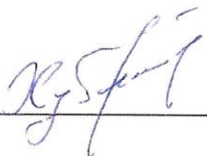


ПРАВИТЕЛЬСТВО МОСКВЫ
ДЕПАРТАМЕНТ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ ГОРОДА МОСКВЫ

СОГЛАСОВАНО

Главный внештатный специалист
Департамента здравоохранения
здравоохранения
города Москвы по трансплантологии


_____ М.Ш. Хубутя

30 МАЯ 2022 г.

РЕКОМЕНДОВАНО

Экспертным советом по науке
Департамента здравоохранения
города Москвы № 10



21 АВГУСТА 202__ г.

**ПОТЕНЦИРОВАНИЕ КОНДУКТИВНЫХ И ИНДУКТИВНЫХ
СВОЙСТВ ТРАНСПЛАНТАТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ**

Методические рекомендации № 66

Москва – 2022

УДК: 611-018.41:616.712.1 -089.844

ББК: 54.547+54.548

Авторский знак: П-64

Организация-разработчик:

Государственное бюджетное учреждение здравоохранения города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

Авторы:

Боровкова Наталья Валерьевна, д. м. н., заведующая научным отделением биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»;

Пономарев Иван Николаевич, к. м. н., старший научный сотрудник научного отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»;

Макаров Максим Сергеевич, к. б. н., старший научный сотрудник научного отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»;

Сторожева Майя Викторовна, научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»;

Офицеров Андрей Аркадьевич, младший научный сотрудник отделения биотехнологий и трансфузиологии ГБУЗ «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы».

Рецензенты:

Паршиков Михаил Викторович, д. м. н., профессор, заслуженный изобретатель РФ, руководитель ФДПО кафедры травматологии, ортопедии и медицины катастроф МГМСУ им. А. И. Евдокимова;

Сластинин Владимир Викторович, к. м. н., врач травматолог-ортопед ГБУЗ «ГКБ им. С. С. Юдина ДЗМ».

Потенцирование кондуктивных и индуктивных свойств трансплантатов костной ткани / сост. Н. В. Боровкова, И. Н. Пономарев, М. С. Макаров [и др.]. – М.: ГБУЗ «НИИ СП им. Н. В. Склифосовского ДЗМ», 2022. – 24 с.

Данные методические рекомендации содержат положения по потенцированию кондуктивных и индуктивных свойств трансплантатов костной ткани. Даются методы и режимы насыщения трансплантатов золями коллагена разной концентрации, а также тромбоцитами или выделенными из них факторами роста.

Методические рекомендации разработаны в ходе выполнения научно-исследовательской работы «Совершенствование процессов изготовления и повышение регенераторного потенциала тканевых трансплантатов, используемых в лечении больных с неотложными состояниями».

ОГЛАВЛЕНИЕ

1.	Введение	5
2	Потенцирование кондуктивности	6
2.1.	Ручной способ насыщения коллагеном	11
2.2.	Автоматизированный способ насыщения коллагеном	12
3.	Потенцирование индуктивного влияния.....	14
3.1.	Насыщение тромбоцитами или ростостимулирующими факторами из них	17
4.	Заключение.....	18
5.	Блок-схема модификации трансплантатов костной ткани	20
5.1.	Потенцирование кондукторных свойств	20
5.2.	Увеличение индуктивных свойств трансплантатов	21
6.	Литература.....	22

1. Введение

Репаративная регенерация – процесс восстановления поврежденной или замещения утраченной ткани, реализуемый через миграцию, пролиферацию и дифференцировку клеток-предшественников [12, 13, 16]. Большое значение для реализации этих процессов имеют наличие приемлемого для адгезии и миграции клеток субстрата, цитокиновый состав среды, передача межклеточных сигналов [3, 4, 18]. Миграция клеток обусловлена как наличием сигнала для направленного движения, так и структурными особенностями ткани. Несмотря на то что клетки человека адгезируют на различных субстратах, включая искусственные, кондуктивность материалов, используемых для изготовления костных трансплантатов, бывает различной [7, 13, 14, 19]. В настоящее время в мировой практике для лечения дефектов костей широко используются различные трансплантаты на основе аллогенной костной ткани [2, 7, 10], однако стоит отметить, что даже в нативном состоянии кость обладает низкой кондуктивностью. После консервирования кондуктивные свойства костных трансплантатов дополнительно снижаются, что заметно затрудняет колонизацию их клетками и замещение костным регенератом [5, 8, 20]. Таким образом, актуальной задачей является разработка методик повышения кондуктивных свойств костных трансплантатов. Кроме этого, важно стимулировать процессы формирования костной ткани в области дефекта. При создании эффективных костных трансплантатов необходимо добиться наличия у них следующих характеристик:

- остеокондуктивность – свойство трансплантата, позволяющее играть роль каркаса для образования регенерата костной ткани. Оно определяется созданием или увеличением на контактирующей поверхности условий, облегчающих адгезию и миграцию клеток;

- **остеоиндуктивность** – свойство трансплантата способствовать остеогенезу через активацию внутриклеточных процессов, управляющих пролиферацией и дифференцировкой клеток-предшественников.

Повышение кондуктивности достигается путем модификации поверхности исходного трансплантата и насыщения его высоко адгезивными веществами [15–17]. Для повышения индуктивности необходимо насыщение трансплантата цитокинами, способствующими росту и дифференцировке клеток.

