



Оценка *in vitro* влияния аллогенной костной матрицы на характеристики мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани при создании комбинированных тканеинженерных конструкций

Л.А. Черданцева¹, Е.А. Анастасиева¹, Д.Я. Алейник², М.Н. Егорихина², И.А. Кирилова¹

¹ ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск, Россия

² ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, г. Нижний Новгород, Россия

Реферат

Цель исследования — оценка *in vitro* влияния нативной и депротенизированной компактной и губчатой аллогенных костных матриц на характеристики мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани (МСК ЖТ) для создания эффективной комбинированной тканеинженерной конструкции. **Материал и методы.** Исследовали 24 образца нативной и депротенизированной компактной и губчатой костной ткани, которые подвергали механической обработке, моделированию с последующей стерилизацией образцов ионизирующим излучением и бактериологическим контролем стерилизации. Часть образцов проходила процедуру депротенизации. В качестве тестовых культур для оценки взаимодействия с исследуемыми образцами костной ткани использовали охарактеризованные культуры МСК ЖТ человека. Для характеристики выраженности адгезии, миграции и жизнеспособности МСК на образцах костного матрикса использовали флуоресцентный имиджер Cytation-5 и флуорохромы Hoechst 3334 (BD Pharmingen™) и кальцеин (Calcein AM, BD Pharmingen™). Цитотоксичность матриц оценивали с помощью МТТ-теста после 1 и 7 сут. экстракции. **Результаты.** Образцы исследуемых костных матриц характеризуются отсутствием цитотоксичности (ранг 1). Это сопровождается хорошей адгезией и миграцией МСК ЖТ на любой поверхности костного матрикса и сохранением жизнеспособности клеток в течение 7 сут. наблюдения. В большей степени изменения касаются увеличения размеров ядер клеток, адгезированных на депротенизированной костной матрице губчатой структуры, на 25–30% по сравнению с величиной аналогичного параметра на других образцах. При этом размеры клеток на депротенизированной костной матрице несколько больше (величина ядер клеток с 8,8 до 11,5 мкм, средняя площадь ядер клеток от 86,3 мкм до 129,0 мкм, средний периметр ядер клеток с 30,7 мкм до 40,7 мкм), чем на образцах нативной костной матрицы. **Заключение.** Результаты исследования различных аллогенных костных матриц демонстрируют, что глубокая степень очистки костной матрицы определяет отсутствие цитотоксичности и наиболее благоприятные условия для адгезии, миграции, пролиферации и жизнеспособности МСК ЖТ. Это обуславливает возможность создания тканеинженерных конструкций на основе матриц из костной ткани различной структуры. Наилучшим образом для этой цели подходят депротенизированные губчатые костные матрицы.

Ключевые слова: тканеинженерные конструкции, депротенизированная и нативная костная матрица, губчатая и компактная структура, мезенхимальные стромальные клетки, адгезия, миграция клеток, жизнеспособность, ядра клеток.

Источник финансирования: грант Российского фонда фундаментальных исследований №15-29-04875.

📖 Черданцева Л.А., Анастасиева Е.А., Алейник Д.Я., Егорихина М.Н., Кирилова И.А. Оценка *in vitro* влияния аллогенной костной матрицы на характеристики мезенхимальных стромальных клеток из жировой ткани при создании комбинированных тканеинженерных конструкций. *Травматология и ортопедия России*. 2021;27(1):53-65. <https://doi.org/10.21823/2311-2905-2021-27-1-53-65>.

Cite as: Cherdantseva L.A., Anastasieva E.A., Aleynik D.Ya., Egorikhina M.N., Kirilova I.A. [In Vitro Evaluation of the Allogeneic Bone Matrix Effect on the Adipose Mesenchymal Stromal Cells Characteristics in Combined Tissue Engineering]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and Orthopedics of Russia]. 2021;27(1):53-65. (In Russian). <https://doi.org/10.21823/2311-2905-2021-27-1-53-65>.

✉ Кирилова Ирина Анатольевна / Irina A. Kirilova; e-mail: IrinaKirilova71@mail.ru

Рукопись поступила/Received: 01.11.2020. Принята в печать/Accepted for publication: 10.02.2021.

© Черданцева Л.А., Анастасиева Е.А., Алейник Д.Я., Егорихина М.Н., Кирилова И.А., 2021



In Vitro Evaluation of the Allogeneic Bone Matrix Effect on the Adipose Mesenchymal Stromal Cells Characteristics in Combined Tissue Engineering

Liliya A. Cherdantseva¹, Evgeniya A. Anastasieva¹, Diane Ya. Aleynik²,
Marfa N. Egorikhina², Irina A. Kirilova¹

¹ Tsivyan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russia

² Privolzhsk Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia

Abstract

The aim of the study was to evaluate in vitro the effect of native and deproteinized compact and spongy allogeneic bone matrices on the characteristics of adipose mesenchymal stromal cells (ASC) in combined tissue engineering. **Material and Methods.** 24 samples of native and deproteinized compact and spongy bone were examined, which were exposed to mechanical treatment, modeling, followed by sterilization of the samples by ionizing radiation and bacteriological control of sterilization. Some of the samples underwent deproteinization. The characterized cultures of human ASC were used as test cultures to assess the interaction with the bone samples. The Cytation-5 fluorescent imager and Hoechst 3334 fluorochromes (BD Pharmingen™) and calcein (Calcein AM, BD Pharmingen™) were used to characterize the degree of adhesion, migration, and viability of ASC on bone matrix samples. Matrix cytotoxicity was evaluated by MTT assay on days 1 and 7 of extraction. **Results.** The bone matrix samples are characterized by the absence of cytotoxicity (rank 1). ASC demonstrated good adhesion and migration on any surface of the bone matrix and preservation of cell viability during 7 days of observation. Nuclei sizes of the cells adhered to the deproteinized bone matrix of the spongy structure increased by 25–30% compared to other samples. The cells on deproteinized bone matrix had greater size (the size of the cells from nuclei 8.8 to 11.5 μm, the average size of cells nuclei from an 86.3 μm to 129,0 μm, the average perimeter of the cells nuclei from 30.7 μm to 40.7 μm) than in the native bone matrix samples. **Conclusion.** The results of the study of various allogeneic bone matrices demonstrate that deep purification of the bone matrix determines the absence of cytotoxicity and the most favorable conditions for the adhesion, migration, proliferation and viability of ASC. Also makes it possible to use tissue engineering based on bone matrices of different structures. Deproteinized spongy bone matrices are best suited for this purpose.

Keywords: tissue engineering, deproteinized and native bone matrix, spongy and compact bone, mesenchymal stromal cells, adhesion, cell migration, viability, cells nuclei.

Funding: grant of the Russian Foundation for Basic Research No. 15-29-04875.

Введение

В настоящее время увеличивается потребность в костнопластических материалах для оказания высокотехнологичной медицинской помощи в травматологии, ортопедии и челюстно-лицевой хирургии пациентам, нуждающимся в замещении костных дефектов и восполнении участков атрофии костной ткани разного этиопатогенеза [1, 2, 3, 4]. Характер регенеративных процессов костной ткани при замещении костного дефекта в значительной мере определяется свойствами самого костнозамещающего материала [1, 3, 5]. Существующие искусственные костнозамещающие материалы не обладают необходимыми характеристиками, в полной мере соответствующими свойствам костной ткани [1, 6, 7]. Несмотря на то, что «золотым стандартом» при замещении патологически измененных участков костной ткани в рамках рекон-

структивно-пластического хирургического лечения является аутотрансплантат, в качестве альтернативы, оптимально соответствующей по своим структурно-функциональным характеристикам аутокости, применяются аллотрансплантаты [7, 8, 9, 10]. В качестве терапевтически эффективных можно рассматривать аллотрансплантаты из губчатого вещества костной ткани, использование которых обеспечивает адекватную васкуляризацию как одно из основополагающих условий для реализации органотипического репаративного остеогенеза. Однако наиболее перспективным направлением можно считать разработку и использование комбинированных тканеинженерных конструкций на основе аллокости в качестве матрицы для мезенхимальных стромальных клеток (МСК) с целью активации репаративного остеогенеза патологически измененной костной ткани [2, 11, 12, 13].

