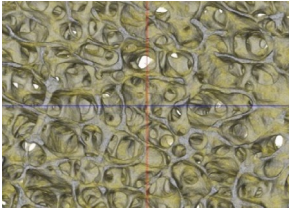
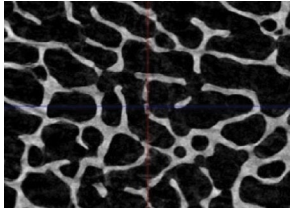
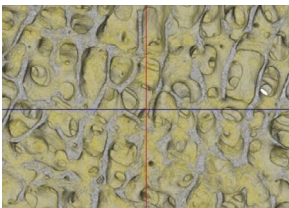
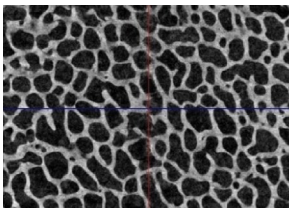
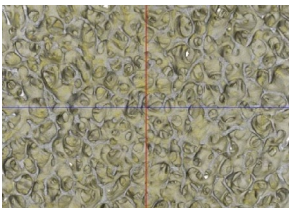
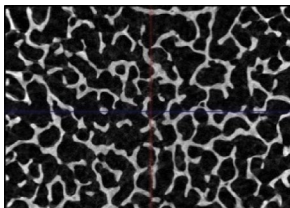
В данной работе этическая экспертиза не требовалась ввиду отсутствия воздействия на живые организмы в процессе исследования.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В соответствии с результатами микротомографического исследования (табл. 4), макроскопических изменений в трабекулярной костной структуре после воздействия в соответствии с указанными выше протоколами очистки не наблюдалось. Сохранность костной структуры отчётливо подтверждается результатами гистологического

Таблица 4. Результаты томографического исследования

Table 4. The results of the tomographic examination

3D-реконструкция	Микро-КТ срез	3D-реконструкция	Микро-КТ срез
1-1		1-2	
			
2-1		2-2	
			
3-1		3-2	
			

исследования при использовании фазово-контрастной и поляризационной микроскопии (табл. 5).

У образцов 1-1 и 3-1 костные трабекулы обычной толщины формировали ячеистую сеть, что характерно для нормальной губчатой кости. Во всех остальных

образцах присутствовали признаки нарушения микро-структуры и архитектоники костной ткани с увеличением площади межтрабекулярного пространства: костные трабекулы становились тоньше, были более рыхло и параллельно расположены, появлялось много мелких трабекул.

Таблица 5. Микроскопия образцов ксеногенного костного матрикса

Table 5. Microscopy of xenogenic bone matrix samples


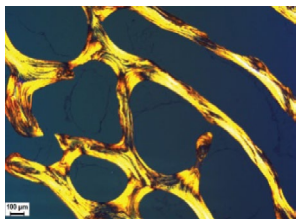
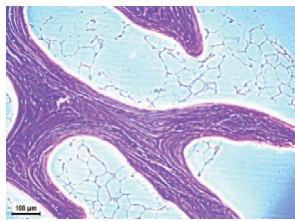
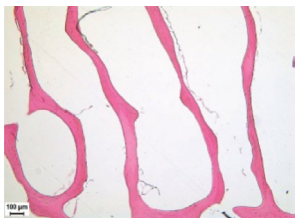
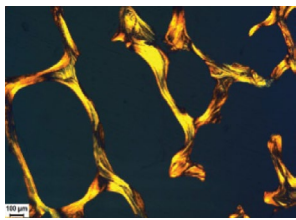
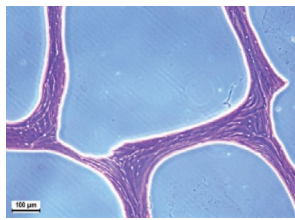
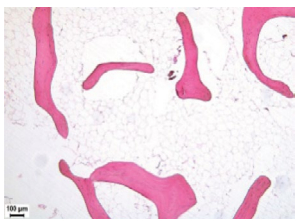
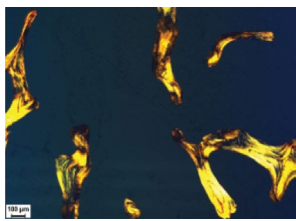
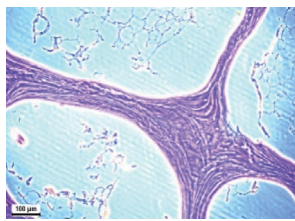
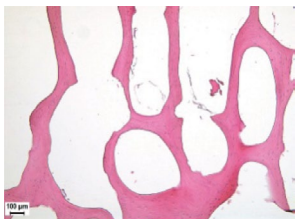
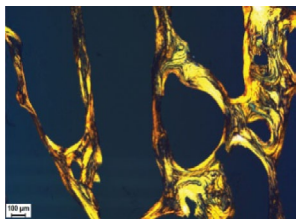
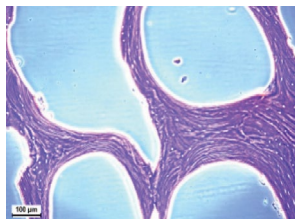
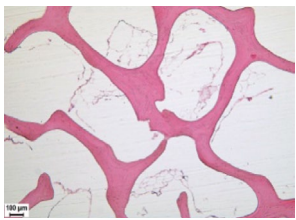
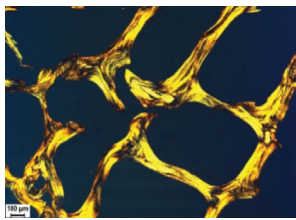
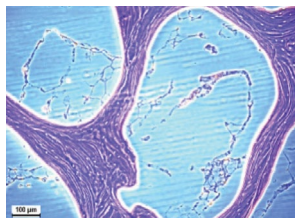
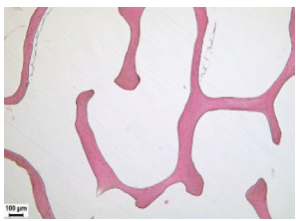
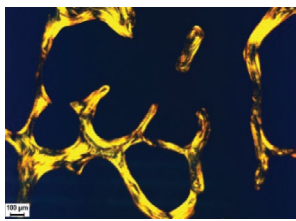
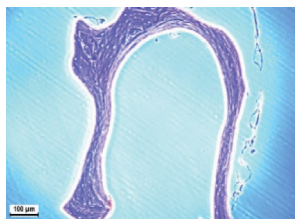
Номер методики	Светлопольная микроскопия, гематоксилин-эозин, увеличение $\times 50$	Поляризационная микроскопия, пикросириус красный, увеличение $\times 50$	Фазово-контрастная микроскопия, гематоксилин-эозин, увеличение $\times 100$
1-1			
1-2			
2-1			
2-2			
3-1			
3-2			

