

# Оптимизация методики изготовления костно-пластического материала на основе коллагена человека 1-го типа и аллогенной костной крошки

А.А. Офицеров<sup>1</sup>, М.С. Макаров<sup>✉1</sup>, М.В. Сторожева<sup>1</sup>, Н.В. Боровкова<sup>1,2</sup>, И.Н. Пономарев<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Кафедра трансплантологии и искусственных органов ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ,  
117997, Россия, Москва, ул. Островитянова, д. 1

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

## Аннотация

**Введение.** Изделия на основе костной крошки и коллагена считаются перспективными при лечении дефектов кости. При этом оптимальная методика получения таких трансплантатов не выработана.

**Цель.** Оптимизировать методику получения костно-пластического материала на основе аллогенного коллагена 1-го типа и костной крошки.

**Материал и методы.** Исследовали образцы костно-пластического материала, полученные с использованием аллогенной костной крошки диаметром 180–800 мкм и раствора коллагена человека 1-го типа в уксусной кислоте. Оценивали общую структуру трансплантатов, сохранность коллагена в их составе, проводили морфофункциональный анализ клеток человека линии М-22 в условиях контакта с образцами костно-пластического материала разных типов.

**Результаты.** Процедуры производства костно-пластического материала значимо не влияют на качество коллагена в его составе, при этом лиофилизированные трансплантаты обладают выраженной ацидогенностью и токсичностью в культуре клеток. Вымачивание костно-пластического материала в изотоническом растворе хлорида натрия (0,9% NaCl) в течение 30 минут и более позволяет получить трансплантаты, не токсичные для клеток *in vitro*. В зависимости от концентрации коллагена и размера костной крошки адгезивные свойства готовых костно-пластических материалов заметно варьировали.

**Выводы.** Костно-пластический материал на основе костной крошки и золя коллагена, выделенного методом кислотной экстракции, *in vitro* обладает ацидогенностью и токсичностью, которую можно устранить путем его вымачивания в изотоническом растворе хлорида натрия. В зависимости от концентрации коллагена и размера костной крошки можно получать биосовместимые образцы костно-пластического материала с высокой и низкой адгезивностью для клеток.

**Ключевые слова:** костно-пластический материал, коллаген, биосовместимость, клетки, пролиферативная активность

**Конфликт интересов** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов  
**Финансирование** Исследование проводилось без спонсорской поддержки

**Для цитирования:** Офицеров А.А., Макаров М.С., Сторожева М.В., Боровкова Н.В., Пономарев И.Н. Оптимизация методики изготовления костно-пластического материала на основе коллагена человека 1-го типа и аллогенной костной крошки. *Трансплантология*. 2023;15(2):177–187. <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2023-15-2-177-187>

## Optimization of the technique for manufacturing the osteoplastic material based on type 1 human collagen and allogeneic bone chips

A.A. Ofitserov<sup>1</sup>, M.S. Makarov<sup>✉1</sup>, M.V. Storozheva<sup>1</sup>, N.V. Borovkova<sup>1,2</sup>, I.N. Ponomarev<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup> Department of Transplantology and Artificial Organs, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University,  
1 Ostrovityanov St., Moscow 117997 Russia

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

### Abstract

**Introduction.** Biological grafts, including bone chips and collagen, are supposed to be promising in the treatment of bone tissue treatment. Nevertheless, manufacturing of these grafts still needs to be standardized.

**Aim.** To optimize methodology of osteoplastic material production, based on allogenic 1 type collagen and bone chips.

**Material and methods.** Osteoplastic material grafts were produced, using with allogeneic bone chips 180–800  $\mu\text{m}$  and type 1 collagen solution in acidic acid. We studied total integrity of graft, collagen quality, morphofunctional properties of line M-22 human cells interacting with different type of osteoplastic material grafts.

**Results.** Procedures for manufacturing the osteoplastic material did not significantly affect the quality of collagen in its composition, while lyophilized grafts had pronounced acidogenic and toxic effects in cell culture. Soaking osteoplastic material in isotonic solution for 30 min or longer increased its biocompatibility in vitro. Adhesion properties of osteoplastic material widely varied depending on collagen concentration and bone chips size.

**Conclusion.** Osteoplastic material prepared with allogeneic bone chips of 180–800  $\mu\text{m}$  and collagen solution in acidic acid had pronounced acidogenic and toxic effects in vitro that could be considerably reduced by soaking in isotonic solution. Varying the collagen concentration and the size of bone chips one could produce biocompatible osteoplastic material grafts with high and low adhesion properties.

**Keywords:** osteoplastic material, collagen, biocompatibility, cells, proliferation activity

**CONFLICT OF INTERESTS** Authors declare no conflict of interest  
**FINANCING** The study was performed without external funding

**For citation:** Ofitserov AA, Makarov MS, Storozheva MV, Borovkova NV, Ponomarev IN. Optimization of the technique for manufacturing the osteoplastic material based on type 1 human collagen and allogeneic bone chips. *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2023;15(2):177–187. (In Russ.). <https://doi.org/10.23873/2074-0506-2023-15-2-177-187>

КПМ – костно-пластический материал  
DMEM – Dulbecco's modified Eagles medium

$\lambda$  – длина волны

### Введение

В настоящее время идет активная разработка имплантатов и биологических конструкций для стимуляции остеогенеза и регенерации костной ткани. Для обозначения таких изделий часто используют термин «костно-пластический материал» (КПМ) [1]. По своему химическому составу КПМ разделяют на биоорганические, керамические, синтетические и композиционные [2, 3], КПМ могут включать диплоидные клетки, а также факторы роста, дифференцировки и цитокины [4–6]. В специализированных медицинских отделениях, занимающихся производством тканевых трансплантатов, есть возможность произ-

