

ВОРОБЬЕВ КОНСТАНТИН АЛЕКСАНДРОВИЧ

**АЛЛОГЕННЫЕ КОСТНЫЕ МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ
РЕКОНСТРУКТИВНОЙ ХИРУРГИИ И ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ**
(экспериментальное исследование)

14.01.24 – трансплантология и искусственные органы

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва 2020

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном учреждении «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

Доктор биологических наук,
профессор

Севастьянов Виктор Иванович

Официальные оппоненты:

Кирпатовский Владимир Игоревич – доктор медицинских наук, профессор, главный научный сотрудник научно-лабораторного отдела Научно-исследовательского института урологии и интервенционной радиологии им. Н.А. Лопаткина – филиал Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский радиологический центр» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Боровкова Наталья Валерьевна – доктор медицинских наук, заведующая научным отделением биотехнологий и трансфузиологии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи имени Н.В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы».

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Самарский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «11» декабря 2020 г. в 10.00 часов на заседании Диссертационного совета Д 208.055.01 при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России по адресу: 123182, Москва, ул. Щукинская, дом 1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Минздрава России, а также на сайте <http://www.transpl.ru>

Автореферат разослан «____»

2020 г.

Ученый секретарь

Диссертационного Совета Д 208.055.01

Кандидат ветеринарных наук

Волкова Елена Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Количество операций с использованием костнопластических материалов в мире колеблется от 3,5 до 4 миллионов ежегодно (Henkel J. et al., 2014) и тенденция к росту продолжает сохраняться (Badwin P. Et al., 2019). Костная трансплантация выполняется в 10 раз чаще, чем других органов и тканей и занимает второе место после применения компонентов крови (Nandi S.K. et al., 2010). Рост количества реконструктивно-пластических операций на скелете можно объяснить увеличением числа высокотехнологичных операций (все виды эндопротезирования) а, соответственно, и количества повторных операций. По данным большинства национальных регистров артропластики коленного и тазобедренного суставов, одной из наиболее актуальных причин растущих потребностей в костнопластических материалах является увеличение ревизионных вмешательств на крупных суставах, которые сопровождаются замещением дефекта в зоне имплантации компонентов эндопротеза (Тихилов Р.М. с соавт., 2013; Загородний Н.В. с соавт., 2014; Корнилов Н.Н. с соавт. 2015; Мухаметов У.Ф. с соавт., 2016; Loma R. et al., 2013).

Широкое применение аллогенных костнопластических материалов традиционно для детской ортопедии, в реконструктивных операциях при костной патологии и деформациях костей у детей, стоит отметить, что количество пациентов данной группы продолжает увеличиваться ежегодно, что объясняется как ростом заболеваемости, так и выявляемости в связи с доступностью диагностики (Снетков А.И. с соавт., 2003; Поздеев А.П. с соавт., 2010; Бандурашвили А.Г., с соавт. 2014).

Аутологичные ткани считаются «золотым стандартом» трансплантации, но в случаях, когда их применение ограничено или невозможно - первой альтернативой считаются аллогенные ткани (Lowry J. et al., 2006; Henkel J. et al., 2014). Донорские ткани и аллогенные костнопластические материалы являются предпочтительными среди прочих биологических и синтетических пластических материалов, поскольку соблюдается один из ведущих принципов трансплантологии – внутривидовой специфичности тканей (Готье С.В., 2018). В органной трансплантации главной задачей является сохранение жизнеспособности органа, при пересадке аллогенных тканей решающее значение имеет сохранность их биологической активности и структуры, случае обработки и стерилизации, которая, в конечном итоге, и определяет положительный результат лечения (Имамалиев А.С. 1975; Кирилова И.А., 2011).

Анализируя состояние деятельности отечественных тканевых банков, было отмечено, что остаются сложности и коллизии в нормативно-правом регулировании в сфере донорства и трансплантации тканей в России (Готье С.В. с соавт., 2018; Путило Н.В., 2019), нет единых стандартов, на которых базируются технологии обработки и стерилизации тканей (Савельев В.И.,

2001; Савельев В.И. с соавт., 2009; Шангина О.Р. с соавт., 2019). В результате производимые костнопластические материалы различны по своим свойствам и не всегда соответствуют качеству, что затрудняет повторяемость и прогнозируемость клинических результатов, а иногда приводит к осложнениям после имплантации (Волков А.В., 2015).

Современной мировой тенденцией стало развитие технологий регенеративной медицины и разработка модифицированных материалов с улучшенными или направленными свойствами (Миронов С.П. с соавт., 2007; Севастьянов В.И. 2014; Готье С.В. 2019; Самойлов А.С. с соавт., 2019). Костнопластические материалы перестали быть статическими и присущая им ранее инертность, сменяется функциональной активностью, посредством нанесения на них культур клеток, биологически-активных веществ, факторов роста, которые стимулируют процессы остеогенеза (Ардашев И.П. с соавт., 2011), либо фиксации на материалах фармакологических субстанций и продуктов генной инженерии (Деев Р.В. с соавт., 2015). В связи с этим, одной из задач биоимплантологии является применение технологий при обработке и стерилизации тканей, позволяющих создавать скаффолды для тканеинженерных конструкций или дальнейшей модификации материалов (Василец В.Н. с соавт., 2010; Бухарова Т.Б. с соавт., 2011; Волова Л.Т. с соавт., 2012; Матвейчук И.В. с соавт., 2013; Севастьянов В.И. с соавт., 2017; Brydone A.S. et al., 2010).

Цель исследования

Создание аллогенных костнопластических материалов с улучшенными биосовместимыми и функциональными свойствами.

Задачи исследования

1. Разработать оригинальный способ децеллюляризации и делипидизации губчатой кости, основанный на рекомендациях и стандартах мировых тканевых банков.
2. Исследовать *in vitro* биосовместимые свойства лабораторных образцов полученных аллогенных костнопластических материалов.
3. Провести сравнительный анализ *in vitro* функциональных свойств образцов костнопластических материалов, заготовленных по разработанной методике и другими способами.
4. На экспериментальной модели полостных дефектов большеберцовой кости кролика:
 - оценить особенности перифокальных реакций тканей после имплантации образцов костнопластического материала.
 - исследовать процессы ремоделирования имплантированного костнопластического материала и регенерации поврежденной костной ткани.

Научная новизна

1. Разработан оригинальный способ обработки аллогенной губчатой костной ткани без использования токсичных химических веществ.
2. В экспериментах *in vitro* доказана способность полученного аллогенного костнопластического материала поддерживать адгезию и пролиферацию остеогенных клеток.
3. На экспериментальной модели полостных дефектов большеберцовой кости доказана высокая способность костного имплантата к ремоделированию, что приводит к восстановлению поврежденной кости без наличия выраженных воспалительных реакций.
4. Научно обоснована и экспериментально подтверждена возможность дальнейшего применения полученного костнопластического аллогенного материала в клинической практике для реконструктивной хирургии при патологии костных тканей.

