

Возможности химической и физической модификации поверхности трансплантатов на основе кортикальной кости с целью повышения их адгезивной привлекательности для клеток человека

М.С. Макаров^{✉1}, М.В. Сторожева¹, А.А. Офицеров¹, И.Н. Пономарев¹,
А.С. Миронов¹, А.А. Будаев¹, Н.В. Боровкова^{1,2,3}

¹ ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»,
129090, Россия, Москва, Большая Сухаревская пл., д. 3;

² Кафедра трансплантологии и искусственных органов им. В.П. Демикова
МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ (Пироговский Университет);
117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1;

³ Кафедра клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии
ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ,
125993, Россия, Москва, Баррикадная ул., д. 2/1, стр. 1

✉ Автор, ответственный за переписку: Максим Сергеевич Макаров, д-р биол. наук, старший научный сотрудник
отделения биотехнологий и трансфузиологии НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского,
makarovms@sklif.mos.ru

Аннотация

Актуальность. Способность клеток к активной адгезии на костном трансплантате увеличивает его репаративные и регенеративные свойства. Нативная кортикальная кость обладает очень низкой биологической кондуктивностью, что резко затрудняет миграцию и адгезию клеток. Для повышения биокондуктивных свойств костных трансплантатов могут быть использованы различные способы модификации поверхности кости.

Цель. Оценить адгезию и пролиферативную активность клеток человека на поверхности трансплантатов кортикальной кости, модифицированной различными способами.

Материал и методы. В работе использовали фрагменты трансплантатов кортикальной кости (ТКК). Для физической модификации внешнюю поверхность костных фрагментов обрабатывали плоским напильником с высокой или с низкой плотностью шлифующих зубьев. Для химической модификации использовали 2н раствор соляной кислоты, 0,005% раствор коллагеназы I, коллагенолитический ферментный препарат «Ферменкол» (0,05 мг/мл). Исследования адгезивности ТКК *in vitro* проводили на культуре фибробластов человека линии М-22. В лунки культуральных флаконов помещали образцы необработанных ТКК (контроль) и образцы модифицированных ТКК, в каждую лунку вносили суспензию, содержащую 10 тыс. клеток, и культивировали клетки в течение 7 суток.

Результаты. Через 3 суток на контрольных образцах ТКК и ТКК с механической обработкой клетки полностью отсутствовали или выявлялись в очень незначительном количестве. На ТКК, обработанных 2н раствором соляной кислоты в течение 3 и 6 часов, средняя плотность клеток на поверхности ТКК составляла 1,0–1,2 тыс./см², после обработки ТКК 2н раствором соляной кислоты в течение 12 часов адгезивность ТКК резко снижалась. Наибольшая плотность клеток наблюдалась на ТКК, обработанных 0,005% коллагеназой 1 или препаратом «Ферменкол» в течение 24 часов, которая составляла 2,0–2,5 тыс./см². Через 7 суток культивирования рост клеток полностью отсутствовал на контрольных ТКК, на ТКК, обработанных напильником с высокой плотностью шлифующих зубьев, и ТКК, обработанных 2н раствором соляной кислоты в течение 12 часов. В опытах с коллагеназой 1 и препаратом «Ферменкол», а также в опытах с обработкой 2н раствором соляной кислоты в течение 3 часов на поверхности ТКК наблюдался интенсивный рост клеток, при этом плотность фибробластов человека линии М-22 и их общее число на ТКК увеличивалось в 3–5 раз без нарушения их жизнеспособности.

Выводы. Физическая модификация не позволяет эффективно повысить адгезивность трансплантатов на основе кортикальной кости. При химической модификации ТКК плотность клеток через 3 и 7 суток после посева зависит от продолжительности воздействия химического агента. Для повышения адгезивности кортикальную кость оптимально обрабатывать 2н раствором соляной кислоты в течение 3 часов, 0,005% раствором коллагеназы 1 или препаратом «Ферменкол» (0,05 мг/мл) в течение 24 часов.

Ключевые слова: кортикальная кость, адгезивность, механическая обработка, ферментативная обработка, клетки, пролиферативная активность

Конфликт интересов Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов

Финансирование Данное исследование выполнено при поддержке гранта автономной некоммерческой организации «Московский центр инновационных технологий в здравоохранении», соглашение № 1603-22/23

Для цитирования: Макаров М.С., Сторожева М.В., Офицеров А.А., Пономарев И.Н., Миронов А.С., Будаев А.А. и др. Возможности химической и физической модификации поверхности трансплантатов на основе кортикальной кости с целью повышения их адгезивной привлекательности для клеток человека. *Трансплантология*. 2025;17(4):385–394. <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2025-17-4-385-394>

© Макаров М.С., Сторожева М.В., Офицеров А.А., Пономарев И.Н., Миронов А.С., Будаев А.А., Боровкова Н.В., 2025

The possibilities of chemical and physical modification of cortical bone grafts' surface in order to increase their adhesive attractiveness to human cells

M.S. Makarov^{✉1}, M.V. Storozheva¹, A.A. Ofitserov¹, I.N. Ponomarev¹,
A.S. Mironov¹, A.A. Budaev¹, N.V. Borovkova^{1,2,3}

¹ N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine,
3 Bolshaya Sukharevskaya Sq., Moscow 129090 Russia;

² V.P. Demikhov Department of Transplantology and Artificial Organs,
N.I. Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov University),
1 Ostrovityanov St., Moscow 117997 Russia;

³ Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a Course in Laboratory Immunology,
Russian Medical Academy of Continuous Professional Education,
2/1 Bldg. 1 Barrikadnaya St., Moscow 125993 Russia

✉Corresponding author: Maksim S. Makarov, Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Scientific Department of Biotechnologies and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, makarovms@sklif.mos.ru

Abstract

Introduction. The ability of cells to adhere on bone graft increases its reparative and regenerative properties. The native cortical bone has a very low biological conductivity, which greatly impedes cell migration and adhesion. Various methods of bone surface modification can be used to enhance the bioconductive properties of bone grafts.