водства КПМ, используя аллогенную кость и раствор коллагена человека 1-го типа. Показано, что коллаген значительно повышает биокондуктивные свойства трансплантатов, стимулирует миграцию собственных клеток пациента и поэтому может быть использован ими в качестве субстрата для формирования собственной кости [3, 7, 8]. При использовании костного материала в виде дисперсных структур (костной крошки) появляется возможность получения пластичных трансплантатов заданного размера и формы. Раствор коллагена способствует инкорпорированию костных гранул, уменьшая риск их смещения или выдавливания при механических нагрузках [9, 10]. Костная крошка обладает остеоген-

ными и остеоиндуктивными свойствами и широко используется в клинической практике [2–4]. Изделия на основе костной крошки и коллагена считаются очень перспективными при лечении дефектов губчатой и кортикальной кости [11, 12]. При этом широко известные изделия содержат в своем составе ксеногенные материалы [1, 5, 8–10]. В связи с этим представляется актуальным разработать методику получения КПП на основе аллогенных материалов, таких как коллаген и костная крошка.

**Цель.** Оптимизировать методику получения костно-пластического материала на основе аллогенного коллагена 1-го типа и костной крошки.

### Материал и методы

Работу проводили в 2022 году в научном отделе биотехнологий и трансфизиологии ГБУЗ «НИИ скорой помощи им. Н.В. Склифосовского ДЗМ».

Для производства КПП использовали растворы коллагена 1-го типа человека, выделенного из сухожилий тканевых доноров путем кислотной экстракции в 0,01 М растворе уксусной кислоты [13], и костную крошку, полученную из кости тканевых доноров [14]. Размер гранул костной крошки варьировал от 180 до 800 мкм. Во всех опытах объем используемых растворов коллагена составлял 100 мл. Для определения оптимального соотношения в 100 мл раствора коллагена вносили от 3 до 10 грамм костной крошки и перемешивали, стремясь достичь ее равномерного распределения и отсутствия конгломератов. Для проведения опытов *in vitro* использовали смесь с оптимальным соотношением костной крошки и коллагена. Смесь золь коллагена и костной крошки перемешивали до однородного состояния, помещали в чашки Петри площадью 10x10 см, замораживали, а затем лиофилизировали в камере с разреженной атмосферой. Готовый КПП стерилизовали с помощью ультрафиолетового облучения.

На первом этапе исследовали влияние на клетки культуры фибробластов человека КПП, изготовленного из 0,6–0,8% золь коллагена 1-го типа человека, используемого для потенцирования остеокондуктивных свойств трансплантатов костной ткани [12], и костной крошки размером 315–430 мкм. В культуру фибробластов КПП помещали без дополнительной обработки. Всего исследовали 5 образцов.

На втором этапе оценивали эффективность способов снижения токсичности КПП. В первой

серии экспериментов трансплантаты готовили по указанной выше методике, затем образцы замачивали в изотоническом растворе хлорида натрия в течение 10, 20, 30, 40, 50 или 60 минут, после чего их помещали в культуру клеток. Во второй серии экспериментов смесь золь коллагена и костной крошки до замораживания отмывали дистиллированной водой. Один цикл включал: центрифугирование смеси костной крошки и коллагена в пробирке типа Falcon с ускорением 3000 g в течение 20 минут, полное замещение супернатанта эквивалентным объемом стерильной дистиллированной воды и ресуспендирование содержимого в пробирке. Число циклов отмывания варьировало от 1 до 4. После отмывания смесь коллагена и костной крошки замораживали, лиофилизировали, но перед помещением в культуру клеток замачивания в изотоническом растворе хлорида натрия не проводили. Всего исследовали 20 образцов.

На третьем этапе исследовали адгезивные свойства КПП, полученные с использованием костной крошки разного диаметра и раствора коллагена в 2 концентрациях, параллельно исследовали коллагеновые губки, полученные из раствора с той же концентрацией коллагена, но без использования костной крошки. В работе использовали 8 типов КПП, полученных из 0,8% или 1,1% золь коллагена 1-го типа человека и костной крошки одного из размеров: 180 мкм, 315 мкм, 630 мкм и 800 мкм. После совмещения компонентов оценивали характер распределения костной крошки в коллагене (гомогенность), после лиофилизации оценивали стабильность готового изделия. Далее в культуре клеток оценивали токсичность образцов КПП и возможность ее редукции путем отмывания в физиологическом растворе хлорида натрия в течение 30 минут. Всего исследовали 22 образца.

