

<https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-24-34>

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ГЕТЕРОЛОГИЧЕСКОГО ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОГО КОСТНОГО МАТРИКСА ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КРИТИЧЕСКИХ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ 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. Оценить эффективность гетерологического деминерализованного костного матрикса (ДКМ) для замещения костных дефектов в эксперименте на модели критического дефекта костей свода черепа крыс.

Материалы и методы. Для эксперимента использовали самцов крыс (n = 48) линии Sprague-Dawley возрастом от 4,5 до 6 месяцев. В ходе оперативного вмешательства создавали критический дефект костей свода черепа и замещали его костным аутооттрансплантатом, гетерологическим ДКМ или препаратом-компараторм (Geistlich Bio-Oss®) либо оставляли незаполненным (отрицательный контроль). Через 4 или 12 недель выводили крыс из эксперимента и проводили исследование областей дефекта при помощи микроскопической оценки срезов тканей, окрашенных гематоксилином и эозином (доля минерализованной ткани от просвета дефекта) и микрокомпьютерной томографии (объем новообразованной костной ткани, минеральная плотность новообразованной ткани, толщина новообразованных костных элементов и распределение их диаметра).

Результаты. Замещение дефектной области костным аутооттрансплантатом, как и ожидалось, показало наилучшие результаты. При применении гетерологического ДКМ и препарата-компаратора наблюдалась выраженное заполнение критиче-

ского дефекта, при этом статистически значимых различий в показателях репарации костной ткани между разработанным оригинальным прототипом и медицинским изделием сравнения выявлено не было. Микрокомпьютерно-томографический и гистологический методы исследования продемонстрировали конкордантные результаты (эффекты имели сопоставимую степень выраженности).

Заключение. Гетерологический ДКМ эффективен для замещения критических костных дефектов свода черепа крыс.

Ключевые слова: деминерализованный костный матрикс, ксенотрансплантаты, аутооттрансплантаты, остеогенез, критический дефект свода черепа.

Выражение благодарности

Авторы благодарят коллектив ООО «НИИ митоинженерии 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. Эффективность гетерологического деминерализованного костного матрикса для замещения критических костных дефектов свода черепа крыс. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020; 5(3): 24-34. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-24-34>

*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

HETEROLOGOUS DEMINERALISED BONE MATRIX IS EFFICIENT FOR THE REPAIR OF CRITICAL-SIZED RAT CALVARIAL DEFECTS

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 heterologous demineralised bone matrix (DBM) for the replacement of bone defects using a critical-sized rat calvarial defect model.

Materials and Methods. For the experiments, we used 48 Sprague-Dawley rats (4.5 to 6 months of age). Critical-sized (8 mm diameter) calvarial defect was filled by the bone autograft, heterologous DBM, or comparator product (Geistlich Bio-Oss®) or remained unfilled (negative control). Upon 4 or 12 weeks, rats were euthanised with the subsequent investigation of the defect and adjacent tissues by means of hematoxylin and eosin staining (mineralized tissue area to the defect area ratio) and microcomputed tomography (volume, thickness, and mineral density of the repaired tissue).

Results. In our experimental setting, bone autograft was the most efficient in bone repair. Heterologous DBM and comparator product were equally efficient in filling the defect and did not show

any statistically significant differences regarding any of the parameters. Microcomputed tomography and routine histological examination demonstrated concordant results.

Conclusion. Heterologous DBM is efficient for the repair of critical-sized rat calvarial defects.

Keywords: demineralised bone matrix, heterologous implants, autograft, bone repair, critical-sized rat calvarial defect,

Acknowledgements

The authors sincerely thank the staff of Mitogenengineering 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. Heterologous demineralised bone matrix is efficient for the repair of critical-sized rat calvarial defects. *Fundamental and Clinical Medicine*. 2020; 5(3): 24-34. <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-3-24-34>

**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

Одним из приоритетных направлений современной травматологии и ортопедии является сокращение сроков реабилитации и улучшение отдаленных результатов, в том числе качества жизни после операций на элементах опорно-двигательной системы [1]. Проблема инвалидизации населения трудоспособного возраста по причине патологий данного рода и травм не теряет актуальности, несмотря на со-

временные методы диагностики и лечения [2–5]. Для решения этой проблемы активно изучается возможность форсирования естественной регенерации костной ткани вместо использования металлических и керамических имплантатов [6–8].

Использование костных аутооттрансплантатов при оперативном лечении дефектов костной ткани является эталоном в связи с абсолютной биосовместимостью для реципиента [9–11].

Однако применение аутоотрансплантатов ограничено высокой травматичностью при их заборе, приводящей к снижению качества жизни пациента в послеоперационном периоде (главным образом вследствие развития хронической инфекции и перманентных болей в области изъятия аутокости) [10, 11]. Аллотрансплантаты, получаемые из донорского материала, обладают значительно меньшим остеокондуктивным и остеоиндуктивным потенциалом, а также несут высокий риск инфекционных и аутоиммунных осложнений [10, 11]. Современные научно-технические разработки в данной области ориентированы на создание аналогов костных материалов, содержащих прогениторные клеточные популяции и биоактивные факторы направленной дифференцировки, что способствует управляемой регенерации ткани [12–16].

