

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-2-8-21>

ПРИМЕНЕНИЕ КСЕНОГЕННОГО НАТИВНОГО НЕРЕКОНСТРУИРОВАННОГО КОСТНОГО КОЛЛАГЕНА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ НА МОДЕЛИ КРИТИЧЕСКОГО ДЕФЕКТА КОСТЕЙ СВОДА ЧЕРЕПА КРЫС

ВЕРЕМЕЕВ А.В.^{1,2*}, БОЛГАРИН Р.Н.¹, НЕСТЕРЕНКО В.Г.², АНДРЕЕВ-АНДРИЕВСКИЙ А.А.³

¹Общество с ограниченной ответственностью «Матрифлекс», г. Москва, Россия

²ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Россия

³Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, г. Москва, Россия

Резюме

Цель исследования. Оценить эффективность замещения костных дефектов при использовании ксеногенного нативного нереконструированного костного коллагена (медицинское изделие Bongraf COLLAGEN) в сравнении с другими широко применяемыми решениями (ксеногенный нативный костный минерал Geistlich Bio-Oss® и костный аутоотрансплантат).

Материалы и методы. В работе была использована классическая модель создания критического (8 мм) дефекта костей свода черепа крыс (48 самцов породы Wistar или Sprague-Dawley). Созданный во время оперативного вмешательства дефект замещали медицинским изделием Bongraf COLLAGEN, препаратом сравнения Geistlich Bio-Oss®, костным аутоотрансплантатом (удаленным участком костей свода черепа) либо оставляли незаполненным (отрицательный контроль, n = 6 на каждую группу). Через 4 или 12 недель от создания дефекта производили вывод животных из эксперимента (n = 3 на временную точку) и исследовали замещение дефекта костной тканью при помощи микрокомпьютерной томографии (объем новообразованной костной ткани, минеральная плотность новообразованной ткани, толщина новообразованных костных элементов и распределение их диаметра) и окрашивания гематоксилином и эозином (доля минерализованной ткани от просвета дефекта).

Результаты. Наилучшие показатели замещения костной ткани в области дефекта (объем и минерализация костной ткани, а также толщина костных элементов) ожидаемо наблюдались при заме-

щении дефекта костным аутоотрансплантатом. У крыс, костный дефект которых замещали изделием Bongraf COLLAGEN или препаратом сравнения Geistlich Bio-Oss®, наблюдались сопоставимые показатели замещения костной ткани, промежуточные между использованием костного аутоотрансплантата и отсутствием заполнения дефекта. При этом была отмечена выраженная тенденция к регенерации костной ткани с течением времени при замещении дефекта изделием Bongraf COLLAGEN.

Заключение. Ксеногенный нативный нереконструированный костный коллаген (Bongraf COLLAGEN) сравним по эффективности при замещении костных дефектов с ксеногенным нативным костным минералом (Geistlich Bio-Oss®).

Ключевые слова: ксеногенные имплантаты, костный коллаген, Bongraf COLLAGEN, Geistlich Bio-Oss, замещение костных дефектов, критический дефект костей свода черепа крыс.

Выражение благодарности

Авторы благодарят коллектив ООО «НИИ митоиженерии МГУ» за содействие в разработке животной модели и получении экспериментальных данных.

Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источник финансирования

Финансирование работы осуществлялось за счет средств гранта ООО «Матрифлекс» от Фонда «Сколково» в рамках проекта «Создание линейки медицинских изделий для регенерации костной ткани на основе нереконструированного коллагена».

Для цитирования:

Веремеев А.В., Болгарин Р.Н., Нестеренко В.Г., Андреев-Андриевский А.А. Применение ксеногенного нативного нереконструированного костного коллагена для замещения костных дефектов на модели критического дефекта костей свода черепа крыс. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(2): 8-21. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-2-8-21>

*Корреспонденцию адресовать:

Веремеев Алексей Владимирович, 125252, Россия, г. Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, д. 12, корп. А, п. 1, эт. 2, оф. 1.e-mail: al.veremeev@gmail.com
© Веремеев А.В. и др.

ORIGINAL RESEARCH

APPLICATION OF XENOGENEIC NATIVE BONE COLLAGEN FOR BONE REPAIR IN CRITICAL-SIZED RAT CALVARIAL DEFECT MODEL

ALEXEY V. VEREMEEV^{1,2**}, ROMAN N. BOLGARIN¹, VLADIMIR G. NESTERENKO², ALEXANDER A. ANDREEV-ANDRIEVSKIY³¹Matriflex LLC, Moscow, Russian Federation²Gamaleya National Research Centre of Epidemiology and Microbiology, Moscow, Russian Federation³Moscow State University, Moscow, Russian Federation

Abstract

Aim. To evaluate the efficacy of bone repair using xenogeneic native bone collagen (Bongraf COLLAGEN) as compared to other widely applied orthopaedic solutions (xenogeneic native bone mineral Geistlich Bio-Oss[®] and bone autograft).

Materials and Methods. We employed a conventional critical-sized (8 mm) rat calvarial defect model (48 Wistar or Sprague-Dawley rats). The artificial defect was repaired using Bongraf COLLAGEN, Geistlich Bio-Oss[®] utilised as a comparator, bone calvarial autograft, or remained unfilled (n = 6 per group). Rats were euthanised 4 or 12 weeks postimplantation (n = 3 per time point) with the subsequent examination (repair extent, volume, thickness and mineral density of the repaired tissue) by means of microcomputed tomography and hematoxylin and eosin staining.

Results. Expectedly, highest volume, thickness and mineral density of the repaired tissue have been observed in defects filled with autografts.

Bongraf COLLAGEN and Geistlich Bio-Oss[®] also demonstrated a comparable and significant repair capability, yet the former option demonstrated higher bone regeneration rate.

Conclusion. Xenogeneic native bone collagen (Bongraf COLLAGEN) is comparable with xenogeneic native bone mineral (Geistlich Bio-Oss[®]).

Keywords: xenogeneic implants, bone collagen, Bongraf COLLAGEN, Geistlich Bio-Oss, bone repair, critical-sized rat calvarial defect.

Acknowledgements

The authors sincerely thank the staff of Mitoengineering Research Institute LLC at Moscow State University for the support in the development of an animal model and data collection.

Conflict of Interest

None declared.

Funding

The study was funded by the grant of Skolkovo Foundation allocated to Matriflex LLC for the project «Development of native collagen-based solutions for bone regeneration».

[◀ English](#)

For citation:

Alexey V. Veremeev, Roman N. Bolgarin, Vladimir G. Nesterenko, Alexander A. Andreev-Andrievskiy. Application of xenogeneic native bone collagen for bone repair in critical-sized rat calvarial defect model. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020; 5(2): 8-21. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-2-8-21>

**Corresponding author:

Dr. Alexey V. Veremeev, Aviakonstruktora Mikoyana Street, 12, A, 2nd Floor, Office 1, Moscow, Russian Federation, 125252. E-mail: al.veremeev@gmail.com
© Alexey V. Veremeev et al.

Введение

Несмотря на совершенствование классических методов диагностики и лечения, разработку и внедрение в клиническую практику новых медицинских технологий и повышение доступности высокотехнологичной медицинской помощи в травматологии и ортопедии, повышение эффективности и сокращение сроков реабилитации после хирургических вмешательств на опорно-двигательном аппарате по-прежнему

являются одними из наиболее важных медицинских и социально-экономических задач [1]. Особую актуальность данная проблема имеет вследствие высокой распространенности травм и иных патологий опорно-двигательного аппарата у лиц трудоспособного возраста [2-5]. Кроме того, в определенных случаях риск инвалидизации у таких пациентов остается достаточно высоким даже при своевременной диагностике и верно выбранной тактике лечения [2-5].

Поэтому в последние годы активно изучается возможность использования и ускорения естественных регенеративных процессов в качестве альтернативы полному механическому замещению костных дефектов при помощи керамических и металлических имплантатов [6-8].

Согласно результатам доклинических и клинических испытаний, использование костных трансплантатов признано «золотым стандартом» при лечении тяжелых переломов, устранении обширных дефектов костной ткани после травм и оперативных вмешательств, а также при замещении утраченных костей [9-11]. Оптимальным подходом является использование ауто трансплантатов [9], однако такой подход характеризуется рядом серьезных осложнений, связанных с его высокой травматичностью (массивная кровопотеря, ранняя послеоперационная боль, хроническая боль в месте забора трансплантата, развитие хронической инфекции), а также с ограниченностью источников забора аутологичного костного материала [10, 11]. Возможной альтернативой костным ауто трансплантатам могли бы являться аллотрансплантаты, однако они имеют значительно меньший остеокондуктивный и остеоиндуктивный потенциал [10, 11]. Кроме того, их использование связано с высоким риском инфицирования и иммунного отторжения организмом реципиента вследствие развития реакции «хозяин против трансплантата» [10, 11].