Цель исследования — оценка *in vitro* влияния нативной и депротеинизированной компактной и губчатой аллогенных костных матриц на характеристики МСК из жировой ткани для создания эффективной комбинированной тканеинженерной конструкции.

Задачи исследования:

1) изучение с использованием цифрового имиджера Cytation 5 адгезии МСК к костному матриксу;

2) изучение миграции МСК в межбалочные пространства;

3) изучение жизнеспособности МСК на костном матриксе.

Заявленные цели исследования сформулированы на основе нашего понимания механизмов реализации процесса заселения костных матриц МСК при создании тканеинженерных конструкций, а именно:

- заселение костных матриц МСК является результатом миграции, пролиферации и дифференцировки данных клеток;

- процесс миграции МСК вглубь костной матрицы зависит от подвижности самих клеток и свойств матрицы (механика, геометрия, химический состав поверхностей и др.);

- пролиферация и дифференцировка МСК на костной матрице зависят от концентрации питательных и регуляторных компонентов среды, на которую, в свою очередь, в определенной степени влияет химический состав матрицы;

- распределение уровня концентраций компонентов среды определяется диффузией молекул и потреблением их клетками на костной матрице.

Материал и методы

Обработка и стерилизация образцов аллогенного костнопластического материала

Изготовление опытных и контрольных образцов костнопластического материала осуществляли из губчатой костной ткани головок бедренной кости, полученных от пациентов-доноров в ходе выполнения артропластики тазобедренного сустава. В работе использовали костную ткань от доноров с отрицательными результатами исследований на гемотрансмиссивные инфекции (RW, гепатиты В и С, ВИЧ-инфекция). Депротеинизированный костнопластический материал заданного размера с необходимыми характеристиками изготавливали экспериментальным многоэтапным модифицированным способом обработки (патент на изобретение RU 2223104 С2 от 10.02.2004) с последующей стерилизацией ионизирующим излучением. На 1-м этапе осуществляли механическое моделирование губчатой костной ткани

для получения образцов необходимой формы и размеров — кубические блоки 1,0×1,0×1,0 см. На 2-м этапе подготовки выполняли последовательную химическую децеллюляризацию образцов от органических компонентов до следового уровня содержания альбумина в фрагментах костной ткани [7]. В последующем осуществляли просушивание образцов и упаковку в индивидуальные промаркированные двойные полиэтиленовые упаковки. На 3-м этапе выполняли стерилизацию готовых образцов костнопластического материала на установке линейного ускорителя электронов ИЛУ-10 (свидетельство № 4/411-0314-18) дозой облучения 25 кГц с последующим бактериологическим контролем стерилизации [13].

Исследование *in vitro* выполнено на 24 образцах (по 6 образцов в каждой группе исследования): нативной аллогенной губчатой; нативной аллогенной компактной; депротеинизированной аллогенной губчатой и депротеинизированной аллогенной компактной костной ткани.

В качестве тестовых культур в работе использовали стерильные культуры дермальных фибробластов (ДФЧ) и мультипотентных МСК из жировой ткани (МСК ЖТ) человека.

Методика выделения и культивирования дермальных фибробластов человека

Для получения клеточной культуры ДФЧ использовали метод тканевых эксплантатов [14]. Использовали биоптаты патологически не измененной кожи (фрагменты невостребованной после косметических операций кожи размером до 1 см²) от пациентов с отрицательными результатами исследований на RW, гепатиты В и С, ВИЧ-инфекцию и отсутствием в анамнезе онкологических заболеваний, туберкулеза и заболеваний кожи. Биоптаты кожи забирали в стерильных условиях операционной во флаконы со стерильной ростовой средой 199 с добавлением 1% раствора антибиотиков (пенициллин/стрептомицин). Работа с исходным материалом и клеточными культурами проходила в культуральном боксе в условиях ламинара. Образцы кожи тщательно промывали средой с антибиотиками (среда 199, 1% пенициллина/стрептомицина для культур клеток), очищали от подкожно-жировой клетчатки и подвергали ферментативной обработке. Использовали холодовую трипсинизацию (трипсин 0,25%) в течение 18 ч. при температуре 4°C. После ферментативной обработки кусочки кожи механически измельчали до размеров 0,1 см² и в шахматном порядке раскладывали в культуральные флаконы Costar 25 см². В качестве ростовой среды использовали среду ДМЕМ с добавлением 1% антибиотиков, 2% глутамина и 10% телячьей эмбриональной сыворотки. Все реактивы и среды, использованные в работе,

фирмы ООО «НПО ПанЭко» (Россия); разовый стерильный культуральный пластик Costar (США).

Культивирование проходило в условиях CO_2 -инкубатора при 5% CO_2 , температуре 37°C, абсолютной влажности. По достижении субконфлюэнтного монослоя (80%) осуществляли пересев клеток. Ежедневный контроль формирования монослоя и стерильности культуры клеток осуществляли с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI 3000 В (Германия). Контрольное исследование культуры клеток на микоплазменную и вирусную контаминацию (вирусы герпеса, цитомегаловирус, вирус Эпштейна–Барр) осуществляли методом полимеразой цепной реакции (ПЦР) с использованием системы Rotor-Gene 6000 (Австралия) и наборов реагентов ФБУН «ЦНИИЭ» Роспотребнадзора. Для исследований *in vitro* использовали культуры ДФЧ на 4–6-м пассаже. Культура фибробластов использовалась для проведения МТТ-теста.

Методика выделения и культивирования мультипотентных МСК ЖТ человека

Образцы подкожно-жировой клетчатки получали в стерильных условиях с последующей тщательной многократной обработкой стерильным раствором Хенкса с антибиотиками (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина) для удаления примеси крови и помещали в стерильные пробирки объемом 50 мл. В качестве транспортной среды использовали фосфатно-солевой буфер (PSB, Gibco) при температуре +4°C. Клетки из жировой ткани выделяли с помощью механической дезагрегации и тепловой ферментативной обработки 0,2% раствором коллагеназы 1 типа (Sigma) в течение часа. Культивирование проводили в атмосфере 5% CO_2 при 37°C и абсолютной влажности. В качестве ростовой среды использовали среду α -MEM (Sigma, США) с добавлением антибиотиков (100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина), 2% глутамина и 20% ТЭС (Gibco), культуральные флаконы Costar (США). После формирования субконфлюэнтного монослоя (70–80%) культуру пересевали. В экспериментах для исследования взаимодействия с образцами использовали культуру клеток 3–4-го пассажа.

Методика визуализации нативной культуры

Визуализацию нативной и окрашенной культуры проводили с помощью инвертированного микроскопа Leica DMI 3000В с программным обеспечением визуализации изображений LAZ. V. 3.4 и возможностью фотофиксации и видеоархивирования. Для оценки характера монослоя использовали увеличение $\times 50$. Для исследования морфофункционального состояния клеток использовали увеличение $\times 100$, $\times 200$ и метод фазового контраста.

Определение концентрации клеток и количества жизнеспособных клеток в культуре

Количество клеток подсчитывали в камере Горяева. В каждой серии использовали данные, полученные при подсчете не менее чем в четырех камерах. Кроме того, подсчет концентрации клеток дублировали с помощью счетчика клеток Countess (Invitrogen, США). Долю мертвых клеток в культуре определяли с использованием исключаящей окраски трипановым синим.