Таблица 6. Морфологические параметры образцов ксеногенной костной ткани

Table 6. Morphological parameters of xenogenic bone tissue samples

Номер методики	Костная структура	Расположение трабекул	Трабекулы	Жировые клетки/оболочки жировых клеток	Кровеносные сосуды
1-1	Сохранена	Нормальное	Нормальные	Сохранены	Нет
1-2	Сохранена	Рыхлое, параллельно расположенные	Тонкие	Сохранены	Есть
2-1	Сохранена	Рыхлое	Мелкие	Сохранены	Нет
2-2	Сохранена	В некоторых участках рыхлое, есть параллельно расположенные	Тонкие	Сохранены	Нет
3-1	Сохранена	Нормальное	Нормальные	Сохранены	Нет
3-2	Сохранена	Рыхлое	Тонкие	Сохранены	Нет

В соответствии с морфологическими параметрами образцов (табл. 6), очищенных по применяемым методикам, в незначительной части лакун сохранялись остециты, мембраны адипоцитов (жировых клеток) костного мозга, в одном из образцов наблюдались кровеносные сосуды.

ОБСУЖДЕНИЕ

Таким образом, при воздействии гипертонического раствора хорошо сохраняются костные трабекулы, которые формируют ячеистую сеть, характерную для нормальной губчатой кости, однако гипертонический раствор хуже остальных влияет на вымывание остецитов. Гипертонический раствор отделяет ДНК от белков [24, 25]. Гипотонические растворы могут легко вызывать лизис клеток с помощью простых осмотических эффектов с минимальными изменениями молекул матрикса и архитектуры в соответствии с литературными данными [25]. Однако при четырёхчасовом воздействии гипотоническим раствором отмечались незначительные нарушения структуры: костные трабекулы становились тоньше, были более рыхло и параллельно расположены. Всё это в итоге может привести к снижению костной плотности, упругости и эластичности с последующим повышением ломкости кости. В соответствии с литературными данными,

гипо- и гипертонические растворы эффективно лизируют клетки, но неэффективно удаляют клеточные остатки [20]. Воздействие проточной водой хорошо сохраняет костные трабекулы, оставляя наименьшее количество остецитов в межтрабекулярном пространстве (табл. 7). Сохранность жировых клеток в результате первичной очистки в водных растворах указывает на недостаточно эффективную делипидизацию и требует дополнительных методов очистки.