Таким образом, в связи с недостаточным количеством ауто трансплантатов и недостаточной эффективностью аллотрансплантатов, современные подходы направлены на разработку различных костных заменителей, опционально включающих костные или эндотелиальные клетки-предшественники или факторы роста в целях стимуляции пролиферации и дифференцировки клеток и активации регенеративных процессов в костной ткани [12-15]. В настоящее время тканевая инженерия и регенеративная медицина рассматриваются как перспективные области знания, обеспечивающие разработку новых методов лечения и медицинских изделий для лечения врожденных и приобретенных костных дефектов [12-15]. Подобные инновационные продукты могут успешно применяться в клинической практике у пациентов с врожденными патологиями опорно-двигательного аппарата, а также при доброкачественных новообразованиях костной ткани и травмах костей [16].

Костный коллаген I типа представляет собой нативный биоматериал, вместе с гидроксипапатитом ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) в первую очередь ответственный за биофизические и механические свойства костной ткани [17, 18]. Процесс выделения костного коллагена I типа из ксеногенной костной ткани обладает высокой технологичностью [19, 20]; кроме того, за счет своей волокнисто-пористой структуры выделяемый костный коллаген I типа высокопроницаем для лекарственных средств, после имплантации успешно заселяется клетками и обладает удовлетворительными механическими свойствами и высокой биосовместимостью, что делает его подходящей системой доставки лекарственных средств для таргетной терапии [21]. Помимо этого, костный коллаген I типа также используется в составе композитных материалов и применяется в качестве вспомогательного материала для увеличения остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств каркасов (матриков, скаффолдов) для замещения костных дефектов [22, 23].

Поскольку в процессе эволюции структура молекулы коллагена изменилась крайне незначительно, биофизические (в том числе механические) свойства данного белка практически не зависят от биологического вида, из которого он выделен [24]. Поэтому, вследствие целесообразности использования в травматологии и ортопедии аутологичного коллагена, а также этических и экономических сложностей в отношении применения аллогенного коллагена, на первый план выходит ксеногенный коллаген, доступный для выделения из мелких и крупных животных в промышленных масштабах [25].

Важным достоинством ксеногенного нативного нереконструированного костного коллагена является то, что при выделении физико-химическими методами глубокой очистки и децеллюляризации он сохраняет свою нативную волокнисто-пористую структуру и практически не теряет своих исходных биофизических (в том числе механических) свойств, приобретая при этом высокую чистоту, что повышает его безопасность для рабочего персонала и пациентов, а также позволяет проводить импрегнацию различных биологически активных компонентов [26, 27]. За счет того, что выделяемый при помощи такого подхода ксеногенный костный коллаген сохраняет свои изначальные структуру и свойства, он способен обеспечивать пол-

ный спектр osteoconductive и osteoinductive сигналов, характерных для нативной костной структуры и необходимых для развития костной ткани [27].

В промышленном производстве для выделения костного коллагена в медицинских целях стандартно используется как бычий, так и свиной костный материал. Несмотря на отсутствие видоспецифичности биофизических свойств коллагена, использование бычьего коллагена сопряжено с риском губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота, чрезвычайно опасного и летального заболевания, вызываемого прионами [25]. В связи с этим более безопасным представляется использование свиного коллагена, который к тому же обладает еще более низкой иммуногенностью, чем бычий [28]. В то же время религиозные убеждения в некоторых географических регионах ограничивают применение каких-либо продуктов, получаемых из крупного рогатого скота или свиней. Кроме того, в Российской Федерации и во многих других странах до сих пор не было зарегистрировано ни одного случая губчатой энцефалопатии крупного рогатого скота. По этим причинам как бычий, так и свиной коллаген остаются актуальными для регенеративной медицины и по сегодняшний день.

На основании оригинальной технологии выделения и обогащения бычьего костного коллагена было разработано отечественное медицинское изделие Bongraf COLLAGEN, представляющее собой ксеногенный нативный нереконструированный костный коллаген для замещения костных дефектов, потенциально пригодный к использованию в травматологии, ортопедии и стоматологии. Целью данного исследования было оценить эффективность замещения костных дефектов при использовании изделия Bongraf COLLAGEN в сравнении с костным аутотрансплантатом и широко применяемым в хирургической практике ксеногенным нативным костным минералом (Geistlich Bio-Oss®, Geistlich Pharma).

Материалы и методы

Объекты исследования

Медицинское изделие Bongraf COLLAGEN представляет собой ксеногенный бесклеточный костный коллаген высокой степени очистки в виде мембраны с нативной нереконструированной волокнисто-пористой структурой, получаемый из бычьих бедренных костей по

оригинальной технологии OnIonTech™ путем многоступенчатой очистки костной ткани (последовательных стадий механической очистки, дезинфекции, удаления контаминирующих белков, делипидизации, выделения и обогащения коллагена, ферментации) и стерилизуемый посредством сверхкритической флюидной экстракции [29]. В качестве объекта сравнения (препарата-компаратора) было использовано медицинское изделие Geistlich Bio-Oss® (Geistlich Pharma), представляющее собой нативный костный гранулированный (диаметр гранул от 0,25 до 1 мм) минерал, получаемый из крупного рогатого скота путем многоступенчатой очистки костной ткани и стерилизуемый γ -излучением.

Лабораторные животные

Все эксперименты на лабораторных животных были проведены на базе виварно-экспериментального комплекса ООО «НИИ митоинженерии МГУ». В исследование было включено 48 самцов крыс линии Wistar или Sprague-Dawley со зрелым костным скелетом (возрастом от 4,5 до 6 месяцев) на момент начала эксперимента, полученных из научно-производственного подразделения филиала Института биоорганической химии Российской академии наук – питомника лабораторных животных «Пушино». Животные были клинически здоровы, но, по данным микробиологического мониторинга, являлись носителями *Helicobacter spp.* и *Gardia muris*. Другие патогены из списка FELASA 2014 у животных выявлены не были. Длительность адаптации после получения из питомника составляла не менее 7 суток.

В первом (пилотном) эксперименте крысы были размещены в индивидуально-вентилируемых клетках в блоке передержки животных, во втором (основном) эксперименте – в клетках открытого типа в барьерной зоне виварно-экспериментального комплекса. До операции крыс содержали в клетках T3 (Tecniplast) с площадью пола 780 см² по две особи или в клетках T4 (Tecniplast) с площадью пола 1500 см² по четыре особи. После моделирования костного дефекта крыс содержали изолированно в клетках T3. На протяжении всего исследования животные имели неограниченный доступ к корму («Чара для содержания», Ассортимент-Агро) и стерильной обратноосмотической воде. В качестве подстилки использовали деревянную щепу Lignocel (JRS). Все материалы, поступающие к животным, стерилизовали автоклавированием.

Таблица 1.
Схема основного эксперимента

Table 1.
Experimental protocol

Экспериментальная группа (n = 6) <i>Experimental group</i> (n = 6)	Исследуемый биоматериал <i>Sample biomaterial</i>	Принцип сбора образцов <i>Sample collection</i>	Методы оценки репаративного процесса <i>Methods of examination</i>
Отрицательный контроль <i>Negative control</i>	Отсутствует <i>None</i>	4 и 12 недель после создания дефекта (по 3 особи на временную точку) <i>4 and 12 weeks after the defect (3 rats per time point)</i>	Microcomputed tomography, histological examination (<i>hematoxylin and eosin staining, light microscopy</i>)
Положительный контроль <i>Positive control</i>	Удаленные кости свода черепа (аутографт) <i>Excised calvarial bones (autograft)</i>		
Препарат-компаратор <i>Comparator</i>	<i>Geistlich Bio-Oss®</i>		
Тестируемый препарат <i>Tested solution</i>	<i>Bongraf COLLAGEN</i>		

Температура в комнате содержания животных составляла 20-26°C, относительная влажность – 30-70%, световой день – 12 часов (включение света в 09:00).

Все животные были индивидуально маркированы перфорациями ушных раковин; кроме того, клетки маркировались карточками, содержащими информацию о заселяющих клетку особях и проводимых с ними манипуляциях. В пилотном эксперименте крыс взвешивали ежедневно в течение семи дней после операции. В основном эксперименте после оперативного вмешательства крыс также взвешивали ежедневно в течение первых шести дней. Далее крыс взвешивали еженедельно, начиная со дня начала эксперимента (маркировки животных). Массу тела определяли с точностью ± 1 г при помощи технических весов Pioneer PA2102 (Ohaus). Распределение крыс по экспериментальным группам проводили путем рандомизации с использованием стандартного алгоритма GraphPad (GraphPad Prism).