Внеклеточный матрикс кости представляет собой нативный биоматериал, на 85–90% состоящий из коллагена I типа, а также содержащий другие типичные для внеклеточного матрикса в целом белки (коллаген III, V, IX, XII, XIV, XIX, XX и XXI типа, фибронектин, альбумин, фетuin-A, различные факторы роста) [17, 18]. Кроме того, при частичной деминерализации костный матрикс также содержит гидроксипатит ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$), вместе с коллагеном I типа определяющий структурные и функциональные характеристики костной ткани [17, 18]. Процесс выделения костного матрикса из ксеногенной костной ткани обладает высокой технологичностью [19, 20]; кроме того, за счет своей волокнисто-пористой структуры выделяемый кристаллический костный минерал является проницаемым для лекарственных средств, после имплантации успешно заселяется клетками и обладает высокой биосовместимостью, что делает его подходящей системой доставки лекарственных средств для таргетной терапии [21–23]. Еще одним важным достоинством костного матрикса при замещении костной ткани является его низкая иммуногенность, обусловленная естественной природой гидроксипатита и высокой консервативностью белков экстрацеллюлярного матрикса в процессе эволюции [24]. Костный матрикс используется как в сегментарном виде для получения каркасов (матрикса, скаффолдов) [25], так и в виде микроразмерных или наноразмерных гранул для самостоятельного замещения костной ткани [26, 27] либо в составе композитных материалов как вспомогательный материал с целью увеличения остео-

кондуктивных и остеоиндуктивных свойств каркасов для замещения костных дефектов [28, 29].

Из всех источников предпочтительным является гетерологический (ксеногенный) костный матрикс, сохраняющий свою структуру и аморфную форму при различных способах обработки, в том числе включающих в себя методы глубокой очистки, децеллюляризации и деминерализации [28, 29]. Поэтому гетерологический деминерализованный костный матрикс (ДКМ) не изменяет свои первоначальную структуру и свойства, что обеспечивает сравнимую с нативной тканью прочность, остеокондуктивность и остеоиндуктивность [25–27].

Ранее нашей группой был разработан протокол для получения гетерологического ДКМ с целью замещения дефектов костной ткани и последующего клинического внедрения.

Цель исследования

Оценка эффективности гетерологического ДКМ в эксперименте на модели критического дефекта костей свода черепа крыс.

Материалы и методы

Объекты исследования

Источником гранулированного нативного не-реконструированного ДКМ (диаметр 0,25–1 мм) были бедренные кости быка. ДКМ получали при помощи последовательных стадий очистки костной ткани: механическая очистка, дезинфекция, децеллюляризация, удаление липидов, удаление нуклеиновых кислот, деминерализация, фракционирование и газовая стерилизация. В качестве препарата-компаратора использовалось медицинское изделие Geistlich Bio-Oss® (Geistlich Pharma), являющееся нативным костным минералом в виде гранул аналогичного диаметра, который получают из костной ткани крупного рогатого скота путем многоступенчатой очистки по патентованной технологии с последующей стерилизацией γ -излучением.

Лабораторные животные

Эксперименты с лабораторными животными были выполнены на базе виварно-экспериментального комплекса ООО «НИИ митохондриологии МГУ» в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, и одобрены локальным этическим комитетом Научно-исследовательского института митохондриологии при МГУ (код этического утверждения 37/2019, утверждено 17 июня 2019

года). В эксперимент было включено 48 самцов крыс линии Sprague-Dawley со зрелым костным скелетом (возрастом от 4,5 до 6 месяцев) на момент начала эксперимента. Лабораторные животные были получены из подразделения филиала Института биоорганической химии Российской академии наук – питомника лабораторных животных «Пушино». Животные были клинически здоровы и не были инфицированы патогенами из списка FELASA 2014, за исключением *Helicobacter spp.* и *Gardia muris*. Адаптационный период животных после прибытия из питомника составлял 7 суток.

В пилотном эксперименте животных содержали в полипропиленовых индивидуальных проветриваемых клетках в блоке передержки животных, в основном эксперименте – в клетках открытого типа в барьерной зоне виварно-экспериментального комплекса. В предоперационный период крысы содержались в клетках ТЗ (Tecniplast, Италия) с площадью пола 780 см² по две особи или в клетках Т4 (Tecniplast, Италия) с площадью пола 1500 см² по четыре особи. На протяжении всего исследования животные имели неограниченный доступ к корму («Чара для содержания», Ассортимент-Агро, Россия) и стерильной обратнотокмической воде. В качестве подстилки использовали деревянную щепу Lignocel (JRS, Россия). Все материалы, поступающие к животным, автоклавируют. На протяжении всего времени эксперимента поддерживали стандартные условия: циклы температуры (23 ± 3 °C), относительной влажности ($50 \pm 20\%$) и 12 ч света / темноты (включение света в 09:00) и отслеживали состояние здоровья всех крыс ежедневно.