2. Потенцирование кондуктивности

Одним из способов потенцирования кондуктивных свойства трансплантатов костной ткани является насыщение коллагеном I типа человека – белком, преобладающим в межклеточном матриксе многих тканей, в том числе костной. Взаимодействуя с ним, клетка может осуществлять как направленное движение (миграцию), так и фиксацию с последующим переходом к пролиферации, дифференцировке или синтезу. Важным является структура коллагенового волокна. Известно, что чем более компактна структура коллагена, тем меньше клеток способно к адгезии на его поверхности

Поскольку насыщение подразумевает заполнение пустот внутри трансплантата, то для его осуществления следует использовать коллаген в форме золя. При этом предпочтение следует отдавать тем, в которых белок имеет нативную длинноцепочечную структуру, т. е. сохраняет специфические участки, обеспечивающие контакт с клетками. Однако такие золи даже при относительно небольшой концентрации белка имеют большую вязкость, что затрудняет насыщение. В то же время давление, оказываемое для обеспечения пропитывания золя коллагена внутрь трансплантата, может приводить к разделению на компоненты.

Исследования, результаты которых легли в основу данного раздела методических рекомендаций, были направлены на оптимизацию методики насыщения костных трансплантатов коллагеном.

В работе использовали трансплантаты компактной, губчатой костной ткани человека или их сочетания, изготовленные по стандартной методике и лиофилизированные, золи коллагена I типа человека с концентрациями 0,6–1,39 %, полученные методом кислотной экстракции из сухожилий человека.

На I этапе определяли допустимые режимы (величины ускорения) центрифугирования, при которых золь коллагена сохраняет целостность. В центрифужные пробирки вносили по 10 мл золя коллагена с концентраций 0,6–0,79 %, 0,8–0,99 %, 1,0–1,19 % или 1,2–1,39 % и центрифугировали 20 минут с ускорением от 100 до 1500 g. Затем визуально оценивали гомогенность золя, и если она сохранялась, то ускорение считали «допустимым», а в случае осаждения коллагена – «недопустимым». Образцы перемешивали и снова центрифугировали, но уже в режиме, увеличенном на 100 g, оценивали. Такой цикл повторяли, пока не достигали «недопустимого» ускорения для золя с данной концентрацией коллагена. Последнее значение ускорения, при котором осаждение белка не превышало 5 % от исходного уровня, принимали за максимально допустимый режим.

Результаты. В золе с концентрацией коллагена 0,6–0,79 % уже после центрифугирования с ускорением 100 g отмечали формирование прозрачного венчика жидкости в верхней части, но его высота не превышала 5 % от общей (рисунок 1). При последующих центрифугированиях (с пошаговым увеличением величины ускорения) наблюдали более выраженное осаждение коллагена: при 200 g оно достигало 10 %, при 300 и 400 g – 20 % и т. д.

Золь с концентрацией коллагена 0,8–0,99 % сохранял стабильность в случае центрифугирования с ускорением 100 и 200 g. Однако уже при режиме 300 g в его верхней части происходило формирование прозрачного венчика жидкости высотой не более 5 % от общей. Выраженность эффекта

увеличивалась по мере увеличения режима центрифугирования: при 400 g достигало 15 %, при 500 и 600 g – 20 % и т. д.

Золь с концентрацией коллагена 1,0–1,19 % сохранял стабильность при центрифугировании с ускорением вплоть до 300 g. Использование режимов 400–700 g приводило к формированию в верхней части золя прозрачного венчика жидкости высотой не более 5 % от общей. При последующих центрифугированиях наблюдали более выраженное осаждение коллагена: при 800–1000 g оно достигало 10 %, при 1100 и 1200 g – 15 %, и т. д.

Золь с концентрацией коллагена 1,2–1,39 % сохранял стабильность при центрифугировании с ускорением вплоть до 900 g. Использование режимов 1000–1300 g приводило к формированию в верхней части золя прозрачного венчика жидкости высотой не более 5 % от общей. При последующих центрифугированиях наблюдали более выраженное осаждение коллагена: при 1400 g оно достигало 10 %, при 1500 g – 15 % (рис. 1).