Экспериментальная модель

В работе была использована экспериментальная модель дефекта костей свода черепа, состоящая в хирургическом удалении участка теменных костей диаметром 8 мм [30]. Дефект такой величины является «критическим», и у взрослых крыс при спонтанном заживлении костная ткань не заполняет его полностью [30]. В пилотном эксперименте на десяти крысах была отработана методика выполнения хирургической операции по созданию критического дефекта костей свода черепа. У части животных дефект оставляли незаполненным, другим крысам дефект заполняли аутографтом костной ткани (удаленным участком свода черепа). За состоянием животных наблюдали в течение 7 дней после операции, обращая внимание на це-

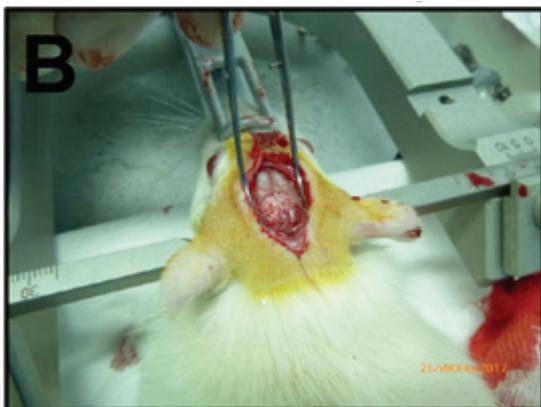
лостность швов и видимые признаки послеоперационных осложнений, после чего подвергали эвтаназии и исследовали место создания дефекта макроскопически. В основном эксперименте (по шесть крыс на группу) была проведена оценка репаративных свойств медицинского изделия Bongraf COLLAGEN в сравнении с препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® и двумя контрольными группами – с незаполненным костным дефектом и с дефектом, заполненным удаленным участком свода черепа по аналогии с пилотным экспериментом (таблица 1).

Животных наркотизировали сочетанным внутривенным введением 15-20 мг/кг тилетамина, 15-20 мг/кг золазепам и 3-6 мг/кг ксилазина. Для подготовки операционного поля над сводом черепа сбрасывали шерсть и обрабатывали кожу антисептиками на основе этанола и повидон-йода. Далее для доступа к костям свода черепа разрезали кожу по средней линии головы, после чего разрезали соединительную ткань черепа и надкостницу и отслаивали их от черепа при помощи шпателя (рисунок 1А). Затем при помощи трепана диаметром 8 мм и стоматологического привода при низкой скорости вращения (около 1000 оборотов в минуту) и постоянном смачивании физиологическим раствором (0,9% NaCl) делали насечку на теменных костях черепа практически на полную толщину кости (до прозрачности). При помощи элеватора выпиленный фрагмент кости удаляли, формируя тем самым дефект (рисунок 1Б). При удалении костного фрагмента сохраняли целостность твердой мозговой оболочки и сосудов. Сформированный дефект обильно промывали физиологическим раствором и удаляли мелкие фрагменты костной ткани по краям, придавая дефекту круглую форму. Дефект оставляли незаполненным (отрицатель-

Создание костного дефекта



Замещение костного дефекта



Созданный костный дефект



Ушивание соединительной ткани



Рисунок 1.

Ход операции по созданию критического костного дефекта костей свода черепа крыс. А) создание костного дефекта при помощи трепана диаметром 8 мм, стоматологического привода и элеватора; Б) созданный незаполненный костный дефект; В) замещение костного дефекта (в примере костный аутооттрансплантат); Г) ушивание соединительной ткани после замещения костного дефекта.

Figure 1.

Creation of critical-sized rat calvarial bone defect. A. Creation of bone defect using a 8 mm trephine, dental motor and elevator. B. Created unfilled bone defect. C. Repair of the defect using a bone autograft. D. Suturing of the connective tissue after the defect repair.

ный контроль), заполняли удаленными костями свода черепа (реимплантация, положительный контроль), препаратом-компаратором (Geistlich Bio-Oss®) или тестируемым препаратом (Bongraf COLLAGEN) (рисунок 1B). Надкостницу сшивали рассасывающейся нитью Monocryl (Ethicon) (рисунок 1Г).

Кожу сшивали рассасывающейся нитью Т-сорб (Политехмед). После операции крысам вводили 10 мл/кг физиологического раствора подкожно каждые 1-1,5 часа и согревали при помощи электрогрелки до пробуждения. В первые двое суток после операции животным внутрибрюшинно вводили 10 мг/кг нефопама и 50 мг/кг ко-тримоксазола 2 раза в день.

Через один либо три месяца от создания дефекта по три особи из каждой группы подвергали эвтаназии путем ингаляции CO₂ в заправочной камере, при помощи стоматологического бора извлекали кости свода черепа, включающие область дефекта и окружающую неповрежденную ткань, и фиксировали их в забуференном фосфатом 4% растворе формалина (pH 7,2-7,6) в течение 48 часов. Хранение эксплантированных образцов костной ткани осуществляли в 1% водном растворе формалина при 2-8°C.

Микротомографический и гистологический анализ эксплантированной костной ткани

С целью определения трехмерной структуры и минеральной плотности кости фиксированные образцы исследовали методом микрокомпьютерной томографии (SkyScan 1172, Bruker) при разрешении ≈ 8 мкм в вокселе. Томографирование исследуемых образцов проводили одновременно с калибровочными образцами диаметром 8 мм и минеральной плотностью гидроксиапатита 0,25 и 0,75 г/см³. При проведении исследования образцы поддерживали в увлажненном состоянии. Анализ микрокомпьютерных томограмм проводили при помощи программного обеспечения CatAn (Bruker), рассчитывая минеральную плотность новообразованной костной ткани, а также количественные характеристики ее трехмерной структуры (объем новообразованной костной ткани, толщину новообразованных костных элементов и распределение их диаметра). После исследования образцы возвращали в 1% водный раствор формалина и хранили при 2-8°C до проведения гистологического исследования для оценки структуры костной ткани и прилежащих мягких тканей.

Для подготовки к гистологическому исследованию образцы выдерживали в декальцинирующем электролитном растворе (ЭргоПродакшн) при комнатной температуре в течение четырех суток до размягчения, достаточного для микротомной резки. Затем образец подвергали дегидратации в семи сменах 99,7% изопропанола (БиоВитрум) по 5 часов в каждой, пропитывали парафиновой средой Histomix (БиоВитрум) в двух порциях по 2 часа в каждой и заливали в парафин. После застывания парафиновые блоки подготавливали для резки на микротоме, для чего блок размечали так, чтобы можно было взять параллельные ступенчатые срезы из следующих областей: два – по касательным линиям, проведенным через точки на противоположных краях дефекта, один – через центр, пересекая дефект по его диаметру, и еще два – посередине между центральным и описанными краевыми срезами. Все срезы монтировали на предметные стекла и после депарафинизации и регидратации окрашивали гематоксилином и эозином (БиоВитрум) по стандартному протоколу и исследовали с помощью микроскопа Axio Scope.A1 (Carl Zeiss). Фото съемку срезов осуществляли при помощи камеры AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss) с программным обеспечением AxioVision 3.0 (Carl Zeiss).

Рисунок 2.

Общее состояние лабораторных крыс после оперативного вмешательства по замещению критического дефекта костей свода черепа в пилотном эксперименте (А) и основном эксперименте в краткосрочном (Б) и долгосрочном периодах наблюдения (В).

Figure 2.

General examination of laboratory animals after the repair of critical-sized rat calvarial bone defect in pilot (A) and main experiment in short- (B) and long-term (C).

Статистический анализ

Статистический анализ экспериментальных данных проводили в программе GraphPad Prism 6 (GraphPad Software). Данные представляли в виде среднего и стандартного отклонения от среднего. Анализ временных рядов осуществляли посредством двухфакторного дисперсионного анализа (факторы «группа» и «время»). Межгрупповые различия оценивали методом однофакторного дисперсионного анализа, попарные сравнения групп проводили с использованием критерия Тьюки. Различия считали ста-

стистически значимыми при вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу $p < 0,05$.