Все исследования *in vitro* проводили на культуре фибробластов человека линии M-22 20–22 пассажами. В каждую лунку с площадью ростовой поверхности 1,9 см<sup>2</sup> (4-луночного планшета) вносили по 10 тыс. клеток в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagles medium), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки. В контрольные лунки вносили суспензию клеток без КПП, в опытные лунки помещали образцы КПП или коллагеновой губки, а затем вносили суспензию клеток. Клетки инкубировали 3 суток при температуре 37°C и 5% концентрации углекислого газа в атмосфере. Оценивали количество клеток на дне лунок и на поверхности трансплан-

татов, общую структурную целостность клеток и их морфологию. Для этого клетки окрашивали витальным (прижизненным) флуорохромным красителем на основе трипафлавина-акридинового оранжевого или трипафлавина-родамина С и исследовали с помощью конфокального люминесцентного микроскопа Nikon 80i (Nikon, Япония) [15]. Кроме того, оценивали автофлуоресценцию коллагена волокон в составе КППМ. Регистрацию автофлуоресценции коллагена в нефиксированных неокрашенных образцах КППМ проводили с помощью синего светофильтра ( $\lambda$  возбуждения – 380–420 нм,  $\lambda$  эмиссии – от 450 нм, экспозиция – 1 сек). Для количественной характеристики автофлуоресценции коллагена использовали параметр средней интенсивности свечения (в фут-канделах, foot candle, FC). Для сравнения оценивали интенсивность свечения коллагеновых волокон в составе коллагеновых повязок, приготовленных с использованием того же раствора коллагена по известной методике [13].

Статистическую обработку полученных данных проводили с помощью методов вариационной статистики с использованием пакета программ "Microsoft Excel 2000". Вычисляли средние арифметические значения ( $M$ ) и среднеквадратичные отклонения ( $\sigma$ ). Для оценки различий использовали  $t$ -критерий Стьюдента. Проверку распределения на нормальность проводили с помощью теста Колмогорова–Смирнова. Различия значений считали статистически значимыми при уровне значимости более 95% ( $p < 0,05$ ).

### Результаты и обсуждение

В процессе разработки КППМ необходимо было получить цельный трансплантат с гомогенным распределением компонентов. Опытным путем было показано, что в 100 мл раствора коллагена удается гомогенно распределить до 6 г костной крошки. Если масса костной крошки превышала 6 г, полученная смесь теряла гомогенность, образовывались конгломераты, а после лиофилизации трансплантат фрагментировался. Таким образом, при производстве КППМ оптимальным соотношением костной крошки с раствором коллагена является 6 г на 100 мл.

На первом этапе исследования *in vitro* использовали образцы КППМ, изготовленные на основе 0,8% раствора коллагена 1-го типа и костной крошки размером 315–430 мкм. Обращало на себя внимание изменение окраски индикатора питательной среды DMEM, свидетельствующее о

смещении pH в кислую сторону (ацидогенность), которое проявлялось уже в течение 1 часа после помещения КППМ в опытную лунку и не было связано с контаминацией образцов патогенной флорой. Через 1 час инкубации КППМ в лунках значение pH составляло в среднем 4,5 при норме 7,0–7,2 для среды DMEM. Через 3 суток культивирования на дне данных лунок число клеток было очень низким и не превышало в среднем 1 тыс. на  $см^2$ . В то же время в контрольных лунках содержание клеток составляло 14–15 тыс. на  $1 см^2$ . В составе КППМ клетки не были выявлены, таким образом, заметное снижение числа клеток на дне лунок не было связано с их миграцией внутрь трансплантата. Одновременно с этим в опытных лунках в культуральной среде отмечали большое количество ошаренных клеток – такие клетки имеют характерную округлую форму, не контактируют друг с другом, имеют выраженные дефекты ядра и вакуолярной системы, что отчетливо выявляется при окрашивании витальными флуорохромными красителями. Подобные изменения характерны для сильно деформированных или апоптотических клеток. Таким образом, готовые образцы КППМ обладали выраженной ацидогенностью и токсичностью, что приводило к массовой гибели клеток.

Для снижения токсичности КППМ применяли 2 способа: вымачивание готового КППМ в изотоническом растворе хлорида натрия или отмывание КППМ на этапе изготовления дистиллированной водой. Показатели контрольных образцов в обоих исследованиях были сопоставимы. В контрольных лунках (без КППМ) число клеток после 3 суток культивирования на дне лунок составляло 23–24 тыс./ $см^2$ , тогда как в опытах с исходным КППМ этот параметр не превышал 0,9–1,0 тыс./ $см^2$ , а на поверхности КППМ клетки полностью отсутствовали (табл. 1). В лунках, где образцы КППМ предварительно вымачивали в изотоническом растворе хлорида натрия, количество клеток на дне составляло от  $3,0 \pm 0,5$  до  $17,5 \pm 0,8$  тыс./ $см^2$ , увеличиваясь по мере роста длительности вымачивания изделия с 10 до 50 минут. Параллельно увеличивалось число клеток на трансплантате: после вымачивания в течение 20 минут их количество составляло  $1,0 \pm 0,2$  тыс./ $см^2$ , а после 50 минут достигало  $4,5 \pm 0,7$  тыс./ $см^2$ . Стоит особо подчеркнуть, что в опытах, где вымачивание КППМ продолжалось 10–20 минут, многие клетки на дне лунок и на поверхности трансплантата имели измененный вид, плохо контактировали с пластиком, имели дефекты в составе ядра и цито-

плазмы. Витальное окрашивание клеток показало заметное снижение яркости наружной мембраны, резкое снижение количества секреторных везикул в составе клеток, свидетельствующие о деформации клеток, разрушении их вакуолярных структур, нарушении контактных взаимодействий, что в совокупности можно расценить как токсический эффект. В опытах, где вымачивание составляло 30–50 минут, деформированные клетки отсутствовали, соответственно морфология клеток была нормальной или близкой к норме. В случае вымачивания КППМ в течение 60 минут число клеток и их морфология значительно отличались от результатов опытов, где вымачивание составило 50 минут.