Оценка дифференцировочного потенциала МСК

Дифференцировочный потенциал клеток оценивали на культурах клеток 3-го пассажа. Для проведения дифференцировки применяли набор Human Mesenchymal Stem Cell Functional Identification Kit (R&D systems, США). В качестве специфических красителей использовали: Oil Red (Sigma, США) для окраски липидных вакуолей, алizarиновый красный (Sigma, США) — для выявления солей кальция в процессе дифференцировки в остеобласты. Хондрогенную дифференцировку оценивали по образованию в среде специфических шариков (pellet) и отложению коллагена 2-го типа с помощью антител к коллагену 2-го типа (polyclonal antibody to Collagen II, Abcam, ab34712).

Определение фенотипа МСК и ДФЧ

Фенотип клеток определяли с использованием панели моноклональных антител CD 90Fitc, CD 105PE, CD 73PE, CD 44 Fitc, CD 10 PC7, CD 45 PC5, CD 14PC5, CD HLA-DRPC7 (Becton Coulter, США) с соответствующими изотипическими контролями. Исследования проводили на цитофлуориметре BD FACS CANTO II (Becton Dickinson, США). Результаты выражали в процентах как долю клеток, экспрессирующих соответствующий маркер от общего количества клеток.

Определение адгезии клеток и жизнеспособности МСК ЖТ при культивировании на образцах костной матрицы

Для оценки адгезии и жизнеспособности клеток на поверхности образцов суспензию МСК ЖТ 3-го пассажа в концентрации 2×10^6 /мл засеивали на поверхность образцов в небольшом объеме среды. Через 2–3 мин. после введения клеточной суспензии добавляли ростовую среду до общего объема 2 мл с целью полного погружения образцов с клетками в среду и инкубировали в CO_2 -инкубаторе при стандартных условиях. Контроль роста культуры осуществляли в течение 96 ч. с видеоархивированием каждые 24 ч. Смену ростовой среды проводили каждые 48 ч. Культивирование и контроль

роста культуры клеток осуществляли в течение 96 ч. с видеоархивированием каждые 24 ч. Через 24, 48 и 96 ч. культивирования часть образцов отбирали для исследования методом флуоресцентной микроскопии, который был реализован на многофункциональном фотометре-имиджере Cytation 5 (BioTek, США), позволяющем визуализировать клетки не только на гладкой поверхности, но и в структуре пористого материала.

Прижизненное окрашивание ядер клеток и маркировку живых клеток, адгезировавшихся на образцах, характеристику их морфологии проводили с применением флуорохрома Hoechst 3334 (BD Pharmingen™) и кальцеина (Calcein AM, BD Pharmingen™) в соответствии с протоколами производителя.

Для оценки цитотоксичности материала использовали стандартный МТТ-тест [15]. В качестве тестовой культуры использовали культуру дермальных фибробластов человека 4–5-го пассажа, полученную в лаборатории биотехнологий университетской клиники ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России. Культура была стерильна, микоплазмами и вирусами не контаминирована. Жизнеспособность клеток в культуре перед вводом в эксперимент составляла 97%.

Испытуемые образцы заливали средой ДМЕМ с 1% антибиотиков (пенициллин/стрептомицин) и 2% телячьей эмбриональной сыворотки на 1-е сут. и 7-е сут. для получения экстракта и помещали в CO₂-инкубатор при стандартных условиях. Через 1 или 7 сут. экстракт над образцами отбирали. Клетки в концентрации 1×10⁵/мл засевали на лунки плоскодонного 96-луночного планшета в среде ДМЕМ с 1% антибиотиков и 10% инактивированной телячьей эмбриональной сыворотки и культивировали при 37°C, 5% CO₂ и абсолютной влажности в течение 3 дней. После 3 дней культивирования ростовая среда над клетками заменялась экстрактом от образцов в различной концентрации (1:1; 1:2; 1:4). Через 24 ч. культивирования с экстрактом среда в лунках заменялась раствором МТТ, и клетки инкубировались с МТТ еще 4 ч. Раствор МТТ готовился в концентрации 1 мг/мл в сбалансированном растворе Хенкса. Через 4 ч. инкубации супернатант осторожно отбирали, добавляли ДМСО (200 µl), после чего регистрировали оптическую плотность (ОП) при 540 нм на анализаторе Sunrise (Австрия).

Относительную интенсивность роста клеток (ОИР) определяли по следующей формуле:

$$\text{ОИР (\%)} = \frac{\text{Средняя ОП в тестовой культуре}}{\text{Средняя ОП в контроле}} \times 100,$$

где ОП — оптическая плотность.

Полученные данные выражали в условных единицах ОП, ОИР в процентах, а затем оценивали, ориентируясь на ранговую шкалу оценки цитотоксичности [16].

Статистический анализ

Результаты исследований обрабатывали методами непараметрической статистики с применением критерия парных сравнений Вилкоксона при помощи пакета программ STATISTICA 6.0.

Результаты

Обработка и стерилизация образцов аллогенного костнопластического материала

Весь обработанный материал был представлен нативной и депротенизированной аллогенной костной тканью губчатой и компактной структуры в форме кубических блоков размером 1,0×1,0×1,0 см (рис. 1).

Готовые образцы после стерилизации и маркировки использовали для запланированных исследований.

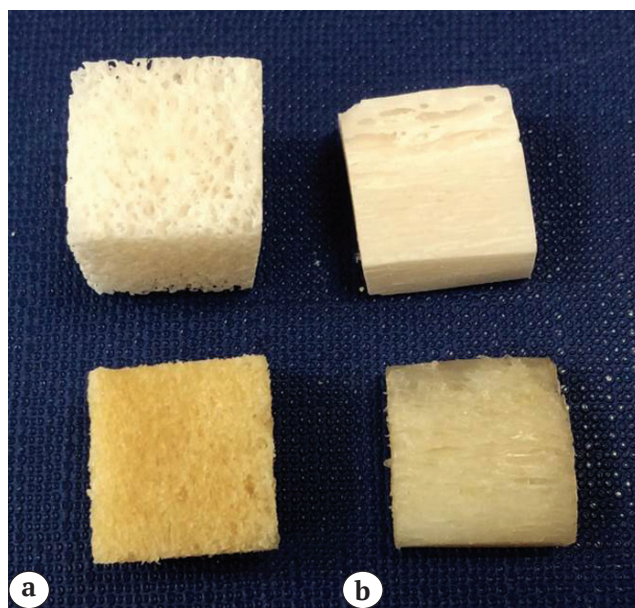


Рис. 1. Костные блоки:
а — губчатой структуры;
б — компактной структуры;
верхний ряд — депротенизированные;
нижний ряд — нативные

Figure 1. Bone blocks:
a — spongy bone;
b — compact bone;
top row — deproteinized; bottom row — native

Определение адгезии клеток и жизнеспособности МСК ЖТ при культивировании на образцах костной матрицы

Перед началом исследования клетки были охарактеризованы. Морфологически в течение всего времени наблюдения клетки представляли собой типичные фибробластоподобные клетки с выраженными отростками, четкими контурами, гомогенной цитоплазмой. Жизнеспособность клеток в культуре составляла 97–98%. Фенотип был характерен для мезенхимальных клеток: CD90⁺, CD105⁺, CD73⁺, CD44⁺, CD10⁺, CD45⁻, CD14⁻, CD34⁻, CD HLA DR⁻. Клетки были способны дифференцироваться в адипогенном, хондрогенном и остеогенном направлениях.

Изучали возможность заселения МСК ЖТ костного матрикса разной структуры (компактной и губчатой) и разной степенью физико-химической обработки (нативный — минимальная обработка и депротеинизированный, т.е. практически полностью лишенный органического компонента кости).

Исследование характера адгезии МСК ЖТ на образцах костных матриц в полях зрения при разном увеличении выявили отчетливую визуализацию ядер клеток как через 48 ч., так и через 144 ч. (рис. 2). В то же время на образцах контрольных серий (только костная матрица) клетки отсутствовали (рис. 3).