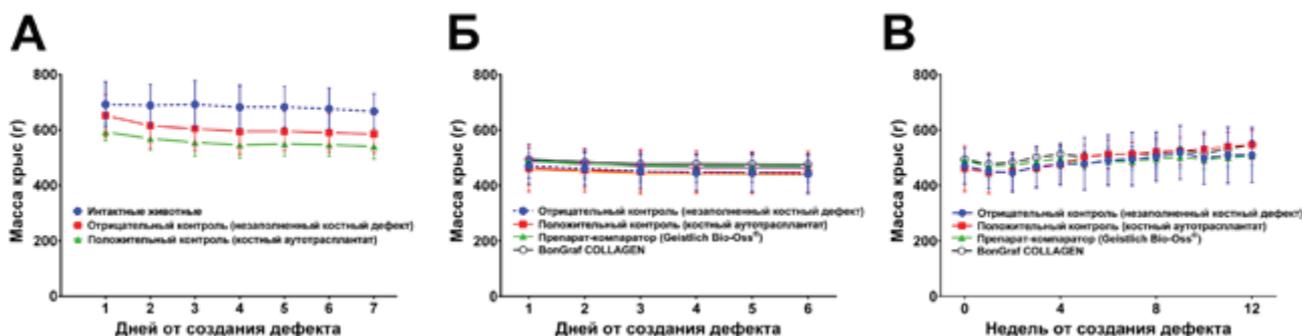
Результаты

Результаты тестирования экспериментальной модели (пилотный эксперимент) и общее состояние животных в основном эксперименте

О состоянии животных после операции судили по объективным (масса тела) и субъективным данным (внешний осмотр). В пилотном эксперименте масса тела крыс после оперативного вмешательства снижалась в течение первых двух суток, после чего оставалась стабильной на протяжении недельного наблюдения (**рисунок 2А**). Наряду с операционной травмой снижение массы тела крыс было обусловлено использованием в послеоперационный период антибиотиков. По данным внешнего осмотра, состояние животных восстанавливалось на четвертые-пятые сутки после операции.

При макроскопическом осмотре послеоперационного поля через 7 дней после создания дефекта было обнаружено, что разрез кожи в значительной степени или полностью заживлен; видимых признаков воспаления выявлено не было. У животных из группы положительного контроля реимплантированные аутотрансплантаты костей свода черепа устойчиво находились в дефекте без смещения за счет новообразованной соединительной ткани.

В основном эксперименте было отмечено отсутствие выраженной динамики массы тела животных в течение первой недели после оперативного вмешательства вне зависимости от экспериментальной группы (**рисунок 2Б**). В то же время в течение всего времени эксперимента (12 недель) масса тела животных постепенно увеличивалась, также независимо от экспериментальной группы (**рисунок 2В**).



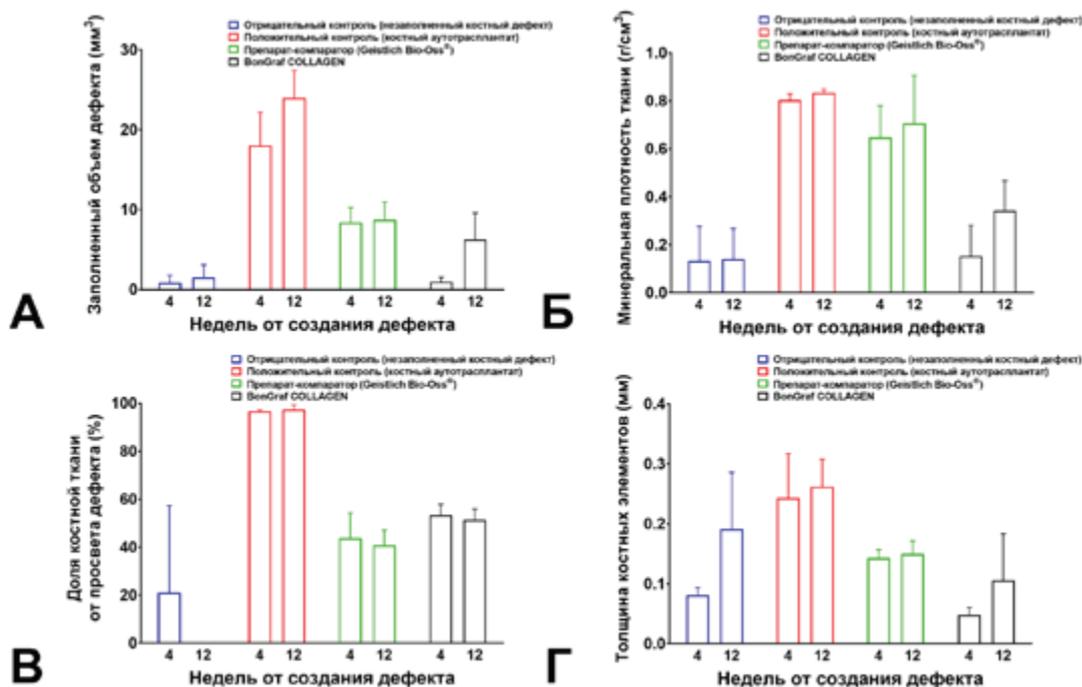


Рисунок 3.

Сравнение показателей новообразованной костной ткани при отсутствии заполнения созданного дефекта (отрицательный контроль), а также при замещении критического дефекта костей свода черепа крыс удаленными участками теменных костей (положительный контроль), классически применяемым в хирургической практике для замещения костных дефектов препаратом Geistlich Bio-Oss® (ксеногенным костным гранулированным минералом, получаемым из крупного рогатого скота путем многоступенчатой очистки костной ткани и стерилизуемым γ -излучением) или медицинским изделием Bongraf COLLAGEN (ксеногенным бесклеточным костным коллагеном высокой степени очистки в виде мембраны, получаемым из бычьих бедренных костей по оригинальной технологии OnlonTecthm и стерилизуемым посредством сверхкритической флюидной экстракции).

Figure 3.

Comparison of bone repair in unfilled critical-sized rat calvarial bone defects (negative control) or defects filled with calvarial bone autograft, Geistlich Bio-Oss® (xenogeneic refined and γ -sterilised bone mineral) or Bongraf COLLAGEN (bovine purified acellular bone collagen membranes sterilised by supercritical fluid extraction).

А) оценка заполненного новообразованной костной тканью объема дефекта методом микрокомпьютерной томографии; Б) оценка минеральной плотности новообразованной ткани методом микрокомпьютерной томографии; В) оценка доли костной (минерализованной) ткани от просвета созданного дефекта при окрашивании гематоксилином и эозином; Г) оценка толщины новообразованных костных элементов методом микрокомпьютерной томографии.

A. Microcomputed tomography volumetric analysis. B. Microcomputed tomography-based densitometry. C. Hematoxylin and eosin evaluation of repair efficiency. D. Microcomputed tomography analysis of bone element thickness.

Влияние медицинского изделия Bongraf COLLAGEN на репарацию искусственно созданного костного дефекта

Центральную роль в оценке репаративного процесса при искусственном создании критического дефекта свода костей черепа занимает анализ объема новообразованной костной ткани в просвете дефекта, оцениваемого методом микрокомпьютерной томографии. Как и ожидалось, у крыс группы отрицательного контроля (спонтанная репарация костной ткани) костная ткань в просвете дефекта практически отсутствовала, а наибольший объем костной ткани в просвете дефекта был у крыс группы положительного контроля, которым реимплантировали удаленные кости свода черепа (рисунок 3А). У крыс, костный дефект которых замещали препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® (очищенной и измельченной гетерологичной костной тканью в виде гранул) или тестируемым медицинским изделием Bongraf COLLAGEN (очищенным гетерологичным костным коллагеном в виде мембраны), объем

костной ткани в просвете дефекта через 12 недель после операции был значительно выше, чем у животных группы отрицательного контроля (рисунок 3А). При заполнении костного дефекта изделием Bongraf COLLAGEN стоит отметить выраженную динамику к увеличению заполненного объема к 12-й неделе в сравнении с 4-й неделей после оперативного вмешательства (рисунок 3А). Репрезентативные микрокомпьютерные томограммы приведены на рисунке 4.

Об общей минерализации новообразованных тканей в месте создания дефекта судили по минеральной плотности тканей, также измеренной при помощи микрокомпьютерной томографии. Дефект крыс группы отрицательного контроля практически не содержал минерализованной ткани ни через 4, ни через 12 недель после оперативного вмешательства; напротив, у крыс группы положительного контроля минеральная плотность в области дефекта была максимальной на обеих временных точках (рисунок 3Б). Минеральная плотность ткани в

Рисунок 4.