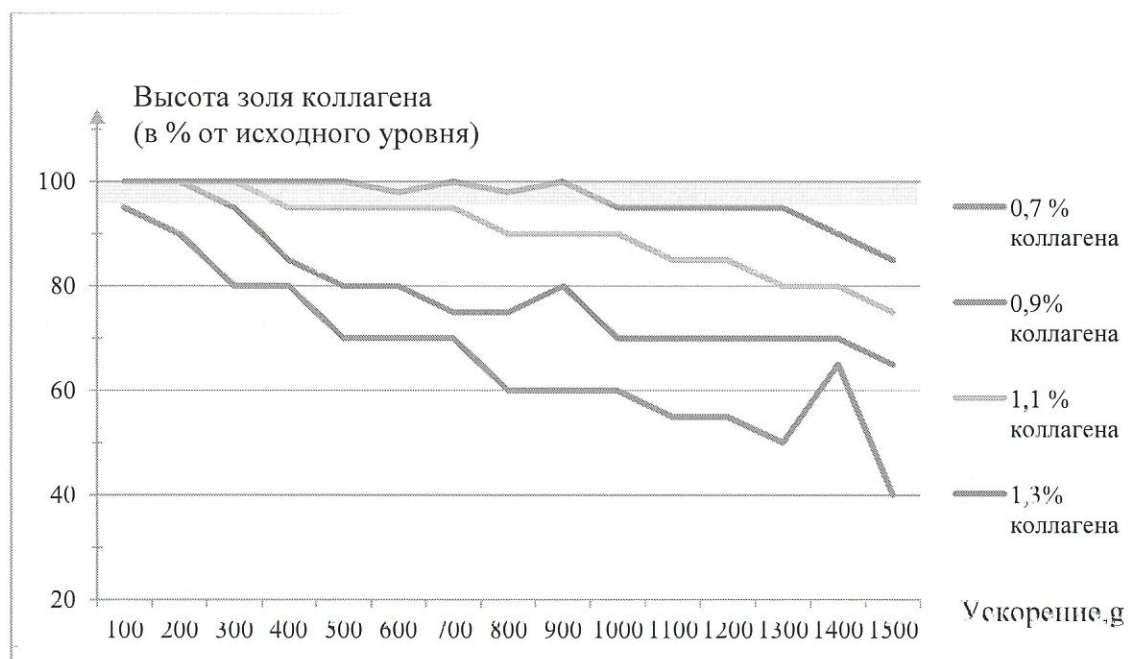


Рисунок 1. Уровень золя коллагена после центрифугирования с различным ускорением.

Вывод: максимальное допустимое ускорение центрифугирования для образцов золь коллагена I типа с концентрацией 0,6–0,79 % составляет 100 g, при 0,8–0,99 % – 300 g, 1,0–1,19 % – 700 g, 1,2–1,39 % – 1300 g.

На втором этапе определяли, достаточно ли данного режима для насыщения трансплантата костной ткани золем коллагена. Для этого в центрифужные пробирки вносили по 10 мл золя коллагена одной из концентраций и по одному лиофилизированному трансплантату губчатой костной ткани, на пробирках отмечали итоговый уровень золя. Образцы центрифугировали в максимально допустимом для данной концентрации коллагена режиме, определенном ранее. После визуально оценивали уровень золя коллагена, и если он сохранялся на исходной позиции, такой режим центрифугирования признавали недостаточным. Снижение уровня по сравнению с исходным свидетельствовало о поступлении золя коллагена внутрь трансплантата, а режим центрифугирования признавали достаточным. На достаточном режиме центрифугирование повторяли до тех пор, пока уровни золя до и после оставались равными, что расценивали как признак полного насыщения трансплантата. Насыщенные коллагеном трансплантаты лиофилизировали и стерилизовали гамма-лучами.

В результате при использовании указанных режимов отмечали не только сохранение целостности золя, но и снижение его уровня на протяжении 3–4 повторов центрифугирования. Последнее было косвенным признаком перераспределения в закрытой пробирке золя коллагена внутрь трансплантатов костной ткани. В последующем при микроскопии во всех образцах определяли диффузную автофлуоресценцию аллогенного коллагена между трабекулами с интенсивностью от 7 до 15 фут-кандел (рис. 2).