**Таблица 1. Оценка биосовместимости трансплантатов костно-пластического материала, подготовленных разными способами**

**Table 1. Biocompatibility assessment of osteoplastic material grafts prepared by different methods**

Вымачивание готового лиофилизированного трансплантата в изотоническом растворе хлорида натрия		
Длительность экспозиции КППМ в изотоническом растворе хлорида натрия	Плотность клеток линии М-22 через 3 суток культивирования, тыс./см <sup>2</sup>	
	Дно лунки	Поверхность трансплантата
Контроль 1. Лунки с клетками без трансплантата	24,1±1,2	—
Контроль 2. 0 мин (трансплантат без вымачивания)	1,0±0,2	0
10 мин	3,0±0,5	0
20 мин	5,3±0,4	1,0±0,2
30 мин	11,1±1,0*	2,6±0,5*
40 мин	13,0±1,0*	2,8±0,6*
50 мин	17,5±0,8*	4,5±0,7*
60 мин	17,0±1,0*	4,0±0,6*
Отмывание смеси жидкого коллагена и костной крошки от кислой среды дистиллированной водой с последующей лиофилизацией		
Количество отмываний	Плотность клеток линии М-22 через 3 суток культивирования, тыс./см <sup>2</sup>	
	Дно лунки	Поверхность трансплантата
Контроль 1 (лунки с клетками без трансплантата)	23,5±1,0	—
Контроль 2 (без отмывания)	0,9±0,2	0
1 раз	6,5±1,2	1,0±0,3
2 раза	7,5±1,6	1,0±0,2
3 раза	7,5±1,9	1,6±0,2
4 раза	5,0±0,9	1,8±0,2

\*статистически значимо при  $p < 0,05$  относительно контроля 2 – опытов с 10- и 20-минутным вымачиванием

В серии экспериментов, где проводили отмывание смеси коллагена и костной крошки до лиофилизации, отмечалось поэтапное изменение ее рН с 3,3 до 6,1 по мере увеличения количества циклов обработки до 4. При исследовании *in vitro* количество клеток на дне лунок, в которые помещали КППМ, прошедшие разное количество циклов дополнительной обработки, составляло от 5,0 до 7,5 тыс./см<sup>2</sup> ( $p > 0,05$ ). В то же время плотность клеток на поверхности трансплантата после 3–4 отмываний коллагена оказалась выше, чем после 1–2 отмываний. Однако абсолютные значения плотности клеток были во всех случаях очень низкими, не превышали 2 тыс./см<sup>2</sup> и были ниже, чем в опытах с вымачиванием трансплантатов в течение 30–60 минут (см. табл. 1). Таким образом, вымачивание готовых лиофилизированных трансплантатов КППМ в изотоническом растворе хлорида натрия более эффективно снижает их токсичность, а продолжительность вымачивания при этом должна составлять не менее 30 минут.

При оценке КППМ, полученных с использованием крошки разного размера и 2 концентраций коллагена, было показано, что при использовании 0,8% золя коллагена наиболее гомогенную смесь удается получить в случае замешивания относительно крупной костной крошки (600–800 мкм). В опытах с растворами 1,1% коллагена, напротив, наиболее гомогенная смесь образовывалась с использованием мелкой крошки (180 мкм) (табл. 2). После лиофилизации все образцы были стабильными и не фрагментировались. В опытах *in vitro* параллельно оценивали образцы КППМ и коллагеновые повязки, полученные из раствора с той же концентрацией коллагена (0,8 и 1,1%). В присутствии коллагеновых повязок не наблюдалось деформации клеток на дне лунок и в составе трансплантатов, клетки адгезировали на поверхности повязок (рис. 1А). Все образцы КППМ без предварительного вымачивания были токсичными и препятствовали росту клеток (рис. 1В). В опытах, где КППМ предварительно вымачивали в изотоническом растворе хлорида натрия в течение 30–50 минут, выраженной деформации клеток не наблюдалось. В КППМ, полученных из 0,8% раствора коллагена, его образцы с костной крошкой диаметром 180–600 мкм через 3 суток культивирования имели сходную плотность клеток на своей поверхности (рис. 1С) и статистически значимо не отличались от коллагеновых трансплантатов без костной крошки, тогда как в КППМ с костной крошкой диаметром 800 мкм число клеток было ниже в 3–4 раза (рис. 2А).

Число клеток на дне лунок было наибольшим в опытах, где диаметр костной крошки составлял 180 мкм. В КПМ, полученных из 1,1% раствора коллагена, адгезия клеток на поверхности КПМ была гораздо менее выраженной, чем на коллагене без костной крошки и в КПМ, приготовленном с использованием 0,8% раствора коллагена и костной крошки диаметром 180–600 мкм. Стоит отметить, что на дне лунок наибольшая плотность клеток наблюдалась в тех случаях, где диаметр костной крошки составлял 180 и 800 мкм (рис. 2В). В целом можно заключить, что 0,8% раствор коллагена предпочтительней для изготовления КПМ, чем 1,1% раствор. КПМ, приготовленные с использованием 0,8% раствора коллагена и костной крошки диаметром 180–600 мкм после предварительного вымачивания, являются адгезивными и нетоксичными для клеток.