Objective. To evaluate the adhesion and proliferative activity of human cells on the surface of cortical bone grafts modified by various methods.

Material and methods. Fragments of cortical bone grafts (CBGs) were used in the study. For physical modification the outer surface of the bone fragments was processed with a flat file with high or low density of grinding teeth. A 2N hydrochloric acid (HCl) solution, 0.005% collagenase I solution, and the collagenolytic enzyme preparation Fermencol (0.05 mg/mL) were used for chemical modification. In vitro studies of the CBG adhesion were performed in culture of human fibroblasts M-22 line. Untreated CBGs (control) and modified CBGs were placed in the wells of culture vials; a cell suspension containing 10,000 cells was added to each well. Cells were cultured for 7 days.

Results. After 3 days of cultivation, the cells were completely absent or detected in very small numbers on the control CBG samples and CBG samples subjected to mechanical processing. On CBGs treated with 2N hydrochloric acid solution for 3 and 6 hours, the average cell density on the CBG surface estimated 1.0–1.2 thousand/cm²; on CBGs treated with 2N hydrochloric acid solution for 12 hours, the CBG adhesiveness acutely decreased. The highest cell density was observed on CBGs, treated with 0.005% collagenase 1 or Fermencol for 24 hours and amounted to 2.0–2.5 thousand/cm². After 7 days of cultivation, the cell growth was completely absent on the control CBGs, on CBGs processed with a file with a high grinding tooth density, and CBGs treated with 2N hydrochloric acid solution for 12 hours. In experiments with collagenase 1 and Fermencol, as well as in experiments with the treatment with a 2N hydrochloric acid solution for 3 hours, an intensive cell growth was observed on the CBG surface, density of human fibroblasts of the M-22 line and their total number on CBGs increased 3–5-fold without affecting their viability.

Conclusion. Physical modification did not effectively increase the adhesiveness of cortical bone grafts. Effectiveness of chemical modification depends on the duration of exposure to the chemical agent. To increase the adhesion, the cortical bone graft should be optimally treated either with 2N hydrochloric acid solution for 3 hours, or 0.005% collagenase 1 solution for 24 hours, or with Fermencol (0.05 mg/mL) for 24 hours.

Keywords: cortical bone, adhesiveness, mechanical treatment, enzymatic treatment, cells, proliferative activity

CONFLICT OF INTERESTS Authors declare no conflict of interest

FINANCING This study was supported by a Grant from the Autonomous Non-profit Organization "Moscow Center for Innovative Technologies in Healthcare", Agreement No. 1603-22/23

For citation: Makarov MS, Storozheva MV, Ofitserov AA, Ponomarev IN, Mironov AS, Budaev AA, et al. The possibilities of chemical and physical modification of cortical bone grafts' surface in order to increase their adhesive attractiveness to human cells. *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2025;17(4):385–394. (In Russ.). <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2025-17-4-385-394>

ТКК – трансплантат кортикальной кости

Актуальность

В процессе разработки и исследования костных трансплантатов большое значение имеет такой параметр трансплантата, как адгезивная привлекательность для клеток (адгезивность). Способность клеток к активной адгезии на костном трансплантате означает возможность в условиях *in vivo* заселения трансплантата собственными клетками с последующим ремоделированием и интеграцией трансплантата в здоровую кость [1–3]. Лизис и резорбция костных трансплантатов на основе аллогенных тканей до сих пор составляют заметную проблему трансплантологии и регенеративной медицины [4–6]. Во многом разрушение и потеря аллогенных костных трансплантатов обусловлены их низкой биологической кондуктивностью (способностью стимулировать миграцию клеток), отсутствием адгезии и пролиферации клеток на поверхности трансплантата. Отсутствие адгезии клеток на костном трансплантате делает невозможными их дальнейший рост, дифференцировку и восстановление целостности кости [7]. Нативная необработанная кортикальная кость имеет высокую плотность внеклеточного матрикса, обладает очень низкой биологической кондуктивностью [1, 4], что резко затрудняет миграцию и адгезию клеток. Для повышения биокондуктивных свойств костных трансплантатов могут быть эффективно использованы естественные полимеры, адгезивно привлекательные для клеток, в первую очередь, коллаген [8–10]. С другой стороны, неоднократно показано, что адгезия клеток на субстрате в значительной степени зависит от его топографии и плотности. Коллагеновые матриксы с очень плотным распределением коллагена являются адгезивно непривлекательными для клеток [11]. Основной минеральный компонент кости, гидроксиапатит (3-кальций фосфат), обладает разной адгезивностью для клеток в зависимости от его топографии и архитектуры [12, 13]. Можно предположить, что уменьшение плотности упаковки коллагена и гидроксиапатита в кортикальной кости позволит увеличить ее адгезивность для клеток. Для этого могут быть использованы различные методики физической и химической модификации кости. В связи с этим значительный интерес представляют ферментативные препараты, которые применяют для лечения рубцовых формирований и коррекции топографии межклеточного матрикса живых тканей [14–16].