Репрезентативные гистологические снимки (окрашивание гематоксилином и эозином) новообразованной костной ткани в просвете созданного дефекта при отсутствии заполнения дефекта (отрицательный контроль) либо замещении дефекта удаленными участками темных костей (костный ауто трансплантат, положительный контроль), широко применяемым препаратом Geistlich Bio-Oss® или оригинальным медицинским изделием Bongraf COLLAGEN.



Figure 4.

Representative histological images (hematoxylin and eosin staining) of critical-sized rat calvarial bone defect repair in unfilled defects (negative control), defects filled with calvarial bone autograft, Geistlich Bio-Oss® or Bongraf COLLAGEN.

А) гистологические снимки, сделанные через 4 недели после операции; Б) гистологические снимки, сделанные через 12 недель после операции.

A. 4 weeks post-operation. B. 12 weeks post-operation.

просвете костного дефекта, заполненного препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® или тестируемым медицинским изделием Bongraf COLLAGEN, на 12-й неделе после операции была значимо выше, чем у крыс группы отрицательного контроля (рисунок 3Б). Заполнение дефекта препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® приводило к более выраженной минерализации в сравнении с изделием Bongraf COLLAGEN, с динамикой к увеличению минерализации на 12-й неделе после оперативного

вмешательства в сравнении с 4-й неделей (рисунок 3Б).

Для оценки выраженности остеогенеза при анализе окрашивания срезов гематоксилином и эозином также была рассчитана доля минерализованной ткани от площади дефекта. В частности, у крыс без заполнения дефекта минерализованная ткань в просвете дефекта практически отсутствовала, а у крыс с реимплантированными костями свода черепа – заполняла почти весь дефект (рисунок 3В). У крыс, де-

Рисунок 5.

Репрезентативные гистологические снимки (окрашивание гематоксилином и эозином) новообразованной костной ткани в просвете созданного дефекта при отсутствии заполнения дефекта (отрицательный контроль) либо замещении дефекта удаленными участками темных костей (костный ауто трансплантат, положительный контроль), широко применяемым препаратом Geistlich Bio-Oss® или оригинальным медицинским изделием Bongraf COLLAGEN.

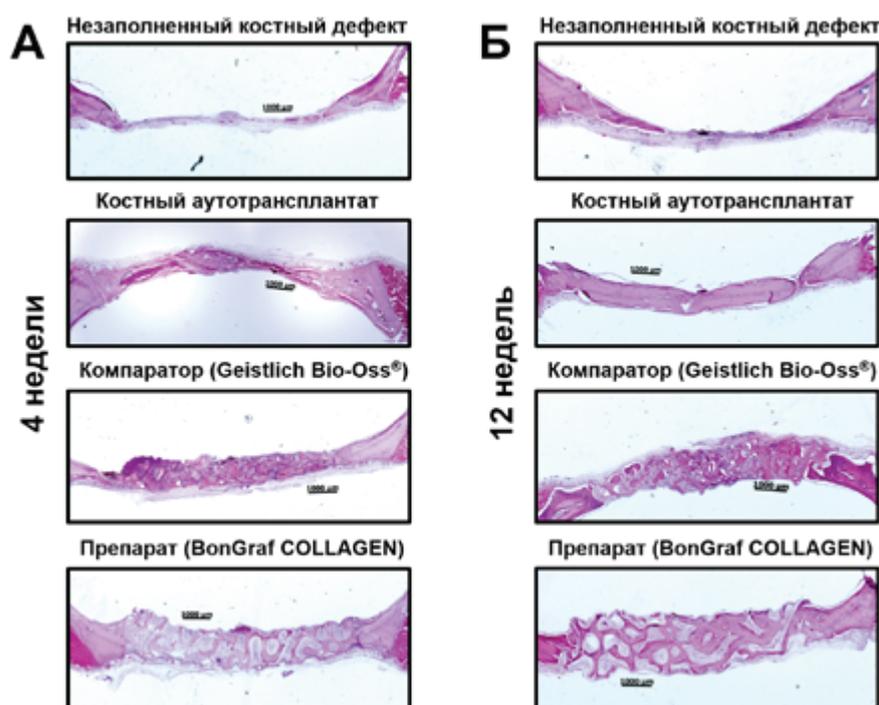


Figure 5.

Representative histological images (hematoxylin and eosin staining) of critical-sized rat calvarial bone defect repair in unfilled defects (negative control), defects filled with calvarial bone autograft, Geistlich Bio-Oss® or Bongraf COLLAGEN.

фекты свода черепа которых заполняли препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® или тестируемым медицинским изделием Bongraf COLLAGEN, доля минерализованной ткани в просвете дефекта составляла от 40 до 55% и не различалась между медицинскими изделиями или на разных сроках заживления (**рисунок 3В**). Репрезентативные гистологические снимки представлены на **рисунке 5**.

Еще одним важным аспектом оценки репарации дефектов костной ткани является микрофотографическое измерение толщины новообразованных костных элементов. У крыс с незаполненным костным дефектом толщина костных балок через 4 недели после операции была наименьшей, однако к 12-й неделе достигала величин, близких к наибольшим среди всех групп показателям крыс с реимплантированными костями свода черепа (**рисунок 3Г**). При замещении костного дефекта препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® или тестируемым медицинским изделием Bongraf COLLAGEN толщина костных балок была промежуточной между таковой в вышеуказанных группах и увеличивалась с течением времени при заполнении дефекта изделием Bongraf COLLAGEN (**рисунок 3Г**).

С целью дополнительной оценки характеристик костных элементов было проанализировано распределение костных элементов по диаметру. У крыс с незаполненным костным дефектом через 4 недели после его создания наблюдались исключительно мелкие элементы с диаметром < 200 мкм, однако спустя 12 недель после операции распределение размера костных элементов становилось более равномерным, а их максимальный диаметр увеличивался до 500 мкм (**рисунок 6**). В группе крыс с аутотрансплантатом костей свода черепа на обеих временных точках в костной ткани присутствовали элементы более широкого диапазона диаметров (до 600 мкм) с равномерным их распределением (**рисунок 6**). Крысы, получавшие препарат-компаратор Geistlich Bio-Oss®, характеризовались относительно однородным распределением диаметра костных элементов (до 350 мкм) в просвете созданного дефекта без выраженной временной динамики (**рисунок 6**). В то же время при заполнении дефекта изделием Bongraf COLLAGEN через 4 недели после операции костные элементы имели существенно меньший диаметр (до 150 нм), однако к 12-й неделе наблюдалось увеличение их предельно-

го диаметра до 400 нм (**рисунок 6**). При этом пик распределения диаметров костных элементов при заполнении дефекта препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® приходился на 150 нм, а при заполнении дефекта изделием Bongraf COLLAGEN – на 50 нм на обеих временных точках (**рисунок 6**).

Обсуждение

Согласно данным общемирового эпидемиологического исследования Global Burden of Disease, ежегодно по поводу различных травм за медицинской помощью обращается около 1 млрд человек и регистрируется около 5 млн летальных исходов [3]. Как следствие, в мире ежегодно проводится около 4 млн оперативных вмешательств, требующих замещения костных дефектов [31], из которых более 1,5 млн проводится в США [32]. Поэтому клиническая потребность в коммерчески доступных и готовых к использованию (commercially available off-the-shelf ready-to-use) имплантатах для замещения костных дефектов достаточно велика [31, 32]. Проведенный анализ рынка показал, что уже на данный момент ежегодная потребность в костных имплантатах в Российской Федерации составляет от 150 до 275 тысяч имплантатов (маркетинговая группа «Текарт»). В то же время, несмотря на присутствие подобных ксеногенных костных имплантатов на отечественном рынке (к примеру, нативный костный минерал Geistlich Bio-Oss®), остается открытым вопрос соотношения их стоимости (учитывая необходимость импорта) и эффективности.

С этой целью была разработана оригинальная технология многоступенчатой очистки ксеногенной костной ткани OnIonTech™, включающая в себя последовательные стадии механической очистки, дезинфекции, удаления контаминирующих белков, делипидизации, выделения и обогащения коллагена, а также ферментации костного материала с последующей стерилизацией посредством сверхкритической флюидной экстракции. На основе указанной технологии, в свою очередь, было разработано медицинское изделие Bongraf COLLAGEN, представляющее собой ксеногенный бесклеточный костный коллаген высокой степени очистки в виде мембраны с нативной нереконструированной волокнисто-пористой структурой, получаемый из бычьих бедренных костей. Предполагается, что данное изделие может быть использо-

Рисунок 6.