**Таблица 2. Оценка степени гомогенности смеси костной крошки и раствора коллагена**

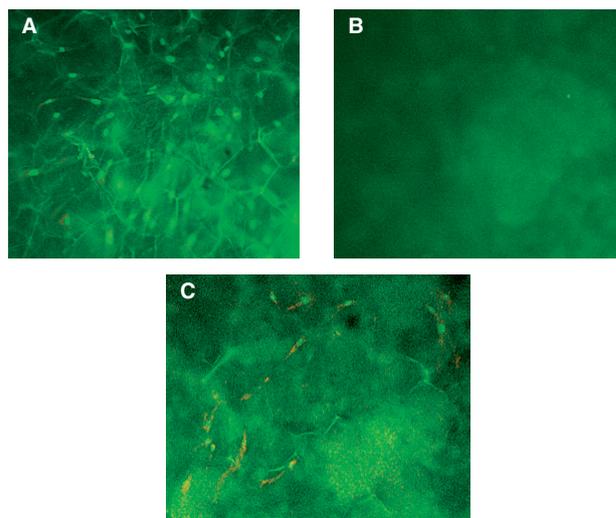
**Table 2. Homogeneity assessment in the mixture of bone chips and collagen solution**

Параметры	Концентрация коллагена в растворе	
	0,8 %	1,1 %
Размер гранул костной крошки, мкм		
180	Низкая	Высокая
315	Средняя	Низкая
630	Высокая	Средняя
800	Высокая	Низкая

Примечания. Низкая гомогенность – происходит образование сгустков крошки и коллагена во всем объеме смеси, полностью размешать сгустки не удается. Средняя гомогенность – при смешивании образуются отдельные сгустки, при более интенсивном перемешивании сгустки исчезают. Высокая гомогенность – при смешивании сгустки не образуются

Для оценки качества коллагена использовали автофлуоресценцию коллагеновых волокон в КПМ и коллагеновых повязках, полученных из раствора с той же концентрацией коллагена, которая использовалась при изготовлении КПМ (0,8 и 1,1%). При анализе автофлуоресценции коллагена в коллагеновых повязках отчетливо выявлялись зоны с диффузным расположением коллагена и зоны с коллагеновыми волокнами (рис. 3А). В образцах КПМ коллагеновые волокна выявлялись гораздо реже, основная область была заполнена диффузным слоем коллагена (рис. 3В). Средняя интенсивность автофлуоресценции коллагена в повязках и КПМ статистически значимо не отличалась и составляла в среднем  $28 \pm 1$  FC. При сравнении образцов КПМ с разным размером костной крошки не выявлено различия по

интенсивности свечения коллагена. По нашим наблюдениям, химическая деградация коллагена сопровождается резким увеличением автофлуоресценции волокон и превышает 60 FC [11]. При обследовании образцов КПМ были выявлены лишь отдельные незначительные волокна с таким уровнем свечения. В целом в составе КПМ коллаген имел нормальную структурную целостность.

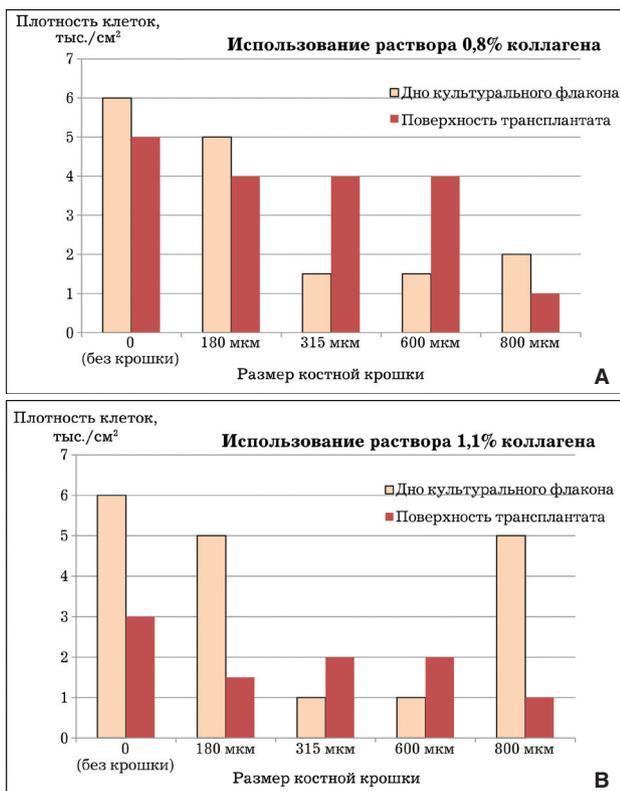


**Рис. 1. Рост клеток M-22 на коллагеновых матрицах, полученных из 0,8% раствора коллагена, через 3 суток культивирования. Увеличение  $\times 100$ . Окраска трипафлавином-акридиновым оранжевым. А – коллагеновая повязка (без костной крошки); В – костнопластический материал из 0,8% коллагена и костной крошки без вымачивания; С – костнопластический материал из 0,8% коллагена и костной крошки, предварительно вымоченный в изотоническом растворе хлорида натрия в течение 40 минут**

**Fig. 1. Growth of M-22 cells on collagen matrices obtained from 0.8% collagen solution after 3 days of culturing. Magnification 100x. Tripaflavin-acridine orange stain. A: collagen dressing (without bone chips); B: osteoplastic material of 0.8% collagen and bone chips without soaking; C: osteoplastic material of 0.8% collagen and bone chips, pre-soaked in isotonic sodium chloride solution within 40 minutes**