Предложенный скрининговый метод определения коэффициента очистки по денситометрической плотности, определённой по результатам микро-КТ, даёт возможность быстро оценить степень очистки межтрабекулярного пространства. Этот метод является грубым 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. Межтрабекулярное пространство, заполненное ретикулярной и жировой тканью, освобождается в процессе очистки, заполняясь воздухом. При расчёте коэффициента очистки минерализованный компонент кости не учитывался, поскольку его количество в объёме связано с удалённостью от надкостницы и уменьшается от периферии к костномозговому каналу. В соответствии с расчётным по денситометрическим показателям коэффициентом очистки межтрабекулярное

Таблица 7. Морфологический анализ содержания остецитов

Table 7. Morphological analysis of osteocyte content

Номер методики	Процент содержания костных лакун с оставшимися после обработки ядрами остецитов от общего числа лакун в образце	Количество костных лакун с оставшимися ядрами остецитов в костной ткани (шт/100 тыс. мкм ² образца)
1-1	34,0±4,1	13,6±1,7
1-2	7,7±1,1	3,3±0,5
2-1	25,9±3,7	10,7±1,5
2-2	7,7±1,5	3,3±0,7
3-1	12,6±2,3	4,5±0,8
3-2	5,2±1,3	2,8±0,7

Таблица 8. Соотношение веществ/биотканей в объёме образцов (%) и коэффициент очистки**Table 8.** The ratio of substances/biological tissues in the volume of samples (%) and the purification coefficient

Вещество/биоткань \ Номер методики	1-1	1-2	2-1	2-2	3-1	3-2
Воздух	17,4	18,9	12,0	27,7	8,5	21,9
Ткань межтрабекулярного пространства	72,1	56,5	73,1	66,5	79,0	66,6
Минерализованный компонент кости	10,5	24,6	14,9	5,8	12,6	11,6
Коэффициент очистки	0,24±0,05	0,33±0,06	0,16±0,04	0,42±0,06	0,11±0,04	0,33±0,06

пространство костной ткани после воздействия проточной водой и гипо- и гипертоническими растворами заполнено в меньшей степени воздухом и в большей — иными веществами (возможно, клеточными остатками ретикулярной и жировой ткани) (табл. 8).

В связи с необходимостью удаления лизисных клеточных остатков 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 [26].

УЗ-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. При обработке костного матрикса 6% раствором перекиси водорода в остеоцитах ядер наблюдается в несколько раз меньше, чем при обработке в 3% растворе, следовательно, его иммуногенность ниже, но общая костная структура более рыхлая, трабекулы становятся тоньше и реже, что подтверждается данными гистологического и микротомографического исследований. Таким образом, использование 6% раствора перекиси водорода вызывает деструкцию и нежелательно с точки зрения сохранности архитектуры.

На основании результатов первого этапа исследования протокол первичной очистки включает последовательное воздействие проточной водой в течение 4 часов, гипотоническим раствором в течение 2 часов и 3% раствором

перекиси водорода в ультразвуке в течение 8 часов. При использовании указанного протокола сохраняется нормальная костная структура, однако также сохранены мембраны адипоцитов (жировых клеток) костного мозга, количество остеоцитов с ядрами ~10%. Коэффициент очистки составляет 0,68±0,06.

Следующим этапом работы было исследование воздействия органических растворителей (смеси этанола с хлороформом и гексана с пропанолом) и сверхкритической флюидной экстракции диоксидом углерода на ксеногенный костный матрикс, подвергнутый первичной очистке.

Эффективность использования всех этих методов подтверждается результатами томографического и гистологического исследований: сохранностью микроархитектоники (костные трабекулы формируют характерную для нормальной губчатой кости ячеистую сеть, костный матрикс имеет нормальную тонковолокнистую структуру), лизисом клеток (в лакунах сохранено меньше 10% остеоцитов с ядрами, остальные лакуны пустые) и полным удалением клеточных остатков (мембраны адипоцитов костного мозга отсутствуют). На рис. 2, 3 приведены результаты томографического и гистологического исследований для образца, очищенного по методике 4-3. Результаты исследований образцов, очищенных по методикам 4-1 и 4-2, представляют собой аналогичную картину.

Коэффициент очистки ксеногенного костного матрикса после глубокой очистки при воздействии органических растворителей и сверхкритической флюидной экстракции (4-1, 4-2, 4-3), в соответствии с результатами томографического исследования (рис. 3), составляет ~0,90±0,07 для образцов, очищенных по методике 4-1, ~0,92±0,04 для образцов, очищенных по методике 4-2, и ~0,91±0,05 для образцов, очищенных по методике 4-3, что значительно превышает коэффициент очистки после первичного воздействия.