Все животные, участвующие в эксперименте, были индивидуально промаркированы путем перфорирования ушных раковин, также клетки маркировали карточками, где содержалась ин-

формация о заселяющих клетку особях и проводимых с ними манипуляциях. Особям пилотного эксперимента проводился мониторинг веса ежедневно в течение 7 дней после оперативного вмешательства, крысам основного эксперимента – ежедневно в течение 6 дней после оперативного вмешательства. Массу тела измеряли при помощи технических весов Pioneer PA2102 (Ohaus, США), с точностью ± 1 г. Распределение крыс по экспериментальным группам проводили путем рандомизации с использованием стандартного алгоритма GraphPad (GraphPad Prism).

Экспериментальная модель

В работе использовали экспериментальную модель дефекта костей свода черепа, которая состояла в хирургическом удалении теменных костей диаметром 8 мм [30]. Дефект такого размера у взрослых крыс является «критическим» и исключает самопроизвольную регенерацию костной ткани [30]. В пилотном эксперименте на 10 крысах была отработана методика выполнения хирургической операции по созданию критического дефекта костей свода черепа. Часть животных не подвергалась манипуляциям по заполнению дефекта. Другой группе крыс дефект заполняли аутооттрансплантатом костной ткани (удаленным участком свода черепа). Состояние животных отслеживали на протяжении 7 дней после операции, обращая внимание на целостность швов и видимые признаки послеоперационных осложнений, после чего подвергали эвтаназии и оценивали морфологию дефектного участка. Основной эксперимент (по 6 крыс в группе) включал в себя оценку регенеративных свойств гетерологического ДКМ в сравнении с препаратом-компараторм Geislich Bio-Oss® и двумя контрольными группами – без заполнения костного дефекта и с дефектом, заполненным удаленным участком свода черепа по аналогии с пилотным экспериментом (таблица 1).

Экспериментальная группа (n = 12 на группу) <i>Experimental group</i> (n = 12 per group)	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 6 особей на временную точку) <i>4 and 12 weeks after the defect (6 rats per time point)</i>	<i>Microcomputed tomography, histological examination (hematoxylin and eosin staining, light microscopy)</i>
Положительный контроль <i>Positive control</i>	Удаленные кости свода черепа (аутооттрансплантат) <i>Excised calvarial bones (autograft)</i>		
Препарат-компараторм <i>Comparator product</i>	Geislich Bio-Oss®		
Тестируемый препарат <i>Tested solution</i>	Heterologous demineralised bone matrix		

Таблица 1.

Схема основного эксперимента

Table 1.

Experimental design

Животных наркотизировали путем внутрибрюшинного введения 15-20 мг/кг тилетамина, 15-20 мг/кг золазепама и 3-6 мг/кг ксилазина. Для доступа к операционному полю над сводом черепа сбривали шерсть и разрезали кожу по средней линии головы, потом разрезали соединительные ткани черепа и надкостницу и отслаивали их от черепа при помощи шпателя. При помощи трепана диаметром 8 мм и стоматологического привода при скорости вращения 1000 оборотов в минуту с непрерывным смачиванием физиологическим раствором (0,9% NaCl), производили насечку на теменных костях почти на толщину кости (до прозрачности). Выпиленный костный фрагмент удаляли при помощи элеватора, тем самым формируя дефект необходимого диаметра. Получившуюся дефектную область промывали физиологическим раствором и удаляли мелкие костные остатки по краям. В группе отрицательного контроля дефектную область оставляли незаполненной, в группе положительного контроля – заполняли удаленными костями свода черепа (реимплантация), в третьей группе – препаратом-компаратором (Geistlich Bio-Oss®), в четвертой – гетерологическим ДКМ (надкостницу сшивали рассасывающейся нитью Monocryl (Ethicon)).

Кожу сшивали рассасывающейся нитью Т-сорб (Политехмед, Россия). После операционного вмешательства 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 1 и 3 месяца после искусственного создания дефекта по 3 крысы из каждой группы производили вывод крыс из эксперимента путем их помещения в герметичную камеру с атмосферой, перенасыщенной углекислым газом (CO₂). При помощи стоматологического бора эксплантировали кости свода черепа, содержащие область дефекта и окружающую неповрежденную ткань, и фиксировали их в забуференном фосфатом 4% растворе формалина (pH 7,2-7,6) на протяжении 48 часов. Хранение полученных биоптатов производили в 1% водном растворе формалина при 2–8°C.

Микротомографический и гистологический анализ эксплантированной костной ткани

Определение трехмерной структуры и минеральной плотности кости проводили при помощи 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. В ходе томографического исследования костной ткани образцы поддерживали в увлажненном состоянии. Для анализа микрокомпьютерных томограмм использовали программное обеспечение CTAn (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). По завершении исследования образцы переносили обратно в раствор формалина до морфологического исследования структур костной и прилежащих мягких тканей.

Для гистологического исследования образцы декальцинировали до полного размягчения в электролитном растворе (ЭргоПродакшн, Россия) в течение 96 часов при комнатной температуре (22–25°C). Далее биоптаты подвергали дегидратации в семи сменах 99,7% изопрепа (БиоВитрум, Россия) по 5 часов в каждой смене. Пропитывали в двух сменах парафиновой среды Histomix (БиоВитрум, Россия), по два часа в каждой смене и заключали в парафин. Готовые 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. Депарафинизированные срезы окрашивали гематоксилином и эозином (БиоВитрум, Россия) по стандартному протоколу. Морфологическое исследование выполняли при помощи светового микроскопа Axio Scope.A1 (Carl Zeiss, Германия). Фото съемку срезов осуществляли при помощи камеры AxioCam MRc 5 (Carl Zeiss) с программным обеспечением AxioVision 3.0 (Carl Zeiss).