Практическая значимость

1. Разработанный аллогенный костнопластический материал расширяет возможности технологий реконструктивной и заместительной хирургии на костных тканях.
2. Применение полученного материала в сочетании с культурой клеток, факторами роста, аутологичной обогащённой тромбоцитами плазмой, аспиратом костного мозга и антибактериальными препаратами позволяет рекомендовать его для создания тканеинженерных конструкций - биомедицинских клеточных продуктов, как для эффективного замещения дефекта костной ткани, так и для стимуляции процессов ее регенерации.

Методология и методы исследования

1. Модифицированные протоколы выделения, культивирования, подтверждения фенотипа и дифференцировки в остеогенном направлении ММСК из костного мозга бедренной кости крысы линии Wistar, основанные на классических методиках.
2. Метод физической и химической децеллюляризации и делипидизации аллогенной губчатой костной ткани. Полученный костный матрикс будет стерилизован радиационным способом и исследован на биологическую безопасность.
3. Морфологические методы исследования с применением окрасок гематоксилином-эозином и окраской по методу Малори для оценки перифокальных реакций тканей и процессов остеointеграции ткани реципиента с имплантатом.
4. Метод сканирующей электронной микроскопии использовался для визуальной оценки состояния минерально-коллагенового матрикса костных блоков.

5. Рентгенологический метод – мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ) для оценки процесса ремоделирования имплантированного материала.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанный способ обработки губчатой костной ткани, позволяет получить костнопластический материал, обладающий остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами.

2. Полученный по оригинальной методике костнопластический материал продемонстрировал низкую цитотоксичность, высокую степень биосовместимости и способность поддерживать адгезию и пролиферацию клеток.

3. Способы децеллюляризации, делипидизации и стерилизации, применяемые к губчатой костной ткани при изготовлении имплантатов для реконструктивной хирургии на скелете, влияют на функциональные свойства костнопластического материала.

4. Разработанный по оригинальной методике костнопластический материал, является апирогенным, биосовместимым, биodeградируемым и стимулирующим процессы костеобразования имплантатом.

Степень достоверности и апробации результатов

Достоверность результатов определяется объемом проведенных исследований. В исследованиях *in vitro* использованы клеточные культуры ММСК крыс линии Wistar, выделенных по оригинальному протоколу; в экспериментах *in vivo* моделирование костного дефекта выполнено (в общем) на 96 сегментах нижних конечностей 48 кроликов породы Шиншилла с применением современных лабораторных и инструментальных методов анализа (сканирующая электронная микроскопия, рентгенологический - мультиспиральная компьютерная томография (МСКТ), бактериологический, радиационный, методы физической и химической децеллюляризации и делипидизации, методы работы с клеточными линиями), а также адекватных методов статистической обработки данных.

Апробация работы состоялась 02 июля 2020 года на совместной конференции научных и клинических подразделений Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Результаты работы были представлены и доложены на российских и международных конференциях: VII Всероссийский симпозиум с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии» (Астрахань, 2017 г.); III Российский национальный конгресс «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2017 г.);

Всероссийская конференция с международным участием «Биологические аспекты замещения костных дефектов и взаимодействия имплантат-кость» (Санкт-Петербург, 2017 г.); XI Всероссийский съезд травматологов-ортопедов (Санкт-Петербург, 2018 г.); 19-й международный конгресс европейского общества травматологов-ортопедов (Барселона, Испания 2018 г.); IX Всероссийский съезд трансплантологов (Москва, 2018 г. работа удостоена призового места); Всероссийская научная конференция «Современные проблемы гистологии и патологии скелетных тканей» (Рязань, 2018 г.); Евразийский ортопедический форум EOF (Москва, 2019 г.); X научно-практическая конференция с международным участием «Сверхкритические флюиды: фундаментальные основы, технологии, инновации» (Ростов-на-Дону, 2019 г.); IV Российский национальный конгресс с международным участием «Трансплантация и донорство органов» (Москва, 2019 г.); XVIII ассамблея «Здоровая Москва» (Москва, 2020 г.); Конгресс по ортобиологии «Технологии регенеративной медицины в травматологии и ортопедии» (Москва, 2020 г.).

Внедрение результатов исследования в практику

Результаты исследования внедрены в отдел биомедицинских технологий и тканевой инженерии Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов имени академика В.И. Шумакова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, в лабораторию «Тканевой Банк» Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации, в отделение травматологии и ортопедии Государственного бюджетного учреждения здравоохранения города Москвы «Городская клиническая больница №31 Департамента здравоохранения города Москвы», а также в образовательный процесс на кафедре травматологии, ортопедии и артрологии факультета непрерывного медицинского образования Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Российский университет дружбы народов».

Личный вклад автора

Автор лично принимал участие в формулировании цели и задач исследования, участвовал в разработке технологии изготовления костнопластического материала и составлении плана экспериментальных исследований. Самостоятельно выполнял весь рабочий цикл – забор донорского материала, децеллюляризация и делипидизация губчатой кости, отработка методик и контроль качества этапов. Самостоятельно выполнял операции на кроликах, отслеживал их в послеоперационном периоде.

Разрабатывал, планировал и проводил эксперименты с культурой мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга крыс. Самостоятельно осуществлял интерпретацию полученных результатов в научных публикациях, тезисах и докладах на научных конференциях.

Публикации по теме диссертации

По теме диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 3 статьи в российских журналах, входящих в перечень рецензируемых научных изданий ВАК РФ, 1 статья в зарубежном журнале. Получен патент на изобретение.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы, посвященной материалам и методам исследования, результатов собственных исследований и их обсуждения, заключения, выводов, практических рекомендаций и списка литературы, включающего 221 источник, в том числе 68 отечественных и 153 зарубежных. Работа изложена на 157 страницах машинописного текста, иллюстрирована 62 рисунками, содержит 7 таблиц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Костнопластические материалы

Тестировали четыре группы костнопластических материалов:

Контрольная группа (КГ) имплантаты, заготовленные химическим способом, на основе человеческой губчатой кости (головка бедренной кости) взятой от посмертных доноров очищенной до минерально-коллагенового костного матрикса, стерилизованной химическим способом. Данные импланты получали в костном банке из морозильной камеры -20, полностью погруженными в стерилизующую морозостойкую многокомпонентную жидкую среду (патент РФ №2235462) и герметично упакованные в полиэтиленовые пакеты, согласно технологии.

Первая группа сравнения (ГС1) - материалы на основе губчатой аллокости из головки бедренной кости, резецированной во время операции первичного эндопротезирования тазобедренного сустава, заготовленной термическим способом по технологии TELOS в приборе LobatorSD-2 (TelosGmbH, Германия) в соответствии с инструкциями производителя.

Вторая группа сравнения (ГС2) - высокоочищенный ксеногенный биоматериал «Остеоматрикс» (коммерческий продукт) на основе кости, представляющий собой композицию природного коллагена и гидроксиапатита (ГАП) в сочетании с сульфатированными гликозаминогликанами (сГАГ) расфасованный в стеклянные флаконы по 20 см куб, лиофилизированных, стерилизованных ионизирующим излучением дозой 18 кГр.

Опытная группа (ОГ) – аллогенный материал на основе губчатой аллокости заготовленный по разрабатываемой экспериментальной методике очистки циклическим способом, лиофилизированный и стерилизованный радиацией. Для изготовления материала использовалась губчатая кость от прижизненных доноров, взятая из головок бедренных костей, резецированных в ходе операции (первичной тотальной артропластики тазобедренного сустава) и губчатая кость из мышечков бедренной и большеберцовой костей от доноров-трупов.