Органические растворители оказывают воздействие на лизис клеток путём дегидратации, солюбилизации и удаления липидов, эффективно удаляют клетки из плотных тканей и инактивируют пирогены. Однако растворители способны сшивать и осаждать белки, включая коллаген [20]. При химическом воздействии на костную ткань органическими растворителями возможно снижение некоторых факторов роста, биологической активности

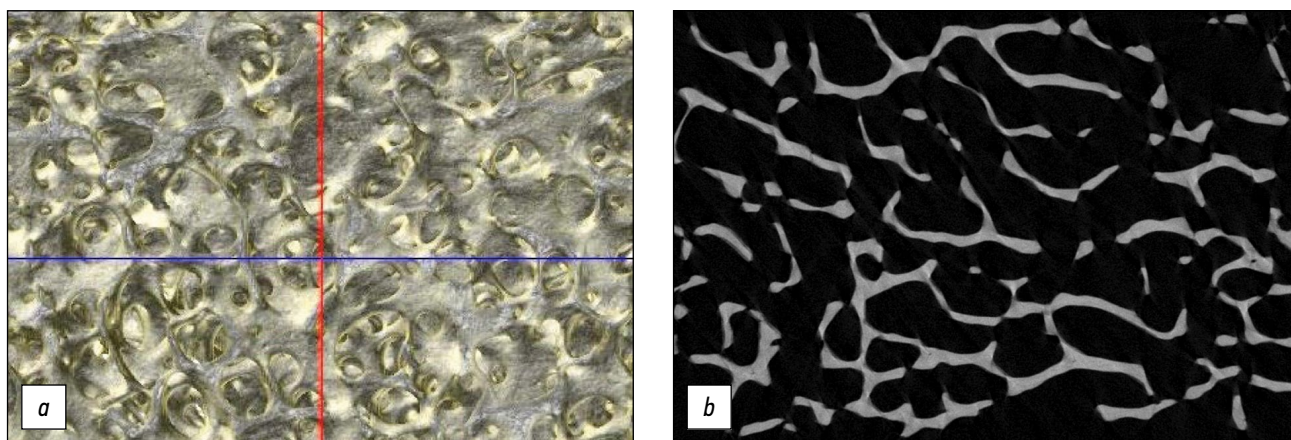


Рис. 2. Результаты томографического исследования образца, очищенного по методике 4-3: *a* — 3D-реконструкция, *b* — микро-КТ срез.

Fig. 2. Tomographic results of the sample purified by technique 4-3: *a* — 3D reconstruction, *b* — micro-CT slice.

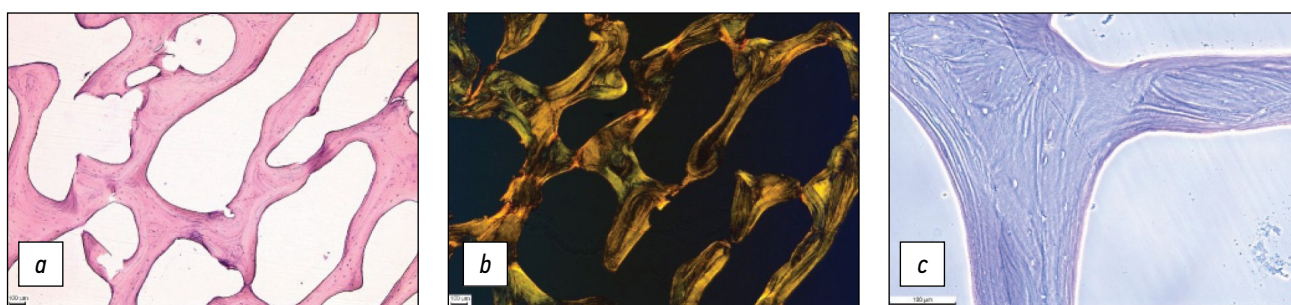


Рис. 3. Микроскопия образца, очищенного по методике 4-3: *a* — светлопольная, гематоксилин-эозин, увеличение $\times 50$; *b* — поляризационная, пикросириус красный, увеличение $\times 50$; *c* — фазово-контрастная, гематоксилин-эозин, увеличение $\times 10$.

Fig. 3. Microscopy of the sample purified by method 4-3: *a* — light-field, hematoxylin-eosin, magnification $\times 50$; *b* — polarization, picrosirius red, magnification $\times 50$; *c* — phase-contrast, hematoxylin-eosin, magnification $\times 10$.

полученных матриксов в большинстве случаев и снижение биосовместимости, увеличение частоты отрицательного иммунного ответа из-за остаточных реагентов [26].

Согласно результатам спектроскопии ядерного магнитного резонанса, следовые количества реагентов действительно присутствуют после удаления органических растворителей вакуумированием, что может повышать иммуногенность. В спектрах ЯМР ^1H образцов, обработанных органическими растворителями, обнаружены химические сдвиги, которые соответствуют следовым количествам этанола, пропанола, гексана (рис. 4) [27]. На рис. 4*a* представлен спектр ЯМР ^1H вытяжки из матрикса, очищенного смесью этанола ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) и хлороформа (CHCl_3). Согласно G.R. Fulmer и соавт. [27], при использовании бензола ($\text{C}_6\text{D}_5\text{H}$) в качестве внутреннего стандарта химические сдвиги групп этанола приходятся на 0,50; 0,96 и 3,34 м.д., химические сдвиги групп хлороформа — на 6,15 м.д. Последний сдвиг на спектре не обнаружен. Другие сдвиги присутствуют на спектре с незначительным смещением.