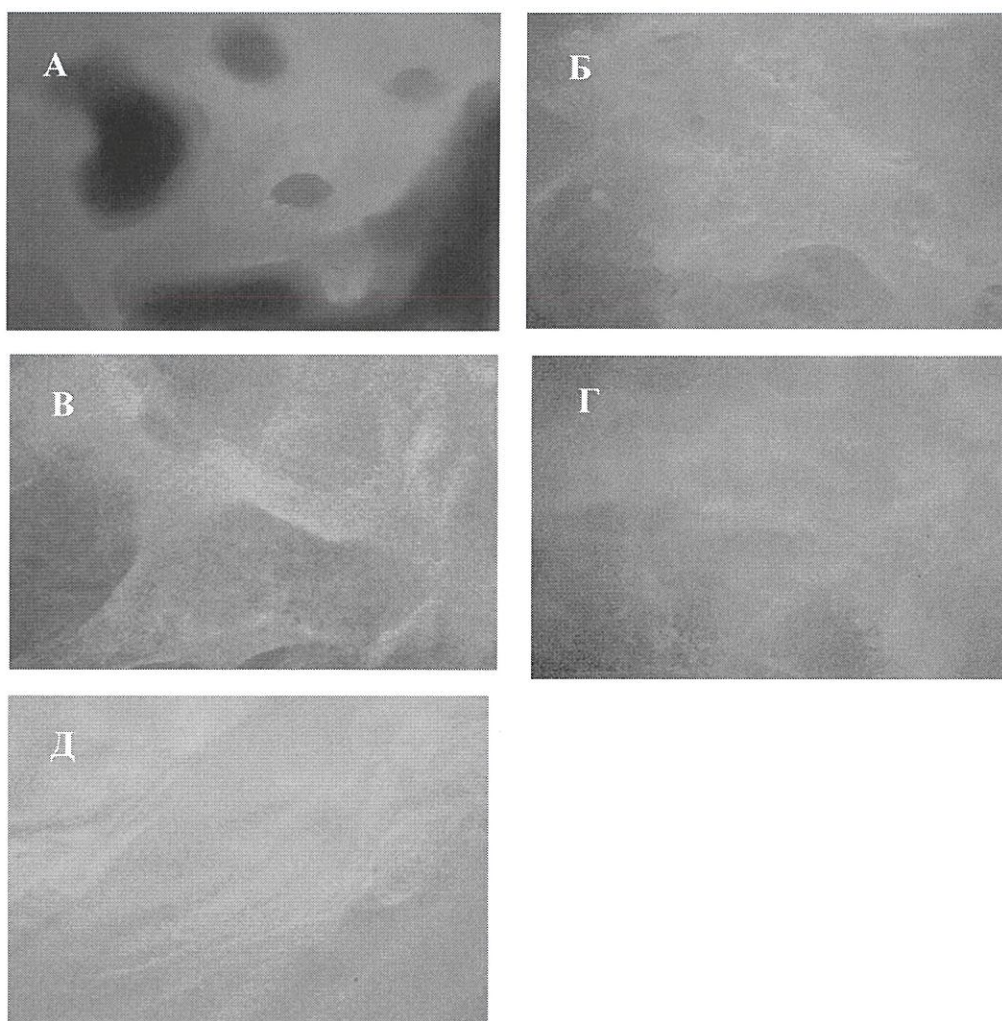


Рисунок 2. Аутофлюоресценция аллогенного коллагена на спиле трансплантатов костной ткани. А – контрольный (ненасыщенный) образец, Б – трансплантат насыщен золею коллагена 0,6–0,79 %, В – трансплантат насыщен золею коллагена 0,8–0,99 %, Г – трансплантат насыщен золею коллагена 1,0–0,19 %, Д – трансплантат насыщен золею коллагена 1,2–0,39 %. Увеличение 100.

Таким образом, адекватное насыщение трабекул коллагеном достигается при использовании 0,7–1,3 % раствора коллагена.

Кондуктивные свойства исследовали на культуре фибробластов человека линии М-22. В 6 чашек Петри ($S=10 \text{ см}^2$) помещали по одному трансплантату костной ткани: 5 насыщенных золею коллагена одной из концентраций, 1 ненасыщенный (контроль). Далее в чашки вносили по 3 мл

суспензии с 50 000 клетками в среде DMEM с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки и помещали их в термостат с 37 °С и 5 % концентрацией CO₂ в атмосфере. На 3-и и 7-е сутки с помощью флуоресцентного микроскопа проводили подсчет колоний на трансплантатах в тыс/см², одновременно оценивали проникновение аллогенного коллагена в трансплантат.

Установлено, что на контрольных образцах губчатой кости (без коллагена) клетки не адгезировали в течение всего срока культивирования. В опытных лунках наибольшее количество клеток было отмечено на поверхности трансплантатов с концентрацией коллагена 0,7 % – в этом случае через 3 суток культивирования количество клеток составило 6 тыс/см², через 7 суток – 9 тыс/см². На поверхности трансплантатов, насыщенных 0,9 % золев коллагена, число клеток через 3 и 7 суток составляло 2 и 4 тыс/см², соответственно. При этом не наблюдалось снижения структурной целостности клеток, как на поверхности трансплантатов, так и на дне чашек Петри. На образцах костной ткани, насыщенных золями коллагена с концентрацией 1,1 % и 1,3 %, клетки культуры не определялись.

Вывод: насыщение коллагеном позволяет потенцировать кондуктивные свойства у трансплантатов костной ткани. Для этого предпочтение следует отдавать использованию зелей с концентрациями коллагена 0,7 % или 0,9 %. В этом случае допустимым и достаточным режимом центрифугирования будет 100 g и 300 g, соответственно.

2.1. Ручной способ насыщения коллагеном

Применим для потенцирования кондуктивных свойств у лиофилизированных трансплантатов губчатой костной ткани путем насыщения золями с концентрацией коллагена не более 0,8 %.

Для проведения работы дополнительно требуются дрель, сверло диаметром 2 мм, шприц объемом 10–20 мл и емкость объемом 100–200 мл.

В трансплантате губчатой костной ткани высверливают сквозные отверстия диаметром 2 мм в различных направлениях. Затем его помещают в емкость и добавляют 0,6–0,8 % золь коллагена в таком количестве, чтобы трансплантат был полностью покрыт. Через сформированные отверстия дополнительно шприцем (без иглы) прокачивают золь коллагена.

Насыщенный коллагеном трансплантат замораживают при $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и лиофилизируют в вакууме с прогреванием до температуры $+36\text{ }^{\circ}\text{C}$. В результате получают комбинированный костный аллотрансплантат, который представляет собой недеминерализованный костный блок губчатой кости, содержащий по всему объему коллаген I типа человека в виде губки с мелкоячеистой структурой. Перед применением трансплантат упаковывают, маркируют и стерилизуют гамма-лучами. Метод защищен патентом РФ № 2524618 «Комбинированный костный аллотрансплантат и способ его получения».

Основными преимуществами ручного метода является относительная простота и небольшое количество расходных материалов, требуемое для его реализации. Однако низкая технологичность ограничивает его применимость. Так, способ предназначен для насыщения коллагеном трансплантатов губчатой костной ткани. При этом, несмотря на ее пористую структуру, требуется дополнительное высверливание сквозных 2 мм отверстий. Прокачивание коллагена шприцем не позволяет использовать золи с низкой текучестью, обусловленной более высокими концентрациями коллагена. При этом отсутствуют критерии оценки полноты насыщения трансплантата золем коллагена. В итоге степень насыщения коллагеном губчатой костной ткани может варьироваться в широких пределах. Кроме того, данный способ неприменим для трансплантатов, поверхность которых представлена компактной костной тканью. Указанных недостатков лишен автоматизированный способ насыщения коллагеном.