Работа с культурой клеток. В работе использовались культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК), выделенные из костного мозга (КМ) крыс линии Wistar. Для выделения ММСК использовали содержимое костномозгового канала бедренной кости крыс линии Wistar, общее количество – 10 крыс самок в возрасте 6-8 недель, весом 200-210 г. Для культивирования использовали стандартную ростовую среду: раствор DMEM Gluta MAX с низким содержанием глюкозы, 15% эмбриональной телячьей сыворотки, 100 мкг/мл стрептомицина и 100 Ед/мл пенициллина (LifeTechnologies, Великобритания), модифицированную остеогенную и хондрогенные среды. Подтверждение фенотипа ММСК выполняли на проточном цитометре CytoFLEX (BeckmanCoulter, США), для этого использовали клетки четвертого пассажа.

Остеогенная и хондрогенная дифференцировка ММСК. Для остеогенной дифференцировки ММСК культивировали при +37° С в 24-луночном планшете (Eppendorf, Германия) в количестве 100×10^3 на лунку в течение 14 дней. Остеогенную среду заменяли на свежую каждые 3 дня. Остеогенез оценивали по наличию отложений кальция на поверхности клеточного монослоя окрашиванием клеток ализариновым красным. Для хондрогенной дифференцировки ММСК засеивали в количестве 100×10^3 в 96-луночный планшет (Eppendorf, Германия) и выращивали при +37°С в течение 21 дня. Хондрогенную среду заменяли свежей каждые 3 дня. Хондрогенез оценивали с помощью ПЦР в реальном времени.

Выделение экстракта костных блоков, определение в нём концентрации белка и pH. Костные блоки помещали в центрифужные пробирки объемом 50 мл (Eppendorf, Германия), содержащие стандартную питательную среду без эмбриональной бычьей сыворотки. Количество среды составляло 2 мл на блок, всего 10 блоков в пробирке. Образцы инкубировали при +37°С в шейкере при скорости 200 об/мин. Через 24 полученную среду собирали и центрифугировали на скорости 2000 об/мин в течение 10 мин. Концентрацию белка в экстракте костных блоков определяли в соответствии с инструкциями производителя на флуориметре Qubit 3.0 с использованием набора для анализа белка Qubit (ThermoFisherScientific, США). Количество белка в контрольной среде вычитали из значений образцов для получения конечных концентраций. Образцы бессывороточной среды служили отрицательным контролем.

Оценка воздействия экстракта костных блоков на жизнеспособность ММСК. Степень жизнеспособности ММСК определяли методом МТТ. Подсчет процента нежизнеспособных клеток проводили с помощью флуоресцентной микроскопии на микроскопе EVOS FL (ThermoFisherScientific, США) при 4-х кратном увеличении использованием фильтров DAPI / GFP. Процент мертвых клеток (зеленый) был рассчитан по отношению к общему количеству ядер клеток (синий) с использованием плагина счетчика клеток в Image J Fiji1.51n.

Жизнеспособность ММСК в костных блоках. Оценка осуществлялась жизнеспособности осуществлялась после инкубирования костных блоков в клеточной среде, для этого измеряли оптическую плотность с длиной волны 540–620 нм на приборе ThermoEMS (ThermoFisherScientific, США). Среднее значение плотности контрольных блоков без клеток вычитали из полученных значений исследуемых образцов.

Сканирующая электронная микроскопия образцов костнопластических материалов. Визуализацию минерально-коллагенового матрикса губчатого вещества полученных костных блоков проводили на сканирующем электронном микроскопе Jeol JSM 6390LA (Япония). Для исследования использовали 12 образцов материалов, взятых в случайном порядке

Моделирование полостного дефекта и костная пластика. Для моделирования дефекта и имплантации тестируемых материалов использовали кроликов породы Шиншилла (средний возраст 7 мес., средняя масса 2,7 кг). Эксперименты выполняли на большеберцовой кости 48 половозрелых особей на обеих конечностях животного, всего - 96 макропрепаратов. Для моделирования полостного дефекта в межмышечковой зоне большеберцовой кости выполняли оперативное вмешательство на обеих задних конечностях. Доступ к проксимальному отделу большеберцовой кости осуществляли из кожного разреза 2 см от передне-медиальной поверхности формирования полостного дефекта использовали костный булавовидный бор диаметром 8 мм, с помощью которого формировали полостной дефект глубиной до эндоста противоположной стороны кортикальной стенки - до 10-12 мм.

Гистологические и морфометрические методы исследования. Для гистологического исследования выполняли резекцию проксимального отдела большеберцовой кости с суставной поверхностью тибialного плато на границе верхней/средней трети большеберцовой кости, удаляя мягкие ткани. Фиксировали полученный материал в 10% растворе нейтрального формалина (рН 7,4). Экспериментальный материал после фиксации декальцинировали в 25% растворе соли органической кислоты «Трилон Б» в течении 72 часов, обезвоживали в изопропанолe восходящей концентрации с использованием установки проводки материала Microm STR-120 (MicronTechnology, США) и заливали в парафин, применяя заливочную станцию Leica (Германия). Срезы толщиной 5-7 мкм получали с помощью санного микротомa Leica (Германия). Окраску проводили гематоксилином и эозином согласно протоколам производителей (Био-Витрум, Россия) с использованием автоматического линейного стейнера RaffaelloAdvanced (DIAPATH, S.p.A., Италия). Микроскопическое исследование и фотодокументирование выполняли с помощью светового микроскопа «Leica» (Германия), оснащенного цифровой камерой «Nikon» (Model E950, Япония) с увеличением 40, 100, 200 и 400 раз.

Во всех четырёх экспериментальных группах оценивали особенности перифокальных реакций, остеоинтеграции и ремоделирования тестируемых костных образцов с 7-х до 90-х суток после замещения полостных дефектов большеберцовой кости у кроликов по следующим параметрам: 1) наличие/отсутствие и клеточный состав воспалительного инфильтрата; 2) наличие/отсутствие фиброзной капсулы и её гистологические особенности; 3) наличие/отсутствие и сроки возникновения новообразованных костных балок; 4) наличие/отсутствие плотной волокнистой соединительной (фиброзной) ткани; 5) анализ ангиогенеза и состояния гемопоэтического компонента; 6) сроки биоинтеграции имплантата. Для количественного анализа структурных компонентов использовали морфометрическую сетку Г.Г. Антандилова, установленную в объектив X10 микроскопа МИКМЕД-6 (ЛОМО).

Мультиспиральная компьютерная томография. Исследование выполняли на томографе ToshibaAquilionPrime (Япония) (параметры 120 кВ, 50 мА, фильтр Bone, толщина среза 0,5 мм). При проведении МСКТ проксимального отдела большеберцовой кости кроликов оценивали: 1) границы костного дефекта; 2) характер содержимого зоны дефекта, заполненной костнопластическим материалом; 3) размер дефекта кортикальной пластинки входного отверстия дефекта; 4) особенности резорбции и ремоделирования имплантированного материала. Исследование выполняли на 7, 21, 45 и 90 сутки, согласно запланированным срокам. Визуализацию полученных данных выполняли с помощью программы *efilm* и программы *Siemenssyngo fastView*.