При изучении образцов нативной компактной костной ткани (кортикальный фрагмент) с увеличением $\times 40$ было проанализировано по 886 ядер клеток со средним размером ядер 8,8 мкм (от 5,0

до 23 мкм) (рис. 4). При этом средняя площадь ядер клеточных элементов составляла 86,3 мкм (от 13 до 408 мкм), а средний периметр ядер — 30,7 мкм (от 14,6 до 91,3 мкм).

Отмечена равномерная адгезия клеток на поверхности образцов нативной компактной костной ткани, соответствующая архитектонике образцов: на выпуклых поверхностях ядра клеток визуализировались более компактно и скученно, в зонах гаверсовых каналов визуализация ядер была меньшей и затруднена за счет изменения плоскости поверхностей для адгезии клеток.

На следующем этапе исследования изучили миграцию клеток в толщу костного матрикса с 1-х по 7-е сут. Местами ядра клеток располагались очень скученно, что может служить косвенным признаком процессов деления.

При изучении депротеинизированного кортикального фрагмента при увеличении $\times 40$ было проанализировано 1056 ядер клеток со средним размером ядер 9,1 мкм (от 5,2 до 28,2 мкм) (рис. 5). Средняя площадь ядер клеточных элементов 88,9 мкм (от 18,2 до 520,0 мкм), средний периметр ядер 32,1 мкм (от 15,6 до 109,2 мкм). Следует отметить некоторое увеличение размеров ядер клеток, что может быть связано с более глубокой степенью очистки костного матрикса от белкового компонента. При этом плотность распределения адгезировавшихся клеток не отличается, и распределение клеток по поверхности депротеинизированных костных матриц аналогично показателям для нативных костных матриц.

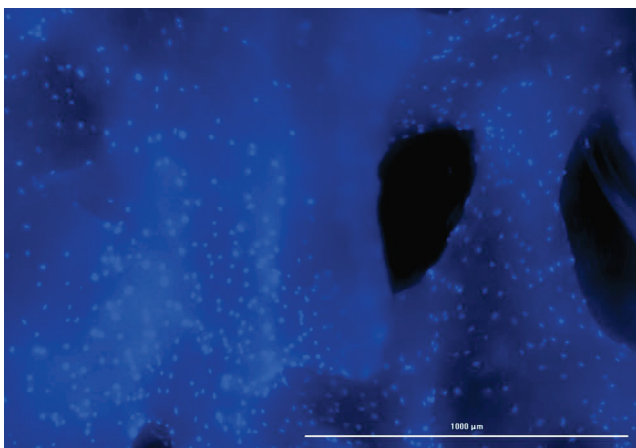


Рис. 2. Ядра клеток на образце депротеинизированной костной матрицы губчатой структуры (костнопластический материал «Депротекс»). Сшитая Z-stack фотография. Флуорохром Hoechst 33342. Ув. $\times 40$

Figure 2. Cells nuclei on a deproteinized spongy bone matrix samples (bone graft material “Deprotex”). Stapled Z-stack photo. Fluorochrome Hoechst 33342. Mag. $\times 40$

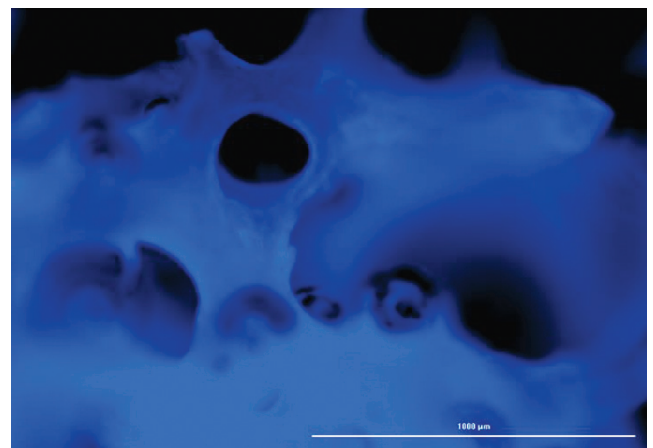


Рис. 3. Образец депротеинизированной костной матрицы губчатой структуры (костнопластический материал «Депротекс») без клеток. Флуоресцентная микроскопия. Флуорохром Hoechst 33342. Ув. $\times 40$

Figure 3. Deproteinized spongy bone matrix sample (bone graft material “Deprotex”) without cells. Fluorescence microscopy. Fluorochrome Hoechst 33342. Mag. $\times 40$

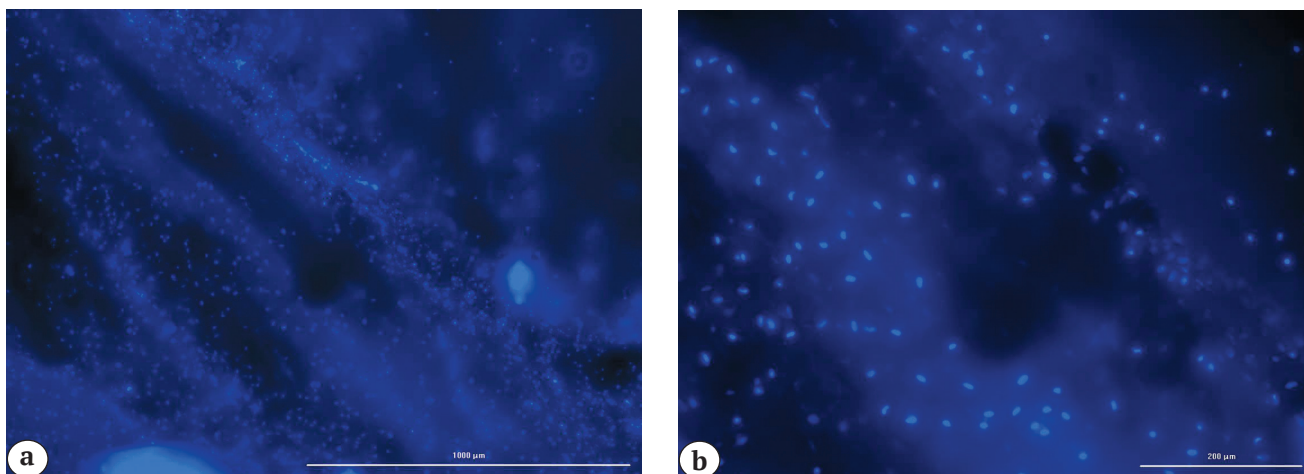


Рис. 4. Адгезия клеток на нативном костном матриксе компактной структуры (внутренняя поверхность распила): а — ув. $\times 40$; б — ув. $\times 100$. Синим цветом окрашены ядра клеток. Флуорохром Hoechst 33342

Figure 4. Cell adhesion on native compact bone matrix (internal surface): а — mag. $\times 40$; б — mag. $\times 100$. The cells nuclei are blue colored. Fluorochrome Hoechst 33342