Целью данной работы было оценить адгезию и пролиферацию фибробластов человека на поверхности трансплантатов кортикальной кости (ТКК), модифицированной различными способами.

Материал и методы

Работу проводили на базе научного отделения биотехнологий и трансфузиологии и отделения консервирования тканей и производства трансплантатов ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ». В работе использовали фрагменты ТКК тканевых доноров площадью 1,25–1,5 см², очищенные от мягких тканей, липидных включений и клеточных компонентов по стандартной методике [10]. Для физической модификации внешнюю поверхность костных фрагментов обрабатывали плоским напильником с высокой плотностью шлифующих зубьев (300 зубьев на 1 см длины напильника) или с их низкой плотностью (100 зубьев на 1 см длины напильника) до появления выраженной шероховатости кости. Показано, что шероховатая поверхность повышает адгезивные свойства костных трансплантатов [1], однако в настоящее время отсутствуют общепринятые методики и рекомендации для подобной модификации ТКК. В связи с этим в нашей работе для физической обработки ТКК использовали широкодоступный инструментальный, который также может быть применен в отделениях по производству тканевых трансплантатов.

Для химической модификации использовали следующие типы обработок:

- инкубация в 2н растворе соляной кислоты (2н раствор соляной кислоты). Сроки инкубации – 3, 6 и 12 часов при 20–22°C;
- инкубация в 0,005% растворе коллагеназы I («Биопрепарат», Россия). Сроки инкубации – 12 и 24 часа при 20–22°C;
- инкубация в 0,005% растворе (0,05 мг/мл) коллагенолитического ферментного препарата «Ферменкол» (НПК Высокие Технологии, Россия). Сроки инкубации – 12 и 24 часа при 20–22°C.

В регенеративной медицине соляная кислота используется для деминерализации костных трансплантатов с целью повышения их пластичности и получения коллагеновых матриксов с высокой плотностью [3]. Стандартная процедура деминерализации кости составляет не менее 24 часов. В нашей работе были выбраны более короткие сроки обработки с целью сохранения общей конформации матрикса в составе ТКК

и одновременно повышения его адгезивности. Концентрации ферментативных препаратов и продолжительность обработки ими ТКК были выбраны с учетом функциональных характеристик ферментов в их составе [14–16].

После обработки химическими агентами образцы ТКК 3 раза промывали дистиллированной водой.

Исследования *in vitro* проводили на культуре фибробластов человека линии М-22. В каждую лунку с площадью ростовой поверхности 1,9 см² (4-луночного планшета) вносили по 10 тыс. клеток в среде ДМЭМ, содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки. Количество клеток в суспензии определяли с помощью камеры Горяева. В контрольные лунки вносили суспензию клеток без ТКК (контроль 1) и суспензию клеток с ТКК без модификации поверхности (контроль 2). В опытные лунки помещали модифицированные образцы ТКК площадью 1,25–1,5 см², а затем вносили суспензию клеток. Клетки инкубировали 7 суток в среде ДМЭМ при температуре 37°C и 5% концентрации СО₂ в атмосфере со сменой среды каждые 3 суток. Для окраски клеток использовали витальные флуорохромные красители на основе триафлавина и акридинового оранжевого или триафлавина и родамина С [17]. Для получения флуоресцентного изображения клеток, окрашенных триафлавином и акридиновым оранжевым, использовали синий светофильтр (длина волны (λ) возбуждения – 450–490 нм, λ эмиссии – от 510 нм, экспозиция – 1 с), для получения флуоресцентного изображения клеток, окрашенных триафлавином и родамином С, использовали зеленый светофильтр (λ возбуждения – 510–560 нм, λ эмиссии – от 575 нм, экспозиция – 1 с). Через 3 и 7 суток после посева оценивали количество клеток на поверхности трансплантатов (на 1 см²), общую структурную целостность клеток и их морфологию. Параллельно оценивали общую топографию коллагена на поверхности ТКК путем анализа его автофлуоресценции (λ возбуждения – 380–420 нм, λ эмиссии – от 450 нм, экспозиция – 1 с).

Полученные статистические данные обрабатывали с помощью методов вариационной статистики при помощи программы Statistica 10.0. Проверку распределения на нормальность проводили с помощью теста Колмогорова–Смирнова. С учетом ненормального распределения данных было принято решение использовать непараметрические критерии. Вычисляли медиану (Me), 1-й и 3-й квартили (25%;75%), оценку различия

между группами проводили с использованием U-критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при уровне значимости более 95% ($p < 0,05$).

Результаты и обсуждение

Через 3 суток на контрольных образцах ТКК и ТКК с механической обработкой клетки полностью отсутствовали на большинстве участков поверхности, в остальных участках выявлялись преимущественно единичные клетки со слабым ростом цитоплазмы. Клеточные скопления были очень немногочисленными и содержали не более 10 клеток. Таким образом, исходные ТКК и ТКК с механической обработкой были адгезивно непривлекательными для клеток. В опытах с обработкой 2н раствором соляной кислоты в течение 3 и 6 часов средняя плотность клеток на поверхности ТКК составляла 1,0–1,2 тыс./см², после обработки ТКК 2н раствором соляной кислоты в течение 12 часов адгезивность ТКК резко снижалась (табл. 1). В опытах с обработкой 0,005% коллагеназой 1 в течение 24 часов плотность клеток составляла в среднем 2,0 тыс./см² и была в 2,8 раза выше, чем при обработке коллагеназой 1 в течение 12 часов ($p < 0,05$). В опытах с обработкой препаратом «Ферменкол» в течение 12 и 24 часов средняя плотность клеток на ТКК составляла 1,4 тыс./см² и 2,5 тыс./см² соответственно, при этом различия не были статистически значимыми. Во всех опытах адгезирующие клетки имели слабый рост цитоплазмы и малое количество секреторных везикул. При этом не наблюдалось выраженной деформации клеток на фоне их низкой пролиферативной активности через 3 суток.