Статистический анализ результатов. Анализ результатов работы с культурой клеток проводили с повторными исследованиями или с независимыми образцами костных блоков ($n \geq 3$). Результаты приведены как средние значения со стандартным отклонением. Разница между средними значениями в экспериментальных группах была оценена с помощью GraphPadPrism 6.0 (США): однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с тестом Tukey для анализа независимых концентраций белка и значений pH; двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с тестом Sidak, для анализа парных значений pH; двухвыборочный t-тест в модификации Уэлча для всех сравнений жизнеспособности ММСК с контрольной группой; парный t-тест для результатов ПЦР. Различия считали достоверными при $P < 0,05$. Анализ данных гистоморфометрии проводили при помощи «MicrosoftExcel» из пакета «MicrosoftOffice 2003» с определением доверительного интервала для средней (по Р. Фишеру) и достоверности различий между изучаемыми группами (величина p). Различия считали достоверными при 95%-ном уровне значимости $p < 0,05$.

Способ изготовления костнопластического материала на основе аллогенной губчатой кости. Способ представляет собой очистку губчатой кости от органических компонентов (делипидизацию и депротеинизацию) и клеточных элементов (децелюлизацию) применяя сочетание физического и химического воздействия на костную ткань. В основу технологии был взят принцип циклической очистки, в котором превалирует физического воздействие с минимальным химическим. Для изготовления была использована аллогенная губчатая кость от прижизненных доноров, взятых из головок бедренных костей, резецированных в ходе операции первичной тотальной артропластики тазобедренного сустава, и губчатая кость из мыщелков бедренной и большеберцовой костей от доноров-трупов. 30 головок бедренных костей были выбраны в случайном порядке от прижизненных доноров, средний возраст составил 60,5 лет (возрастной диапазон 53 – 68 лет). Изъятие головок проходило согласно правилам забора, образцы погружали в двойной стерильный полиэтиленовый контейнер и отправляли на хранение при температуре -80°C в морозильную камеру. Оттаивание проходило в течение 8 часов при комнатной

температуре. Далее в стерильных условиях в боксе биологической безопасности ThermoFisherScientific MSC.9 головки очищали от мягких тканей и хряща, макроскопически оценивали участки с условно-здоровой губчатой костью, при помощи медицинской ручной пилы в стерильных условиях в ламинаре выпиливали кубовидные блоки со стороной ребра 5 мм. Подготовленные блоки погружали в физиологический раствор 400 мл + 1 г ципрофлоксацина и оставляли на 8 часов в холодильнике при температуре +4°C. После экспозиции в растворе антибиотика, блоки промывали в водяной шейкерной бане GFL 1083 (Германия) в течение 1 ч. в дистиллированной воде, предварительно разогретой до 59°C. После чего выполняли промывку водой под давлением (гидродинамическая струя) в течение 15 мин. Далее циклическим способом проводили отмывку костных блоков от клеток и других органических компонентов до минерально-коллагенового матрикса. На первом цикле блоки промывали в водяной шейкерной бане 20 мин. в 10% водном растворе гидрокарбоната натрия с последующей промывкой водой под давлением 15 мин., затем проводили отмывание образцов в ультразвуковой мойке Finnsonic-15170 ml5 (Финляндия) в 10% водном растворе гидрокарбоната натрия 20 мин. при температуре 59°C при частоте 45 Гц и повторно выполняли промывку гидродинамической струей 15 мин. Затем блоки в 10% водном растворе гидрокарбоната натрия в орбитальном шейкере Biosan ES-20 (Латвия) 220 об/минуту в течение 15 мин. По завершению этапа промывки блоки 15 мин. центрифугировали на центрифуге Thermo scientific Megafuge 16R (США) 1850 g, после чего измеряли количества белка в осадке на приборе QUBIT согласно инструкции производителя. На втором цикле использовали такую же последовательность этапов, но с отмывкой дистиллированной водой. По завершению цикла, измеряли концентрацию белка в осадочной жидкости. После пяти циклов концентрация белка составила $21 \pm 3,1$ мкг/мл. Далее выполняли очистку блоков 3% раствором перекиси водорода, предварительно разогретой до 57°C, в следующей последовательности: водяная шейкерная баня, ультразвуковая мойка, орбитальный шейкер 220 об/мин по 20 мин. Затем блоки промывали раствором этанола 70% при температуре 57°C последовательно: водяная шейкерная баня, ультразвуковая мойка, орбитальный шейкер 220 об/мин по 20 минут, 3-х кратная инкубация по 15 мин. в стерильной воде при температуре 59°C в орбитальном шейкере. Блоки высушивали в течение 2-х часов в термостате BMT MMM group (Чехия) при температуре 45°C, после чего выполняли быструю заморозку (-80 C⁰). Блоки лиофилизировали в сублимационной установке HETOPowerDryPL3000 (Дания), при отрицательном давлении с постепенным нагревом от -40°C до +40°C. Температуру повышали на +20°C каждые 8 ч., общее время составило 40 ч. и включило в себя 5 этапов нагрева по 8 ч. Далее блоки упаковывали в двойную полиэтиленовую упаковку «КЛИНИПАК» (Россия). Конечную стерилизацию ионизирующим излучением потоком быстрых электронов на радиационно-технологической установке с линейным ускорителем электронов УЭЛР-10-10-С2 дозой излучения 25 кГр.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Подтверждение фенотипа культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. По результатам проточной цитофлуориметрии, доля клеток с типичным для ММСК фенотипом $CD90^{+}CD45^{-}$ составляла более 95% (рисунок 1).

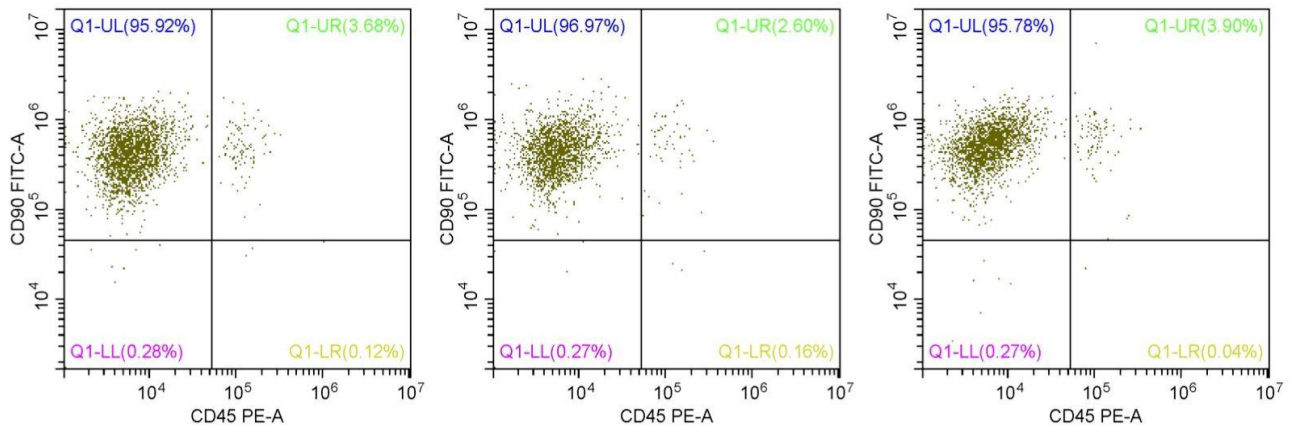


Рисунок 1 - Результаты подтверждение $CD90^{+}CD45^{-}$ фенотипа мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток с помощью проточной цитофлуориметрии

Способность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток к хондрогенной и остеогенной дифференцировке. После 14 суток культивирования ММСК в остеогенной среде наблюдалось положительное окрашивание ализариновым красным, указывающее на отложение кальция в клеточном монослое. На 21 сутки хондрогенеза наблюдалось увеличение экспрессии ACAN в 5 раз, что свидетельствует о синтезе внеклеточного матрикса хондробластами (рисунок 2).