2.2. Автоматизированный способ насыщения коллагеном

Применим для потенцирования кондуктивных свойств у лиофилизированных трансплантатов губчатой, компактной костной ткани или их сочетания путем насыщения золями с концентрацией коллагена до 1,3 %.

Для проведения работы дополнительно требуются центрифуга, весы, дрель, сверло диаметром 2 мм, емкость с крышкой (совместимая с бакетами центрифуги).

В трансплантатах, содержащих компактную костную ткань, ее просверливают на всю толщину, располагая отверстия в шахматном порядке с плотностью 5 отверстий на $6,25 \text{ см}^2$ поверхности трансплантата (квадрат $2,5 \times 2,5 \text{ см}$). В случае если образец выполнен только губчатой костной тканью, наносить дополнительные отверстия нет необходимости. Трансплантат помещают в емкость, куда вносят золь коллагена в таком количестве, чтобы он полностью покрывал трансплантат. После этого емкость герметично закрывают, отмечают уровень золя и центрифугируют в течение 20 минут. При концентрации золя коллагена 0,6–0,79 % для центрифугирования используют ускорение, равное 100 g, при 0,8–0,99 % – 300 g.

После каждого цикла центрифугирования оценивают уровень золя, его снижение свидетельствует о перемещении коллагена внутрь трансплантата. При этом если трансплантат начинает выступать над уровнем золя, необходимо добавить золь коллагена до первоначального уровня. Повторяют центрифугирование до тех пор, пока уровень золя остается неизменным, что свидетельствует об окончании насыщения трансплантата.

Насыщенный коллагеном трансплантат лиофилизируют. В результате получают комбинированный костный аллотрансплантат, который представляет собой недеминерализованный костный блок губчатой, компактной костной ткани или их сочетания и содержащий по всему объему коллаген I типа человека в виде губки с мелкоячеистой структурой. Затем

трансплантат упаковывают, маркируют и стерилизуют, например, гамма-лучами. Метод защищен патентом РФ № 2524618 «Способ насыщения коллагеном трансплантата костной ткани».

3. Потенцирование индуктивного влияния

Индуктивное влияние трансплантата костной ткани на клетки зависит от спектра и количества факторов роста, выделяющихся из него. Увеличить оба параметра можно формированием в трансплантате депо факторов роста, например, из тромбоцитов [11, 16, 21]. При этом предпочтительным является их расположение по периферии трансплантата – в зонах, непосредственно контактирующих с живыми тканями организма. Это должно увеличить вероятность реализации не только ростостимулирующего влияния, но и хемотаксиса.

Ранее при сравнительной характеристике концентраций ростовых факторов в препаратах было показано, что в лизате, полученном из отмытых тромбоцитов, концентрация большинства ростовых факторов была заметно выше, чем в лизате богатой тромбоцитами плазмы: PDGF – в 4,2 раза, FGF – в 2,5 раза, EGF – в 4,9 раза, VEGF – в 2,3 раза ($p < 0,05$). Одновременно с этим концентрация цитокинов IL1alpha была ниже в 3 раза, IL 6 – в 1,6 раза ($p < 0,05$) [1]. Таким образом, при выборе между богатой тромбоцитами плазмой (PRP, БоТП) и отмытыми тромбоцитами (ОтмТр) предпочтение следует отдавать вторым.

Исследования, результаты которых легли в основу данного раздела методических рекомендаций, были направлены на оценку ростостимулирующего влияния концентрата отмытых тромбоцитов и их лизата в культуре фибробластов человека. При этом препараты тромбоцитов применяли как самостоятельно, так и в комбинации с трансплантатами костной ткани стандартными и предварительно насыщенными золями коллагена двух концентраций.

В работе использовали 9 трансплантатов костной ткани (размерами 5 x 10 x 20 мм, подготовленные по стандартной методике). 6 из них насытили коллагеном I типа человека по описанной выше методике золем с концентрацией коллагена 0,6–0,79 или 0,8–0,99 %. Тромбоциты выделяли из стабилизированной EDTA венозной крови доноров-добровольцев путем двухэтапного центрифугирования. На первом кровь центрифугировали 5 минут с ускорением 300 g, затем переносили плазму с тромбоцитами в новые пробирки. На втором этапе тромбоциты концентрировали путем центрифугирования пробирок 17 минут с ускорением 700 g, затем удаляли всю супернатантную плазму и вносили стерильный 0,9 % раствор NaCl в объеме, равном 1/10 исходного количества крови. Биоматериал перемешивали и разделяли на две равные части. Одну часть (концентрат отмытых тромбоцитов (ОтмТр)) оставляли при комнатной температуре, а во втором образце тромбоциты лизировали путем замораживания до -40 °С с последующим медленным размораживанием при 4С в течение 6 часов. В лизате осаждали разрушенные клетки путем центрифугирования 20 минут с ускорением 3000 g, а полученный супернатант (лизат отмытых тромбоцитов) использовали в работе.