Через 7 суток культивирования рост клеток полностью отсутствовал на контрольных ТКК, на ТКК, обработанных напильником с высокой плотностью шлифующих зубьев, и ТКК, обработанных 2н раствором соляной кислоты в течение 12 часов (табл. 2). В первых 2 случаях вообще не удавалось выявить жизнеспособные клетки на поверхности ТКК (рис. 1), а в опытах с обработкой 2н раствором соляной кислоты в течение 12 часов число клеток статистически значимо не менялось по сравнению со значениями через 3 суток культивирования. Напротив, в опытах с коллагеназой 1 и препаратом «Ферменкол» на поверхности ТКК наблюдался интенсивный рост клеток: плотность фибробластов человека линии М-22 и их общее число на ТКК увеличивалось

в 3–5 раз (табл. 2), клетки активно распластывались на поверхности, имели характерную для них веретеновидную или фибробластоподобную форму, структура ядра и цитоплазмы клеток М-22 соответствовали норме (рис. 2). В опытах, где обработка коллагеназой 1 или «Ферменколом» составляла 24 часа, средняя плотность клеток была статистически значимо в 1,7 раза выше аналогичных значений в опытах с ферментативной обработкой в течение 12 часов ($p < 0,05$).

Таблица 1. Оценка количества фибробластов человека линии М-22 на поверхности трансплантатов кортикальной кости in vitro через 3 суток культивирования

Table 1. Estimation of the number of human M-22 line fibroblasts on the surface of cortical bone grafts in vitro after 3 days of cultivation

Тип модификации поверхности кости свода черепа		Число клеток на 1 см ² поверхности краниотрансплантата Me (Q ₁ ; Q ₃)
Контроль (без обработки)		0 (0;100)
Механическая обработка напильником с высокой плотностью шлифующих зубьев		0 (0;100)
Механическая обработка напильником с низкой плотностью шлифующих зубьев		100 (0;700)
Экспозиция в 2н растворе соляной кислоты	3 часа	1200 (600;4200)*
	6 часов	1000 (100;4000)*
	12 часов	50 (0;400)*
Экспозиция в 0,005% растворе коллагеназы 1	12 часов	700 (60;4500)**
	24 часа	2000 (500;5800)**
Экспозиция в препарате «Ферменкол» (0,05 мг/мл)	12 часов	1400 (1000;2800)*
	24 часа	2500 (1200;7300)*

Примечания: * $p < 0,05$ относительно контроля, + $p < 0,05$ относительно опыта с экспозицией в 2н растворе соляной кислоты в течение 3 часов, * $p < 0,05$ относительно опыта с экспозицией в коллагеназе 1 в течение 12 часов

На ТКК, обработанных 2н раствором соляной кислоты в течение 3 часов, через 7 суток наблюдалась сходная динамика роста клеток, как и при использовании ферментных препаратов. На ТКК, обработанных 2н раствором соляной кислоты в течение 6 часов, плотность клеток была статистически значимо ниже, чем в опытах с обработкой «Ферменколом» и коллагеназой 1 в течение 24 часов, 2н раствором соляной кислоты в течение 3 часов ($p < 0,05$), т.е. на ТКК, обработанных 2н раствором соляной кислоты в течение 6 часов, наблюдалась более низкая пролиферативная активность клеток М-22 без их видимого повреждения. В опытах с механиче-

ской обработкой напильником с низкой плотностью шлифующих зубьев плотность клеток резко возрастала по сравнению с таковой через 3 суток, однако была заметно ниже, чем в опытах с коллагеназой 1, «Ферменколом» и обработкой 2н раствором соляной кислоты в течение 3 часов (табл. 2). Анализ автофлуоресценции коллагена показал высокую неоднородность межклеточного материала на поверхности ТКК после всех типов химических и физических обработок. Это обстоятельство могло препятствовать более активной адгезии и миграции клеток.

Таблица 2. Оценка количества фибробластов человека линии М-22 на поверхности трансплантатов кортикальной кости in vitro через 7 суток культивирования

Table 2. Estimation of the number of human M-22 line fibroblasts on the surface of cortical bone grafts in vitro after 7 days of cultivation

Тип модификации поверхности краниотрансплантата		Число клеток на 1 см ² поверхности краниотрансплантата Me (Q ₁ ; Q ₃)
Контроль (без обработки)		0 (0;0)
Механическая обработка напильником с высокой плотностью шлифующих зубьев		0 (0;0)
Механическая обработка напильником с низкой плотностью шлифующих зубьев		300 (25;1000)**
Экспозиция в 2н растворе соляной кислоты	3 часа	5250 (2750;7300)*
	6 часов	3000 (2000;4050)*
	12 часов	40 (0;300)+
Экспозиция в 0,005% растворе коллагеназы 1	12 часов	3500 (2250;4750)*
	24 часа	6000 (4000;8870)**\$
Экспозиция в препарате «Ферменкол» (0,05 мг/мл)	12 часов	4500 (2000;6500)**
	24 часа	7500 (4200;10000)**\$

Примечания: * $p < 0,05$ относительно контроля, + $p < 0,05$ относительно опыта с экспозицией в 2н растворе соляной кислоты в течение 3 часов, * $p < 0,05$ относительно опыта с экспозицией в 2н растворе соляной кислоты в течение 6 часов, \$ $p < 0,05$ относительно опыта с экспозицией с коллагеназой или препаратом «Ферменкол» в течение 12 часов

С учетом того, что при производстве краниотрансплантатов планируется использовать большие фрагменты костных лоскутов, механическая обработка представляется более трудоемкой и неудобной по сравнению с химической обработкой, а также повышает риск значительной механической деформации трансплантата. Таким образом, более оправданной является модификация поверхности ТКК с помощью химических факторов.