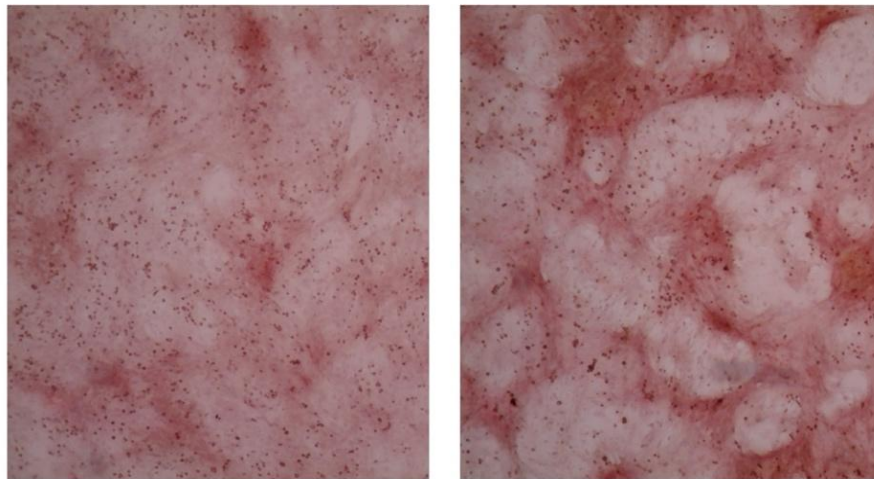


Рисунок 2 - Остеогенная дифференцировка мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток с окраской ализариновым красным на 14 день. Увеличение 4X

Биохимические свойства экстракта костных блоков. Уровень белка в экстракте из костных блоков после термической обработки (ГС1) и в опытных образцах (ОГ) был в 4 раза ниже, чем в среде после химической стерилизации (КГ). Уровень pH экстракта во всех образцах показал щелочное состояние. В течении 24 ч инкубационного периода наблюдался сдвиг pH в щелочную сторону. Через 24 часа у материалов КГ pH экстракта был ниже по сравнению с группами ГС1 и ОГ (таблица 1).

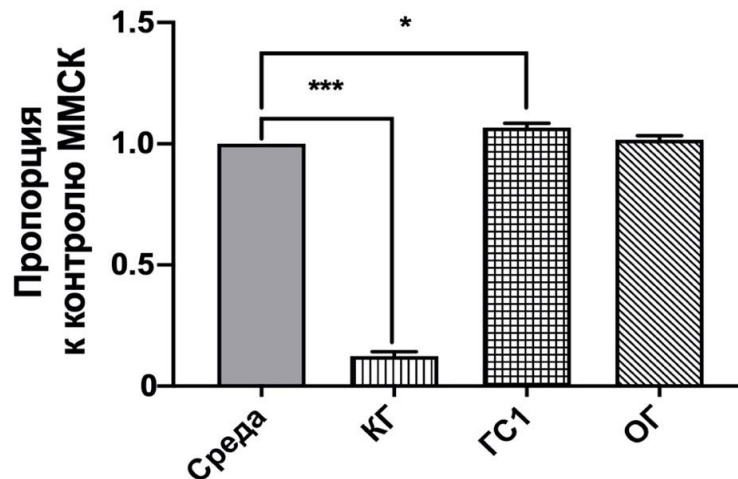
Таблица 1 - Биохимические свойства экстрактов костных блоков

Тип экстракта	pH			Концентрация белка, мкг/мл
	0 ч	24 ч	p	
Контрольная группа	8,0 ± 0,11	8,2 ± 0,1***	<0,01	164 ± 20***
Первая группа сравнения	8,5 ± 0,04	8,6 ± 0,02	0,02	44 ± 23
Вторая группа сравнения	8,4 ± 0,03	8,6 ± 0,02	<0,01	40 ± 16
Контрольная среда	8,5 ± 0,04	8,9 ± 0,07	<0,0001	-

Значения P относятся к сравнению уровня pH для каждого типа экстракта в начале эксперимента и через 24 ч;

**** P < 0,0001 относится к сравнению уровня pH и концентрации белка между типами экстрактов.*

Влияние костного экстракта на жизнеспособность мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток. Доля мертвых ММСК, выращенных в контрольной среде, была около 1%, тогда как в экстракте из блоков КГ она составляла 100%. В то же время доли мертвых ММСК, культивированных в экстрактах из костных блоков ГС1 и ОГ были схожи, но значительно ниже, чем у материалов после химической стерилизации. Доля жизнеспособных ММСК, культивированных в экстракте из блоков после химической стерилизации, была около нуля, тогда как в случае экстрактов из блоков после термической стерилизации и опытных образцах она соответствовала контролю в обычной среде культивирования (рисунок 3).



*** $P < 0,0001$, * $P < 0,05$.

Рисунок 3 - Доля жизнеспособных мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток через 72 часов культивирования в экстрактах костных блоков

Результаты сканирующей электронной микроскопии. Визуализация структур губчатого вещества костных блоков представлена на серии фотоизображений, полученных при помощи сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (Рисунок 4). На рисунке 4 (А, Б) представлены блоки группы КГ, микроархитектура соответствует нормальному строению губчатого вещества костной ткани, межтрабекулярные пространства свободны, на основании чего можно судить о степени очистки от органических компонентов, форма и поверхность трабекул гладкая без микротрещин и разрушений, пучки волокон коллагена без признаков разволокнения.

