

на правах рукописи

Минайчев Владислав Валентинович

**Клеточные и тканевые аспекты биосовместимости
кальций-фосфатных соединений,
полученных низкотемпературным синтезом**

1.5.22. – Клеточная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Пушино – 2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук

Научный руководитель: кандидат биологических наук,
Фадеева Ирина Сергеевна

Официально оппоненты:

Бонарцев Антон Павлович, доктор биологических наук, ФГБОУ ВО Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биоинженерии, доцент

Деев Роман Вадимович, кандидат медицинских наук, доцент, ФГБНУ «Российский научный центр хирургии имени академика Б.В. Петровского», НИИ морфологии человека имени академика А.П. Авцына», первый заместитель директора

Ведущая организация:

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр травматологии и ортопедии имени Н.Н. Приорова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Защита диссертации состоится «20» июня 2024 г. в 16.00 часов на заседании Диссертационного совета 24.1.232.01 (Д 002.285.01) на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290, Московская область, г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3.

С диссертацией можно ознакомиться в Центральной библиотеке Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» по адресу: 142290 г. Пушкино, ул. Институтская, д. 3 и на сайте <https://www.pbcras.ru>

Автореферат разослан «___» _____ 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д.б.н.

Дегтярева Ольга Васильевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы

Ограниченность регенеративного потенциала костной ткани, определяет необходимость использования различных имплантов для восстановления целостности и/или утраченного объёма кости [Нои и др., 2022]. По статистике, в мире ежегодно выполняется 20 млн. ортопедических операций, 70% из которых требуют использования имплантатов для заполнения костных дефектов. Среди имплантируемых материалов наиболее широкое распространение получило использование синтетических веществ, прежде всего, на основе кальций-фосфатных соединений (КФС) [Lukina и др., 2023]. К преимуществам КФС в сравнении с другими видами остеопластических материалов относятся простота и дешевизна их синтеза, возможность получения материалов с различными прочностными характеристиками и разнообразной геометрией. Кроме того, благодаря сходству с минеральным компонентом костного матрикса КФС обладают osteoconдуктивными (способны обеспечивать адгезию, пролиферацию и миграцию клеток на своей поверхности) и osteoиндуктивными (способны стимулировать дифференцировку клеток-предшественников в клетки костной ткани) свойствами и, как следствие, способны стимулировать регенерацию костной ткани [Lu, Yu, Chen, 2018].

Однако вследствие недостатка знаний относительно влияния физико-химических свойств КФС на их биосовместимость, т.е. способности материала встраиваться в организм пациента, не вызывая местных или системных побочных эффектов, и индуцировать клеточную или тканевую реакцию, необходимую для достижения оптимального терапевтического эффекта [Williams, 2008], материалы на их основе проявляют нестабильные эффекты в организме: от регенерации костной ткани до отторжения материала организмом. Исследование биосовместимости КФС и разработка на основе полученных знаний новых высокоэффективных остеопластических материалов имеет неоспоримую научную и практическую значимость.

Получившие широкое распространение в клинической практике материалы на основе кальций-фосфатов, полученных высокотемпературным синтезом ($>1000^{\circ}\text{C}$) обладают необходимыми прочностными характеристиками, однако не способны обеспечивать регенерацию костной ткани. В связи с этим одним из рассматриваемых подходов увеличения биосовместимости КФС является их синтез в условиях, приближенных к физиологическим, в частности при низких температурах ($20\text{-}37^{\circ}\text{C}$). Однако клеточные и тканевые аспекты биосовместимости подобных материалов остаются во многом неизученными.

Цель работы заключалась в исследовании клеточных и тканевых аспектов биосовместимости кальций-фосфатных соединений, полученных низкотемпературным синтезом.

Были поставлены следующие задачи:

1. Исследовать специфику биологической реакции клеток и тканей на пастообразные кальций-фосфатные ГАп-материалы, полученные методом высоко- и низкотемпературного синтеза *in vitro* и *in vivo*;

2. Исследовать специфику биологической реакции клеток и тканей на предшественники ГАп – дигидрат дикальцийфосфата (ДКФД) и октакальций фосфат (ОКФ), а также самого ГАп, полученных методом низкотемпературного синтеза в форме порошков *in vitro* и *in vivo*;

3. Исследовать влияние частичной замены Ca^{2+} на Sr^{2+} в структуре ОКФ на его цитотоксичность *in vitro* и биосовместимые (относительно биологической безопасности) и osteoconдуктивные свойства и *in vivo*;

4. Разработать подход повышения биосовместимости КФС, полученных методом низкотемпературного синтеза, в составе композитных материалов.