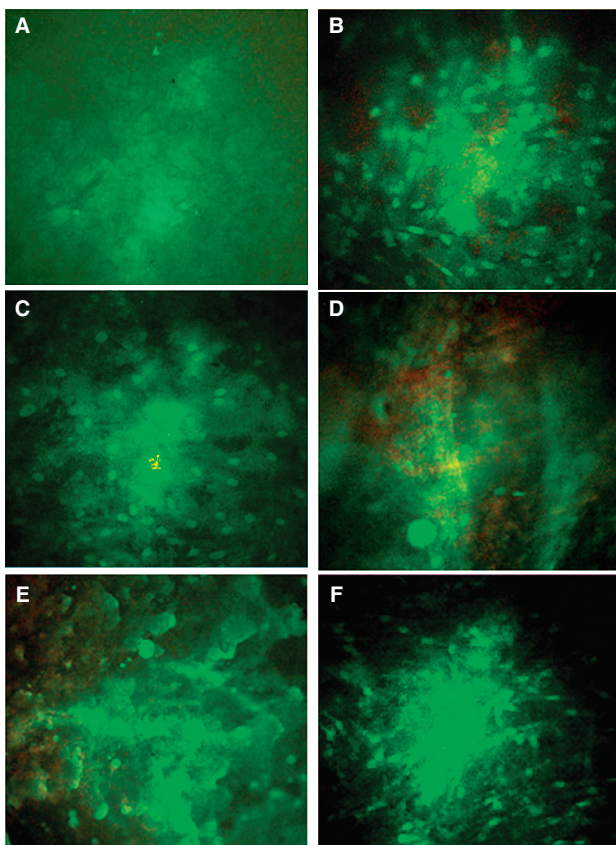


Рис. 1. Выявление фибробластов человека линии M-22 на фрагментах трансплантатов кортикальной кости с механической и химической модификацией через 7 суток культивирования. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым. Увеличение $\times 200$. А – контроль (без обработки); Б – ТКК, экспонированный в 2N растворе соляной кислоты в течение 3 часов; В – ТКК, экспонированный в 2N растворе соляной кислоты в течение 6 часов; Г – ТКК, экспонированный в 2N растворе соляной кислоты в течение 12 часов; Д – ТКК, обработанный напильником с высокой плотностью шлифующих зубьев; Е – ТКК, обработанный напильником с низкой плотностью шлифующих зубьев

Fig. 1. Detection of human fibroblasts of M-22 line on the fragments of cortical bone grafts subjected to mechanical and chemical modification, after 7 days of cultivation. Vital staining with trypaflavin-acridine orange. Magnification $200\times$. A, control (no treatment); B, CBGs exposed to 2N hydrochloric acid solution for 3 hours; C, CBGs exposed to 2N solution of hydrochloric acid for 6 hours; D, CBGs exposed to a 2N solution of hydrochloric acid for 12 hours; E, CBGs processed with a file with a high grinding tooth density; F, CBGs processed with a file with a low grinding tooth density

Проведенное исследование показало, что для повышения адгезивности краниотрансплантатов могут быть в равной степени использованы обработка 2N раствором соляной кислоты в течение 3 часов, обработка коллагеназой 1 (0,005% раствор) и препаратом «Ферменкол» (0,05 мг/мл) в течение 24 часов. Выбор реагента зависит

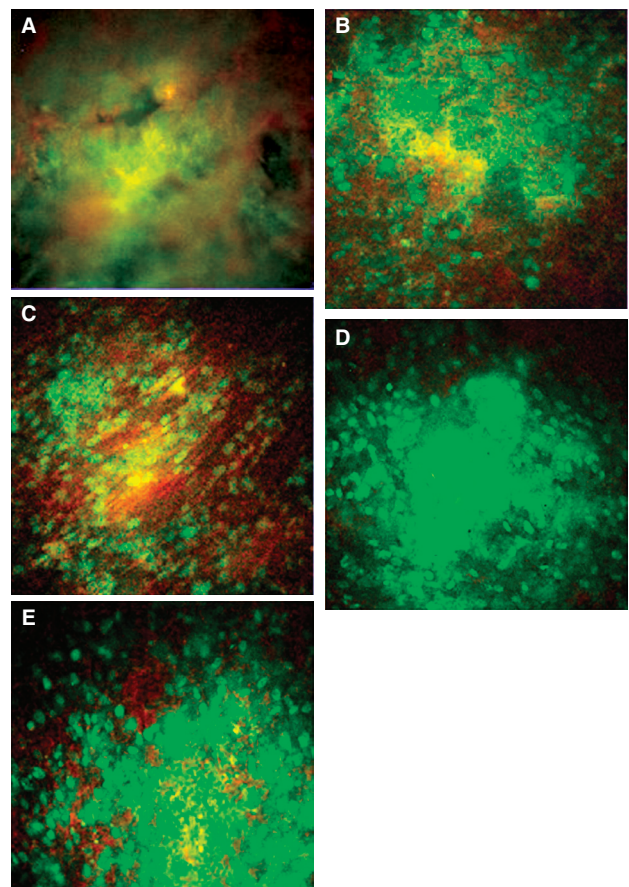


Рис. 2. Выявление фибробластов человека линии M-22 на фрагментах трансплантатов кортикальной кости с ферментативной модификацией поверхности через 7 суток культивирования. Витальное окрашивание трипафлавином-акридиновым оранжевым. Увеличение $\times 200$. А – контроль (без обработки); Б – обработка ТКК 0,005% коллагеназой 1 в течение 12 часов; В – обработка ТКК 0,005% коллагеназой 1 в течение 24 часов; Г – обработка ТКК препаратом «Ферменкол» в течение 12 часов; Д – обработка ТКК препаратом «Ферменкол» в течение 24 часов

