

For citation. Chueshova N. V., Cheshik I. A., Nadyrov E. A., Nikolaev V. I., Kirilenko S. I., Rozhin V. V., Kondrachuk A. N., Serdyuchenko N. S. Analysis of the cellular composition of the native auto-transplantation mixture used for plastics of bone tissue defects. *Doklady Natsional'noi akademii nauk Belarusi = Doklady of the National Academy of Sciences of Belarus*, 2021, vol. 65, no. 6, pp. 715–723 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1561-8323-2021-65-6-715-723>

Введение. Костная пластика является ключевым этапом ряда операций, выполняемых в травматолого-ортопедических, нейрохирургических, челюстно-лицевых отделениях. В качестве пластического материала может быть использован костный аутооттрансплантат, аллотрансплантат, ксенотрансплантат, синтетическая костная ткань и ее производные [1; 2]. Каждая группа трансплантатов имеет свои плюсы и минусы, в настоящее время не существует «идеального» трансплантата, который имел бы явные преимущества перед остальными. По этой причине проводятся многочисленные исследования по разработке универсального или подходящего для конкретного оперативного вмешательства трансплантата.

Метод костной пластики местным аутооттрансплантатом в виде костной стружки используется в основном в челюстно-лицевой хирургии, где костная ткань после рассверливания канала используется для подготовки ложа перед имплантацией штифта. Для сбора костной стружки разработаны и запатентованы специальные устройства, представляющие из себя колбы с фильтрующим элементом внутри [3–5].

Большая часть исследований костной стружки сводится к изучению ее гистологического строения и характеризуют ее как остеогенную ткань благодаря наличию сохранившихся остеобластов и остеоцитов [6; 7]. Реже костная стружка используется в нейрохирургии, травматологии и ортопедии. Ряд исследований не нашел преимуществ у костной стружки против местного трансплантата в виде костных чипсов, но и не выявил отрицательных сторон у этого вида трансплантата. Проводилось гистологическое изучение костной стружки, полученной при резекции костной ткани позвонка, результаты которого были аналогичными исследованиям при резекции костной ткани верхней и нижней челюстей. Исследование жизнеспособности остеобластов костных чипсов культуральным методом показало значительное превосходство их остеогенных свойств по сравнению с остеобластами костной стружки (100 % пассаж остеобластов в течение в среднем 5,6 суток по сравнению с 57 % пассажа в среднем за 14,8 дней). Неоднозначность полученных данных в различных исследованиях как *in vitro*, так и *in vivo* не позволяет сделать заключение об эффективности данного вида костной пластики и требует дальнейшего изучения этого вида трансплантата [8; 9].

Для исключения осложнений, связанных с забором аутооттрансплантата, сокращения числа случаев использования аллокости и улучшения результатов костной пластики, нами разработан метод получения нативной трансплантационной аутосмеси (НТА) – гетерогенной пластинчатой массы, состоящей преимущественно из костных балок с остеобластами, очагов лимфоидного и миелоидного кроветворения и, возможно, мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК) пациента [10; 11].

ММСК обладают значительной пластичностью и способностью дифференцироваться в различные типы клеточных линий: жировую, хондрогенную, остеогенную, миогенную и в другие направления дифференцировки [12]. Учитывая характер получения НТА (механическое, термическое воздействие), обоснован вопрос об оценке жизнеспособности предложенного трансплантата. Одним из таких показателей является выживаемость клеток НТА в течение нескольких суток (когда начинается врастание вновь образованных кровеносных сосудов) и, в частности, выделенных из нее ММСК – клеток предшественников остеобластов, которые должны определять остеогенный эффект костной пластики.

Цель работы – определить иммунофенотипические характеристики клеток нативной трансплантационной аутосмеси и их выживаемость в различные сроки наблюдения.

Материалы и методы исследования. Источником костного аутооттрансплантата являлась НТА, полученная в результате фильтрации аспирата из раны, образующегося при резекции костной ткани хирургической высокооборотистой костной фрезой. На первом этапе образуется гетерогенная жидкая масса, на втором – под воздействием вакуума осуществляется аспирация этой массы из раны в «устройство для фильтрации костной стружки», в котором происходит ее сепарация.

рация на жидкую и условно твердую составляющие (пат. ВУ № 11383, пат. ВУ № 22923). После окончания работы костной фрезой, фильтр отсоединяется от вакуума, разбирается. Из фильтрующего элемента извлекается пластичная гетерогенная масса красного цвета – НТА, которая представляет из себя фрагменты разрушенной кости, красный и желтый костный мозг, соединительную ткань, периферическую кровь. НТА сохраняется в стерильных условиях во влажной среде до выполнения костной пластики [10; 11].

Для оценки жизнеспособности клеточного состава полученную НТА измельчали в 10 %-ной сыворотке крупного рогатого скота и фильтровали через нейлоновый фильтр с диаметром пор 70 мкм (Sarstedt, Германия). Фильтрат переносили в стерильные полипропиленовые пробирки (15 мл), содержащие 10 мл полной культуральной среды (RPMI; 25 мМНЕРЕС; 100 Ед/мл пенициллин; 100 мкг/мл стрептомицин; 0,25 мкг/мл амфотерицин-В; 10 % инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, NuClon) и инкубировали при 37 °С в CO₂-инкубаторе [13]. На 1-е, 2-е и 3-и сутки проводили анализ жизнеспособности суспензии клеток НТА используя 5 мкл конъюгата Annexin-V-Fitc в комбинации с 10 мкл ДНК красителя – propidiumiodide (PI, 50 мкг/мл) [14].