Научная новизна работы

В работе показано, что уменьшение содержания кристаллической фазы в пастообразном гидратированном ГАп, полученным низкотемпературным синтезом, улучшает его биосовместимость и повышает остеокондуктивные свойства в организме. Установлено, что цитотоксический эффект *in vitro* различных КФС – предшественников ГАп, полученных низкотемпературным синтезом, более выражен для зависимых от прикрепления клеток, что может быть связано с их адгезией к клеточной поверхности. ДКФД и ОКФ проявляют признаки биосовместимости в модели гетеротопической имплантации крысам *in vivo*, но не вызывают значимых остеогенных эффектов. Введение ионов Sr^{2+} в структуру ОКФ приводит к снижению его цитотоксичности *in vitro*, повышению биологической безопасности образцов и проявлению остеокондуктивности *in vivo*. Сочетание ДКФД с деминерализованным костным позволяет получать материал с остеогенными свойствами. Полученные результаты расширяют представления о потенциале влияния кальций-фосфатных соединений, полученных низкотемпературным синтезом, на процессы биоинтеграции синтетических материалов и репаративно-регенеративных процессов остеогенеза.

Теоретическая и практическая значимость работы

Предложенные подходы к повышению биосовместимости кальций-фосфатных соединений путём их синтеза при физиологической температуре ($\leq 37^\circ\text{C}$), а также частичной замены ионов Ca^{2+} на Sr^{2+} являются основой для разработки новых osteoplastических материалов. Помимо этого, разработанный биомиметический композитный материал на основе дигидрата дикальцийфосфата и деминерализованного костного матрикса может быть предложен в качестве перспективного osteoplastического материала с автономным остеогенным эффектом.

Методология и методы исследования

Работа выполнена с использованием междисциплинарного подхода на стыке материаловедения, биофизики, клеточной биологии и физиологии, а также на основе анализа полученных множеством иных исследователей и коллективом лаборатории результатов. Для физико-химического анализа структуры и состава изучаемых материалов использовали методы рентгенофазового анализа, ИК-спектроскопии, микрокомпьютерной томографии и сканирующей электронной микроскопии. Биосовместимость материалов *in vitro* и *in vivo* исследовали такими методами, как культивирование клеток, проточная цитометрия, конфокальная и флуоресцентная микроскопии, спектрофото- и флуориметрия, работами с экспериментальными животными (методы гетеротопической имплантации лабораторным животным), дифференциальным гистохимическим анализом, световой микроскопией, цифровой обработкой микроскопических изображений, а также статистическими методами обработки данных. Эксперименты выполнены на базе Лаборатории биомедицинских технологий, Лаборатории тканевой инженерии и Лаборатории фармакологической регуляции клеточной резистентности ИТЭБ РАН, а также Лаборатории композиционных материалов №20 ИМЕТ РАН и Лаборатории биологических испытаний ФИБХ РАН. В работе использовали оборудование Центра коллективного пользования ИТЭБ РАН и ИМЕТ РАН.

Основные научные положения, выносимые на защиту:

1. Использование низкотемпературного (20°C) синтеза для получения пастообразного гидратированного ГАп-материала приводит к повышению его

остеокондуктивных свойств *in vivo*, по сравнению с пастообразным гидратированным ГАп-материалом, полученным высокотемпературным (120°C) синтезом;

2. Цитотоксические свойства негидратированных КФС, полученных низкотемпературным синтезом, более выражены по отношению к зависимым от прикрепления клеток; при этом наиболее выраженные показатели биологической безопасности и остеокондуктивности в условиях *in vitro* и *in vivo* проявляет дигидрат дикальцийфосфата;

3. Замещение ионов Ca^{2+} на Sr^{2+} в структуре октакальций фосфата позволяет значительно снизить степень цитотоксичности *in vitro* и повысить биологическую безопасность и остеокондуктивность *in vivo*;

4. Создание биомиметических композитных материалов путём комбинации низкотемпературных предшественников ГАп с деминерализованным костным матриксом позволяет повысить остеоиндуктивные и остеогенные свойства КФС.

Достоверность результатов исследования подтверждается использованием сертифицированного научного оборудования, программного обеспечения, а также передовых методик проведения экспериментов в области клеточной биологии, работы с экспериментальными животными и цифрового анализа гистологических изображений. Статистическая значимость полученных результатов подтверждена использованием репрезентативного и воспроизводимого материала с применением методов параметрической и непараметрической статистики при анализе данных.

Апробация результатов исследования. Результаты диссертационной работы были представлены на Всероссийском конгрессе молодых ученых-биологов, «Симбиоз – России-2017» (Казань, 2017), Третьем междисциплинарном молодежном научном форуме с международным участием «Новые материалы» (Москва, 2017), Международной Пущинской школе-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века» (Пущино, 2018), VI съезде биологов России (Сочи 2019), IV и V Национальном конгрессе по регенеративной медицине (Москва, 2019, 2022), III Объединенном научном форуме физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (Сочи, 2021).