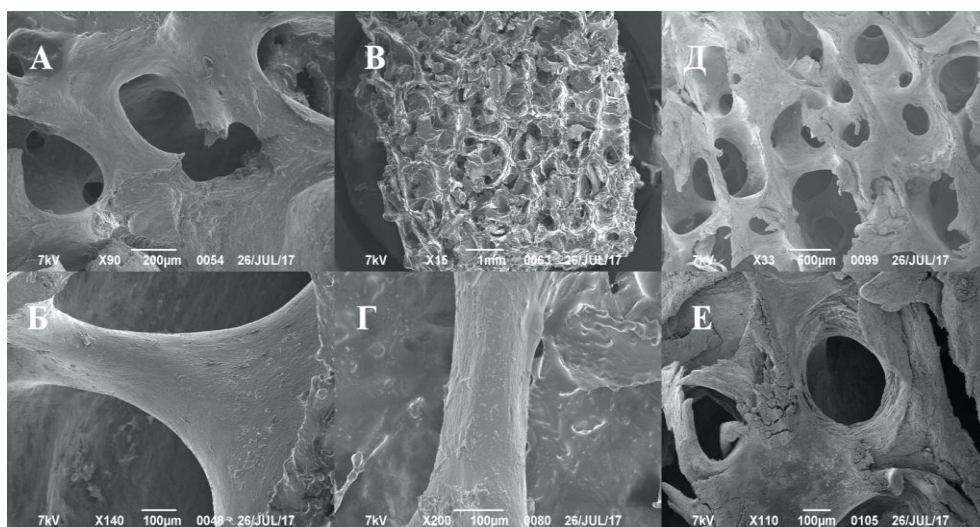


Рисунок 4 - Микрофотографии костных блоков Нанпыление золото-палладий. Контрольный штрих указан на рисунке. А, Б – блоки контрольной группы; В, Г – блоки первой группы сравнения; Д, Е – блоки опытной группы

На рисунке 4 (В, Г) представлены блоки из группы ГС1, минерально-коллагеновый матрикс заполнен органическими компонентами костного мозга на рисунке 4 В, признаков переломов трабекул нет, структура трабекулы правильная, оценить состояние пучков коллагеновых волокон нельзя из-за органического налета, покрывающего ее поверхность.

На рисунке 4 (Д, Е), представлены материалы из опытной группы, микроархитектура также соответствует нормальному строению губчатого вещества костной ткани, межтрабекулярные пространства свободны. На структурах минерально-коллагенового матрикса определяются множественные трещины и участки разволокнения в пучках костного коллагена, микропереломы трабекул с частичной отслойкой.

На основании данных фотоизображений, полученных с помощью сканирующей электронной микроскопии, выполнена оценка микроархитектоники строения костного матрикса, определена степень очистки от органических компонентов.

Результаты исследований гистоморфологических и гистоморфометрических изменений в зоне имплантации костнопластических материалов в динамике. Репаративные процессы в контрольной группе протекают достаточно интенсивно. Воспаление выражено на 7-е сутки, в последующие сроки не определялось. Остеогистогенез происходит без образования хрящевой «мозоли». Материал контрольной группы КГ подвергается остеоинтеграции к 90-м суткам эксперимента, процессы регенерации в зоне костной пластики практически завершаются и переходят в стадию длительной адаптивной перестройки регенерационного гистогенеза. Частично сохраняется имплантат, плотно встроенный в структуру новообразованной пластинчатой костной ткани. Нарастание доли костной ткани, подтверждается данными морфометрии (таблица 2).

Таблица 2 - Морфометрические показатели в зоне костной пластики контрольной группы ($M \pm m$, объемная доля, %)

Показатель, объемная доля (%)	Сроки эксперимента, сут. ($M \pm m$)			
	7	21	45	90
Костная ткань	50,31 $\pm$ 1,72	61,37 $\pm$ 3,65	69,50 $\pm$ 2,49	76,57 $\pm$ 1,1
Соединительная ткань	42, 16 $\pm$ 1,19	25,74 $\pm$ 3,15	11,39 $\pm$ 1,92	6,92 $\pm$ 1,68
Сосуды микроциркуляторного русла	1,37 $\pm$ 0,25	4,2 $\pm$ 2	4,98 $\pm$ 2,45	5,86 $\pm$ 0,17
Гемопоэтический компонент	5,07 $\pm$ 0, 29	7,4 $\pm$ 0,35	11,24 $\pm$ 1,14	13,27 $\pm$ 1,2

Во второй группе сравнения на 7-е сутки, после костной пластики, определялись признаки воспаления, которые сохраняющиеся до 45-х суток наблюдения. Репарации зоны костной пластики протекает с образованием

небольшого количества элементов хрящевой ткани. Сроки остеointеграции костнопластического материала, сходны данным контрольной группы. Доля гемопоэтических элементов и ангиогенез также сопоставимы. Таким образом, через на 90-е сутки после костной пластики регенерация определялись как завершенная с сохранявшимися фрагменты биорезорбируемого имплантата. Данные гистоморфометрии, представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Морфометрические показатели в зоне костной пластики второй группы сравнения ($M \pm m$, объемная доля, %)

Показатель, объемная доля (%)	Сроки эксперимента, сут ($M \pm m$)			
	7	21	45	90
Костная ткань	49,37 $\pm$ 3,12	62,14 $\pm$ 2,18	70,21 $\pm$ 0,08	75,55 $\pm$ 2,01
Соединительная ткань	38,38 $\pm$ 1,93	25,28 $\pm$ 1,78	12,3 $\pm$ 1,95	7,96 $\pm$ 0,39
Сосуды микроциркуляторного русла	1,49 $\pm$ 1,2	4,01 $\pm$ 2,11	4,91 $\pm$ 1,91	5,45 $\pm$ 0,31
Гемопоэтический компонент	4,88 $\pm$ 0,66	7,95 $\pm$ 1,3	14,08 $\pm$ 0,57	15,06 $\pm$ 0,1

В целом, по результатам исследования процесса репарации в группе ГС1, установлено, что: в ранние сроки выявляется достаточное количество клеток лимфогистиоцитарного ряда; объемная доля костной ткани в динамике после костной пластики оказывается меньше, чем в группах КГ и ГС2 (таблица 4). Биоинтеграция не завершается к 90-м суткам эксперимента

Таблица 4 - Морфометрические показатели в зоне костной пластики, первой группы сравнения ($M \pm m$, объемная доля, %)

Показатель, объемная доля (%)	Сроки эксперимента, сут ($M \pm m$)			
	7	21	45	90
Костная ткань	48,52 $\pm$ 2,33	59,73 $\pm$ 3,17	67,42 $\pm$ 3,29	70,24 $\pm$ 3,07
Соединительная ткань	43,29 $\pm$ 3,74	25,91 $\pm$ 2,63	14,32 $\pm$ 3,03	7,76 $\pm$ 0,39
Сосуды микроциркуляторного русла	1,21 $\pm$ 0,31	4,01 $\pm$ 0,83	4,94 $\pm$ 2,8	5,04 $\pm$ 1,76
Гемопоэтический компонент	7,02 $\pm$ 0,12	8,91 $\pm$ 0,25	12,11 $\pm$ 1,7	12,71 $\pm$ 0,61

Исследование процесса репарации костного дефекта опытно группы показало, что результаты, полученные во всех изученных группах сопоставимы, но отличаются в сроках продолжения воспалительной реакции, Установлено, что объемы образованной костной становится практически одинаковым с контрольной группой (таблица 5). Биоинтеграция имплантата опытной группы полностью завершается к сроку 90 суток.