Ростостимулирующие свойства исследовали на культуре фибробластов человека линии М-22. В 9 чашек Петри ($S=10 \text{ см}^2$) помещали по одному трансплантату костной ткани. Затем по одному образцу каждого типа пропитали 100 мкл концентрата ОтмТр, его лизата или культуральной средой DMEM. В итоге получили 8 вариантов: 2 трансплантата, насыщенные только золем коллагена 0,7 или 0,9 %, 2 – концентратом отмытых тромбоцитов или его лизатом, 4 – их комбинацией, и один контрольный образец, не насыщенный ничем. Далее в чашки вносили по 3 мл суспензии, содержащей 50 000 культивированных фибробластов человека в среде DMEM с добавлением 10 % фетальной бычьей сыворотки и помещали их в термостат с 37 °С и 5 % концентрацией CO₂ в атмосфере. Подсчет фибробластов на

трансплантатах и культуральном пластике проводили на 3-и и 7-е сутки в тыс/см².

Результаты. На дне чашки Петри, где находился контрольный (ненасыщенный) образец, количество клеток составляло на 3-и сутки 15 тыс/см², на 7-е – 20 тыс/см², при этом на трансплантате они отсутствовали. Такое распределение было характерно для всех образцов, не насыщенных коллагеном, в том числе пропитанных концентратом отмытых тромбоцитов или его лизатом. При этом в чашках, где находилась кость, совмещенная только с лизатом ОтмТр, количество клеток на пластике было наибольшее (3-и сутки – 18 тыс/см², 7-е сутки – 23 тыс/см²). А в случае использования концентрата ОтмТр данный показатель составлял на 3-и сутки – 10 тыс/см², 7-е сутки – 20 тыс/см².

На трансплантатах, обработанных только 0,7 % золев коллагена, количество клеток на 3-и сутки составляло 4 тыс/см², на 7-е – 5 тыс/см², а на насыщенных 0,9 % – 3 и 1 тыс/см², соответственно. При этом на дне чашек количество клеток, как правило, было меньше, чем в контроле на указанные величины.

На трансплантатах, подвергшихся комбинированной обработке, наибольшее количество клеток было в случае использования золя коллагена 0,7 % и лизата ОтмТр (3-и сутки – 6 тыс/см², 7-е – 10 тыс/см²), а наименьшее – в случае использования концентрата отмытых тромбоцитов в комбинации с золев коллагена 0,9 % (3-и сутки – 2 тыс/см², 7-е – 0 тыс/см²). При этом на дне большее количество клеток также было в чашках, где находились трансплантаты, пропитанные лизатом ОтмТр (3-и сутки – 13–14 тыс/см², 7-е – 16–18 тыс/см²).

Таким образом, для потенцирования кондукторных свойств трансплантатов костной ткани их следует насыщать золев с концентрацией коллагена 0,7 %. Применение лизата отмытых тромбоцитов оказывает более выраженный ростостимулирующий эффект, чем использование концентрата

отмытых тромбоцитов. Совместное применение коллагена и лизата ОтмТр позволяет достичь наиболее выраженного комбинированного эффекта.

Отдельно следует отметить, что выраженность индуктивного влияния зависит и от способности трансплантата костной ткани не только связывать, но и затем постепенно высвобождать факторы роста. Поэтому в работе целесообразно использовать трансплантаты, уже насыщенные коллагеном. При этом из-за того, что после совмещения с ростовыми факторами или клетками трансплантаты не могут быть стерилизованы, очень важно в работе использовать стерильные компоненты и исключить вероятность контаминации болезнетворными агентами.

3.1. Насыщение тромбоцитами или ростостимулирующими факторами из них

Использование тромбоцитов позволяет в короткие сроки получить значительное количество факторов роста. Эффект обусловлен их пресинтезированием в процессе формирования тромбоцитов и сохранением во внутриклеточных гранулах. Реализация рост-стимулирующего эффекта требует дегрануляции через активацию тромбоцитов *in situ* или *in vitro* путем, например, лизиса. При этом длительность сохранения депо ростостимулирующих факторов ограничена временем их элиминации или распада [6, 12].

Тромбоциты выделяют и концентрируют из венозной крови, собранной в вакуумные пробирки с ЕДТА, в два этапа. На первом – кровь разделяют на компоненты центрифугированием 5 минут с ускорением 300g. Затем всю супернатантную плазму с тромбоцитами из пробирок с ЕДТА переносят в стерильные центрифужные (тип Falcon) или «сухие» вакуумные пробирки. На втором этапе тромбоциты концентрируют центрифугированием 17 минут с ускорением 700 g. Затем из пробирки удаляют всю бедную тромбоцитами плазму и вносят стерильный 0,9 % раствор NaCl в объеме, равном 1/10

исходного количества крови. Для завершения получения концентрата отмытых тромбоцитов (ОтмТр) осадок клеток ресуспендируют в растворе.

Далее концентрат отмытых тромбоцитов можно использовать для насыщения трансплантата как есть с последующей активацией дегрануляции клеток *in situ* либо получения бесклеточного лизата *in vitro*.

Лизис отмытых тромбоцитов проводят путем быстрого замораживания биоматериала до $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ и медленного размораживания при $+2-6\text{ }^{\circ}\text{C}$. Затем для осаждения разрушенных клеток пробирку центрифугируют 20 минут с ускорением 3000 g и температурой в камере $8\text{ }^{\circ}\text{C}$. Бесклеточный супернатант, насыщенный ростовыми факторами из лизированных отмытых тромбоцитов, аккуратно переносят в новую стерильную пробирку.