На рис. 4*b* представлен спектр ЯМР ^1H вытяжки из матрикса, очищенного смесью гексана ($\text{CH}_3(\text{CH}_2)_4\text{CH}_3$) и пропанола ($(\text{CH}_3)_2\text{CHOH}$). Согласно G.R. Fulmer и соавт. [27], при использовании бензола в качестве внутреннего стандарта химические сдвиги групп пропанола приходятся

на 0,95 и 3,67 м.д., химические сдвиги групп гексана — на 0,89 и 1,24 м.д. Сдвиг, характерный для гексана, обнаружен при 1,27 м.д., сдвиги, относящиеся к пропанолу, при 0,95 и 3,64 м.д. Обнаруженные сдвиги свидетельствуют о следовых количествах органических растворителей на поверхности матриксов.

На рис. 4*c* представлен спектр ЯМР ^1H вытяжки из матрикса, очищенного сверхкритической флюидной экстракцией. На спектре обнаружены единственные сдвиги малой интенсивности, синглет, в той же области, где находится вода. Сверхкритический диоксид углерода удаляет остатки клеток при пропускании через ткани с контролируемой скоростью, аналогичной сушке в критической точке, для удаления клеток при минимальном изменении механических свойств матрикса [28]. При экстракции в CO_2 удаление липидов из ткани на 14% эффективнее, чем традиционная экстракция липидов [29]. В литературе сообщается о возможности ск- CO_2 служить стерилизующим агентом [28, 30], однако этот эффект применительно к костной ткани требует дополнительного изучения.

Технология сверхкритической флюидной экстракции высокоэффективно очищает костный матрикс и не оставляет следов органических растворителей, остаточное