Статистический анализ

Экспериментальные данные подвергались статистическому анализу 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 для исключения систематической ошибки множественных сравнений. Различия считали статистически значимыми при вероятности отвергнуть верную нулевую гипотезу $p < 0,05$.

Результаты

Результаты апробации экспериментальной модели (безопасность и эффективность)

Состояние животных после операции оценивалось по объективным (масса тела) и субъективным (внешний осмотр) данным. Масса тела крыс в пилотном эксперименте уменьшалась в течение первых 2 суток после операции, на протяжении последующих 5 дней масса оставалась неизменной. Помимо травмы, вызванной оперативным вмешательством, снижение массы тела также было вызвано использованием антибиотиков. Макроскопически состояние животных нормализовалось спустя 4–5 дней после операции.

Через 7 дней после операции осмотр области с искусственно созданным дефектом показал высокую скорость регенерации кожных покровов (разрез кожи в значительной степени или полностью заживлен) и отсутствие видимых признаков воспалительных процессов. У животных из группы положительного контроля наблюдали отсутствие смещения реимпланти-

рованного аутооттрансплантата в области дефекта благодаря новообразованной соединительной ткани.

В основном эксперименте отсутствовала отрицательная динамика массы тела животных на протяжении всей 1-й недели после операции независимо от экспериментальной группы. Кроме того, масса тела животных всех экспериментальных групп увеличивалась на протяжении всего эксперимента (12 недель).

Влияние ДКМ на репарацию костного дефекта

Для оценки восстановительного процесса при искусственно созданном критическом дефекте черепа использовали анализ объема новообразованной костной ткани в просвете дефекта с помощью метода микрокомпьютерной томографии (микроКТ, **рисунок 1**). У группы с изначальным отсутствием костной ткани в просвете дефекта репарации практически не наблюдали, тогда как у группы с реимплантированным аутооттрансплантатом ожидаемо наблюдали наибольший объем костной ткани (**рисунок 2А**). В группе особей основного эксперимента, где дефект замещали препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® или гетерологическим ДКМ, объем костной ткани был статистически значимо больше по сравнению с особями отрицательного контроля. Помимо этого наблюдали отсутствие ярко выраженной динамики увеличения объема костной ткани к 12-й неделе после операции в сравнении с 4-й неделей (**рисунок 2А**). Значимых статистических различий между ДКМ и препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® не наблюдали (**рисунок 2А**).

Рисунок 1.

Репрезентативные микрокомпьютерные томограммы новообразованной костной ткани в просвете созданного дефекта при отсутствии заполнения дефекта (отрицательный контроль) либо замещении дефекта удаленными участками темных костей (костный аутооттрансплантат, положительный контроль), препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® или гетерологическим ДКМ. А) 4 недели после операции; Б) 12 недель после операции

Figure 1.

Representative microcomputed tomography images of critical-sized rat calvarial bone defect repair in unfilled defects (negative control), defects filled with calvarial bone autograft (positive control), Geistlich Bio-Oss® or heterologous DBM. A. 4 weeks post-operation. B. 12 weeks post-operation