Для гистологического исследования полученный материал фиксировали в 10 %-ном растворе нейтрального формалина в течение 48 ч. Проводка полученного материала производилась на тканевом процессоре Microm STP-120 (Thermo Scientific, Германия) по протоколу, после чего изготавливали гистологические блоки. Гистологические срезы толщиной 4–5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Цитологические препараты окрашивали и фиксировали в фиксаторе-красителе Май–Грюнвальд, затем окрашивали по Романовскому–Гимзе. Всего было исследовано 8 образцов НТА от пациентов в возрасте от 35 до 60 лет.

Изучение клеточного состава НТА проводили путем изучения ММСК, полученных из фильтрата НТА. Протокол выделения ММСК включал несколько последовательных стадий. Костный материал подвергали ферментативной обработке в течение 40 мин 0,1 %-ной коллагеназой I типа. Полученную клеточную взвесь промывали фосфатным буфером с 10 %-ной эмбриональной телячьей сывороткой (FBS, Химмедсинтез) и фильтровали. Фильтрат центрифугировали на градиенте плотности Histopaque-1077 (плотность 1,077 г/мл) при комнатной температуре в течение 30 мин при 600 g, в результате чего получали кольцо мононуклеарных клеток. Полученную суспензию клеток однократно отмывали в среде DNEM/F-12 путем центрифугирования при 300 g в течение 5 мин. Осадок клеток ресуспензировали в полной культуральной среде DNEM/F-12 с 10 % FBS. Клетки культивировали во флаконах T-75 в CO₂-инкубаторе при 37 °С, меняя среду каждые 2–3 дня. Морфологию клеток при культивировании оценивали с помощью инвертированного микроскопа Leica DMIL (Wetzlar, GmbH). После формирования 70–80 % конфлюэнтного монослоя клетки снимались с поверхности пластика обработкой 0,25 %-ным трипсином в течение 5 мин и отмывались в растворе фосфатно-солевого буфера.

Оценку чистоты полученной культуры и идентификацию ММСК путем иммунофенотипирования клеток методом проточной цитометрии с использованием моноклональных антител – CD105, CD73, CD90, CD14, CD34, CD133 человека (Elabscience), конъюгированных с флуорохромом в концентрации 5 мкл на 10⁶ клеток. Детекцию экспрессии моноклональных антител к ММСК и анализ жизнеспособности клеток НТА проводили на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 (Beckman Coulter, США), укомплектованном аргонно-ионным лазером с длиной волны 488 нм. Измерения проводили на 10000 клеток при скорости потока не более 300 измерений/с.

Проведение исследований одобрено этическим комитетом учреждения «Гомельская областная клиническая больница» и учреждением образования «Гомельский государственный медицинский университет», исследование соответствует положениям Хельсинской декларации 1975 г.

Результаты и их обсуждение. Гистологическое исследование показало, что НТА представляет собой фрагменты костных балок с сохранившимися остеобластами по периферии (рис. 1, *a*). Кроме того, в исследуемом материале в большом количестве присутствовали очаги миелоидного и лимфоидного кроветворения (рис. 1, *b*). У пациентов в возрасте старше 40 лет наблюдалось увеличение количества липоцитов в ткани красного костного мозга. Следует отметить, что в исследуемых образцах НТА определялись мелкие очаги некрозов и отложений фибрина, что, по-видимому, было обусловлено механическим воздействием высокооборотистой хирургической костной фрезы.

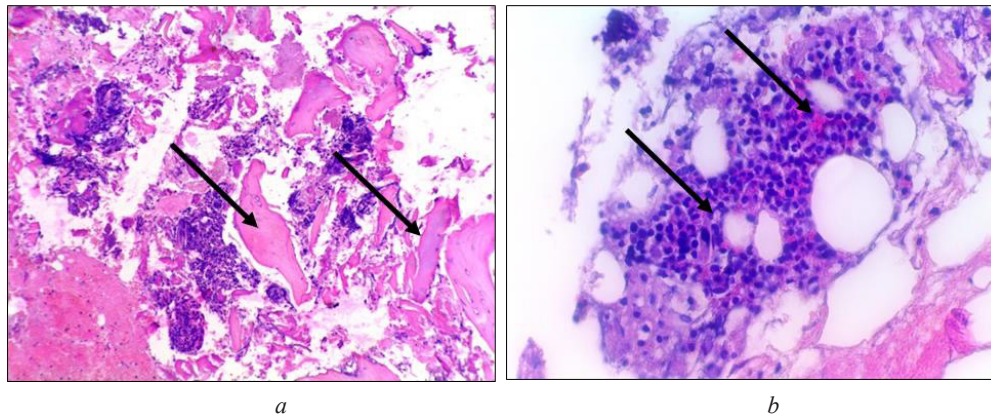


Рис. 1. Гистологическое строение костной стружки: *a* – увеличение $\times 50$; *b* – увеличение $\times 200$.
Окраска гематоксилином и эозином

Fig. 1. Histological structure of bone chips: *a* – magnification $\times 50$; *b* – magnification $\times 200$. Hematoxylin and eosin staining

Проведенное гистологическое исследование НТА позволило предположить, что указанный материал может обладать остеогенными, остеоиндуктивными и остеокондуктивными свойствами за счет наличия остеобластов, ММСК и гемопоэтических клеток, тромбоцитов и нитей фибрина.