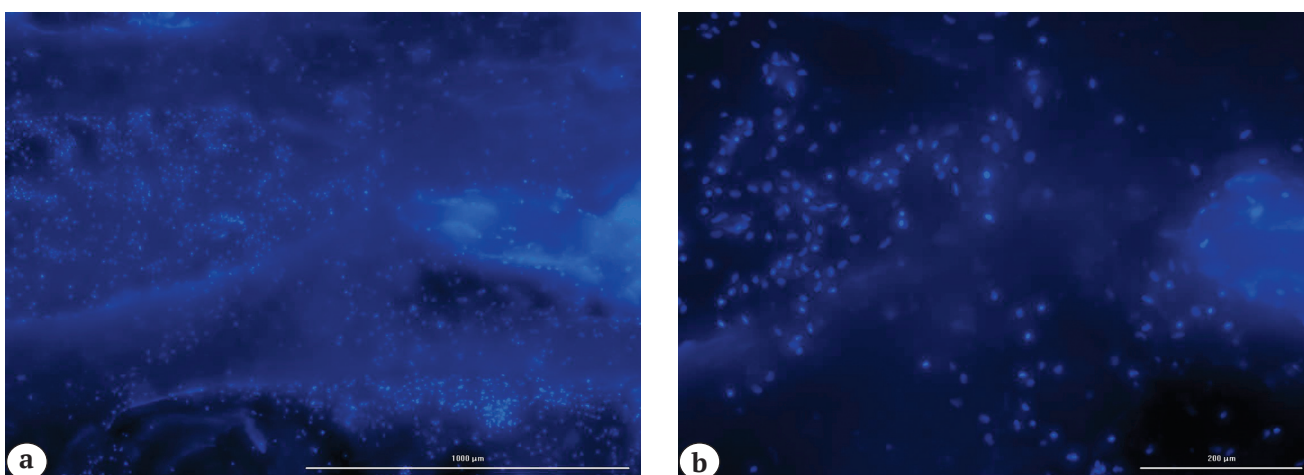


Рис. 5. Адгезия клеток на депротенизированных костных матрицах компактной структуры (внутренняя поверхность распила): а — ув. $\times 40$; б — ув. $\times 100$. Флуорохром Hoechst 33342.

Figure 5. Cell adhesion on deproteinized compact bone matrix (internal surface): а — mag. $\times 40$; б — mag. $\times 100$. Fluorochrome Hoechst 33342

При исследовании депротенизированных губчатых костных фрагментов при увеличении $\times 40$ было проанализировано 413 ядер клеток со средним размером ядер 11,5 мкм (от 5,2 до 29,2 мкм) (рис. 6). Средняя площадь ядер клеточных элементов при этом составила 129 мкм (от 13,0 до 600,0 мкм), средний периметр ядер соответствовал 40,7 мкм (от 15,6 до 120,9 мкм).

Следующим этапом изучали миграцию клеток в толщу образцов костной матрицы с 1-х по 3-и сут. (рис. 7). При этом выявили смещение ядер клеток по плоскости, что при шивке изображений, выполненных в разных плоскостях, сопро-

вождалось увеличением количества ядер в одном поле зрения.

Для подтверждения жизнеспособности клеток на образцах исследуемого материала образцы были докрашены флуорохромом (Calcein AM, BD Pharmingen™), который специфически окрашивает цитоплазму только жизнеспособных клеток. На поверхности материала хорошо визуализировались клетки с зеленым сигналом свечения в цитоплазме (рис. 8). Это свидетельствует о сохранении МСК жизнеспособности на образцах материала на протяжении всего срока наблюдения (144 ч./6 сут.).

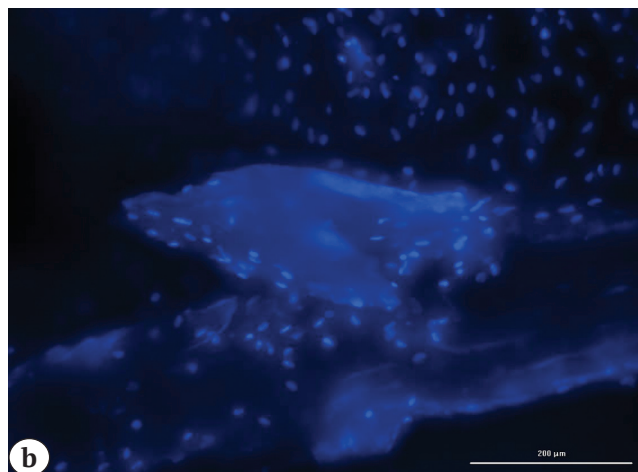
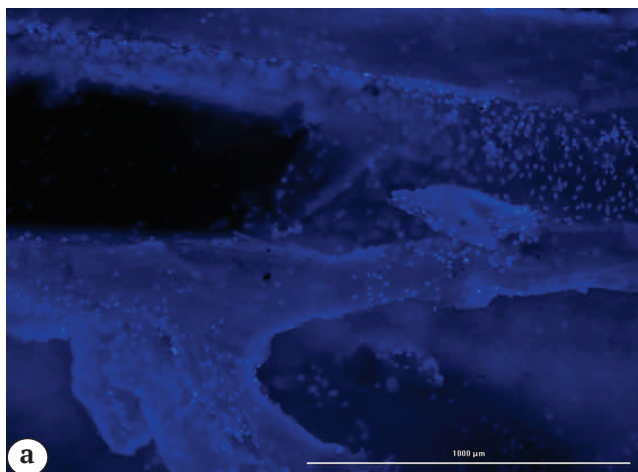


Рис. 6. Адгезия клеток на депротенизированных костных матрицах губчатой структуры (внутренняя поверхность распила): а — ув. $\times 40$; б — ув. $\times 100$. Флуорохром Hoechst 33342

Figure 6. Cell adhesion on deproteinized spongy bone matrix (internal surface): а — mag. $\times 40$; б — mag. $\times 100$. Fluorochrome Hoechst 33342

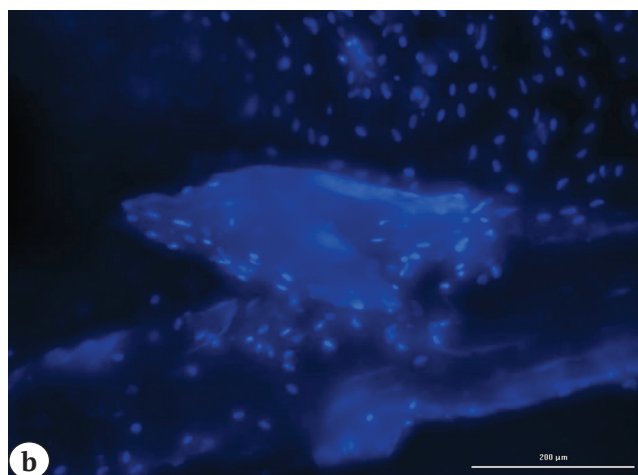
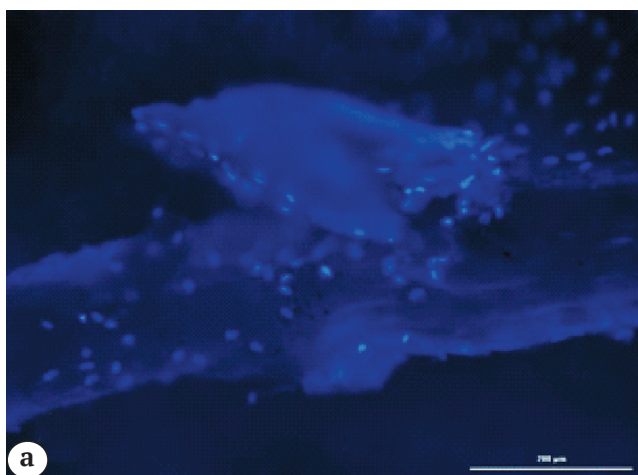


Рис. 7. Миграция клеток в толщу депротенизированного костного матрикса губчатой структуры (внутренняя поверхность распила): а — до шивки; б — после шивки изображений. Флуорохром Hoechst 33342. Ув. $\times 100$

Figure 7. Migration of cells inside the deproteinized spongy bone matrix (internal surface): а — before stapling; б — after stapling of the images. Fluorochrome Hoechst 33342. Mag. $\times 100$