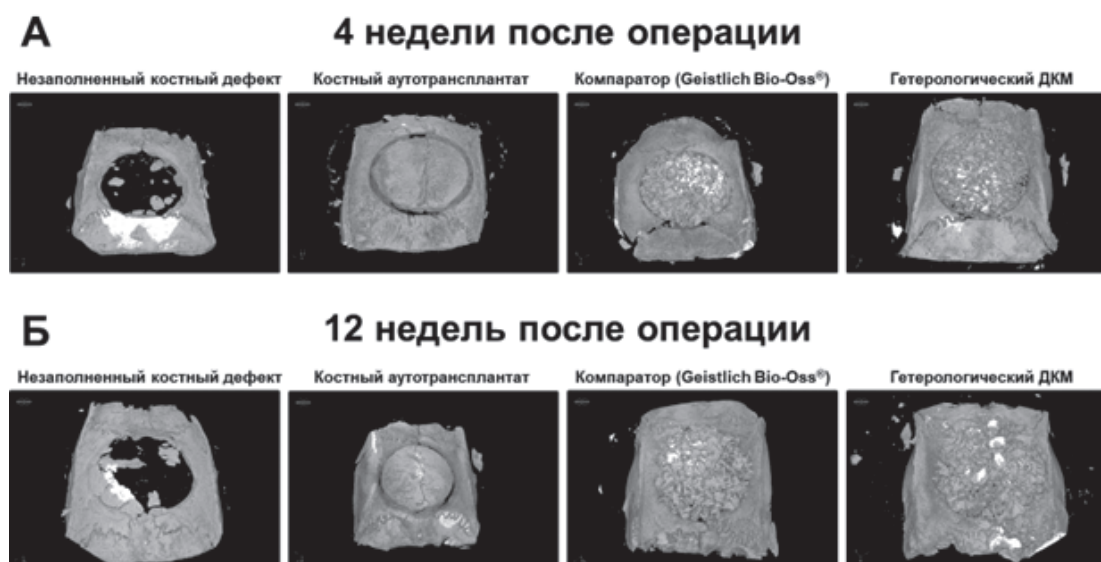
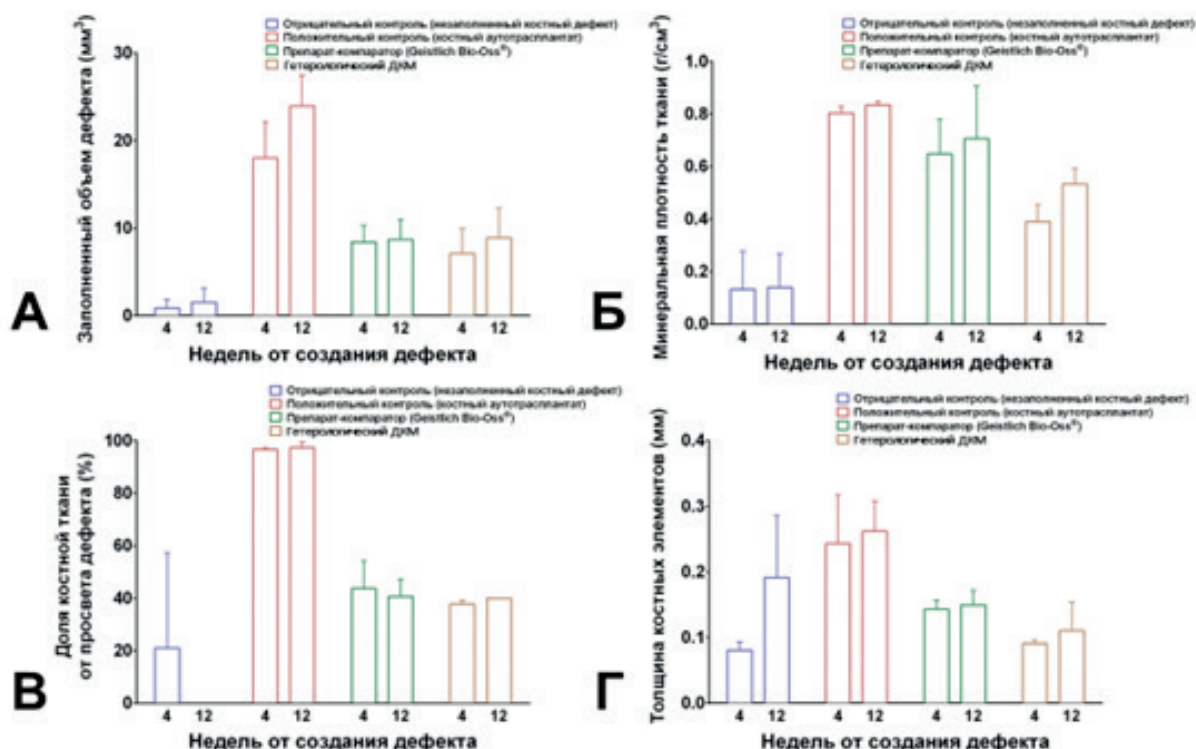


Рисунок 2.

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), препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® или гетерологическим ДКМ. 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.

Figure 2.

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



При помощи микроКТ оценивали плотность тканей, по результатам чего делали выводы об общей минерализации новообразованных тканей в месте искусственно созданных дефектов. В группе крыс отрицательного контроля не наблюдали минерализованной ткани ни через 4, ни через 12 недель после оперативного вмешательства, тогда как в группе положительного контроля минеральная плотность в области дефекта была максимальной независимо от времени наблюдения (рисунок 2Б). При заполнении дефекта гетерологическим ДКМ и препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® минеральная плотность ткани была ближе к показателям минерализации положительного, а не отрицательного контроля (рисунок 2Б).

На гистологических препаратах, окрашенных гематоксилином и эозином (рисунок 3), оценивали выраженность остеогенеза и рассчитывали долю минерализованной ткани от площади дефекта. Так, у группы крыс отрицательного контроля минерализованная ткань в просвете дефекта почти отсутствовала, тогда как у группы крыс положительного контроля заполняла почти весь дефект (рисунок 2В). У групп крыс из основного эксперимента процент минерализованной ткани в просвете дефекта составлял от 40 до 50% и не имел различий между группами на разных стадиях послеоперационного периода (рисунок 2В).

Для дополнительной оценки регенеративных процессов в костной ткани также выполняли микроКТ-измерение толщины новообразованных костных элементов. У группы крыс отрицательного контроля толщина костных балок через 4 недели после операции была наименьшей, тогда как к 12-й неделе достигала показателей группы крыс с реимплантированными костями свода черепа (рисунок 2Г). При замещении костного дефекта препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® или гетерологическим ДКМ значения толщины костных балок находились между группами отрицательного и положительного контроля и незначительно увеличивались со временем (рисунок 2Г).