Несмотря на множество инструментальных методов оценки жизнеспособности клеток, ДНК-проточная цитофлуориметрия обеспечивает относительно простой метод мониторинга морфофункционального состояния как популяции клеток, так и каждой клетки в отдельности путем последовательного анализа большого числа образцов. Оценка морфофункционального состояния НТА проводили методом, основанным на выявлении структурно-биохимических изменений, происходящих вне ядерного аппарата клеток трансплантата. Использование набора Annexin-V-Fitc – PI (Invitrogen) позволяет проводить оценку не только жизнеспособности клеток, но и фиксировать стадии гибели клеток путем апоптоза, основываясь на выявлении изменений архитектуры мембраны клеток [15; 16].

Цитометрический анализ жизнеспособности НТА (рис. 2) позволяет выделить четыре популяции клеток: живые клетки – An-V⁻PI⁻; клетки на ранней стадии апоптоза – An-V⁺PI⁻; поздняя стадия апоптоза и частично некротирующие клетки – An-V⁺PI⁺ и некротические клетки – An-V⁻PI⁺.

Анализ клеточного состава НТА на 1-е сутки инкубации показал высокий процент живых клеток An-V⁻PI⁻ – 98,7 %. Инкубация данной смеси на 2-е и 3-и сутки привела к незначительному снижению доли жизнеспособных клеток, что составило соответственно 97,2 и 97,7 %.

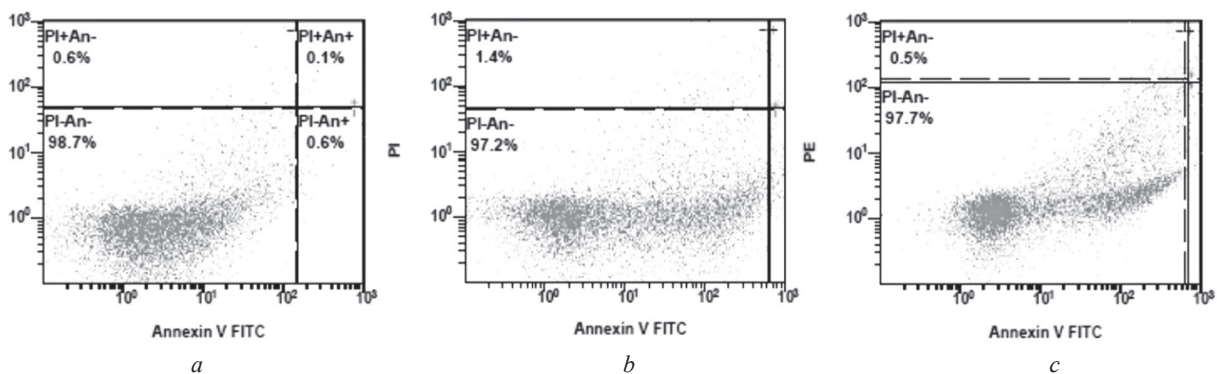


Рис. 2. Жизнеспособность клеток нативной трансплантационной аутомеси с использованием Annexin-V (An) и пропидия иодида (PI) на 1-е (*a*), 2-е (*b*) и 3-и (*c*) сутки инкубации *in vitro*

Fig. 2. Cell viability of native transplant autosuspension using Annexin-V (An) and propidium iodide (PI) at 1 (*a*), 2 (*b*), and 3 (*c*) days of incubation *in vitro*

При инкубации НТА в течение 2 суток выявлено увеличение доли An-V⁺-клеток, которая достигала 1,3 % при сравнении с 1-м и 3-м днем инкубации, что составляло соответственно 0,6 и 0,9 %. При этом доля клеток, имеющих двойное окрашивание аннексином V и йодидом пропидия (An-V⁺PI⁺) на 1-е, 2-е и 3-и сутки инкубации составила 0,1, 0,1 и 0,9 %. Учитывая особенности выделения НТА (механическое и термическое воздействие на костную ткань хирургическими фрезами) установлена довольно низкая доля PI⁺-клеток (некротические клетки) – 0,6 %, тогда как на 2-е сутки инкубации выявлено увеличение данных клеток до 1,5 %, но более длительная инкубация в течение 3 суток показала наименьшее количество некротических клеток – 0,5 %.

Таким образом, в результате проведенного анализа оценки выживаемости клеточного материала аутотрансплантата, установлена высокая устойчивость НТА к механическим и термическим воздействиям, что имеет важное значение для дальнейшего применения данного материала при аутопластике.

Для оценки характеристики клеточного состава полученного костного материала вначале получили слой мононуклеарных клеток путем градиентного центрифугирования с последующим их культивированием. В результате экспансии клеток путем пересева получили клетки, обладающие фибробластоподобной морфологией (рис. 3), которая характерна для ММСК [17].