Fig. 2. Detection of human fibroblasts of M-22 line on the fragments of cortical bone grafts subjected to enzymatic modification of the surface, after 7 days of cultivation. Vital staining with trypaflavin-acridine orange. Magnification $200\times$. A, control (no treatment); B, treatment of CBGs with 0.005% collagenase 1 for 12 hours; C, treatment of CBGs with 0.005% collagenase 1 for 24 hours; D, treatment of CBGs with Fermencol for 12 hours; D, treatment of CBGs with Fermencol for 24 hours

от материально-технической базы, доступной в тканевом медицинском учреждении или специализированном отделении по производству тканевых трансплантатов, где будет производиться заготовка и обработка краниотрансплантатов. При использовании ферментативных препаратов плотность клеток на поверхности ТКК через 3 и 7 суток после посева была выше, чем при исполь-

Выводы

зовании 2н раствора соляной кислоты, однако эти различия не были статистически значимыми. Таким образом, в отсутствие ферментативных препаратов обработка 2н раствором соляной кислоты в течение 3 часов может быть эффективно использована для модификации кортикальной кости. С другой стороны, необходимо учитывать, что воздействие сильных кислот может вызывать разрушение коллагена и других естественных полимеров в составе костного трансплантата, вызывать удаление кальция, что в итоге может негативно повлиять на прочностные характеристики трансплантата [3, 18]. В рамках проведенного исследования не проводилось оценки механических свойств модифицированных костных трансплантатов, что, безусловно, является важной задачей будущих исследований. Химическая модификация поверхности трансплантатов на основе кортикальной кости или преимущественно с кортикальной костью может быть особенно актуальна при производстве краниотрансплантатов на основе аутологичных или аллогенных костей свода черепа. Кроме того, химическая модификация может быть использована для повышения биокондуктивности костных трансплантатов в тех случаях, когда их насыщение коллагеном или другими естественными полимерами невозможно. Повышение адгезивности костных трансплантатов позволит увеличить их эффективность и приживаемость.

1. Физическая модификация не позволяет эффективно повысить адгезивность трансплантатов на основе кортикальной кости. Адгезия клеток полностью отсутствовала на поверхности трансплантатов кортикальной кости, обработанных напильником с высокой плотностью шлифующих зубьев. На поверхности трансплантатов кортикальной кости, обработанных напильником с низкой плотностью шлифующих зубьев, количество фибробластов человека линии М-22 составляло в среднем 0,3 тыс. на 1 см² через 7 суток культивирования и было статистически значимо в 10–25 раз ниже, чем при ферментативной обработке трансплантатов кортикальной кости ($p < 0,05$).

2. При химической модификации трансплантатов кортикальной кости плотность фибробластов человека линии М-22 через 3 и 7 суток после посева зависит от продолжительности воздействия химического агента. Для повышения адгезивности кортикальную кость оптимально обрабатывать 2н раствором соляной кислоты в течение 3 часов, 0,005% раствором коллагеназы 1 или препаратом «Ферменкол» (0,05 мг/мл) в течение 24 часов.

3. Через 7 суток после посева клеток на поверхности трансплантатов кортикальной кости, обработанных 2н раствором соляной кислоты, плотность клеток увеличивается в 3,0–4,4 раза ($p < 0,05$), на поверхности трансплантатов кортикальной кости, обработанных коллагеназой 1, – в 3,0–5,0 раза ($p < 0,05$), на поверхности трансплантатов кортикальной кости, обработанных препаратом «Ферменкол», – в 3,0–3,2 раза ($p < 0,05$) по сравнению со значениями через 3 суток (статистически значимо во всех случаях).