Насыщение концентратом отмытых тромбоцитов или его лизатом может быть выполнено как до установки трансплантата костной ткани, так и после. В обоих случаях концентрат или его лизат набирают в шприц и затем через иглу вводят внутрь костной ткани.

4. Заключение

Представленные в настоящих рекомендациях способы потенцирования кондуктивных и индуктивных свойств клеток подразумевают использование стандартного медицинского оборудования, которым может быть оснащено любое ЛПУ. Методика получения тромбоцитных препаратов является простой и широкодоступной в практике ЛПУ. На сегодняшний день есть уже большое число экспериментальных работ, где показана эффективность комбинации костных трансплантатов и тромбоцитных препаратов. Преимуществом использования тромбоцитов является возможность получить большое число ростовых факторов и других биологически активных веществ без использования культур клеток. В литературе неоднократно описана возможность заселения модифицированных костных трансплантатов мультипотентными мезенхимными стромальными клетками, способными

осуществлять конститутивный (постоянный) синтез ростовых факторов [3, 13, 18]. Также такой подход позволяет запустить остеогенную дифференцировку мультипотентных клеток. Однако в настоящий момент клиническое применение клеточных линий в РФ регулируется Федеральным законом от 23.06.2016 №180-ФЗ «О биомедицинских клеточных продуктах (БМКП)», который требует обязательную регистрацию БМКП, обучение медицинских работников по соответствующей дополнительной профессиональной программе (программе повышения квалификации).

Альтернативным вариантом являются минимально-манипулированные клетки. Название отражает процесс их получения – только выделение из биоматериала без масштабирования в искусственных условиях и/или изменения биологических характеристик. Благодаря этому ряд методик позволяет при заборе биоматериала в начале операции выделить из него необходимые клетки уже к моменту установки костного имплантата. При этом дополнительное использование методов иммуномагнитной сепарации обеспечивает возможность сформировать препарат из клеток с одним фенотипом.

В настоящее время основными источниками получения минимально-манипулированных клеток рассматривают костный мозг и подкожно-жировую клетчатку.

5. Блок-схема модификации трансплантатов костной ткани

5.1. Потенцирование кондуктивных свойств

Ручной способ насыщения трансплантата губчатой кости золем с концентрацией коллагена до 0,8 % -----	Автоматизированный способ насыщения трансплантата губчатой, компактной костной ткани или их сочетания золем с концентрацией коллагена до 1,3 %. -----
<ol style="list-style-type: none">1. В трансплантате дрелью формируют сквозные отверстия диаметром 2 мм в различных направлениях.2. Трансплантат помещают емкость с золем коллагена до полного погружения.3. Дополнительно шприцем (без иглы) прокачивают золь с коллагеном через отверстия в трансплантате.	<ol style="list-style-type: none">1. В компактной костной ткани трансплантатов дрелью формируют отверстия диаметром 2 мм в шахматном порядке с плотностью 5 отверстий на 6,25 см² поверхности трансплантата. Если образец образован только губчатой костной тканью, отверстия не формируют.2. Трансплантат помещают в контейнер с золем коллагена до полного погружения.3. Контейнер с золем и трансплантатом герметично закрывают и центрифугируют 20 минут. При концентрации золя коллагена 0,6–0,79 % ускорение задают 100 g, при 0,8–0,99 % – 300 g, при 1,0–1,19 % – 700 g; при 1,2 – 1,3 % – 1300g.
<p>Лиофилизация. Трансплантат замораживают до -40 °С. Лиофилизируют в вакууме с прогреванием до температуры +36 °С.</p>	
<p>Стерилизация. Лиофилизированный трансплантат стерилизуют ионизирующим излучением (2,5 кГр).</p>	

5.2. Увеличение индуктивных свойств трансплантатов

Получение концентрата отмытых тромбоцитов

1. Кровь забирают из кубитальной вены в стерильные одноразовые вакуумные пробирки с ЭДТА.
2. Кровь в пробирке разделяют на компоненты путем центрифугирования 5 минут с ускорением 300 g. Затем всю супернатантную плазму с тромбоцитами стерильной пипеткой или шприцем с иглой отбирают и переносят в новые стерильные пробирки (сухие, без каких-либо добавок).
3. В пробирках с плазмой осаждают тромбоциты путем центрифугирования 17 минут с ускорением 700 g. Затем всю обедненную клетками плазму удаляют, а к осадку тромбоцитов вносят 0,9 % раствор NaCl в объеме, равном 1/10 забранной крови. Осадок клеток ресуспендируют до полного исчезновения тромбоцитарных конгломератов.

Лизис отмытых тромбоцитов

- Пробирки с концентратом отмытых тромбоцитов замораживают до температуры -40°C .
- Размораживают пробы при $+4^{\circ}\text{C}$.
- Пробирки центрифугируют 20 минут при 3000 g. Супернатант отбирают и используют для работы

Совмещение тромбоцитных препаратов и трансплантатов костной ткани

- Концентрат отмытых тромбоцитов или его лизат набирают в шприц с иглой.
- Вводят тромбоцитный препарат в трансплантат костной ткани через губчатое вещество, спил или ранее сформированные дополнительные перфорации. Пасыщение трансплантата может быть выполнено как до его установки, так и после.