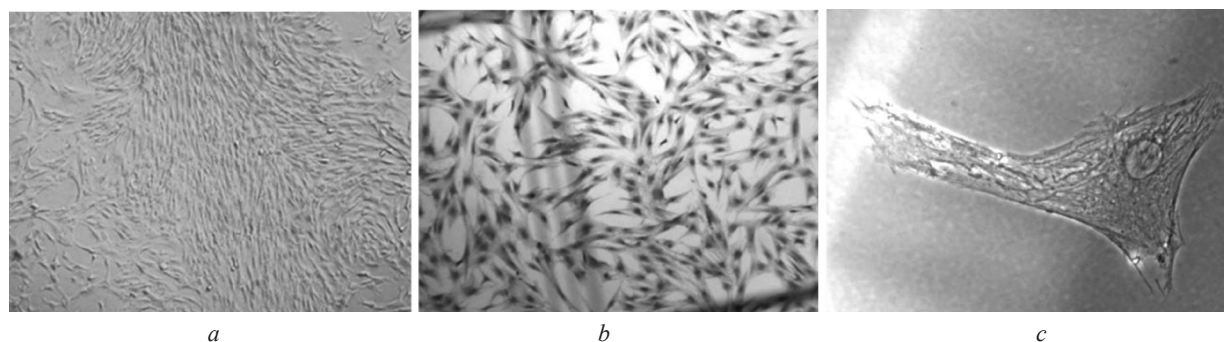


Рис. 3. Мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки на третьем пассаже: *a* – без окраски, монослой культуры, $\times 50$; *b* – окраска по Романовскому–Гимзе, монослой культуры, $\times 100$; *c* – фазовый контраст, $\times 600$

Fig. 3. Multipotent mesenchymal stromal cells at the third passage: *a* – without staining, culture monolayer, $\times 50$; *b* – Romanowsky–Giemsa staining, culture monolayer, $\times 100$; *c* – phase contrast, $\times 600$

На рис. 3 (*a*, *b*) полученный монослой клеток представлен многочисленными группами клеток, имеющих одинаковую морфологию. При фазово-контрастной микроскопии (рис. 3, *c*) можно отметить, что клетки имеют отросчатую форму, крупное ядро, содержащее одно или два ядрышка. Вокруг ядра располагается зона органелл, а в отростках клеток хорошо выявляются элементы цитоскелета. В результате получена культура клеток со структурой, имеющей сходство с ММСК красного костного мозга.

После формирования 95 %-ного конфлюэнтного монослоя, культуру обрабатывали пепсином и в результате получили суспензию клеток в количестве $10 \cdot 6/\text{мл}$, что является необходимым условием для анализа их морфологической характеристики путем иммунофенотипирования.

В настоящее время для изучения фенотипа ММСК, выделенных из костного мозга, предложено большое количество специфичных поверхностных антигенов, экспрессируемых клетками [18; 19]. В соответствии с рекомендациями международного сообщества по клеточной терапии (International Society for Cellular Therapy) фенотип ММСК определяется экспрессией CD73, CD90, CD105 и отсутствием маркеров гемопоэтического звена, например, CD14, CD34, CD133 и т. д. Считается, что чистая культура ММСК может быть получена на 2–3 пассаже. В связи с этим иммунофенотипирование (уровень экспрессии) клеток проводили на культурах клеток 3-го пассажа с использованием поверхностных маркеров – CD14, CD34, CD133, CD73, CD90, CD105 (рис. 4).

Выбор негативных моноклональных антител был обоснован тем, что ММСК не экспрессируют CD14 (маркер моноцитов и макрофагов), CD34 (маркер гемопоэтических клеток) и CD133 (маркер гемопоэтических и эндотелиальных стволовых клеток). К настоящему времени выявлено