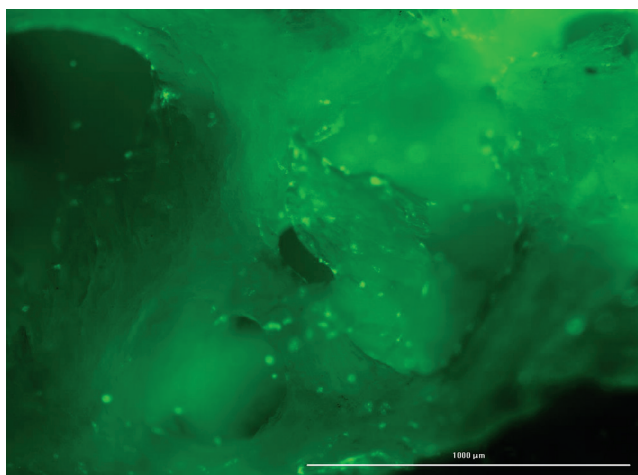


Рис. 8. Жизнеспособные клетки на образцах материала «Депротекс». Флуоресцентная микроскопия. Флуорохром Calcein AM. Ув. $\times 40$

Figure 8. Viable cells on Deprotex samples. Fluorescence microscopy. The fluorochrome Calcein AM. Mag. $\times 40$

Для оценки цитотоксичности материала использовали стандартный МТТ-тест (табл. 1). Анализ результатов исследования абсорбции гранул формазана при проведении МТТ-теста не выявил статистически значимых отличий величин данного параметра взаимодействия фибробластов дермы человека с экстрактами образцов модифицированной ДПК, полученных после 1-х и 7-х сут. экстракции в сравнении с показателем соответствующего контроля, что свидетельствовало

об отсутствии снижения жизнеспособности клеток выбранной для исследования клеточной линии.

Из представленных данных видно, что экстракты аллогенного материала «Депротекс» не токсичны, т.к. уровень (ранг) цитотоксичности соответствует 1 согласно ранговой шале оценки цитотоксичности (табл. 2).

Уровень цитотоксичности 0 и 1 соответствует нетоксичным материалам, 2–5 — цитотоксичным [16].

Таблица 1

Выраженность цитотоксичности депротейнизированной костной матрицы (костнопластический материал «Депротекс»)

Группа	Единицы измерения	Период экстракции «Депротекс»	
		1 день	7 дней
Контроль (n = 8)	ОП, М±m	0,345±0,016	0,563±0,146
	ОИР, %	100	100
	Ранг цитотоксичности	0	0
Экстракт (n = 8)	ОП, М±m	0,332±0,032	0,459±0,177
	ОИР, %	96	81
	Ранг цитотоксичности	1	1
Экстракт 1:1 (n = 8)	ОП, М±m	0,326±0,021	0,544±0,189
	ОИР, %	94	97
	Ранг цитотоксичности	1	1
Экстракт 1:2 (n = 8)	ОП, М±m	0,315±0,039	0,554±0,189
	ОИР, %	91	98
	Ранг цитотоксичности	1	1
Экстракт 1:4 (n = 8)	ОП, М±m	0,341±0,045	0,551±0,19
	ОИР, %	99	98
	Ранг цитотоксичности	1	1

Таблица 2

Шкала оценки цитотоксичности [16]

Относительная интенсивность роста	Уровень цитотоксичности
100	0
75–99	1
50–74	2
25–49	3
1–24	4
0	5

Обсуждение

Одной из перспективных современных стратегий лечения массивных и осложненных дефектов костной ткани стало использование сложных конструкторов (тканеинженерных конструкций) на основе матриц-носителей и культивированных клеток [17].

В качестве носителей-скаффолдов (каркасов) для тканеинженерных конструкций используются как искусственные, так и биологические материалы. Носитель (каркас) для МСК должен обладать остеоиндуктивностью, остеокондуктивностью [18], обеспечивать адгезию и функционирование клеток. Важнейшая характеристика такого каркаса — биосовместимость, что включает отсутствие цитотоксичности и способность поддерживать нормальный клеточный метаболизм [19]. Еще одним важным критерием для создания каркасов/носителей являются механические свойства, которые должны максимально соответствовать механическим свойствам костей хозяина [20]. Кроме того, для обеспечения диффузии кислорода, питательных веществ и удаления продуктов метаболизма необходимой особенностью носителей является наличие системы взаимосвязанных пор различного размера [21], что потенциально обеспечивает и условия для формирования мелких кровеносных сосудов. Таким образом, каркасы (носители-скаффолды) должны служить проводящим и индуктивным микроокружением для поддержания пролиферации и дифференцировки стволовых клеток в остеобласты и остециты, т.е. становиться нишей для стволовых клеток и быть направленными на имитацию свойств естественной костной ткани [22, 23].

Всем перечисленным требованиям соответствуют продукты из аллогенной кости. Они являются практически идеальным материалом для получения каркасов для сложных конструкторов, т.к. по своей архитектонике и физико-механическим свойствам соответствуют характеристикам кости реципиента и обладают остеоиндуктивностью и остеокондуктивностью. Одним из недостатков аллогенного костного материала является сложность получения исходной донорской костной ткани.

В качестве наиболее перспективного клеточного компонента для регенерации костной ткани на протяжении двух последних десятилетий активно изучаются МСК. Они могут быть получены из самых различных источников: костного мозга, надкостницы, пульпы зуба, плаценты, пуповины, жировой ткани и т.д. [24]. Все виды МСК, независимо от источника получения, должны соответствовать трем основным критериям, выработанным Международным обществом клеточной терапии (ISCT): адгезия к пластику, экспрессия специфических

маркеров, способность к дифференцировке в остеобласты, адипоциты и хондробласты в условиях *in vitro* [25]. Для восстановления костной ткани основное значение имеет остеогенный потенциал клеточных культур. По данным одних специалистов, остеогенный потенциал МСК КМ и МСК ЖТ не отличается [26, 27], по данным других, остеогенный потенциал МСК КМ и МСК надкостницы выражены значительно, чем МСК ЖТ [28, 29]. При этом в сравнительном исследовании было показано, что выход стволовых клеток и способность к пролиферации у МСК ЖТ выше, чем у МСК КМ [30]. Указанные особенности МСК ЖТ, а также легкая доступность при получении и относительное изобилие МСК ЖТ по сравнению с МСК КМ, позволяющие получить необходимое для терапевтических целей количество клеточной массы, делают жировую ткань наиболее перспективным источником МСК для практического применения [31, 32]. Чаще всего большое количество аллогенной жировой ткани может быть получено во время стандартных операций липосакции, которые проводятся в клиниках всего мира. Кроме того, важно подчеркнуть, что использование жировой ткани позволяет получать и в ряде ситуаций применять не только аллогенные, но и аутологичные МСК ЖТ, что снимает массу юридических, этических и даже психологических проблем, возникающих у некоторых пациентов при лечении сложных патологических процессов. Все вышесказанное послужило основанием для выбора в качестве клеточного материала для исследования МСК ЖТ человека.

Заселение костных матриц клетками (дермальные фибробласты и МСК) происходит равномерно, что подтверждено количественными данными — количество адгезированных клеток на одно поле зрения. Однако нельзя не отметить факт, что осуществление депротенинизации (децеллюляризации) костной матрицы изменяет характеристики адгезированных клеток. Так, наиболее выраженные изменения касаются увеличения размеров ядер клеток, адгезированных на депротенинированную костную матрицу губчатой структуры на 25–30% по сравнению с величиной аналогичного параметра на образцах нативной или депротенинированной костной матрицы компактной структуры. Это может быть обусловлено более глубокой степенью очистки и освобождением костного матрикса от органических компонентов до следового уровня содержания альбумина в образцах костной ткани с формированием большей площади поверхности матрицы [7]. При этом показатели плотности адгезии клеток и распределение клеток по поверхности депротенинированной костной матрицы губчатой структуры аналогичны показателям нативной

костной матрицы и депротеинизированной костной матрицы компактной структуры. Поскольку губчатая структура костной ткани предполагает достаточно выраженную пористость материала матрицы, ядра клеток располагаются по внутренним и внешним поверхностям трабекул (периметрам пор), подчеркивая архитектуру костной матрицы.