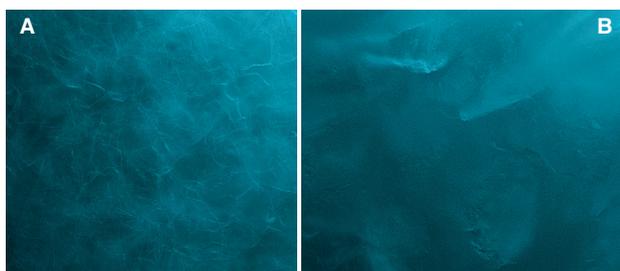
## Заключение

В настоящее время при производстве костно-пластического материала на основе коллагена и костной крошки не приводят четких обоснований, показывающих оптимальность выбранных параметров коллагена и крошки [1, 2, 8–10]. Известно, что адгезивные свойства коллагеновых матриц в значительной степени зависят от концентрации коллагена в исходном растворе. Матрицы с диффузным распределением коллагена стимулируют активную миграцию клеток, а также их пролиферацию, при этом такие матрицы быстро деградируют в ране [7].



**Рис. 2.** Рост клеток *in vitro* в присутствии предварительно вымоченного костно-пластического материала. Для получения костно-пластического материала с использованием 0,8% раствора коллагена (A) и 1,1% коллагена (B)

**Fig. 2.** Number of cells, cultivated in the presence of previously soaked osteoplastic material. To obtain osteoplastic material we used 0.8% collagen solution (A) or 1.1% collagen (B)



**Рис. 3.** Автофлуоресценция коллагена в составе коллагеновых повязок (A) и костно-пластического материала (B), полученных из 0,8% раствора коллагена. Увеличение x40

**Fig. 3.** Collagen autofluorescence in the collagen dressings (A) and in osteoplastic material (B) obtained from a 0.8% collagen solution. Magnification 40x

Матрицы с высокой компактизацией коллагена являются неадгезивными для клеток человека, но одновременно с этим обладают высокой механической прочностью и гораздо медленнее резорбируются [6, 8]. Наше исследование показало, что в зависимости от условий приготовления образцы костно-пластических материалов могут быть как адгезивными для клеток, так и практически неадгезивными на фоне отсутствия токсичности. Таким образом, в зависимости от поставленных целей мы можем получать костно-пластические материалы с разными биологическими свойствами. При этом необходимо учитывать, что комбинация костной крошки и золя коллагена в уксусной кислоте вызывает ацидогенность трансплантатов костно-пластического материала после лиофилизации. Во многом это может быть обусловлено образованием дигидрофосфата в результате контакта уксусной кислоты с фосфатом кальция в составе крошки. Наше исследование показало, что предварительное вымачивание костно-пластического материала в изотоническом растворе хлорида натрия заметно снижает его ацидогенность и токсичность в культуре клеток. С другой стороны, в условиях *in vivo* токсичность невымоченного костно-пластического материала может быть менее выраженной благодаря разным формам биологической активности, которые отсутствуют *in vitro*. Для более детальной оценки биосовместимости костно-пластического материала, а также его адгезивных и репаративных свойств необходимо проведение исследований на экспериментальных животных.

**Выводы**

1. Костно-пластический материал на основе костной крошки и золя коллагена, выделенного методом кислотной экстракции, обладает ацидогенностью и токсичностью. Исходные образцы костно-пластических материалов снижают pH культуральной среды DMEM от нормального, составляющего 7,0–7,2, до 3,3–4,5, тем самым препятствуя адгезии и пролиферации клеток M-22, и вызывают выраженные нарушения в структуре клеточных мембран; этот токсический эффект приводит к массовой гибели клеток M-22 *in vitro*.

2. Для эффективного снижения ацидогенности и токсичности образцы костно-пластического материала перед применением следует выдерживать в изотоническом растворе хлорида натрия (0,9% NaCl) не менее 30 минут. Данный способ

более эффективен, чем отмывание смеси крошки и коллагена до лиофилизации. При вымачивании готовых костно-пластических материалов в течение 30–60 минут в изотоническом растворе хлорида натрия плотность клеток на дне культуральных флаконов и на поверхности матриц статистически значимо в 1,5–3 раза превышала аналогичные значения в опытах, где смесь крошки и коллагена предварительно отмывали дистиллированной водой.

3. Использование крупной костной крошки (диаметром 800 мкм) снижает адгезивные свойства готовых костно-пластических материалов. Образцы костно-пластического материала, полученные с использованием 0,8% раствора коллагена, являются статистически значимо в 2–2,5 раза более адгезивными для клеток человека по сравнению с костно-пластическими материалами, полученными из 1,1% раствора коллагена.