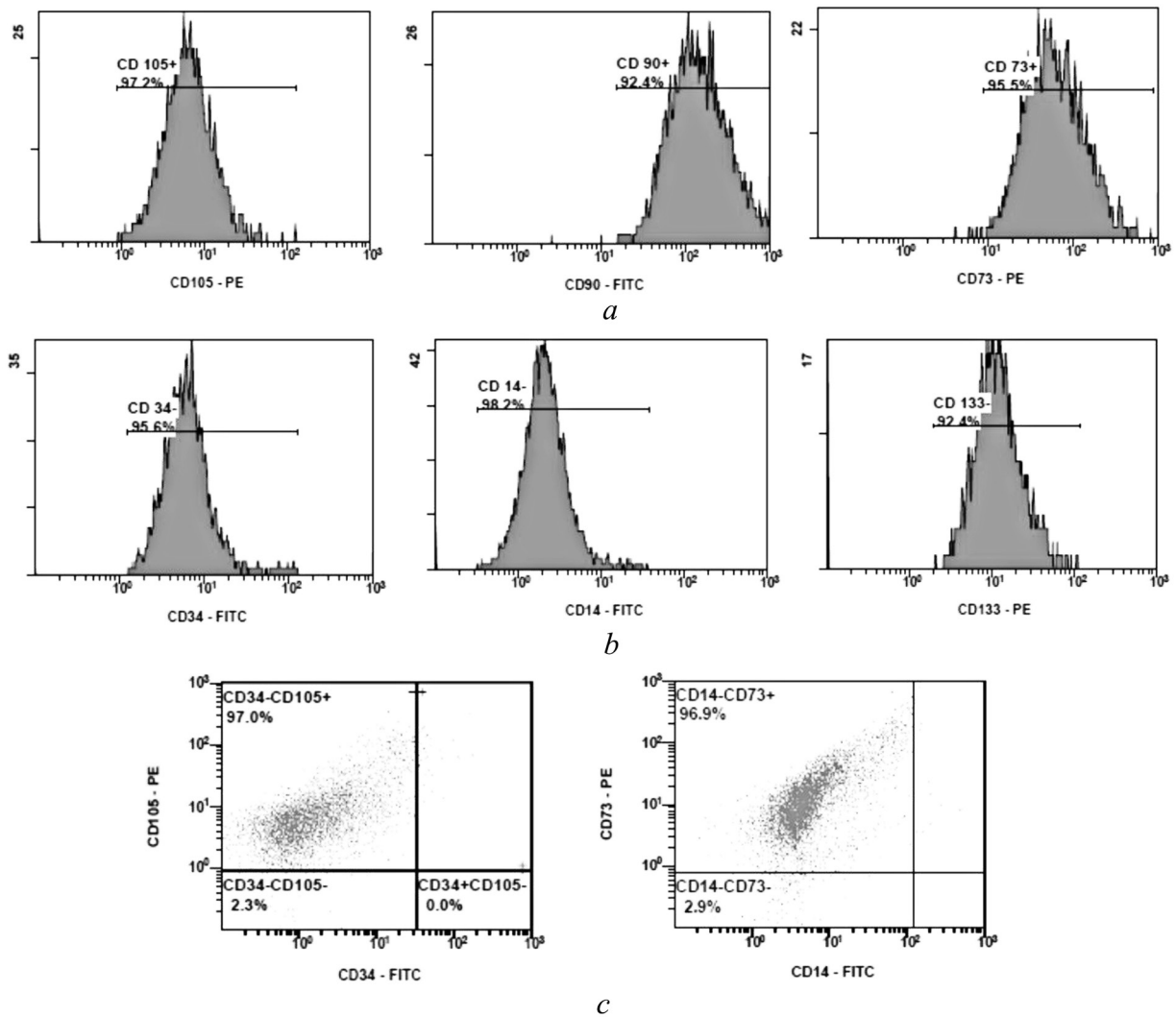


Рис. 4. Гистограммы экспрессии мембранных антигенов культуры мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток нативной трансплантационной аутомесеси: *a* – иммунофенотип ММСК экспрессирован антигенами CD105, CD90 и CD73; *b* – не экспрессированы маркеры кроветворных клеток CD34, CD14 и CD133; *c* – двумерная гистограмма популяции клеток с фенотипом CD34⁻/CD105⁺ и CD14⁻/CD73⁺

Fig. 4. Histograms of expression of membrane antigens of the culture of multipotent mesenchymal stromal cells of the native transplant auto-mixture: *a* – MMSC immunophenotype expressed by antigens CD105, CD90 and CD73; *b* – markers of hematopoietic cells CD34, CD14, and CD133 are not expressed; *c* – two-dimensional histogram population cells with CD34⁻/CD105⁺ and CD14⁻/CD73⁺ phenotype

множество позитивных маркеров ММСК, тем не менее поиск универсальных маркеров усложняется прогениторной способностью клеток в osteo-, chondro- и adipogenic направлении и набор маркеров должен определяться в соответствии с поставленными задачами для изоляции и очистки культуры ММСК [20]. Для идентификации ММСК (рис. 4) нами подобран минимальный набор маркеров – CD73, CD90, CD105, уровень экспрессии которых служит отражением плотности изучаемого антигена на поверхности ММСК, что может свидетельствовать об их функциональном состоянии и иметь существенное значение при терапевтическом применении.

Цитофлуориметрический анализ профиля культуры клеток 3-го пассажа показал высокий уровень экспрессии поверхностных маркеров CD105, CD90, CD73 и отсутствие гемопоэтических маркеров CD14, CD34, CD133, что соответствует данным, приведенным другими авторами [21]. Популяция клеток с фенотипом CD90, CD73, CD105 составила соответственно 92,4, 95,5 и 97,2 %, тогда как в культурах наблюдалась низкая детекция гемопоэтических маркеров CD34 – 4,4 %, CD14 – 1,8 % и CD133 – 1,6 %. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о фенотипе

ММСК адгезивной культуры, которые после повреждения кости и секреции в ложе трансплантата костного морфогенетического протеина ММСК НТА будут трансформироваться в остеобласты с последующим формированием новой костной ткани.

Заключение. Гистологическое исследование позволило определить в составе НТА фрагменты костных балок с сохранившимися остеобластами, очаги миелоидного и лимфоидного кровотока и отложения фибрина, что позволило предположить наличие ММСК. В последующем при иммунофенотипировании адгезивной культуры 3-го пассажа достоверно были выделены ММСК в НТА. ДНК-проточная цитофлуориметрия НТА подтвердила практически полное сохранение жизнеспособности трансплантата на 3-и сутки (97,7 % живых клеток). Полученные данные свидетельствуют о наличии у НТА остеогенных, остеоиндуктивных, остеокондуктивных свойств и обосновывают дальнейшее ее исследование с целью использования в качестве нового способа аутопластики при хирургических вмешательствах.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Conflict of interests. The authors declare no conflict of interests.