Более глубокая степень очистки костной матрицы способствует более выраженной адгезии, миграции и, вероятно, пролиферации клеточных элементов, о чем косвенно свидетельствует увеличение размеров ядер клеток (от 8,8 до 11,5 мкм), средняя площадь ядер клеточных элементов (от 86,3 мкм до 129,0 мкм) и средний периметр ядер (от 30,7 мкм до 40,7 мкм). Клетки хорошо адгезируются на поверхности и в глубоких структурах образцов губчатого костного материала, проникая в его поры. Это сопровождается сохранением жизнеспособности клеток до 7 суток исследования.

Матрицы, изготовленные из различных по структуре и различными способами технологической обработки образцов костной ткани, используемые в нашей работе, нетоксичны для живых клеток. Наши данные подтверждаются данными других исследователей (патент на изобретение RU 2715238 C1 от 26.02.2020).

Заключение

Полученные *in vitro* результаты исследования влияния нативной и депротеинизированной компактной и губчатой аллогенных костных матриц свидетельствуют о том, что глубокая степень очистки костной матрицы определяет отсутствие цитотоксического влияния и формирование наиболее благоприятных условий для реализации свойств и характеристик (адгезия, миграция, пролиферация клеточных элементов, жизнеспособность) МСК ЖТ. Полученные результаты демонстрируют возможность создания тканеинженерных конструкций на основе матриц из костной ткани различной структуры. Наиболее подходят для этой цели депротеинизированные костные матрицы, особенно губчатые по структуре.

Этическая экспертиза

Все процедуры и манипуляции, выполняемые в ходе данного исследования, рассмотрены и утверждены этическим комитетом ФГБУ «ННИИТО им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России на предмет соответствия этическим принципам, а протокол исследования *in vitro* одобрен локальным этическим комитетом и утвержден Ученым советом ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России.

Информированное согласие

Каждый пациент, предоставивший свой материал для получения клеточных культур, дал информированное добровольное информированное согласие на участие в исследовании и был предварительно обследован и осмотрен специалистами.

Литература [References]

1. Воробьев К.А., Божкова С.А., Анисимова Л.И., Нетылько Г.И. Влияние методов заготовки костнопластического материала на процессы ремоделирования в модели костного дефекта в эксперименте *in vivo*. *Практическая медицина*. 2019;17(1):67-72. doi: 10.32000/2072-1757-2019-1-67-72.
2. Vorobyov K.A., Bozhkova S.A., Anisimova L.I., Netylko G.I. [Effect of the osteoplastic material processing methods on the remodeling in the experimental bone defect model *in vivo*]. *Prakticheskaya meditsina* [Practical medicine]. 2019;17(1):67-72. (In Russian). doi: 10.32000/2072-1757-2019-1-67-72.
3. Живцов О.П., Алейник Д.Я., Орлинская Н.Ю., Митрофанов В.Н. Особенности регенерации костной ткани в условиях применения клеточно-инженерной конструкции для восстановления костного дефекта у кроликов. *Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований*. 2019;(11):54-59. doi: 10.17513/mjpf.12931.
4. Zhivtsov O.P., Aleynik D.Ya., Orlynskaya N.Yu., Mitrofanov V.N. [Peculiarities of bone tissue regeneration in conditions of a cell engineering construction for restoring bone defect in a rabbit]. *Mezhdunarodnyy zhurnal prikladnykh i fundamental'nykh issledovaniy* [International journal of applied end fundamental study]. 2019;(11):54-59. (In Russian). doi: 10.17513/mjpf.12931.
5. Кирилова И.А., Садовой М.А., Подорожная В.Т. Сравнительная характеристика материалов для костной пластики: состав и свойства. *Хирургия позвоночника*. 2012;(3):72-83. doi: 10.14531/ss2012.3.72-83.
6. Kirilova I.A., Sadovoy M.V., Podorozhnaja V.T. [Comparative characteristics of materials for bone grafting: composition and properties]. *Hirurgiâ pozvonočnika* [Spine Surgery]. 2012;(3):72-83. (In Russian). doi: 10.14531/ss2012.3.72-83.
7. Мухаметов У.Ф., Мухаметов Ф.Ф., Сулейманов Я.Н., Нараев Р.Я., Нигматуллин Р.Т., Шангина О.Р. Некоторые аспекты ревизионного эндопротезирования тазобедренного сустава. Пластика костных дефектов губчатыми аллоплантами. *Гений ортопедии*. 2016;(4):29-35. doi: 10.18019/1028-4427-2016-4-29-35.
8. Mukhametov U.F., Mukhametov F.F., Suleimanov Ya.N., Nagaev R.Ia., Nigmatullin R.T., Shangina O.R. [Some aspects of the hip arthroplasty revision. Bone defects plasty with sponge allografts]. *Genij Ortopedii*. 2016;(4):29-35. (In Russian). doi: 10.18019/1028-4427-2016-4-29-35.
9. Fernandez de Grado G., Keller L., Idoux-Gillet Y., Wagner Q., Musset A.M., Benkirane-Jessel N. et al. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J Tissue Eng*. 2018;9:2041731418776819. doi: 10.1177/2041731418776819.
10. Воробьев К.А., Божкова С.А., Тихилов Р.М., Черный А.Ж. Современные способы обработки и стерилизации аллогенных костных тканей (обзор литературы). *Травматология и ортопедия России*. 2017;23(3):134-147. doi: 10.21823/2311-2905-2017-23-3-134-147.