Список литературы/References

1. Liu J, Yang L, Zhang H, Zhang JY, Hu YC. Effects of allogeneic bone substitute configurations on cell adhesion process in Vitro. *Orthop Surg.* 2023;15(2):579–590. PMID: 36453151 <https://doi.org/10.1111/os.13395>
2. Sanz-Herrera JA, Reina-Romo E. Cell-biomaterial mechanical interaction in the framework of tissue engineering: insights, computational modeling and perspectives. *Int J Mol Sci.* 2011;12(11):8217–8244. PMID: 22174660 <https://doi.org/10.3390/ijms12118217>
3. Кирилова И.А., Подорожная В.Т., Шаркеев Ю.П., Николаев С.В., Пененко А.В., Уваркин П.В. и др. Свойства деминерализованного костного матрикса для биоинженерии тканей. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2017;(3):25–36. Kirilova IA, Podorozhnaya VT, Sharkeev YuP, Nikolaev SV, Penenko AV, Uvarkin PV, et al. Properties of the demineralized bone matrix for bioengineering of tissue. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2017;(3):25–36. (In Russ.). <https://doi.org/10.17802/2306-1278-2017-6-3-25-36>
4. Corliss B, Gooldy T, Vaziri S, Kubilis P, Murad G, Fargen K. Complications after in vivo and ex vivo autologous bone flap storage for cranioplasty: a comparative analysis of the literature. *World Neurosurg.* 2016;96:510–515. PMID: 27647038 <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2016.09.025>
5. van de Vijfeijken SECM, Munker TJAG, Spijker R, Karssemakers LHE, Vandertop WP, Becking AG, et al. CranioSafe Group. Autologous bone is inferior to alloplastic cranioplasties: safety of autograft and allograft materials for cranioplasties, a systematic review. *World Neurosurg.* 2018;117:443–452. PMID: 29879511 <https://doi.org/10.1016/j.wneu.2018.05.193>
6. Аврунин А.С., Паршин Л.К., Аболин А.Б. Взаимосвязь морфофункциональных изменений на разных уровнях иерархической организации кортикальной кости при старении. *Морфология.* 2006;129(3):22–29. Avrunin AS, Parshin LK, Abolin AB. Interconnection of morpho-functional changes at different levels of cortical bone hierarchic organization in aging. *Morphology.* 2006;129(3):22–29. (In Russ.).
7. Chen S, Guo Y, Liu R, Wu S, Fang J, Huang B, et al. Tuning surface properties of bone biomaterials to manipulate osteoblastic cell adhesion and the signaling pathways for the enhancement of early osseointegration. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 2018;164:58–69. PMID: 29413621 <https://doi.org/10.1016/j.col-surf.2018.01.022>
8. Shirosaki Y, Furuse M, Asano T, Kinoshita Y, Kuroiwa T. Skull bone regeneration using chitosan-siloxane porous hybrids-long-term implantation. *Pharmaceutics.* 2018;10(2):70. PMID: 29890682 <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020070>
9. Кулаков А.А., Григорьян А.С. Реакция тканевых элементов кости на имплантацию синтетических биорезорбируемых материалов на основе молочной и гликолевой кислот. *Стоматология.* 2014;93(4):4–7. Kulakov AA, Grigoryan AS. Reaction of bone tissue elements on synthetic bioresorbable materials based on lactic and glycolic acids. *Stomatology.* 2014;93(4):4–7. (In Russ.).
10. Ваза А.Ю., Файн А.М., Боровкова Н.В., Титов Р.С., Миронов А.С., Каулен В.Д. и др. Аллогенный комбинированный костный трансплантат для лечения сложных переломов проксимального отдела плечевой кости, способ его получения. Патент на изобретение RU 2721873 C1, заявка 2019124307, 31.07.2019, опубл. 25.05.2020, Бюл. № 15. 15 с. URL: <https://patentimages.storage.googleapis.com/39/17/51/3a4b03498923c2/RU2721873C1.pdf> [Дата обращения 3 октября 2025 г.]. Vaza AYU, Fain AM, Borovkova NV, Titov RS, Mironov AS, Kaulen VD, et al. *Allogeneic bone graft for treatment of complex fractures of the proximal humerus, the method of its preparation.* RF Patent 2721873 C1, published May 25, 2020. Bull. № 15. p. 15. Available at: <https://patentimages.storage.googleapis.com/39/17/51/3a4b03498923c2/RU2721873C1.pdf> [Accessed October 3, 2025]. (In Russ.).
11. Makarov MS, Storozheva MV, Borovkova NV. Collagen fiber autofluorescence level in evaluating the biological properties of tissue grafts. *Modern Technologies in Medicine.* 2017;9(2):83–90. <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.2.10>
12. Costa DO, Prowse PD, Chrones T, Sims SM, Hamilton DW, Rizkalla AS, et al. The differential regulation of osteoblast and osteoclast activity by surface topography of hydroxyapatite coatings. *Biomaterials.* 2013;34(30):7215–7226. PMID: 23830579 <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.014>
13. Bohner M, Santoni BLG, Döbelin N. Beta-tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties. *Acta Biomater.* 2020;113:23–41. PMID: 32565369 <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.06.022>
14. Yi G, Zhang S, Ma Y, Yang X, Huo F, Chen Y, et al. Matrix vesicles from dental follicle cells improve alveolar bone regeneration via activation of the PLC/PKC/MAPK pathway. *Stem Cell Res Ther.* 2022;13(1):41. PMID: 35093186 <https://doi.org/10.1186/s13287-022-02721-6>
15. Часнойть А.Ч., Жилинский Е.В., Серебряков А.Е., Тимошок Н.Ю. Оценка противорубцовой эффективности препарата ферменкол®. *Медицинские новости.* 2015;(11):36–40. Chasnoits ACh, Zhilinskiy EV, Serabrakou AE, Tsimashok NYU. Antiscar efficiency evaluation of Fermentol®. *Medicinskie novosti.* 2015;(11):36–40. (In Russ.).
16. Вертиева Е.Ю., Олисова О.Ю., Кочергин Н.Г., Пинсон И.Я. Обзор патогенетических механизмов и методов коррекции рубцов. *Российский журнал кожных и венерических болезней.* 2015;18(1):51–57. Vertieva EYu, Olisova OYu, Kochergin NG, Pinson IYa. Review of pathogenetic mechanisms and methods of scar correction. *Rossiyskiy zhurnal kozhnykh i venericheskikh bolezney.* 2015;18(1):51–57. (In Russ.).
17. Макаров М.С., Хватов В.Б., Конюшко О.И., Боровкова Н.В., Сторожева М.В., Пономарев И.Н. Метод морфофункциональной оценки клеточного компонента биотрансплантатов. Патент на изобретение RU 2484472 C1. Заявка 2012114625/15, 13.04.2012, опубл. 10.06.2013. Бюл. № 16. 13 с. URL: <https://patenton.ru/patent/RU2484472C1.pdf> [Дата обращения 3 октября 2025 г.]. Makarov MS, Khvatov VB, Konushko OI, Borovkova NV, Storozheva MV, Ponomarev IN. *Method of morphofunctional validation of cell component in biological grafts.* Patent RF 2484472 C1, published June 10, 2013. Bull. № 16. p. 13. Available at: <https://patenton.ru/patent/RU2484472C1.pdf> [Accessed October 3, 2025]. (In Russ.).
18. Аврунин А.С., Семёнов А.С., Фёдоров И.В., Мельников Б.Е., Докторов А.А., Паршин Л.К. Влияние минеральной