Список использованных источников

1. Предин, Ю. А. Костные и клеточные имплантаты для замещения дефектов кости / Ю. А. Предин, В. В. Рерих // *Современные проблемы науки и образования*. – 2016. – № 6. – С. 132–146.
2. Результаты трансплантации культуры аутогенных стромальных клеток костного мозга в область краевого дефекта длинных трубчатых костей / Р. В. Деев [и др.] // *Травматология и ортопедия России*. – 2007. – № 2(44). – С. 57–63.
3. A novel method for the salvage of bone dust generated by high-speed burrs in spinal surgery / N. Heidari [et al.] // *Ann. R. Coll. Surg. Engl.* – 2007. – Vol. 89, N 5. – P. 533–534. <https://doi.org/10.1308/rcsann.2007.89.5.533>
4. Histologic evaluation of high speed burr shavings collected during spinal decompression surgery / V. V. Patel [et al.] // *Orthopedics*. – 2009. – Vol. 32, N 1. – P. 23. <https://doi.org/10.3928/01477447-20090101-17>
5. Ekanayake J. Use of the novel ANSPACH bone collector for bone autograft in anterior cervical discectomy and cage fusion / J. Ekanayake, A. Shad // *Acta Neurochirurgica*. – 2009. – Vol. 152, N 4. – P. 651–653. <https://doi.org/10.1007/s00701-009-0513-0>
6. Blay, A. Viability of autogenous bone grafts obtained by using bone collectors: histological and microbiological study / A. Blay, S. Tunchel, W. R. Sendyk // *Pesqui. Odontol. Bras.* – 2003. – Vol. 17, N 3. – P. 234–240. <https://doi.org/10.1590/s1517-74912003000300007>
7. Autologous bone graft harvested during implant site preparation: histological study / M. Santagata [et al.] // *Plast Aesthet. Res.* – 2014. – Vol. 1, N 3. – P. 94–97. <https://doi.org/10.4103/2347-9264.143553>
8. Autografts for spinal fusion: osteogenic potential of laminectomy bone chips and bone shavings collected via high speed drill / C. Eder [et al.] // *Eur. Spine J.* – 2011. – Vol. 20, N 11. – P. 1791–1795. <https://doi.org/10.1007/s00586-011-1736-3>
9. Comparative study between cortical bone grafts versus bone dust for reconstruction of cranial burr holes / V. P. Worm [et al.] // *Surg. Neurol. Int.* – 2010. – Vol. 1, N 1. – P. 91. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.74160>
10. Устройство для фильтрации костной стружки / С. И. Кириленко [и др.] // *Ортопедия, травматология и протезирование*. – 2020. – № 2. – С. 75–79. <https://doi.org/10.15674/0030-59872020275-79>
11. Костно-пластические материалы для выполнения спондилодеза / В. В. Рожин [и др.] // *Проблемы здоровья и экологии*. – 2019. – № 2(60). – С. 13–19.
12. Mesenchymal stromal/stem cells in regenerative medicine and tissue engineering / R. E. B. Fitzsimmons [et al.] // *Stem. Cells International*. – 2018. – Vol. 2018. – P. 1–16. <https://doi.org/10.1155/2018/8031718>
13. Pittenger, M. F. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow / M. F. Pittenger // *Mesenchymal stem cells: methods and protocol* / eds. D. J. Prockop, D. G. Phinney, B. A. Bunnell. – Humana Press, 2008. – P. 27–44. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-169-1_2
14. Kode, J. Mesenchymal stromal cells and their clinical applications / J. Kode, V. Tanavde // *Applications of Flow Cytometry in Stem Cell Research and Tissue Regeneration* / ed. A. Krishan, H. Krishnamurthy, S. Totey. – Bangalore, 2010. – P. 175–188. <https://doi.org/10.1002/9780470631119.ch12>
15. Проточная цитометрия в медицине и биологии / А. В. Зурочка [и др.]. – 2-е изд. – Екатеринбург, 2014. – 576 с.
16. Warnes, G. The multiplexing of assays for the measurement of early stages of apoptosis by polychromatic flow cytometry / G. Warnes // *Flow cytometry – Select topics*. – London, 2016. – P. 85–99. <https://doi.org/10.5772/60549>
17. Isolation, characterization, differentiation and immunomodulatory capacity of mesenchymal stromal/stem cells from human perirenal adipose tissue / P. C. Baer [et al.] // *Cells*. – 2019. – Vol. 8, N 11. – Art. 1346. <https://doi.org/10.3390/cells8111346>
18. Пулин, А. А. Поверхностные маркеры, характеризующие мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки (ММСК) костного мозга человека / А. А. Пулин, И. Н. Сабурова, В. С. Репин // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2008. – Т. 3, № 3. – С. 25–30.
19. Шахпазян, Н. К. Мезенхимальные стволовые клетки из различных тканей человека: биологические свойства, оценка качества и безопасности для клинического применения / Н. К. Шахпазян, Т. А. Астрелина, М. В. Яковлева // *Клеточная трансплантология и тканевая инженерия*. – 2012. – Т. 7, № 1. – С. 23–33.