Наконец был произведен анализ распределения костных элементов по их диаметру. У крыс из группы отрицательного контроля через 4 недели наблюдали только мелкие (до 200 мкм) костные элементы, через 12 недель после оперативного вмешательства – равномерное распределение костных элементов с диаметром до 500 мкм (рисунок 4). В группе крыс положительного контроля на обоих временных точках визуализировали равномерно распределенные костные элементы диаметром до 600 мкм (рисунок 4). У групп крыс, которым был имплантирован препарат-компаратор Geistlich Bio-Oss® или гетерологический ДКМ, дефект

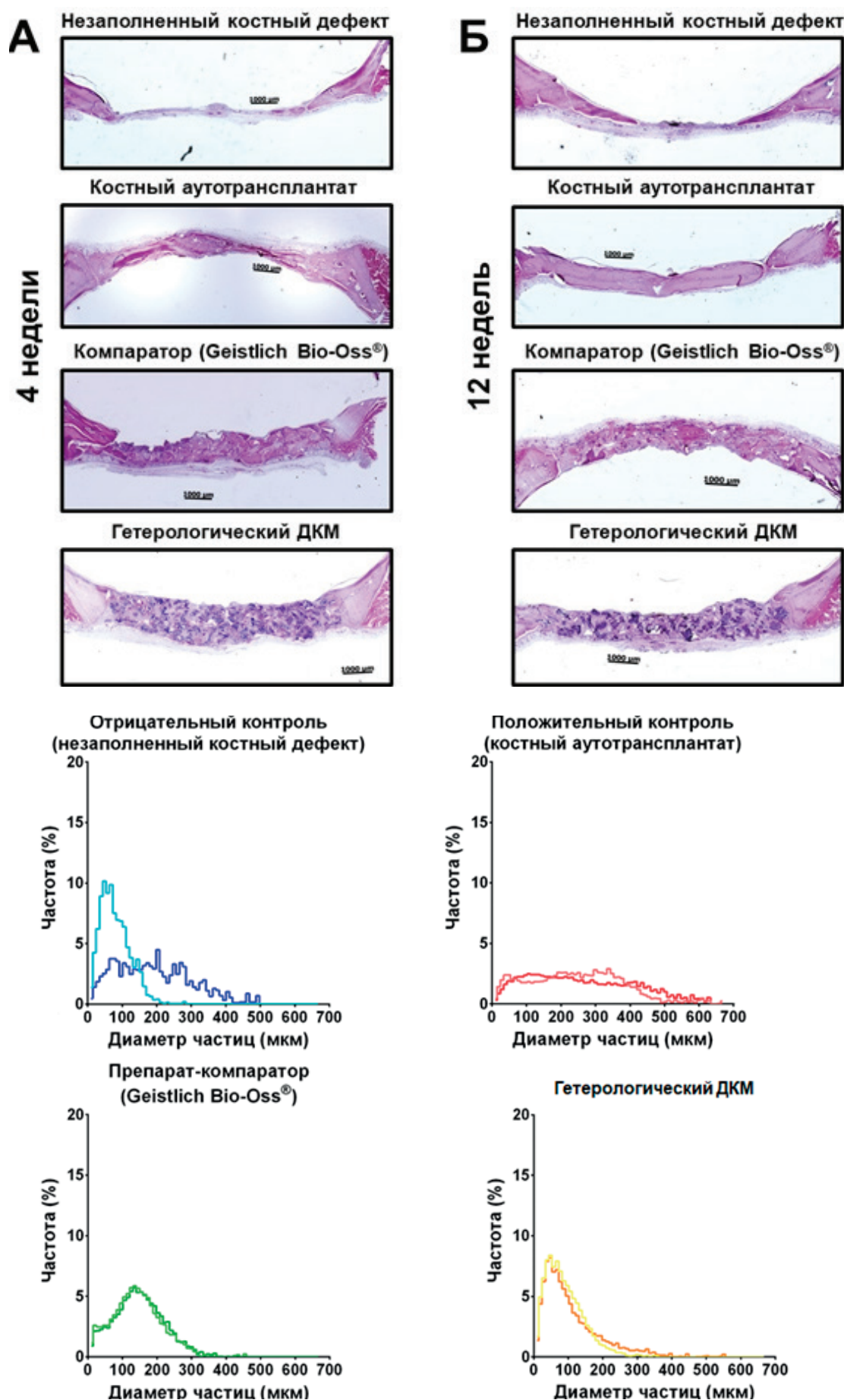


Рисунок 3.

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 теменных костей (костный аутографт, положительный контроль), препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® или гетерологическим ДКМ. А) 4 недели после операции; Б) 12 недель после операции.

Figure 3.

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 (positive control), Geistlich Bio-Oss® or heterologous DBM. A. 4 weeks post-operation. B. 12 weeks post-operation.

Рисунок 4.

Распределение диаметра новообразованных костных элементов в просвете созданного дефекта, оцененное методом микрокомпьютерной томографии. А) незаполненный костный дефект (отрицательный контроль); Б) костный аутографт, (положительный контроль); В) препарат-компаратор Geistlich Bio-Oss®; Г) гетерологический ДКМ.