### Список литературы

1. Кирилова И.А., Байтов В.С., Подорожная В.Т., Почуева Н.Ю. Морфологическая картина остеогенеза в эксперименте при использовании костно-пластического материала "КОСТМА". *Хирургия позвоночника*. 2007;(4):58–61.
2. Кирилова И.А., Подорожная В.Т., Ардашев И.П., Черницов С.В. Различные виды костнопластических материалов для восстановления костной структуры. *Политравма*. 2008;(4):60–64.
3. Walsh WR, Oliver RA, Christou C, Lovric V, Walsh ER, Prado GR, et al. Critical size bone defect healing using collagen-calcium phosphate bone graft materials. *PLoS ONE*. 2017;12(1):e0168883. PMID: 28045946 <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168883>
4. Yoshida K, Sumita Y, Marukawa E, Harashima M, Asahina I. Effect of platelet-rich plasma on bone engineering with an alloplastic substitute containing BMP2. *Biomed Mater Eng*. 2013;23(3):163–172. PMID: 23629530 <https://doi.org/10.3233/BME-130741>
5. Tanaka H, Toyoshima T, Atsuta I, Ayukawa Y, Sasaki M, Matsushita Y, et al. Additional effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in sinus augmentation with deproteinized bovine bone mineral: preliminary results. *Implant Dent*. 2015;24(6):669–674. PMID: 26204169 <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000306>
6. Civinini R, Macera A, Nistri L, Redl B, Innocenti M. The use of autologous blood-derived growth factors in bone regeneration. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2011;8(1):25–31. PMID: 22461800
7. Zhang L, Zhou Y, Su D, Wu S, Zhou J, Chen J. Injectable, self-healing and pH responsive stem cell factor loaded collagen hydrogel as a dynamic bioadhesive dressing for diabetic wound repair. *J Mater Chem B*. 2021;9(29):5887–5897. PMID: 34259303 <https://doi.org/10.1039/d1tb01163d>
8. Kane RJ, Weiss-Bilka HE, Meagher MJ, Liu Y, Gargac JA, Niebur GL, et al. Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties. *Acta Biomater*. 2015;17:16–25. PMID: 25644451 <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.01.031>
9. Jain G, Blaauw D, Chang SJ. A comparative study of two bone graft Substitutes-InterOss® collagen and OCS-B collagen®. *J Funct Biomater*. 2022;13(1):28. PMID: 35323228 <https://doi.org/10.3390/jfb13010028>
10. Fan Q, Zeng H, Fan W, Wu T, Sun J, Yan Q, et al. Ridge preservation of a novel extraction socket applying Bio-Oss® collagen: an experimental study in dogs. *J Dent Sci*. 2021;16(3):831–839. PMID: 34141096 <https://doi.org/10.1016/j.jds.2021.03.005>
11. Ваза А.Ю., Файн А.М., Боровкова Н.В., Галанкина И.Е., Макаров М.С., Забавская О.А. и др. Первый опыт использования разработанных модифицированных аллогенных костных трансплантатов при хирургическом лечении пациентов с тяжелыми переломами хирургической шейки плечевой кости. *Журнал им. Н.В. Склифосовского «Неотложная медицинская помощь»*. 2021;10(1):83–90. <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2021-10-1-83-90>
12. Ваза А.Ю., Файн А.М., Иванов П.А., Клюквин И.Ю., Сластинин В.В., Боровкова Н.В. и др. Анализ применения различных вариантов костной пластики у пострадавших с внутрисуставными переломами. *Трансплантология*. 2015;(4):6–12.
13. Ермолов А.С., Смирнов С.В., Хватов В.Б., Истранов Л.П., Конюшко О.И., Колокольчикова Е.Г. и др. Применение биологически активных раневых покрытий, стимулирующих регенерацию эпителия ожоговых ран IIIa степени. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2008;(3):166–170.
14. Хватов В.Б., Свищев А.В., Ваза А.Ю., Боровкова Н.В., Миронов А.С., Похитонов Д.Ю. и др. Способ изготовления лиофилизованного аллотрансплантата кости. *Трансплантология*. 2016;(1):13–18.
15. Макаров М.С., Сторожева М.В., Боровкова Н.В., Пономарев И.Н. Рост-стимулирующий эффект тромбоцитарных препаратов, полученных разными способами, в культуре фибробластов человека. *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2022;(3):183–188. <https://doi.org/10.47056/1814-3490-2022-3-183-188>