- Vorobyov K.A., Bozhkova S.A., Tikhilov R.M., Cherny A.Zh. [Current Methods of Processing and Sterilization of Bone Allografts (review of literature)]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and Orthopedics of Russia]. 2017;23(3):134-147. (In Russian). doi:10.21823/2311-2905-2017-23-3-134-147.
7. Кирилова И.А. Анатомо-функциональные свойства кости как основа создания костно-пластических материалов для травматологии и ортопедии. Москва: Физматлит; 2019. 256 с.
 - Kirilova I.A. [Anatomical and functional properties of bone as a basis for the creation of bone-plastic materials for traumatology and orthopedics]. Moscow: Fizmatlit; 2019. 256 p.
 8. Gharedaghi M., Peivandi M.T., Mazloomi M., Shoorin H.R., Hasani M., Seyf P., Khazaei F. Evaluation of Clinical Results and Complications of Structural Allograft Reconstruction after Bone Tumor Surgery. *Arch Bone Jt Surg*. 2016;4(3):236-242.
 9. Qu H., Guo W., Yang R., Li D., Tang S., Yang Y. et al. Reconstruction of segmental bone defect of long bones after tumor resection by devitalized tumor-bearing bone. *World J Surg Oncol*. 2015;13:282. doi: 10.1186/s12957-015-0694-3.
 10. Avril P., Le Nail L.R., Brennan M.Á., Rosset P., De Pinieux G., Layrolle P. et al. Mesenchymal stem cells increase proliferation but do not change quiescent state of osteosarcoma cells: Potential implications according to the tumor resection status. *J Bone Oncol*. 2015;5(1): 5-14. doi: 10.1016/j.jbo.2015.11.002.
 11. Perrot P., Rousseau J., Bouffaut A.L., Rédini F., Cassagnau E., Deschaseaux F. et al. Safety concern between autologous fat graft, mesenchymal stem cell and osteosarcoma recurrence. *PLoS One*. 2010;5(6):e10999. doi: 10.1371/journal.pone.0010999.
 12. Caplan A.I., Hariri R. Body Management: Mesenchymal Stem Cell the Internal Regenerator. *Stem Cells Transl Med*. 2015;4(7):695-700. doi: 10.5966/sctm.2014-0291.
 13. Кирилова И.А., Подорожная В.Т., Павлов В.В., Бедорева И.Ю. Организация донорства головок бедренных костей в Новосибирском НИИТО. *Успехи современного естествознания*. 2015;(9):49-52. Режим доступа: <https://natural-sciences.ru/ru/article/view?id=35524>.
 - Kirilova I.A., Podorozhnaya V.T., Pavlov V.V., Bedoreva I.Y. [Unated donation femoral heads in the Novosibirsk RITO]. *Uspekhi sovremennogo yestestvoznaniya* [Advances in Current Natural Sciences] 2015;(9):49-52. Available from: <https://natural-sciences.ru/ru/article/view?id=35524>. (In Russian).
 14. Хэм А., Кормак Д. Костная ткань. В кн.: *Гистология*. Москва: Мир; 1983. Т. 3. С. 19-131.
 - Ham A., Cormack D. Bone tissue. In: *Histology*. Moscow: Mir; 1983. Vol. 3. p. 19-131.
 15. Mossman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Met*. 1983;65:55-63.
 16. Shanmugam S., Gopal B. Antimicrobial and cytotoxicity evaluation of aliovalent substituted hydroxyapatite. *App Surf Sci*. 2014;303:277-281. doi: 10.1016/j.apsusc.2014.02.166.
 17. Ho-Shui-Ling A., Bolander J., Rustom L.E., Johnson A.W., Luyten F.P., Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*. 2018;180:143-162. doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.07.017.
 18. Oryan A., Alidadi S., Moshiri A., Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res*. 2014;9(1):18. doi: 10.1186/1749-799X-9-18.
 19. Amini A.R., Laurencin C.T., Nukavarapu S.P. Bone tissue engineering: recent advances and challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40:363-408. doi: 10.1615/CritRevBiomedEng.v40.i5.10.
 20. Mallick K.K., Cox S.C. Biomaterial scaffolds for tissue engineering. *Front Biosci*. 2013;5:341-360. doi: 10.2741/e620.
 21. Bose S., Roy M., Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends Biotechnol*. 2012;30(10):546-554. doi: 10.1016/j.tibtech.2012.07.005.
 22. Dawson E., Mapili G., Ericson K., Taqvi S., Roy K. Biomaterials for stem cell differentiation. *Adv Drug Deliv Rev*. 2008;60:215-228. doi: 10.1016/j.addr.2007.08.037.
 23. Reichert J.C., Nöth U., Berner A., Huttmacher D.W. Bone. In: Steinhoff G. (ed.) *Regenerative Medicine – from Protocol to Patient*. Switzerland: Springer, Cham; 2016. doi: 10.1007/978-3-319-28386-9_9.
 24. Mushahary D., Spittler A., Kasper C., Weber V., Charwat V. Isolation, cultivation, and characterization of human mesenchymal stem cells. *Cytometry A*. 2018;93(1):19-31. doi: 10.1002/cyto.a.23242
 25. Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal cells. The international Society for cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006; 8(4):315-317. doi: 10.1080/14653240600855905.
 26. Ugarte D.A., Morizono K., Elabarbary A., Alfonso Z., Zuk P.A., Zhu M. et al. Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. *Cells Tissues Organs*. 2003;174:101-109. doi: 10.1159/000071150.
 27. Mizuno H., Tobita M., Uysal A.C. Concise review: Adipose-derived stem cells as a novel tool for future regenerative medicine. *Stem Cells*. 2012;30(5):804-810. doi: 10.1002/stem.1076.
 28. Im G.I., Shin Y.W., Lee K.B. Do adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have the same osteogenic and chondrogenic potential as bone marrow-derived cells? *Osteoarthritis Cartilage*. 2005;13(10):845-853. doi: 10.1016/j.joca.2005.05.005.
 29. Hayashi O., Katsube Y., Hirose M., Ohgushi H., Ito H. Comparison of osteogenic ability of rat mesenchymal stem cells from bone marrow, periosteum, and adipose tissue. *Calcif Tissue Int*. 2008;82(3):238-247. doi: 10.1007/s00223-008-9112-y.
 30. Kern S., Eichler H., Stoeve J., Klüter H., Bieback K. Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*. 2006;24(5):1294-1301. doi: 10.1634/stemcells.2005-0342.
 31. Lendeckel S., Jodicke A., Christophis P., Heidinger K., Wolff J., Fraser J.K. et al. Autologous stem cells (adipose) and fibrin glue used to treat widespread traumatic calvarial defects: case report. *J Craniomaxillofac Surg*. 2004;32(6):370-373. doi: 10.1016/j.jcms.2004.06.002.
 32. Mesimäki K., Lindroos B., Törnwall J., Mauno J., Lindqvist C., Kontio R. et al. Novel maxillary reconstruction with ectopic bone formation by GMP adipose stem cells. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009;38(3):201-209. doi: 10.1016/j.ijom.2009.01.001.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Черданцева Лилия Александровна — канд. мед. наук, заведующий лабораторией заготовки и консервации тканей, ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск, Россия
 cherdanceff@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4729-3694>

Анастасиева Евгения Андреевна — аспирант, ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск, Россия
 evgeniya.anastasieva@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-9329-8373>

Алейник Диана Яковлевна — канд. мед. наук, старший научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины НИИ ЭОиБМТ (НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий), ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, г. Нижний Новгород, Россия
 daleyunik@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1482-4281>

Егорихина Марфа Николаевна — канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник лаборатории регенеративной медицины НИИ ЭОиБМТ (НИИ экспериментальной онкологии и биомедицинских технологий), ФГБОУ ВО «Приволжский исследовательский медицинский университет» Минздрава России, г. Нижний Новгород, Россия
 egorihina.marfa@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8815-9651>

Кирилова Ирина Анатольевна — д-р мед. наук, заместитель директора по научной работе, ФГБУ «Новосибирский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Я.Л. Цивьяна» Минздрава России, г. Новосибирск, Россия
 IrinaKirilova71@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1911-9741>

Заявленный вклад авторов

Черданцева Л.А. — обзор литературы, подготовка нативных и депротенинизированных губчатых алло-костных матриц, написание текста.

Анастасиева Е.А. — обзор литературы, выполнение экспериментального раздела, корректура и перевод текста.

Алейник Д.Я. — дизайн исследования, обработка данных, редактирование текста.

Егорихина М.Н. — проведение биологических исследований, обработка данных.

Кирилова И.А. — концепция, дизайн исследования, написание и редактирование текста.

Все авторы прочли и одобрили финальную версию рукописи статьи. Все авторы согласны нести ответственность за все аспекты работы, чтобы обеспечить надлежащее рассмотрение и решение всех возможных вопросов, связанных с корректностью и надежностью любой части работы.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

AUTHORS' INFORMATION:

Liliya A. Cherdantseva — Cand. Sci. (Med.), Head of the Laboratory for Procurement and Preservation of Tissues, Tsivyan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russia
 cherdanceff@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-4729-3694>

Evgeniya A. Anastasieva — PhD Student, Tsivyan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russia
 evgeniya.anastasieva@gmail.com
<https://orcid.org/0000-0002-9329-8373>

Diane Ya. Aleynik — Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Laboratory of Regenerative Medicine, Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia
 daleyunik@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1482-4281>

Marfa N. Egorikhina — Cand. Sci. (Biol.), Leading Researcher, Laboratory of Regenerative Medicine, Institute of Experimental Oncology and Biomedical Technologies, Privolzhsky Research Medical University, Nizhny Novgorod, Russia
 egorihina.marfa@yandex.ru
<https://orcid.org/0000-0002-8815-9651>

Irina A. Kirilova — Dr. Sci. (Med.), Deputy Director, Tsivyan Novosibirsk Research Institute of Traumatology and Orthopedics, Novosibirsk, Russia
 IrinaKirilova71@mail.ru
<https://orcid.org/0000-0003-1911-9741>