20. Adult Mesenchymal stem cells and cell surface characterization – A systematic review of the literature / P. Mafi [et al.] // *Open Orthopaedics J.* – 2011. – Vol. 5, N 1. – P. 253–260. <https://doi.org/10.2174/1874325001105010253>

21. Рылова, Ю. В. Воздействие цисплатина на мультипотентные мезенхимальные стромальные клетки жировой ткани человека при различном уровне кислорода / Ю. В. Рылова, Л. Б. Буравкова, Б. Д. Животовский // *Вестн. Рос. акад. мед. наук.* – 2016. – Т. 71, № 2. – С. 114–120. <https://doi.org/10.15690/vramn614>

References

1. Predein Y. A., Rerikh V. V. Bone and cellular implants for replacement bone defects. *Sovremennyye problemy nauki i obrazovaniya = Modern problems of science and education*, 2016, no. 6, pp. 132–146 (in Russian).

2. Deev R. V., Tsupkina N. V., Ivanov D. E., Nikolaenko N. S., Dulaev A. K., Gololobov V. G., Pinaev G. P. The results of the crop transplantation of autogenic brain stromal cells in the region of the regional defect of long tubular bones. *Travmatologiya i ortopediya Rossii = Traumatology and Orthopedics of Russia*, 2007, no. 2(44), pp. 57–63 (in Russian).

3. Heidari N., John C., Agyare K., Tucker S. A novel method for the salvage of bone dust generated by high-speed burrs in spinal surgery. *Annals of The Royal College of Surgeons of England*, 2007, vol. 89, no. 5, pp. 533–534. <https://doi.org/10.1308/rcsann.2007.89.5.533>

4. Patel V. V., Estes S. M., Naar E. M., Lindley E. M., Burger E. Histologic evaluation of high speed burr shavings collected during spinal decompression surgery. *Orthopedics*, 2009, vol. 32, no. 1, pp. 23. <https://doi.org/10.3928/01477447-20090101-17>

5. Ekanayake J., Shad A. Use of the novel ANSPACH bone collector for bone autograft in anterior cervical discectomy and cage fusion. *Acta Neurochirurgica*, 2009, vol. 152, no. 4, pp. 651–653. <https://doi.org/10.1007/s00701-009-0513-0>

6. Blay A., Tunchel S., Sendyk W. R. Viability of autogenous bone grafts obtained by using bone collectors: histological and microbiological study. *Pesquisa Odontologica Brasileira*, 2003, vol. 17, no. 3, pp. 234–240. <https://doi.org/10.1590/s1517-74912003000300007>

7. Santagata M., Tartaro G., Tozzi U., D'Amato S., Prisco R. V. E. Autologous bone graft harvested during implant site preparation: histological study. *Plastic and Aesthetic Research*, 2014, vol. 1, no. 3, pp. 94–97. <https://doi.org/10.4103/2347-9264.143553>

8. Eder C., Chavanne A., Meissner J., Bretschneider W., Tuschel A., Becker P., Ogon M. Autografts for spinal fusion: osteogenic potential of laminectomy bone chips and bone shavings collected via high speed drill. *European Spine Journal*, 2011, vol. 20, no. 11, pp. 1791–1795. <https://doi.org/10.1007/s00586-011-1736-3>

9. Worm P. V., Ferreira N. P., Faria M. B., Ferreira M. P., Kraemer J. L., Collares M. V. M. Comparative study between cortical bone graft versus bone dust for reconstruction of cranial burr holes. *Surgical Neurology International*, 2010, vol. 1, no. 1, pp. 91. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.74160>

10. Kirilenko S. I., Rozhin V. V., Nadyrov E. A., Nikolaev V. I., Mazurenko A. N., Dobysh A. A. Device for bone chips filtration. *Ortopediya, travmatologiya i protezirovanie = Orthopedics, traumatology and prosthetics*, 2020, no. 2, pp. 75–79 (in Russian). <https://doi.org/10.15674/0030-59872020275-79>

11. Rozhin V. V., Kirilenko S. I., Nadirov E. A., Nikolaev V. I. Grafts used for spine fusion formation. *Problemy zdoroviya i ekologii = Health and Ecology Problems*, 2019, no. 2(60), pp. 13–19 (in Russian).

12. Fitzsimmons R. E. B., Mazurek M. S., Soos A., Simmons C. A. Mesenchymal stromal/stem cells in regenerative medicine and tissue engineering. *Stem Cells International*, 2018, vol. 2018, pp. 1–16. <https://doi.org/10.1155/2018/8031718>

13. Pittenger M. F. Mesenchymal stem cells from adult bone marrow. Prockop D. J., Phinney D. G., Bunnell B. A., eds. *Mesenchymal stem cells: methods and protocol*. Humana Press, 2008, pp. 27–44. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-169-1_2

14. Kode J., Tanavde V. Mesenchymal stromal cells and their clinical applications. Krishan A., Krishnamurthy H., Totey S., ed. *Applications of Flow Cytometry in Stem Cell Research and Tissue Regeneration*. Bangalore, 2010, pp. 175–188. <https://doi.org/10.1002/9780470631119.ch12>

15. Zurochka A. V., Xajdukov S. V., Kudryavcev I. V., Chereshev V. A. *Flow cytometry in medicine and biology*. 2nd ed. Ekaterinburg, 2014. 574 p. (in Russian).