6. Литература

1. Боровкова Н. В., Макаров М. С., Андреев Ю. В., Сторожева М. В., Пономарев И. Н. Оценка цитокинового состава сыворотки крови и препаратов на основе тромбоцитов человека // Молекулярная медицина. 2021. Т. 19, № 3. С. 51-57.
2. Воробьев К. А., Божкова С. А., Тихилов Р. М., Черный А. Ж. Современные способы обработки и стерилизации аллогенных костных тканей (обзор литературы). Травматология и ортопедия России. 2017. Т. 23. № 3. С.134-147.
3. Деркачев, В. С. Мезенхимальные стволовые клетки в регенерации дефектов костной ткани [Текст] / В. С. Деркачев, С. А. Алексеев, Д. В. Деркачев [и др.] // Actual Science. 2016. Т. 2, № 10. С. 37-39.
4. Кореньков, Д. А. Роль микрочастиц в межклеточной коммуникации [Текст] / Д. А. Кореньков, О. М. Овчинникова, С. А. Сельков [и др.] // Цитология. 2014. Т. 56, № 7. С. 480-488.
5. Кирилова И. А., Садовой М. А., Подорожная В. Т. Сравнительная характеристика материалов для костной пластики: состав и свойства. Хирургия позвоночника. 2012. № 3. С. 72-83.
6. Макаров, М. С. Особенности морфофункционального статуса тромбоцитов человека в норме и патологии [Текст]: Дис. ... канд. биол. наук: 14.01.21 – Гематология и переливание крови / Макаров Максим Сергеевич – М., 2014. – 124 с.
7. Савельев В. И., Булатов А. А. Деминерализованная костная ткань в травматологии и ортопедии. Руководство для врачей Травматология и ортопедия. Том IV. – СПб.: Изд-во «Гиппократ», 2004. С. 265-293.
8. Хватов В. Б., Свищев А. В., Ваза А. Ю., Боровкова Н. В., Миронов А. С., Похитонов Д. Ю., Андреев Ю. В. Способ изготовления лиофилизированного аллотрансплантата кости // Трансплантология. 2016. № 1. С. 13-18.

9. Agarwal A., Manjunath R.G.S., Sethi P. Platelet-rich fibrin in combination with decalcified freeze-dried bone allograft for the management of mandibular degree II furcation defect: A randomised controlled clinical trial // Singapore Dent J. 2019. Vol. 39, № 1. P. 33-40.
10. Carulli C., Matassi F., Civinini R. [et al.] Tissue engineering applications in the management of bone loss // Innocenti M. Clin Cases Miner Bone Metab. 2013. Vol. 10, № 1. P. 22-25.
11. Chang S.-H., Hsu Y.-M., Wang Y. J., Tsao Y.-P., Tung K.-Y., Wang T.-Y., Fabrication of pre-determined shape of bone segment with collagen-hydroxyapatite scaffold and autogenous platelet-rich plasma // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2009. Vol. 20, № 1, P. 23-31.
12. Civinini R., Macera A., Nistri L. [et al.] The use of autologous blood-derived growth factors in bone regeneration // Clinical Cases in Mineral and Bone Metabolism. 2011. Vol. 8, № 1. P. 25-31.
13. Ferreira J.R., Teixeira G.Q., Santos S.G. [et al.] Mesenchymal stromal cell secretome: influencing therapeutic potential by cellular pre-conditioning // Front Immunol. 2018. № 9. P. 28-37.
14. Jiang H., Rhee S., Ho C.-H., Grinnell, F. Distinguishing fibroblast promigratory and procontractile growth factor environments in 3D collagen matrices // FASEB J. 2008. Vol.22. P. 2151–2160.
15. Kempen D.H., Creemers L.B., Alblas J. [et al.]. Growth factor interactions in bone regeneration // Tissue Eng Part B Rev. 2010. Vol.16, № 6. P. 551-566.
16. Marcazzan S., Weinstein R.L., Del Fabbro M. Efficacy of platelets in bone healing: A systematic review on animal studies // Platelets. 2018. Vol.29, №4. P. 326-337.
17. Park K. Chitosan-gelatin-platelet gel composite scaffold for bone regeneration // J Control Release. 2017. № 254. P. 137.
18. Ponte A.L., Marais E., Gallay N. [et al.] The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: comparison of chemokine

- and growth factor chemotactic activities // *Stem Cells*. 2007. № 25. P. 1737-1745.
19. Pedersen J.A., Boschetti F., Swartz M.A. Effects of extracellular fiber architecture on cell membrane shear stress in a 3D fibrous matrix // *J. Biomech*. 2007. Vol. 40. P. 1484--1492.
20. Tanaka H., Toyoshima T., Atsuta I. [et al.] Additional Effects of Platelet-Rich Fibrin on Bone Regeneration in Sinus Augmentation With Deproteinized Bovine Bone Mineral: Preliminary Results // *Implant Dent*. 2015. Vol. 24. № 6. P. 669-674.
21. Yoshida K., Sumita Y., Marukawa E. [et al.] Effect of platelet-rich plasma on bone engineering with an alloplastic substitute containing BMP2 // *Biomed Mater Eng*. 2013. Vol. 23. № 3. P. 163-172.