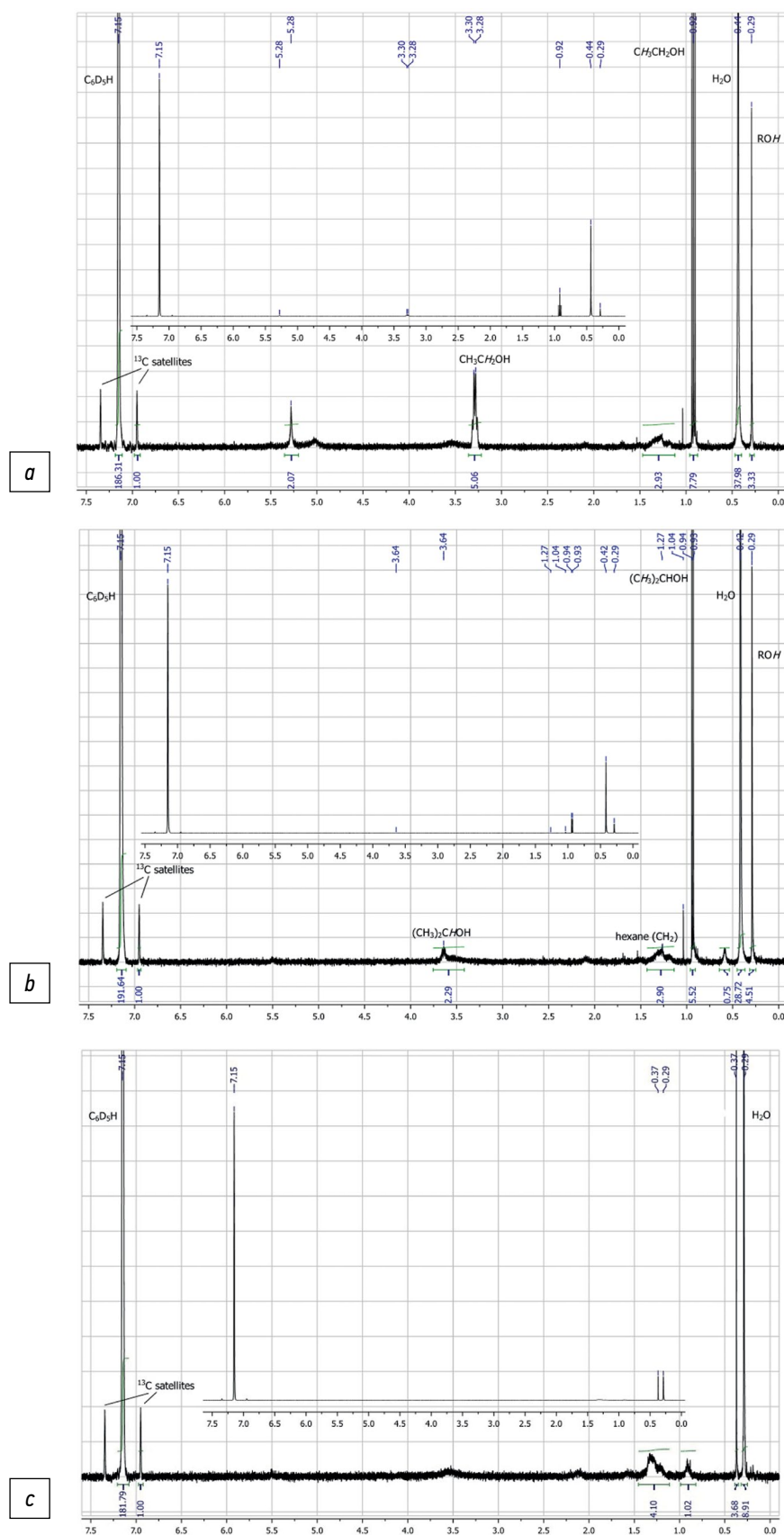


Рис. 4. ЯМР-спектры экстрактов из образцов, очищенных: *a* — этанолом+хлороформом (4-1), *b* — гексаном+пропанолом (4-2), *c* — ск- CO_2 (4-3).

Fig. 4. NMR spectra of extracts from samples purified with: *a* — ethanol+chloroform (4-1), *b* — hexane+propanol (4-2), *c* — sk- CO_2 (4-3).

количество которых могло бы потребовать контроля в процессе производства. По литературным данным, при обработке в sc-CO_2 содержание липидов снижается до 0,1% [29]. Оставшийся после воздействия углекислый газ представляет собой естественный компонент тканей, не является токсичным и легко выводится.

Таким образом, эффективный протокол очистки следующий:

- воздействие проточной водой в течение 4 часов;
- воздействие 0,5% раствором NaCl в течение часа;
- воздействие 3% раствором H_2O_2 при УЗ-воздействии в течение 8 часов;
- воздействие сверхкритическим CO_2 в течение 8 часов при давлении 450 бар, температуре +35 °С.

В нашей работе очистка костного матрикса флюидной экстракцией является эффективной завершающей стадией протокола очистки. При полной очистке межтрабекулярного пространства костной ткани от клеточного компонента наблюдается полная сохранность микро- и макроструктуры ксеногенного костного матрикса.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе выполнения работы был выбран наиболее эффективный протокол очистки ксеногенной спонгиозной костной ткани с использованием сочетания физического и химического воздействия. Подобраны параметры, реагенты и методы воздействия, позволяющие провести полную очистку межтрабекулярного пространства от кровеносных сосудов, клеточных элементов, сохранив

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dickson G., Buchanan F., Marsh D., et al. Orthopaedic tissue engineering and bone regeneration // *Technol Health Care*. 2007. Vol. 15, № 1. P. 57–67.
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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
6. Schwartz C.E., Martha J.F., Kowalski P., et al. 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

микроархитектонику нативной костной ткани, что подтверждается гистологическим и томографическим исследованиями с учётом коэффициента очистки, рассчитанного на основе денситометрической плотности.

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).

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

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

ADDITIONAL INFO

Author contribution. All authors confirm that their authorship meets the international ICMJE criteria (all authors have made a significant contribution to the development of the concept, research and preparation of the article, read and approved the final version before publication).

Funding source. The authors state that there is no external funding when conducting the research and preparing the publication.

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

7. Sen M.K., Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? // *Injury*. 2007. Vol. 38, suppl 1. P. S75–S80. doi: 10.1016/j.injury.2007.02.012
8. Thangarajah T., Shahbazi S., Pendegrass C.J., et al. 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
9. Musson D.S., Gao R., Watson M., et al. Bovine bone particulates containing bone anabolic factors as a potential xenogenic bone graft substitute // *J Orthop Surg Res*. 2019. Vol. 14, № 1. P. 60. doi: 10.1186/s13018-019-1089-x
10. Sackett S.D., Tremmel D.M., Ma F., 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
11. 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
12. Hillebrandt K.H., Everwien H., Haep N., et al. Strategies based on organ decellularization and recellularization // *Transpl Int*. 2019. Vol. 32, № 6. P. 571–85. doi: 10.1111/tri.13462