16. Warnes G. The multiplexing of assays for the measurement of early stages of apoptosis by polychromatic flow cytometry. *Flow cytometry – Select topics*. London, 2016, pp. 85–99. <https://doi.org/10.5772/60549>

17. Baer P. C., Koch B., Hickmann E., Schubert R., Cinatl J., Hauser I. A., Geiger H. Isolation, characterization, differentiation and immunomodulatory capacity of mesenchymal stromal/stem cells from human perirenal adipose tissue. *Cells*, 2019, vol. 8, no. 11, art. 1346. <https://doi.org/10.3390/cells8111346>

18. Pulin A. A., Saburina I. N., Repin V. S. Surface markers of human bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya [Cell transplantology and tissue engineering]*, 2008, vol. 3, no. 3, pp. 25–30 (in Russian).

19. Shachpazyan N. K., Astrelina T. A., Yakovleva M. V. Mesenchymal stem cells from various human tissues: biological properties, assessment of quality and safety for clinical use. *Kletochnaya transplantologiya i tkanevaya inzheneriya [Cell transplantology and tissue engineering]*, 2012, vol. 7, no. 1, pp. 23–33.

20. Mafi P., Hindocha S., Mafi R., Griffin M., Khan W. S. Adult Mesenchymal stem cells and cell surface characterization – A systematic review of the literature. *Open Orthopaedics Journal*, 2011, vol. 5, no. 1, pp. 253–260. <https://doi.org/10.2174/1874325001105010253>

21. Rylova Yu. V., Buravkova L. B., Zhivotovsky B. D. The effects of cisplatin on human adipose tissue derived mesenchymal stromal cells under different oxygen levels. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences*, 2016, vol. 71, no. 2, pp. 114–120 (in Russian). <https://doi.org/10.15690/vramn614>

Информация об авторах

Чуешова Наталья Владимировна – канд. биол. наук, заведующий отделом. Институт радиобиологии НАН Беларуси (4, ул. Федюнинского, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: natalya-chueshova@tut.by.

Чешик Игорь Анатольевич – канд. мед. наук, доцент, директор. Институт радиобиологии НАН Беларуси (4, ул. Федюнинского, 246007, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: irb@irb.basnet.by.

Надыров Эльдар Аркадьевич – канд. мед. наук, доцент. Гомельский государственный медицинский университет (5, ул. Ланге, 246000, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: nadyrov2006@rambler.ru.

Николаев Владимир Иванович – канд. мед. наук, доцент. Гомельский государственный медицинский университет (5, ул. Ланге, 246000, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: traumatology@gsmu.by.

Кириленко Сергей Иванович – канд. мед. наук, заведующий отделением. Гомельская областная клиническая больница (5, ул. Братьев Лизюковых, 246029, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: ortoped74@bk.ru.

Рожин Владимир Владимирович – врач травматолог-ортопед, нейрохирург. Гомельская областная клиническая больница (5, ул. Братьев Лизюковых, 246029, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: reghosp@mail.gome.by.

Кондрачук Алексей Николаевич – ст. науч. сотрудник. Гомельский государственный медицинский университет (5, ул. Ланге, 246000, Гомель, Республика Беларусь). E-mail: alkond@mail.ru.

Сердюченко Николай Сергеевич – член-корреспондент, д-р мед. наук, профессор, академик-секретарь. Национальная академия наук Беларуси (пр. Независимости, 66, 220072, Минск, Республика Беларусь). E-mail: lora323@mail.ru.

Information about the authors

Chueshova Nataliya V. – Ph. D. (Biology), Head of the Department. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninsky Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: natalya-chueshova@tut.by.

Cheshik Igor A. – Ph. D. (Medicine), Associate professor, Director. Institute of Radiobiology of the National Academy of Sciences of Belarus (4, Fedyuninsky Str., 246007, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: irb@irb.basnet.by.

Nadyrov Eldar A. – Ph. D. (Medicine), Associate professor. Gomel State Medical University (5, Lange Str., 246000, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: nadyrov2006@rambler.ru.

Nikolaev Vladimir I. – Ph. D. (Medicine), Associate professor. Gomel State Medical University (5, Lange Str., 246000, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: traumatology@gsmu.by.

Kirilenko Sergey I. – Ph. D. (Medicine), Head of the Department. Gomel Regional Clinical Hospital (5, Brother Lizyukov, 246029, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: ortoped74@bk.ru.

Rozhin Vladimir V. – traumatologist-orthopedist, neurosurgeon. Gomel Regional Clinical Hospital (5, Brother Lizyukov, 246029, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: reghosp@mail.gome.by.

Kondrachuk Alexey N. – Senior researcher. Gomel State Medical University (5, Lange Str., 246000, Gomel, Republic of Belarus). E-mail: alkond@mail.ru.

Serdyuchenko Nikolay S. – Corresponding Member, D. Sc. (Medicine), Professor, Academician-Secretary. National Academy of Sciences of Belarus (66, Nezavisimosti Ave., 220072, Minsk, Republic of Belarus). E-mail: lora323@mail.ru.