Распределение диаметра новообразованных костных элементов в просвете созданного дефекта, оцененное методом микрокомпьютерной томографии. А) распределение диаметра костных элементов при отсутствии заполнения дефекта (отрицательный контроль); Б) распределение диаметра костных элементов при замещении дефекта удаленными участками теменных костей (костный аутографт, положительный контроль); В) распределение диаметра костных элементов при замещении дефекта широко применяемым препаратом Geistlich Bio-Oss®; Г) распределение диаметра костных элементов при замещении дефекта оригинальным медицинским изделием Bongraf COLLAGEN.

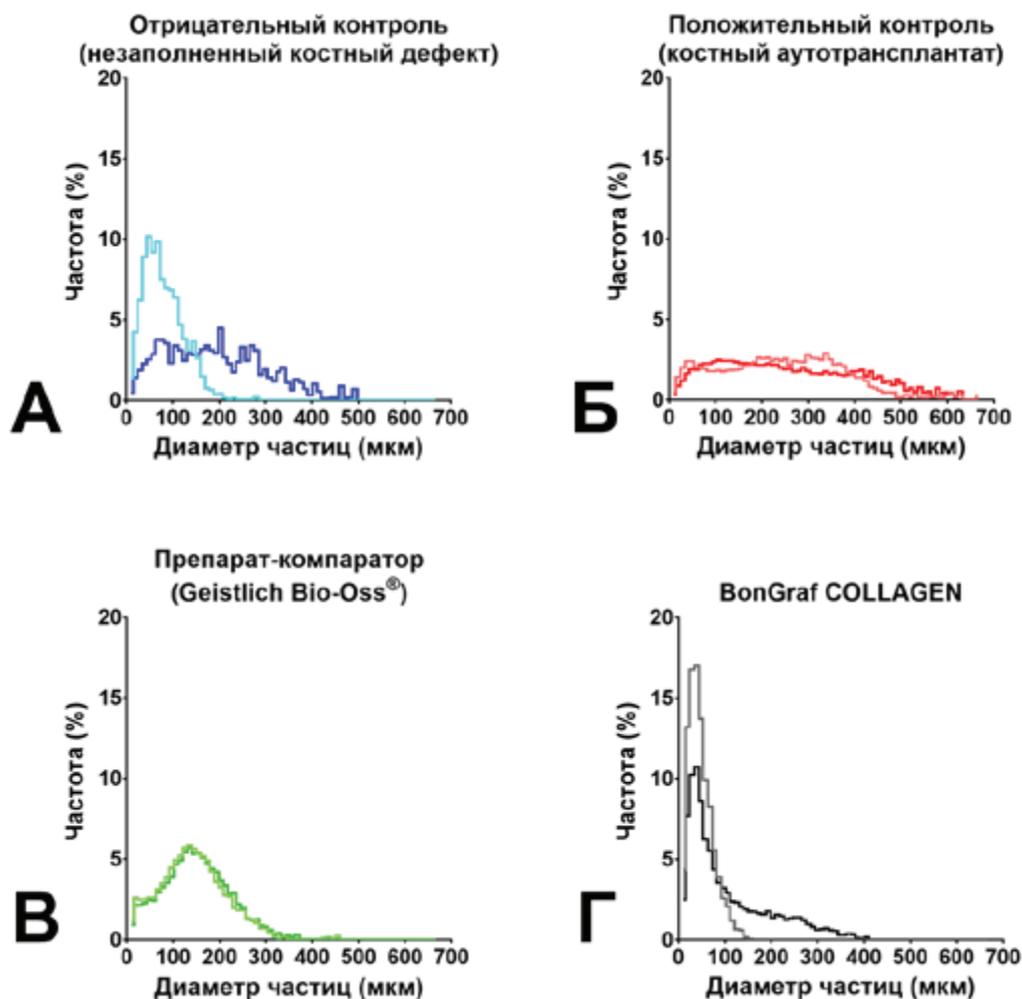


Figure 6.

Distribution of bone elements diameter in the repaired bone tissue as assessed by microcomputed tomography. A. Unfilled defects (negative control). B. Defects filled with calvarial bone autograft. C. Geistlich Bio-Oss®. D. Bongraf COLLAGEN.

вано в травматологии, ортопедии и стоматологии для замещения костных дефектов.

Проведенные нами эксперименты показали, что при замещении критического дефекта костей свода черепа крыс изделием Bongraf COLLAGEN к 12-й неделе после имплантации объем новообразованной костной ткани в просвете дефекта и доля костной ткани от просвета дефекта были не ниже, чем при замещении дефекта препаратом Geistlich Bio-Oss®, широко используемым на данный момент в клинической практике. В то же время препарат Geistlich Bio-Oss® в некоторой степени превосходит изделие Bongraf COLLAGEN в отношении минеральной плотности новообразованных тканей и толщины новообразованных костных элементов. Распределение диаметра новообразованных костных элементов при замещении дефекта изделием Bongraf COLLAGEN было сдвинуто влево (в сторону уменьшения диаметра) в сравнении с препаратом

Geistlich Bio-Oss®, однако этот показатель не свидетельствует напрямую об эффективности костного заменителя (филлера). Наибольшие показатели по всем изученным параметрам регенерации костной ткани ожидаемо наблюдались при замещении дефекта костным аутографтом (удаленным участком костей свода черепа), а наименьшие – при отсутствии заполнения дефекта по причине его критического диаметра (8 мм).

Полученные данные свидетельствуют о том, что изделие Bongraf COLLAGEN в отношении ключевых показателей репарации костной ткани (объем новообразованной костной ткани в просвете дефекта и доля костной ткани от просвета дефекта) не уступает препарату-компаратору Geistlich Bio-Oss®. Причиной этого может являться высокая osteoconductive и osteoinductive, которые сохраняются даже при многоступенчатой очистке и стерилизации нативного костного минерала и костного коллаген-

на. При этом является важным, что многоступенчатая очистка по технологии OnIonTech™ и стерилизация методом сверхкритической флюидной экстракции позволяют достичь высокой степени очистки и безопасности костного коллагена (по аналогии с многоступенчатой очисткой и γ -излучением в случае с нативным костным минералом Geistlich Bio-Oss®).

Результаты выполненного исследования согласуются с опубликованными ранее данными, продемонстрировавшими отсутствие иммуногенности и высокую биосовместимость мембраны из бычьего костного коллагена при подкожной имплантации крысам [21]. Кроме того, было показано, что добавление бычьего коллагена к нативному костному минералу улучшает как остеокондуктивные свойства и регенерацию костной ткани при замещении критического дефекта свода черепа кроликов [22], так и адгезию, пролиферацию и остеогенную диффе-

ренцировку культур преостеобластов мышцы линии ST2 в сравнении с чистым нативным костным минералом [28].

Заключение

Ксеногенный бесклеточный нативный реконструированный костный коллаген высокой степени очистки в виде мембраны Bongraf COLLAGEN, получаемый из бычьих бедренных костей по оригинальной технологии OnIonTech™ и стерилизуемый посредством сверхкритической флюидной экстракции, имеет сходную эффективность при замещении критического дефекта костей свода черепа крыс в сравнении с классически используемым ксеногенным костным гранулированным минералом Geistlich Bio-Oss® (Geistlich Pharma), также получаемым из крупного рогатого скота путем многоступенчатой очистки костной ткани и стерилизуемым γ -излучением.

Литература / References:

- Recent Advances in Orthopedics-2. Courney, P Maxwell. Jaypee Brothers Medical Publishers. 2018; 220 p.
- GBD 2016 Disease and Injury Incidence and Prevalence Collaborators. Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 328 diseases and injuries for 195 countries, 1990-2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. *The Lancet*. 2017; 390(10100): 1211-1259. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)32154-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)32154-2).
- Haagsma JA, Graetz N, Bolliger I, Naghavi M, Higashi H, Mullany EC, Abera SF, Abraham JP, Adofu K, Alsharif U, Ameh EA, Ammar W, Antonio CA, Barrero LH, Bekele T, Bose D, Brazinova A, Catalá-López F, Dandona L, Dandona R, Dargan PI, De Leo D, Degenhardt L, Derrett S, Dharmaratne SD, Driscoll TR, Duan L, Petrovich Ermakov S, Farzadfar F, Feigin VL, Franklin RC, Gabbe B, Gosselin RA, Hafezi-Nejad N, Hamadeh RR, Hijar M, Hu G, Jayaraman SP, Jiang G, Khader YS, Khan EA, Krishnaswami S, Kulkarni C, Lecky FE, Leung R, Lunevicius R, Lyons RA, Majdan M, Mason-Jones AJ, Matzopoulos R, Meaney PA, Mekonnen W, Miller TR, Mock CN, Norman RE, Orozco R, Polinder S, Pourmalek F, Rahimi-Movaghar V, Refaat A, Rojas-Rueda D, Roy N, Schwebel DC, Shaheen A, Shahraz S, Skirbekk V, Søreide K, Soshnikov S, Stein DJ, Sykes BL, Tabb KM, Temesgen AM, Tenkoro EY, Theadom AM, Tran BX, Vasankari TJ, Vavilala MS, Vlassov VV, Woldeyohannes SM, Yip P, Yonemoto N, Younis MZ, Yu C, Murray CJ, Vos T. The global burden of injury: incidence, mortality, disability-adjusted life years and time trends from the Global Burden of Disease study 2013. *Inj Prev*. 2016; 22(1): 3-18. <https://doi.org/10.1136/injuryprev-2015-041616>.
- Global Burden of Disease Child and Adolescent Health Collaboration, Kassebaum N, Kyu HH, Zoeckler L, Olsen HE, Thomas K, Pinho C, Bhutta ZA, Dandona L, Ferrari A, Ghiswot TT, Hay SI, Kinfu Y, Liang X, Lopez A, Malta DC, Mokdad AH, Naghavi M, Patton GC, Salomon J, Sartorius B, Topor-Madry R, Vollset SE, Werdecker A, Whiteford HA, Abate KH, Abbas K, Damtew SA, Ahmed MB, Akseer N, Al-Raddadi R, Alemayohu MA, Altirkawi K, Abajobir AA, Amare AT, Antonio CAT, Arnlov J, Artaman A, Asayesh H, Avokpaho EFGA, Awasthi A, Ayala Quintanilla BP, Bacha U, Betsu BD, Barac A, Bärnighausen TW, Baye E, Bedi N, Bensenor IM, Berhane A, Bernabe E, Bernal OA, Beyene AS, Biadgilign S, Bikbov B, Boyce CA, Brazinova A, Hailu GB, Carter A, Castañeda-Orjuela CA, Catalá-López F, Charlson FJ, Chittheer AA, Choi JJ, Ciobanu LG, Crump J, Dandona R, Dellavalle RP, Deribew A, deVeber G, Dicker D, Ding EL, Dubey M, Endries AY, Erskine HE, Faraon EJA, Faro A, Farzadfar F, Fernandes JC, Fijabi DO, Fitzmaurice C, Fleming TD, Flor LS, Foreman KJ, Franklin RC, Fraser MS, Frostad JJ, Fullman N, Gebregers GB, Gebru AA, Geleijnse JM, Gibney KB, Gidey Yihdego M, Ginawi IAM, Gishu MD, Gizachew TA, Glaser E, Gold AL, Goldberg E, Gona P, Goto A, Gughani HC, Jiang G, Gupta R, Tesfay FH, Hankey GJ, Havmoeller R, Hijar M, Horino M, Hosgood HD, Hu G, Jacobsen KH, Jakovljevic MB, Jayaraman SP, Jha V, Jibat T, Johnson CO, Jonas J, Kasaeian A, Kawakami N, Keiyoro PN, Khalil I, Khang YH, Khubchandani J, Ahmad Kiadaliri AA, Kieling C, Kim D, Kisseon N, Knibbs LD, Koyanagi A, Krohn KJ, Kuate Defo B, Kucuk Bicer B, Kulikoff R, Kumar GA, Lal DK, Lam HY, Larson HJ, Larsson A, Laryea DO, Leung J, Lim SS, Lo LT, Lo WD, Looker KJ, Lotufo PA, Magdy Abd El Razek H, Malekzadeh R, Markos Shifiti D, Mazidi M, Meaney PA, Meles KG, Memiah P, Mendoza W, Abera Mengistie M, Mengistu GW, Mensah GA, Miller TR, Mock C, Mohammadi A, Mohammed S, Monasta L, Mueller U, Nagata C, Naheed A, Nguyen G, Nguyen QL, Nsoesie E, Oh IH, Okoro A, Olusanya JO, Olusanya BO, Ortiz A, Paudel D, Pereira DM, Perico N, Petzold M, Phillips MR, Polanczyk GV, Pourmalek F, Qorbani M, Rafay A, Rahimi-Movaghar V, Rahman M, Rai RK, Ram U, Rankin Z, Remuzzi G, Renzaho AMN, Roba HS, Rojas-Rueda D, Ronfani L, Sagar R, Sanabria JR, Kedir Mohammed MS, Santos IS, Satpathy M,

- Sawhney M, Schöttker B, Schwebel DC, Scott JG, Sepanlou SG, Shaheen A, Shaikh MA, She J, Shiri R, Shiue I, Sigfusdottir ID, Singh J, Silpakit N, Smith A, Sreeramareddy C, Stanaway JD, Stein DJ, Steiner C, Sufiyani MB, Swaminathan S, Tabarés-Seisdedos R, Tabb KM, Tadese F, Tavakkoli M, Taye B, Teeple S, Tegegne TK, Temam Shifa G, Terkawi AS, Thomas B, Thomson AJ, Tobe-Gai R, Tonelli M, Tran BX, Troeger C, Ukwaja KN, Uthman O, Vasankari T, Venketasubramanian N, Vlassov VV, Weiderpass E, Weintraub R, Gebrehiwot SW, Westerman R, Williams HC, Wolfe CDA, Woodbrook R, Yano Y, Yonemoto N, Yoon SJ, Younis MZ, Yu C, Zaki MES, Zegeye EA, Zuhlke LJ, Murray CJL, Vos T. Child and Adolescent Health From 1990 to 2015: Findings From the Global Burden of Diseases, Injuries, and Risk Factors 2015 Study. *JAMA Pediatr.* 2017; 171(6): 573-592. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.0250>.
5. Mokdad AH, Forouzanfar MH, Daoud F, Mokdad AA, El Bcheraoui C, Moradi-Lakeh M, Kyu HH, Barber RM, Wagner J, Cercy K, Kravitz H, Coggeshall M, Chew A, O'Rourke KF, Steiner C, Tuffaha M, Charara R, Al-Ghamdi EA, Adi Y, Afifi RA, Alahmadi H, AlBuhairan F, Allen N, Al-Mazroa M, Al-Nehmi AA, AlRayess Z, Arora M, Azzopardi P, Barroso C, Basulaiman M, Bhutta ZA, Bonell C, Breinbauer C, Degenhardt L, Denno D, Fang J, Fatusi A, Feigl AB, Kakuma R, Karam N, Kennedy E, Khoja TA, Maalouf F, Obermeyer CM, Mattoo A, McGovern T, Memish ZA, Mensah GA, Patel V, Petroni S, Reavley N, Zertuche DR, Saeedi M, Santelli J, Sawyer SM, Ssewamala F, Taiwo K, Tantawy M, Viner RM, Waldfoegel J, Zuñiga MP, Naghavi M, Wang H, Vos T, Lopez AD, Al Rabeeah AA, Patton GC, Murray CJ. Global burden of diseases, injuries, and risk factors for young people's health during 1990-2013: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *The Lancet.* 2016; 387(10036): 2383-401. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00648-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00648-6).
 6. Hasan A, Byambaa B, Morshed M, Cheikh MI, Shakoor RA, Mustafy T, Marei H. Advances in osteobiologic materials for bone substitutes. *J Tissue Eng Regen Med.* 2018; 12(6): 1448-1468. doi: 10.1002/term.2677.
 7. Pearlin, Nayak S, Manivasagam G, Sen D. Progress of Regenerative Therapy in Orthopedics. *Curr Osteoporos Rep.* 2018; 16(2): 169-181. <https://doi.org/10.1007/s11914-018-0428-x>.
 8. Smith WR, Hudson PW, Ponce BA, Rajaram Manoharan SR. Nanotechnology in orthopedics: a clinically oriented review. *BMC Musculoskelet Disord.* 2018; 19(1): 67. <https://doi.org/10.1186/s12891-018-1990-1>.
 9. Azi ML, Aprato A, Santi I, Kfuri M Jr, Masse A, Joeris A. Autologous bone graft in the treatment of post-traumatic bone defects: a systematic review and meta-analysis. *BMC Musculoskelet Disord.* 2016; 17(1): 465. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1312-4>.
 10. Fillingham Y, Jacobs J. Bone grafts and their substitutes. *Bone Joint J.* 2016; 98-B (1 Suppl A): 6-9. doi: 10.1302/0301-620X.98B.36350.
 11. Bhatt RA, Rozental TD. Bone graft substitutes. *Hand Clin.* 2012; 28(4): 457-68. <https://doi.org/10.1016/j.hcl.2012.08.001>.
 12. Mansour A, Mezour MA, Badran Z, Tamimi F. Extracellular Matrices for Bone Regeneration: A Literature Review. *Tissue Eng Part A.* 2017; 23(23-24): 1436-1451. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2017.0026>.
 13. Wang F, Li Q, Wang Z. A comparative study of the effect of Bio-Oss® in combination with concentrated growth factors or bone marrow-derived mesenchymal stem cells in canine sinus grafting. *J Oral Pathol Med.* 2017; 46(7): 528-536. <https://doi.org/10.1111/jop.12507>.
 14. Khojasteh A, Fahimipour F, Jafarian M, Sharifi D, Jahangir S, Khayyatani F, Baghaban Eslaminejad M. Bone engineering in dog mandible: Coculturing mesenchymal stem cells with endothelial progenitor cells in a composite scaffold containing vascular endothelial growth factor. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2017; 105(7): 1767-1777. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33707>.
 15. Nakano K, Murata K, Omokawa S, Akahane M, Shimizu T, Kawamura K, Kawate K, Tanaka Y. Promotion of Osteogenesis and Angiogenesis in Vascularized Tissue-Engineered Bone Using Osteogenic Matrix Cell Sheets. *Plast Reconstr Surg.* 2016; 137(5): 1476-84. <https://doi.org/10.1097/PRS.0000000000002079>.
 16. Oliveira HL, Da Rosa WLO, Cuevas-Suárez CE, Carreño NLV, da Silva AF, Guim TN, Dellagostin OA, Piva E. Histological Evaluation of Bone Repair with Hydroxyapatite: A Systematic Review. *Calcif Tissue Int.* 2017; 101(4): 341-354. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0294-z>.
 17. Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep.* 2013; 2: 447. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.181>.
 18. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2008; 3 Suppl 3: S131-9. <https://doi.org/10.2215/CJN.04151206>.
 19. Castro-Cesena AB, Novitskaya EE, Phadke A, Varghese S, McKittrick J. Isolation of Collagen from Cortical Bovine Bone for Preparation of Porous Collagen Sponges. In: Prorok B. et al. Mechanics of Biological Systems and Materials, 2013. Vol. 5. pp. 73-78. *Conference Proceedings of the Society for Experimental Mechanics Series.* Springer, New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-4427-5_11.
 20. Labastida-Pólito A, Piña-Barba C, Romero-Valdovinos MG, Tello-Solís SR. Physicochemical properties of collagen sheet from bovine femur. *J Appl Biomater Biomech.* 2009; 7(3): 200-4.
 21. Kamadajja DB, Harijadi A, Soesilawati P, Wahyuni E, Maulidah N, Fauzi A, Rah Ayu F, Simanjuntak R, Soesanto R, Asmara D, Rizqiawan A, Agus P, Pramono C. Demineralized Freeze-Dried Bovine Cortical Bone: Its Potential for Guided Bone Regeneration Membrane. *Int J Dent.* 2017; 2017: 5149675. <https://doi.org/10.1155/2017/5149675>.
 22. Salamanca E, Hsu CC, Huang HM, Teng NC, Lin CT, Pan YH, Chang WJ. Bone regeneration using a porcine bone substitute collagen composite in vitro and in vivo. *Sci Rep.* 2018; 8(1): 984. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19629-y>.
 23. Calvo-Guirado JL, Gómez-Moreno G, Guardia J, Ortiz-Ruiz A, Piatelli A, Barone A, Martínez-González JM, Mesguer-Olmo L, López-Marí L, Dorado CB. Biological response to porcine xenograft implants: an experimental study in rabbits. *Implant Dent.* 2012; 21(2): 112-7. <https://doi.org/10.1097/ID.0b013e3182425991>.
 24. Peng YY, Glattauer V, Ramshaw JA, Werkmeister JA. Evaluation of the immunogenicity and cell compatibility of avian collagen for biomedical applications. *J Biomed Mater Res A.* 2010; 93(4): 1235-44. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32616>.
 25. Oryan A, Alidadi S, Moshiri A, Maffulli N. Bone regenerative medicine: classic options, novel strategies, and future directions. *J Orthop Surg Res.* 2014; 9(1): 18. <https://doi.org/10.1186/1749-799X-9-18>.
 26. Lynn AK, Yannas IV, Bonfield W. Antigenicity and immunogenicity of collagen. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 2004; 71(2): 343-54. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30096>.