13. Saldin L.T., Cramer M.C., Velankar S.S., White L.J., Badylak S.F. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function // *Acta Biomater.* 2017. Vol. 49. P. 1–15. doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.068
14. Gardin C., Ricci S., Ferroni L., et al. Decellularization and Delipidation Protocols of Bovine Bone and Pericardium for Bone Grafting and Guided Bone Regeneration Procedures // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 7. P. e0132344. doi: 10.1371/journal.pone.0132344
15. Amirazad H., Dadashpour M., Zarghami N. Application of decellularized bone matrix as a bioscaffold in bone tissue engineering // *Journal of biological engineering.* 2022. Vol. 16, № 1. P. 1–18. doi: 10.1186/s13036-021-00282-5
16. Carvalho M.S., Cabral J.M.S., da Silva C.L., Vashishth D. Bone matrix non-collagenous proteins in tissue engineering: creating new bone by mimicking the extracellular matrix // *Polymers.* 2021. Vol. 13, № 7. P. 1095. doi: 10.3390/polym13071095
17. 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
18. 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
19. Lu H., Hoshiba T., Kawazoe N., Chen G. Comparison of decellularization techniques for preparation of extracellular matrix scaffolds derived from three-dimensional cell culture // *J Biomed Mater Res — Part A.* 2012. Vol. 100A, № 9. P. 2507–2516. doi: 10.1002/jbm.a.34150
20. Crapo P.M., Gilbert T.W., Badylak S.F. An overview of tissue and whole organ decellularization processes // *Biomaterials.* 2011. Vol. 32, № 12. P. 3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057
21. Burk J., Erbe I., Berner D., et al. Freeze-thaw cycles enhance decellularization of large tendons // *Tissue Eng Part C Methods.* 2014. Vol. 20, № 4. P. 276–284. doi: 10.1089/ten.tec.2012.0760
22. Xu H., Xu B., Yang Q., et al. Comparison of decellularization protocols for preparing a decellularized porcine annulus fibrosus scaffold // *PLoS One.* 2014. Vol. 9, № 1. P. e86723. doi: 10.1371/journal.pone.0086723
23. Smith C.A., Board T.N., Rooney P., et al. Correction: human decellularized bone scaffolds from aged donors show improved osteoinductive capacity compared to young donor bone // *PLoS One.* 2017. Vol. 12, № 11. P. e0177416. doi: 10.1371/journal.pone.0187783
24. Cox B., Emili A. Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics // *Nat Protoc.* 2006. Vol. 1, № 4. P. 1872e8. doi: 10.1038/nprot.2006.273
25. Xu C.C., Chan R.W., Tirunagari N. A biodegradable, acellular xenogeneic scaffold for regeneration of the vocal fold lamina propria // *Tissue Eng.* 2007. Vol. 13, № 3. P. 551e66. doi: 10.1089/ten.2006.0169
26. Liao J., Xu B., Zhang R., et al. Applications of decellularized materials in tissue engineering: advantages, drawbacks and current improvements, and future perspectives // *Journal of Materials Chemistry B.* 2020. Vol. 8, № 44. P. 10023–10049. doi: 10.1039/d0tb01534b
27. Fulmer G.R., Miller A.J.M., Sherden N.H., et al. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist // *Organometallics.* 2010. Vol. 29, № 9. P. 2176–2179. doi: 10.1021/om100106e
28. Antons J., Marascio M.G., Aeberhard P. Decellularised tissues obtained by a CO₂-philic detergent and supercritical CO₂ // *Eur Cell Mater.* 2018. Vol. 36. P. 81–95. doi: 10.22203/eCM.v036a07/
29. Smolentsev D.V., Gurin A.A., Venediktov A.A., Evdokimov S.V., Fadeev R.A. Purification of xenogeneic bone matrix by extraction with supercritical carbon dioxide and evaluation of the obtained material // *Russ J Phys Chem B.* 2017. Vol. 11, № 8. P. 1283–1287. doi: 10.1134/S1990793117080115
30. Bernhardt A., Wehr M., Paul B. Improved sterilization of sensitive biomaterials with supercritical carbon dioxide at low temperature // *PLoS One.* 2015. Vol. 10, № 6. P. e0129205. doi: 10.1371/journal.pone.0129205

REFERENCES

1. Dickson G, Buchanan F, Marsh D, et al. Orthopaedic tissue engineering and bone regeneration. *Technol Health Care.* 2007;15(1):57–67.
2. 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
3. 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
4. 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
5. 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.joc.2009.07.006
6. Schwartz CE, Martha JF, Kowalski P, et al. 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
7. Sen MK, Miclau T. Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions? *Injury.* 2007;38(Suppl 1):S75–S80. doi: 10.1016/j.injury.2007.02.012
8. Thangarajah T, Shahbazi S, Pendegrass CJ, et al. 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
9. Musson DS, Gao R, Watson M, et al. Bovine bone particulates containing bone anabolic factors as a potential xenogenic bone graft substitute. *J Orthop Surg Res.* 2019;14(1):60. doi: 10.1186/s13018-019-1089-x
10. Sackett SD, Tremmel DM, Ma F, 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
11. 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
12. Hillebrandt KH, Everwien H, Haep N, et al. Strategies based on organ decellularization and recellularization. *Transpl Int.* 2019;32(6):571–85. doi: 10.1111/tri.13462