Таблица 5 - Морфометрические показатели в зоне костной пластики опытной группы ($M \pm m$, объемная доля в %)

Показатель, объемная доля в %	Сроки эксперимента, сут ($M \pm m$)			
	7	21	45	90
Костная ткань	51,21 $\pm$ 2,24	61,78 $\pm$ 3,08	71,19 $\pm$ 2,37	74,15 $\pm$ 1,23
Соединительная ткань	40,18 $\pm$ 2,17	22,19 $\pm$ 2,55	12,08 $\pm$ 2,11	7,97 $\pm$ 1,34
Сосуды микроциркуляторного русла	1,48 $\pm$ 0,3	4,47 $\pm$ 0,31	4,21 $\pm$ 1,19	5,01 $\pm$ 2,29
Гемопоэтический компонент	7,13 $\pm$ 0,27	9,76 $\pm$ 0,83	12,36 $\pm$ 1,29	12,2 $\pm$ 0,43

Таким образом, данные, полученные при морфометрии, показали, что, несмотря на восстановление кости как органа к концу срока исследования, методы обработки и стерилизации исследуемых костнопластических материалов оказывали влияние на течение процессы остеоинтеграции, ремоделирования и неоостеогенеза после пластики костного дефекта разными материалами.

Результаты исследований мультиспиральной компьютерной томографии. Представленные результаты МСКТ обеих групп на 7-е, 21-е, 45-е, 90-е сутки после костной пластики оценивались по визуальным данным, полученным в трех плоскостях: 1) аксиальной; 2) фронтальной; 3) сагиттальной.

На 7-е сутки после костной пластики костнопластический материал во всех группах наблюдений равномерно распределён в зоне дефекта проксимального метаэпифиза, распространяясь по костномозговому каналу, размеры дефекта входного отверстия кортикальной пластинки 8 мм (рисунок 5).



Рисунок 5 – Мультиспиральная компьютерная томография дефекта проксимального метаэпифиза большеберцовой кости кролика. Опытная группа, 7-е сутки наблюдения: А – аксиальная проекция; Б – сагиттальная проекция

В первой группе сравнения содержимое дефекта неоднородно, структура костнопластического материала с очагами просветления по периферии, отмечается остеобластическая реакция окружающей дефект костной ткани с тенденцией к отграничению. В опытной группе к 45-м суткам зона дефекта хорошо также хорошо визуализируется содержимое однородно, по контуру зоны реконструкции определяется очаги резорбции.

В группе GC1 содержимое дефекта минимально неоднородно, структура костнопластического материала с очагами просветления, сохраняется тенденция к отграничению с оссификацией (Рисунок 6).



Рисунок 6 - Мультиспиральная компьютерная томография дефекта проксимального метаэпифиза большеберцовой кости кролик, сагиттальная проекция. Первая группа сравнения, 45-е сутки наблюдения

На 90-е сутки после имплантации рентгенологическая картина в контрольной и опытной группах сопоставимы (Рисунок 7). Определяется резорбция костнопластического материала с зонами оссификаций и костных пластинок в центре дефекта, полное закрытие входного отверстия кортикальной пластинки, что может свидетельствовать о восстановлении кости, как органа.

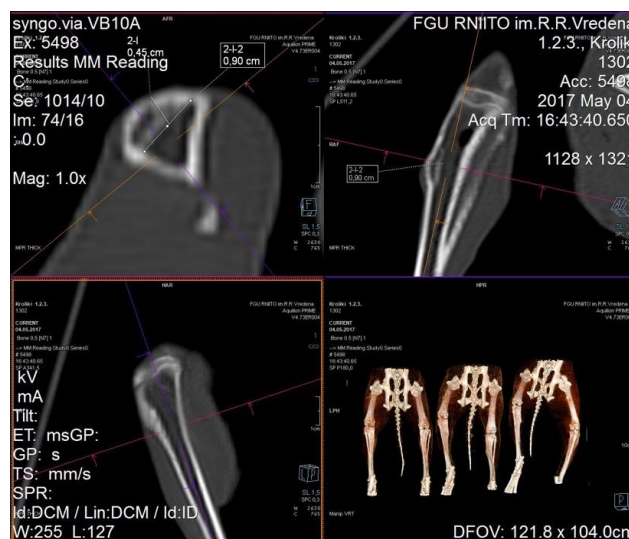


Рисунок 7 - Мультиспиральная компьютерная томография дефекта проксимального метаэпифиза большеберцовой кости кролика. Опытная группа, 90-е сутки наблюдения

Таким образом, применение МСКТ для оценки процессов ремоделирования костнопластических материалов на основе кости в экспериментальной модели дефекта проксимального метаэпифиза большеберцовой кости кролика, является эффективным методом визуализации, позволяющим проводить прижизненную оценку исследуемых показателей в динамике. Испытания *in vivo* различных остеопластических материалов должно быть комплексным, поскольку метод МСКТ не заменяет, а дополняет гистоморфометрический анализ.

Закключение. Полученные в ходе исследования результаты позволяют сделать вывод, что методы обработки и стерилизации костной ткани, влияют на конечные свойства костнопластического материала. В результате, готовый для клинического применения имплантат может иметь разные свойства - биохимические, остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства, что впоследствии будет отражаться на скорости резорбирования, ремоделирования, остеointеграции и неоостеогенеза. Это свидетельствует о необходимости тщательного изучения свойств разрабатываемых костнопластических материалов перед их внедрением в клиническую практику.

Изготовленный по разработанному протоколу аллогенный костнопластический материал подтвердил биосовместимость, продемонстрировал функциональные свойства (остеоиндуктивность и остеогенность) и может быть рекомендован для последующей клинической апробации. Возможность использования его в качестве матрицы-носителя для разработки тканеинженерных конструкций, импрегнации антимикробными препаратами и модификации веществами, открывает дополнительные возможности для дальнейших исследований.

ВЫВОДЫ

1. Разработанный оригинальный способ децеллюляризации и делипидизации губчатой кости с использованием радиационной стерилизации позволил получить аллогенный костнопластический материал, обладающий высокими остеиндуктивными свойствами.
2. При исследовании *in vitro* методом колориметрического теста оценки метаболической активности клеток установлено, что образцы аллогенных костнопластических материалов не проявляют цитотоксический эффект.
3. При культивировании мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток костного мозга с водными экстрактами из образцов аллогенных костнопластических материалов доказано, что разработанный способ обработки, как и термическая обработка нативной костной ткани, практически не влияют на исходный остеиндуктивный потенциал кости.
4. На экспериментальной модели полостных дефектов большеберцовой кости кролика показано отсутствие перифокальных реакций тканей после имплантации децеллюляризированных и делипидизированных по предложенному протоколу образцов, в отличие от способа децеллюляризации и делипидизации с использованием токсических химических веществ или метода термической обработки нативной костной ткани.
5. На модели реконструктивно-пластической операции костного дефекта большеберцовой кости кролика установлено, что методы обработки и стерилизации костной ткани существенно влияют на скорость и характер репаративного остеогенеза для имплантированных материалов.
6. Доказано, что процесс ремоделирования полученного по предложенному способу аллогенного костнопластического материала протекает через стадию «хрящевой мозоли» без признаков воспалительных реакций.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Выбор материала для костной пластики зависит от его применения в конкретной клинической ситуации, при выборе материала необходимо учитывать его функциональные свойства, а также характеристики биodeградации.
2. При стерилизации материалов на заключительном этапе их изготовления радиационная доза поглощения должна быть 25 кГр, в этом случае гарантируется стерильность при сохранении функциональных свойств кости.
3. Полученный костнопластический материал является перспективным для дальнейшего использования в качестве скаффолда при разработке тканеинженерных конструкций.
4. Разработанный способ обработки и стерилизации костной ткани, дает возможность продолжить дальнейшую разработку по модификации и созданию аллогенных костнопластических материалов с дополнительными свойствами.