Figure 3.

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 (positive control). C. Geistlich Bio-Oss®. D. Heterologous DBM.

характеризовался нормальным распределением костных элементов диаметром до 350 мкм независимо от временной точки (4 или 12 недель) (**рисунок 4**). Также было выявлено, что при заполнении дефекта препаратом-компаратором Geistlich Bio-Oss® пик диаметра костных элементов приходился на 150 мкм, а при заполнении дефекта гетерологическим ДКМ – на 75 мкм (**рисунок 4**).

Обсуждение

Травмы продолжают оставаться причиной многочисленных случаев инвалидизации и смертности населения трудоспособного возраста во всем мире. Исследование Global Burden of Disease показало, что в течение года за медицинской помощью по поводу различных травм обращаются около 1 млрд человек, из этих случаев фиксируется около 5 млн летальных исходов [3]. Из всех случаев травм около 4 млн требует оперативных вмешательств с замещением костного дефекта [31], более трети из них проводится в США [32]. Таким образом, растет спрос на коммерчески доступные и готовые к использованию имплантаты для замещения дефектов костных тканей [31, 32].

Для адекватного ответа на данный вызов нашей группой была разработана оригинальная методика получения гетерологического ДКМ, которая заключается в последовательном очищении и дезинфекции костной ткани, удалении клеток, липидов, нуклеиновых кислот и гидроксиапатита и дальнейшем фракционировании для получения гранул с их стерилизацией этиленоксидом. На базе данной оригинальной методики был получен бесклеточный гетерологический ДКМ высокой степени очистки с сохраненной волокнисто-пористой структурой, сырьем для которого являются бычьи бедренные кости. Данное медицинское изделие может применяться в травматологии,

ортопедии и стоматологии для замещения костных дефектов.

Полученные результаты продемонстрировали высокую эффективность регенеративных процессов костной ткани при замещении критического дефекта костей свода черепа крыс (8 мм) гетерологическим ДКМ. Объем новообразованной костной ткани в просвете дефекта и доля костной ткани от просвета дефекта оказались сопоставимы с препаратом Geistlich Bio-Oss®, широко применяемым в клинической практике для замещения костной ткани. Наилучшие показатели регенерации костной ткани наблюдали при реимплантации костей свода черепа в просвет дефекта. Таким образом, можно говорить о сохранности остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств.

Результаты настоящего эксперимента соответствуют предшествующим исследованиям, свидетельствующим о более высокой эффективности ДКМ при замещении дефекта позвоночника кроликов в сравнении с нативным коралловым гидроксиапатитом и сходную эффективность с участком подвздошного гребня (аутотрансплантат) [25]. Бычий ДКМ также продемонстрировал высокую способность к регенерации костной ткани, а также отсутствие иммуногенности при замещении дефектных областей лучевой кости крыс [26] и бедренной кости собак [27]. Помимо этого, аналогичные результаты были получены и при замещении ягнячьим ДКМ дефектов большеберцовой кости у собак [27].

Заключение

Гетерологический ДКМ, получаемый из бычьих бедренных костей по оригинальной запатентованной технологии и стерилизованный этиленоксидом, имеет сопоставимую результативность с присутствующим на рынке коммерческим ксеногенным костным гранулированным минералом Geistlich Bio-Oss®.

Литература / References:

1. Recent Advances in Orthopedics-2. Courtney, P Maxwell [Ed]. Jaypee Brothers Medical Publishers. – 2018. – 220 p.
2. 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. *Lancet*. 2017;390(10100):1211-1259. doi: 10.1016/S0140-6736(17)32154-2.
3. Haagsma JA, Graetz N, Bolliger I, Naghavi M, Higashi H, Mullany EC, Abera SF, Abraham JP, Adofo 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, Hajar 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, Shahrz S, Skirbekk V, Søreide K, Soshnikov S, Stein DJ, Sykes BL,

- Tabb KM, Temesgen AM, Tenkorang 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. doi: 10.1136/injprev-2015-041616.
4. 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, Ghiwot 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, Gebregergs 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, Hajar 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, Kissoon 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 Shifti 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 QTL, 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 JS, Satpathy M, Sawhney M, Schöttker B, Schwebel DC, Scott JG, Sepanlou SG, Shaheen A, Shaikh MA, She J, Shiri R, Shieue I, Sigfusdottir ID, Singh J, Silpakit N, Smith A, Sreeramreddy C, Stanaway JD, Stein DJ, Steiner C, Sufiyan 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, Westernman 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. doi: 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, AlMazroa 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, Waldfogel J, Zúñiga 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. *Lancet*. 2016;387(10036):2383-401. doi: 10.1016/S0140-6736(16)00648-6.
 6. Hasan A, Byambaa B, Morshed M, Cheikh MI, Shakoore RA, Mustafy T, Marei H. Advances in osteobiologic materials for bone substitutes. *J Tissue Eng Regen Med*. 2018 Apr 27. doi: 10.1002/term.2677. [Epub ahead of print]
 7. Pearlin, Nayak S, Manivasagam G, Sen D. Progress of Regenerative Therapy in Orthopedics. *Curr Osteoporos Rep*. 2018;16(2):169-181. doi: 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. doi: 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. doi: 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. doi: 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. doi: 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. doi: 10.1111/jop.12507.
 14. Khojasteh A, Fahimipour F, Jafarian M, Sharifi D, Jahangir S, Khayyat 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. doi: 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. doi: 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. doi: 10.1007/s00223-017-0294-z.
 17. Boskey AL. Bone composition: relationship to bone fragility and antiosteoporotic drug effects. *Bonekey Rep*. 2013;2:447. doi: 10.1038/bonekey.2013.181.
 18. Clarke B. Normal bone anatomy and physiology. *Clin J Am Soc Nephrol*. 2008;3 Suppl 3:S131-9. doi: 10.2215/CJN.04151206.
 19. Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO. Demineralized bone matrix in bone repair: history and use. *Adv Drug Deliv Rev*. 2012;64(12):1063-77. doi: 10.1016/j.addr.2012.06.008.
 20. Holt DJ, Grainger DW. Demineralized bone matrix as a vehicle for