связи между объединениями кристаллитов на механические свойства костного матрикса. Моделирование методом конечных элементов. *Травматология и ортопедия России*. 2013;2(68):72–83.

Avrunin AS, Semenov AS, Fedorov IV, Melnikov BE, Doctorov AA, Parshin LK. Influence of the mineral bond between associations of crystallites on bone matrix mechanical properties. Modeling by the

finite element method. *Travmatologiya i ortopedia Rossii*. 2013;2(68):72–83. (In Russ.).

Информация об авторах

**Максим Сергеевич
Макаров**

д-р биол. наук, старший научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», <https://orcid.org/0000-0002-2184-2982>, makarovms@sklif.mos.ru
20% – разработка дизайна исследования, получение и анализ данных, написание текста рукописи, подготовка обзора публикаций

**Майя Викторовна
Сторожева**

научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», <https://orcid.org/0000-0003-1927-2404>, storozhevamv@sklif.mos.ru
20% – разработка дизайна исследования, получение и анализ данных

**Андрей Аркадьевич
Офицеров**

научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», <https://orcid.org/0000-0003-2170-0009>, ofitserovaa@sklif.mos.ru
15% – разработка дизайна исследования, получение и анализ данных

**Иван Николаевич
Пономарев**

канд. мед. наук, старший научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», <https://orcid.org/0000-0002-2523-6939>, ponomarevin@sklif.mos.ru
15% – разработка дизайна исследования, получение данных для анализа

**Александр Сергеевич
Миронов**

канд. мед. наук, заведующий отделением консервирования тканей и производства трансплантатов с операционным блоком ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», <https://orcid.org/0000-0001-9592-7682>, mironovas@sklif.mos.ru
10% – получение данных для анализа

**Антон Аркадьевич
Будаев**

научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ», <https://orcid.org/0000-0002-5864-5683>, budaevaa@sklif.mos.ru
10% – получение данных для анализа

**Наталья Валерьевна
Боровкова**

д-р мед. наук, заведующая научным отделением биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ»; доцент кафедры трансплантологии и искусственных органов им. В.П. Демикова МБФ ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ (Пироговский Университет); доцент кафедры клинической лабораторной диагностики с курсом лабораторной иммунологии ФГБОУ ДПО РМАНПО МЗ РФ, <https://orcid.org/0000-0002-8897-7523>, borovkovanv@sklif.mos.ru
10% – разработка дизайна исследования, анализ полученных данных

Information about the authors

Maksim S. Makarov	Dr. Sci. (Biol.), Senior Researcher, Scientific Department of Biotechnologies and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, https://orcid.org/0000-0002-2184-2982 , makarovms@sklif.mos.ru 20%, study design development, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data; writing the text of the manuscript, review of publications on the topic of the article
Mayya V. Storozheva	Researcher, Scientific Department of Biotechnologies and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, https://orcid.org/0000-0003-1927-2404 , storozhevamv@sklif.mos.ru 20%, study design development, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data
Andrey A. Ofitserov	Researcher, Scientific Department of Biotechnologies and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, https://orcid.org/0000-0003-2170-0009 , ofitserovaa@sklif.mos.ru 15%, study design development, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data
Ivan N. Ponomarev	Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher, Scientific Department of Biotechnologies and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, https://orcid.org/0000-0002-2523-6939 , ponomarevin@sklif.mos.ru 15%, study design development, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data
Alexander S. Mironov	Cand. Sci. (Med.), Head of the Department for Tissue Preservation and Graft Manufacturing with an Operating Unit, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, https://orcid.org/0000-0001-9592-7682 , mironovas@sklif.mos.ru 10%, obtaining data for analysis
Anton A. Budaev	Researcher, Scientific Department of Biotechnologies and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, https://orcid.org/0000-0002-5864-5683 , budaevaa@sklif.mos.ru 10%, obtaining data for analysis
Natalya V. Borovkova	Dr. Sci. (Med.), Head of the Scientific Department of Biotechnologies and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine; Associate Professor of the V.P. Demikhov Department of Transplantology and Artificial Organs, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University (Pirogov University); Associate Professor of the Department of Clinical Laboratory Diagnostics with a Course in Laboratory Immunology, Russian Medical Academy of Continuous Professional Education, https://orcid.org/0000-0002-8897-7523 , borovkovanv@sklif.mos.ru 10%, study design development, analysis of the obtained data

Статья поступила в редакцию 05.06.2025;
одобрена после рецензирования 02.07.2025;
принята к публикации 29.09.2025

The article was received on June 5, 2025;
approved after reviewing on July 2, 2025;
accepted for publication on September 29, 2025