**СПИСОК РАБОТ,
ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

1. **Воробьев К.А.** Предварительные результаты оценки ремоделирования костнозамещающих материалов по данным МСКТ в разные сроки после имплантации экспериментальным животным/ К.А. Воробьев, И.В. Сушков, С.А. Божкова, Г.И. Нетылько, Д.В. Лабутин // Сборник статей «Актуальные проблемы травматологии и ортопедии». - С-Петербург 2016. - С.34-39.
2. Лабутин Д.В. Влияние методов заготовки костнозамещающего материала на основе аллокости на биосовместимость с мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками (ММСК) / Д.В. Лабутин, **К.А. Воробьев**, С.А. Божкова //Тезисы доклада на конференции. Сборник тезисов VII Всероссийского симпозиума с международным участием «Актуальные вопросы тканевой и клеточной трансплантологии». - Астрахань-2017. - С.20-22.
3. **Воробьев К.А.** Визуализация структур минерально-коллагенового матрикса губчатых костных аллоимплантатов методом сканирующей электронной микроскопии / **К.А. Воробьев**, С.А. Божкова, М.Н. Чепурненко // Сборник статей «Новые горизонты травматологии и ортопедии», посвященный 150-ти летию со дня рождения Р.Р. Вредена. С-Петербург. 2017. С.46-50.
4. Тихилов Р.М. Вопросы стандартизации и нормативно-правового регулирования при работе с головками бедренных костей прижизненных доноров/ Р.М. Тихилов, А.С. Самойлов, С.А. Божкова, Т.А. Астрелина, К.К. Губарев, **К.А. Воробьев** // Статья в журнале (материалы конференции) «Вестник трансплантологии и искусственных органов». 2017. Том 19. №5. С.30.
5. **Воробьев К.А.** Современные способы обработки и стерилизации аллогенных костных тканей (обзор литературы) / **К.А. Воробьев**, С.А. Божкова, Р.М. Тихилов [и др.] // Травматология и ортопедия России. – 2017. – Т.23. - №3. – С. 134-147.
6. Трушников В.В. Сравнительная характеристика процесса ремоделирования зоны костного дефекта костнопластическими материалами разных способов заготовки / В.В. Трушников, Л.И. Анисимова, **К.А. Воробьев**, С.А. Божкова, Г.И. Нетылько // Современные достижения травматологии и ортопедии. Сборник научных статей ФГБУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена» МЗ РФ. 2018 г. С.248-251.
7. Тихилов Р.М. Вопросы организации и нормативно-правового регулирования костных банков в Российской Федерации / Р.М. Тихилов, **К.А. Воробьев**, С.А. Божкова, С.В. Готье, С.М. Хомяков // Тезисы доклада конференции. Материалы всероссийской научной конференции «Современные проблемы гистологии и патологии скелетных тканей». 2018. С.81-83.
8. **Воробьев К.А.** Особенности остеointegrации ремоделирования костных графтов, обработанных методом циклической очистки и стерилизованных радиацией, в эксперименте in vivo / **К.А. Воробьев**, Д.А.

Лабутин, Л.И. Анисимова // Тезисы доклада на конференции «Вестник трансплантологии и искусственных органов». – 2018. Том 20. №S1. С.153.

9. **Vorobyov K.** Bone Grafts prepared with multi-stage cyclic washing and sterilization by gamma-irradiation increase bone remodeling in a rabbit tibial defect model. 19th EFORT Congress 2018. Barcelona, Spain.

10. **Labutin, D.** Human bone graft cytocompatibility with mesenchymal stromal cells is comparable after thermal sterilization and washing followed by γ -irradiation: an *in vitro* study / **D. Labutin, K. Vorobyov, S. Bozhkova, E. Polyakova, T. Vodopyanova** // *Regen Biomater.* – 2018. – V. 5. – No 2. – P. 85-92.

11. **Воробьев К.А.** Влияние методов заготовки костнопластического материала на процессы ремоделирования в модели костного дефекта в эксперименте *in vivo* / **К.А. Воробьев, С.А. Божкова, Л.И. Анисимова [и др.]** // *Практическая медицина.* – 2019. – Т.17. - №1. – С. 93-96.

12. **Эрхова Л.В.** Сверхкритическая обработка ксеногенного костного матрикса в процессе изготовления имплантатов для остеосинтеза / **Л.В. Эрхова, Ю.М. Панов, Н.С. Гаврюшенко, В.В. Зайцев, Ю.С. Лукина, Д.В. Смоленцев, К.А. Воробьев, Д.П. Крутько, Д.А. Леменовский** // *Сверхкритические Флюиды: Теория и Практика.* - 2019. - Т.14. - №4. - С. 42-48.

13. **Воробьев К.А.** Аутологичные стимуляторы регенерации при имплантации аллогенных костнопластических материалов (клинический случай) / **К.А. Воробьев, Т.О. Скипенко, Н.В. Загородний, В.И. Севастьянов, Д.В. Смоленцев, А.Р. Закирова** // *Вестник трансплантологии и искусственных органов.* – 2020. – Том 22. - №4. – С. 134-140.

Патенты

1) Патент РФ №2715238 МПК А61К 35/32 (2015.01), А61F2/28 (2006.01); СПК А61К 35/32 (2020.01), А61F2/28 (2020.01) Способ изготовления аллогенного костнозамещающего материала / **Божкова С.А., Воробьев К.А., Лабутин Д.А.**; заявитель и патентообладатель ФГБУ «РНИИТО им. Р.Р. Вредена» Минздрава РФ.-№2019123516; заявл. 19.07.2019; опубл. 26.02.2020. бюл. №6.-с. 9.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

Гц - герц

ДМСО – диметилсульфоксид

кГр - килוגрей

КМ – костный мозг

ММСК – мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки

Мпа - мегапаскаль

ОЭ – оксид этилена

ПЦР – полимеразная цепная реакция

СКФ – сверхкритический флюид

ск-СО₂ – сверхкритический диоксид углерода

ААТБ (American Association of Tissue Banks) – ассоциация тканевых банков
соединенных штатов Америки

АРАСТБ (Asia Pacific Association of Surgical Tissue Banking) – Азиатско-
тихоокеанская ассоциация тканевых банков

ASMBR (American Society for Bone and Mineral Research) - Американское
общество исследования костного и минерального обмена

АТБФ (Australian Tissue Banking Forum) – Австралийский форум тканевых
банков

DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) - среда Игла в модификации
Дульбекко

ЕАТБ (European Association of Tissue Banks) - Европейская ассоциация
тканевых банков

EUROCET (European Registry for Organs, Tissues and Cells) – европейский
регистр органов, тканей и клеток

FDA (Food and Drug Administration) - Управление по санитарному надзору за
качеством пищевых продуктов и медикаментов

NJR (National Joint Registry) – национальный регистр суставов

SAL (sterility assurance level) – уровень гарантии стерильности