27. Fujioka-Kobayashi M, Schaller B, Saulacic N, Zhang Y, Miron RJ. Growth factor delivery of BMP9 using a novel natural bovine bone graft with integrated atelo-collagen type I: Biosynthesis, characterization, and cell behavior. *J Biomed Mater Res A*. 2017; 105(2): 408-418. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35921>.
28. Moon SH, Lee YJ, Rhie JW, Suh DS, Oh DY, Lee JH, Kim YJ, Kim SM, Jun YJ. Comparative study of the effectiveness and safety of porcine and bovine atelocollagen in Asian nasolabial fold correction. *J Plast Surg Hand Surg*. 2015; 49(3): 147-52. <https://doi.org/10.3109/2000656X.2014.964725>.
29. Veremeev AV, Kutikhin AG, Nesterenko VG, Bolgarin RN. Patent RU2665962C1. Bioresorbable bioscaffold for bone repair and the approach for its preparation. In Russ. (Патент РФ на изобретение № 2665962 «Биорезорбируемый биологический матрикс для замещения дефектов костной ткани и способ его получения»)
30. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*. 2012; 7(10): 1918-29. <https://doi.org/10.1038/nprot.2012.113>.
31. Brydone AS, Meek D, Maclaine S. Bone grafting, orthopaedic biomaterials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H*. 2010; 224(12): 1329-43. <https://doi.org/10.1243/09544119JEIM770>.
32. O'Keefe RJ, Mao J. Bone tissue engineering and regeneration: from discovery to the clinic--an overview. *Tissue Eng Part B Rev*. 2011; 17(6): 389-92. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2011.0475>.

Сведения об авторах

Веремеев Алексей Владимирович, кандидат медицинских наук, генеральный директор ООО «Матрифлекс» (125252, Россия, г. Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, д. 12, корп. А, п. 1, эт. 2, оф. 1).

Вклад в статью: планирование и проведение экспериментов, анализ полученных данных, написание статьи.

ORCID: 0000-0001-9946-1015

Болгарин Роман Николаевич, директор по развитию ООО «Матрифлекс» (125252, Россия, г. Москва, ул. Авиаконструктора Микояна, д. 12, корп. А, п. 1, эт. 2, оф. 1).

Вклад в статью: планирование и проведение экспериментов, анализ полученных данных.

ORCID: 0000-0001-8679-4857

Нестеренко Владимир Георгиевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий отделом иммунологии ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н. Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения Российской Федерации. (123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18).

Вклад в статью: планирование экспериментов, редактирование статьи, подготовка иллюстративного материала.

ORCID: 0000-0001-5623-2466

Андреев-Андриевский Александр Александрович, кандидат биологических наук, руководитель центра доклинических исследований ООО «НИИ митоинженерии МГУ» ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова» (119330, Россия, г. Москва, ул. Ленинские горы, д. 73А).

Вклад в статью: проведение экспериментов.

ORCID: 0000-0002-1173-8153

Статья поступила: 16.05.2020г.

Принята в печать: 29.05.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Authors

Dr. Alexey V. Veremeev, MD, PhD, Chief Executive Officer, Matriflex LLC (Aviakonstruktora Mikoyana Street, 12, A, 2nd Floor, Office 1, Moscow, Russian Federation, 125252).

Contribution: conceived and designed the study; performed the data analysis; wrote the manuscript.

ORCID: 0000-0001-9946-1015

Mr. Roman N. Bolgarin, development director, Matriflex LLC (Aviakonstruktora Mikoyana Street, 12, A, 2nd Floor, Office 1, Moscow, Russian Federation, 125252).

Contribution: conceived and designed the study; performed the data analysis.

ORCID: 0000-0001-8679-4857

Prof. Vladimir G. Nesterenko, MD, DSc, Professor, Head of the Immunology Department, Gamaleya National Research Epidemiology and Microbiology Centre (Gamaleya Street, 18, Moscow, Russian Federation, 123098).

Contribution: designed the study; manuscript editing.

ORCID: 0000-0001-5623-2466

Dr. Alexander A. Andreev-Andrievskiy, PhD, Head of the Center for Preclinical Trials, Mitoengineering Research Institute LLC, Moscow State University (Leninskie Gory Street, 73A, Moscow, Russian Federation, 119330).

Contribution: performed the experiments.

ORCID: 0000-0002-1173-8153

Received: 16.05.2020

Accepted: 29.05.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.