## References

1. Kirilova IA, Baitov VS, Podorozhnaya VT, Pochueva NYu. Morphological presentation of osteogenesis in experimental application of KOSTMA osteoplastic material. *Hir Pozvonoc*. 2007;(4):58–61. (In Russ.).
2. Kirilova IA, Podorozhnaya VT, Ardashev IP, Chernitsov SV. Different kinds of osteoplastic materials for bone structure restoration. *Polytrauma*. 2008;(4):60–64. (In Russ.).
3. Walsh W, Oliver RA, Christou C, Lovric V, Walsh ER, Prado GR, Haider T. Critical size bone defect healing using collagen–calcium phosphate bone graft materials. *PLoS ONE*. 2017;12(1):e0168883. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168883>
4. Yoshida K, Sumita Y, Marukawa E, Harashima M, Asahina I. Effect of platelet-rich plasma on bone engineering with an alloplastic substitute containing BMP2. *Biomed Mater Eng*. 2013;23(3):163–172. <https://doi.org/10.3233/BME-130741>
5. Tanaka H, Toyoshima T, Atsuta I, Ayukawa Y, Sasaki M, Matsushita Y, et al. Additional effects of platelet-rich fibrin on bone regeneration in sinus augmentation with deproteinized bovine bone mineral: preliminary results. *Implant Dent*. 2015;24(6):669–674. <https://doi.org/10.1097/ID.0000000000000306>
6. Civinini R, Macera A, Nistri L, Redl B, Innocenti M. The use of autologous blood-derived growth factors in bone regeneration. *Clin Cases Miner Bone Metab*. 2011;8(1):25–31.
7. Zhang L, Zhou Y, Su D, Wu S, Zhou J, Chen J. Injectable, self-healing and pH responsive stem cell factor loaded collagen hydrogel as a dynamic bioadhesive dressing for diabetic wound repair. *J Mater Chem B*. 2021;9(29):5887–5897. <https://doi.org/10.1039/d1tb01163d>
8. Kane RJ, Weiss-Bilka HE, Meagher MJ, Liu Y, Gargac JA, Niebur G, et al. Hydroxyapatite reinforced collagen scaffolds with improved architecture and mechanical properties. *Acta Biomater*. 2015;17:16–25. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.01.031>
9. Jain G, Blaauw D, Chang SJ. A comparative study of two bone graft Substitutes-InterOss® collagen and OCS-B collagen®. *Funct Biomater*. 2022;13(1):28. <https://doi.org/10.3390/jfb13010028>
10. Fan Q, Zeng H, Fan W, Wu T, Sun J, Yan Q, et al. Ridge preservation of a novel extraction socket applying Bio-Oss® collagen: an experimental study in dogs. *J Dent Sci*. 2021;16(3):831–839. <https://doi.org/10.1016/j.jds.2021.03.005>
11. Vaza AYU, Fain AM, Borovkova NV, Galankina IE, Makarov MS, Zabavskaya OA, et al. The first experience of using the developed modified allogenic bone grafts in the surgical treatment of patients with severe fractures of the surgical neck of the humerus. *Russian Sklifosovsky Journal "Emergency Medical Care"*. 2021;10(1):83–90. (In Russ.). <https://doi.org/10.23934/2223-9022-2021-10-1-83-90>
12. Vaza AYU, Fain AM, Ivanov PA, Klyukvin IYu, Slastinin VV, Borovkova NV, et al. Analysis of the application of different bone grafting procedures in patients with intra-articular fractures. *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2015;(4):6–12. (In Russ.).
13. Ermolov AS, Smirnov SV, Khvatov VB, Istranov LP, Koniusheko OI, Kolokolchikova EG, et al. The use of bioactive wound dressing, stimulating epithelial regeneration of IIIa-degree burn wounds. *Bull Exp Biol Med*. 2008;146(1):153–157. (In Russ.). <https://doi.org/10.1007/s10517-008-0225-0>
14. Khvatov VB, Svishchev AV, Vaza AYU, Borovkova NV, Mironov AS, Pokhitonov DYU, et al. Method of manufacturing a lyophilized allograft bone. *Transplantologiya. The Russian Journal of Transplantation*. 2016;(1):13–18. (In Russ.).
15. Makarov MS, Storozheva MV, Borovkova NV, Ponomarev IN. Growth-stimulating effect of platelet preparations obtained by different methods on human fibroblast culture. *Bull Exp Biol Med*. 2022;174(1):159–163. (In Russ.). <https://doi.org/10.1007/s10517-022-05666-1>

## Информация об авторах

**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  
 25% – разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи

**Максим Сергеевич  
Макаров**

канд. 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  
 25% – разработка дизайна исследования, получение данных для анализа, анализ полученных данных, написание текста рукописи, подготовка обзора публикаций по теме статьи

**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  
 15% – получение данных для анализа, анализ полученных данных

**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 ФГАОУ ВО РНИМУ им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, <https://orcid.org/0000-0002-8897-7523>, BorovkovaNV@sklif.mos.ru  
 25% – разработка дизайна исследования, анализ полученных данных, написание текста рукописи

**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  
 10% – получение данных для анализа, анализ полученных данных

## Information about the authors

<b>Andrey A. Ofitserov</b>	Researcher of the Scientific Department of Biotechnologies and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, <a href="https://orcid.org/0000-0003-2170-0009">https://orcid.org/0000-0003-2170-0009</a> , OfitserovAA@sklif.mos.ru 25%, study design development, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript
<b>Maksim S. Makarov</b>	Cand. Sci. (Biol.), Senior Researcher of the Scientific Department of Biotechnologies and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, <a href="https://orcid.org/0000-0002-2184-2982">https://orcid.org/0000-0002-2184-2982</a> , MakarovMS@sklif.mos.ru 25%, 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
<b>Mayya V. Storozheva</b>	Researcher of the Scientific Department of Biotechnologies and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, <a href="https://orcid.org/0000-0003-1927-2404">https://orcid.org/0000-0003-1927-2404</a> , StorozhevaMV@sklif.mos.ru 15%, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data
<b>Natalya V. Borovkova</b>	Dr. Sci. (Med.), Head of the Scientific Department of Biotechnologies and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine; Associate Professor of the Department of Transplantology and Artificial Organs, N.I. Pirogov Russian National Research Medical University, <a href="https://orcid.org/0000-0002-8897-7523">https://orcid.org/0000-0002-8897-7523</a> , BorovkovaNV@sklif.mos.ru 25%, study design development, analysis of the obtained data, writing the text of the manuscript
<b>Ivan N. Ponomarev</b>	Cand. Sci. (Med.), Senior Researcher of the Scientific Department of Biotechnologies and Transfusiology, N.V. Sklifosovsky Research Institute for Emergency Medicine, <a href="https://orcid.org/0000-0002-2523-6939">https://orcid.org/0000-0002-2523-6939</a> , PonomarevIN@sklif.mos.ru 10%, obtaining data for analysis, analysis of the obtained data

Статья поступила в редакцию 09.02.2023;  
одобрена после рецензирования 15.02.2023;  
принята к публикации 29.03.2023

The article was received on February 9, 2023;  
approved after reviewing February 15, 2023;  
accepted for publication March 29, 2023