- delivering endogenous and exogenous therapeutics in bone repair. *Adv Drug Deliv Rev.* 2012;64(12):1123-8. doi: 10.1016/j.addr.2012.04.002.
21. Lewis CS, Supronowicz PR, Zhukauskas RM, Gill E, Cobb RR. Local antibiotic delivery with demineralized bone matrix. *Cell Tissue Bank.* 2012;13(1):119-27. doi: 10.1007/s10561-010-9236-y.
 22. Chen L, He Z, Chen B, Yang M, Zhao Y, Sun W, Xiao Z, Zhang J, Dai J. Loading of VEGF to the heparin cross-linked demineralized bone matrix improves vascularization of the scaffold. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21(1):309-17. doi: 10.1007/s10856-009-3827-9.
 23. Chen B, Lin H, Wang J, Zhao Y, Wang B, Zhao W, Sun W, Dai J. Homogeneous osteogenesis and bone regeneration by demineralized bone matrix loading with collagen-targeting bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials.* 2007;28(6):1027-35.
 24. Reza Sanaei M, Abu J, Nazari M, AB MZ, Allaudin ZN. Qualitative and quantitative evaluation of avian demineralized bone matrix in heterotopic beds. *Vet Surg.* 2013;42(8):963-70. doi: 10.1111/j.1532-950X.2013.12057.x.
 25. Dodds RA, York-Ely AM, Zhukauskas R, Arola T, Howell J, Hartill C, Cobb RR, Fox C. Biomechanical and radiographic comparison of demineralized bone matrix, and a coralline hydroxyapatite in a rabbit spinal fusion model. *J Biomater Appl.* 2010;25(3):195-215. doi: 10.1177/0885328209345552.
 26. Alidadi S, Oryan A, Bigham-Sadeh A, Moshiri A. Comparative study on the healing potential of chitosan, polymethylmethacrylate, and demineralized bone matrix in radial bone defects of rat. *Carbohydr Polym.* 2017;166:236-248. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.02.087.
 27. Bigham-Sadeh A, Karimi I, Alebouye M, Shafie-Sarvestani Z, Oryan A. Evaluation of bone healing in canine tibial defects filled with cortical autograft, commercial-DBM, calf fetal DBM, omentum and omentum-calf fetal DBM. *J Vet Sci.* 2013;14(3):337-43. doi: 10.4142/jvs.2013.14.3.337.
 28. Zhang Y, Wang J, Ma Y, Niu X, Liu J, Gao L, Zhai X, Chu K, Han B, Yang L, Wang J. Preparation and biocompatibility of demineralized bone matrix/sodium alginate putty. *Cell Tissue Bank.* 2017;18(2):205-216. doi: 10.1007/s10561-017-9627-4.
 29. Tian M, Yang Z, Kuwahara K, Nimni ME, Wan C, Han B. Delivery of demineralized bone matrix powder using a thermogelling chitosan carrier. *Acta Biomater.* 2012;8(2):753-62. doi: 10.1016/j.actbio.2011.10.030.
 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. doi: 10.1038/nprot.2012.113.
 31. Brydone AS, Meek D, MacLaine S. Bone grafting, orthopaedic bio materials, and the clinical need for bone engineering. *Proc Inst Mech Eng H.* 2010;224(12):1329-43. doi: 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. doi: 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, г. Москва, Россия (123098, Россия, г. Москва, ул. Гамалеи, д. 18).

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

ORCID: 0000-0001-5623-2466

Андреев-Андреевский 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

Authors

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

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 (125252, Aviakonstruktora Mikoyana Street, 12, A, 2nd Floor, Office 1, Moscow, Russian Federation).

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 (123098, Gamaleya Street, 18, Moscow, Russian Federation).

Contribution: designed the study; wrote the manuscript.

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 (119330, Leninskie Gory Street, 73A, Moscow, Russian Federation).

Contribution: performed the experiments.

ORCID: 0000-0002-1173-8153

Статья поступила: 10.08.2020г.

Принята в печать: 29.08.2020г.

Контент доступен под лицензией CC BY 4.0.

Received: 10.08.2020

Accepted: 29.08.2020

Creative Commons Attribution CC BY 4.0.