13. Saldin LT, Cramer MC, Velankar SS, White LJ, Badylak SF. Extracellular matrix hydrogels from decellularized tissues: Structure and function. *Acta Biomater.* 2017;49:1–15. doi: 10.1016/j.actbio.2016.11.068
14. Gardin C, Ricci S, Ferroni L, et al. Decellularization and Delipidation Protocols of Bovine Bone and Pericardium for Bone Grafting and Guided Bone Regeneration Procedures. *PLoS One.* 2015;10(7):e0132344. doi: 10.1371/journal.pone.0132344
15. Amirzad H, Dadashpour M, Zarghami N. Application of decellularized bone matrix as a bioscaffold in bone tissue engineering. *Journal of biological engineering.* 2022;16(1):1–18. doi: 10.1186/s13036-021-00282-5
16. Carvalho MS, Cabral JMS, da Silva CL, Vashishth D. Bone matrix non-collagenous proteins in tissue engineering: creating new bone by mimicking the extracellular matrix. *Polymers.* 2021;13(7):1095. doi: 10.3390/polym13071095
17. 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
18. 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
19. Lu H, Hoshiba T, Kawazoe N, Chen G. Comparison of decellularization techniques for preparation of extracellular matrix scaffolds derived from three-dimensional cell culture. *J Biomed Mater Res — Part A.* 2012;100A(9):2507–2516. doi: 10.1002/jbm.a.34150
20. Crapo PM, Gilbert TW, Badylak SF. An overview of tissue and whole organ decellularization processes. *Biomaterials.* 2011;32(12):3233–3243. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.01.057
21. Burk J, Erbe I, Berner D, et al. Freeze-thaw cycles enhance decellularization of large tendons. *Tissue Eng Part C Methods.* 2014;20(4):276–284. doi: 10.1089/ten.tec.2012.0760
22. Xu H, Xu B, Yang Q, et al. Comparison of decellularization protocols for preparing a decellularized porcine annulus fibrosus scaffold. *PLoS One.* 2014;9(1):e86723. doi: 10.1371/journal.pone.0086723
23. Smith CA, Board TN, Rooney P, et al. Correction: human decellularized bone scaffolds from aged donors show improved osteoinductive capacity compared to young donor bone. *PLoS One.* 2017;12(11):e0177416. doi: 10.1371/journal.pone.0187783
24. Cox B, Emili A. Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. *Nat Protoc.* 2006;1(4):1872e8. doi: 10.1038/nprot.2006.273
25. Xu CC, Chan RW, Tirunagari N. A biodegradable, acellular xenogeneic scaffold for regeneration of the vocal fold lamina propria. *Tissue Eng.* 2007;13(3):551e66. doi: 10.1089/ten.2006.0169
26. Liao J, Xu B, Zhang R, et al. Applications of decellularized materials in tissue engineering: advantages, drawbacks and current improvements, and future perspectives. *Journal of Materials Chemistry B.* 2020;8(44):10023–10049. doi: 10.1039/d0tb01534b
27. Fulmer GR, Miller AJM, Sherden NH, et al. NMR Chemical Shifts of Trace Impurities: Common Laboratory Solvents, Organics, and Gases in Deuterated Solvents Relevant to the Organometallic Chemist. *Organometallics.* 2010; 29(9):2176–2179. doi: 10.1021/om100106e
28. Antons J, Marascio MG, Aeberhard P. Decellularised tissues obtained by a CO₂-philic detergent and supercritical CO₂. *Eur Cell Mater.* 2018;36:81–95. doi: 10.22203/eCM.v036a07/
29. Smolentsev DV, Gurin AA, Venediktov AA, Evdokimov SV, Fadeev RA. Purification of xenogeneic bone matrix by extraction with supercritical carbon dioxide and evaluation of the obtained material. *Russ J Phys Chem B.* 2017;11(8):1283–1287. doi: 10.1134/S1990793117080115
30. Bernhardt A, Wehrl M, Paul B. Improved sterilization of sensitive biomaterials with supercritical carbon dioxide at low temperature. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129205. doi: 10.1371/journal.pone.0129205

ОБ АВТОРАХ

* Смоленцев Дмитрий Владимирович;

адрес: Россия, 127299, Москва, ул. Приорова, 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;
eLibrary SPIN: 1192-3848;
e-mail: city-x@bk.ru

Серезникова Наталья Борисовна, канд. биол. наук,

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

Васильев Максим Геннадьевич, канд. мед. наук,

ORCID: 0000-0001-9810-6513;
eLibrary SPIN: 7954-6710;
e-mail: VasilevMG@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. (Engineering);

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

Leonid L. Bionyshev-Abramov;

ORCID: 0000-0002-1326-6794;
eLibrary SPIN: 1192-3848;
e-mail: city-x@bk.ru

Natalya B. Serezhnikova, Cand. Sci. (Biology);

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

Maksim G. Vasilev, MD, Cand. Sci. (Medicine);

ORCID: 0000-0001-9810-6513;
eLibrary SPIN: 7954-6710;
e-mail: VasilevMG@cito-priorov.ru

* Автор, ответственный за переписку / Corresponding author