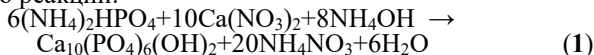
Личный вклад автора. Все представленные в диссертации результаты, получены автором лично, либо при его непосредственном участии. Автор диссертационной работы совместно с научным руководителем участвовал в формулировании целей и задач исследования, планировании и проведении экспериментальной работы и анализе полученных результатов. Автору диссертационной работы принадлежит ключевая роль в выполнении экспериментов, обработке полученных данных, представлении и апробации результатов исследований на научных конференциях и подготовке научных публикаций по выполненной работе.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 20 работ: 8 статей в журналах, входящих в перечень ВАК РФ, Web of Science и Scopus, 11 тезисов докладов на научных конференциях всероссийского и международного уровней и 1 патент на изобретение РФ.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов, методов исследования, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 153 страницах, содержит 45 рисунков и 4 таблицы. Список цитируемой литературы включает 324 источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Кальций-фосфатные материалы. Гидратированную кальций фосфатную пасту, подвергшуюся высокотемпературной (120°С) обработке (гКФП-ВТ), синтезировали в ФГБУН Институт биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН. гКФП-ВТ получали с использованием механоакустической активации в роторно-пульсационном (ООО НПП «Авиатехника») по реакции:

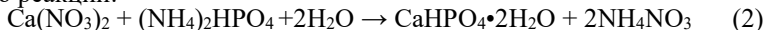


Для удаления нитрата аммония применялась четырёхкратная промывка с применением центрифугирования и последующей сушкой при 120°С в течение 3 часов. Рентгено-фазовый анализ (РФА) показал высокую степень кристалличности материала с рефлексами, характерными для ГАп.

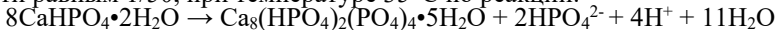
Остальные КФС синтезировали в ФГБУН Институт материаловедения и металлургии им. А.А. Байкова. Для низкотемпературного синтеза гидратированной кальций-фосфатной пасты (гКФП-НТ) использовали жидкофазный метод осаждения ГАп из раствора по реакции (1). гКФП-НТ синтезировали постепенным смешиванием (1:1) растворов фосфата аммония (0,6М) и нитрата кальция (1М) при постоянном перемешивании. Значение рН поддерживали в диапазоне 10,5-11,0. Температура реакционной среды составляла 20°С. РФА и ИК-спектроскопия указывали на высокое содержание аморфной фазы гКФП-НТ, низкое содержание кристаллического ГАп, а также наличие в составе иных кальций-фосфатов. РФА и ИК-спектроскопия, выполненные для пасты гКФП-НТ после её спекания при T=1250°С, показали её превращение в чистый высококристаллический ГАп.

Низкотемпературный порошкообразный ГАп (аГАп-НТ) получали химическим осаждением согласно реакции (1) при комнатной температуре с последующим высушиванием при 37°С в течение 3 суток. РФА выявил низкую степень кристалличности аГАп-НТ.

ДКФД синтезировали химическим осаждением из водного раствора согласно реакции:



Продукт реакции высушивали при 37°С в течение 3 суток. РФА анализ показал наличие на рентгеновской дифрактограмме материала рефлексов, соответствующих ДКФД с химической формулой: $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$. Частицы ОКФ формировали путем выдерживания частиц ДКФД в буферном растворе, содержащем 1,5М ацетата натрия, при соотношении масса образца/масса жидкости равным 1/50, при температуре 35°С по реакции:



Согласно результатам РФА на рентгеновской дифрактограмме полученного КФС присутствовали рефлексы, соответствующие (по данным картотеки JCPDS) ОКФ с химической формулой: $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$.

ОКФ, в котором часть ионов кальция была замещена ионами стронция (ОКФ-Ст), синтезировали методом низкотемпературной химической трансформации в 1,75М растворе ацетата натрия из порошка ДКФД с добавлением в реакционную смесь нитрата стронция.

Методы исследования физико-химических характеристик КФС материалов. Физико-химические свойства КФС-материалов исследовали с помощью рентгенофазового анализа (РФА), ИК-спектроскопии, рентгенофлуоресцентного анализа, динамического светорассеяния, измерения удельной площади поверхности, сканирующей (СЭМ) и просвечивающей (ТЭМ) электронной микроскопии.

Деминерализованный костный матрикс (ДКМ). ДКМ в виде кубиков размером 5*5*5 мм получали по авторской методике (патент RU 2686309 С1).

Для получения ДКМ фрагменты костной ткани крупного рогатого скота подвергали многоэтапной обработке, которая обеспечивала полное удаление клеток и клеточного дебриса, липидов и минеральных солей с сохранением структуры и микроархитектоники коллагенового матрикса.

Осаждение ДКФД на ДКМ. КФС-покрытие на деминерализованном костном матриксе формировали путём его инкубации в растворе, содержащем 0,9М CaCl₂, 2М ацетата натрия, 0,15М L-глутаминовой кислоты и 0,9М ортофосфорной кислоты, доведенной до pH 5,5. Инкубацию ДКМ проводили в течение 48 часов при 35°C.

Экспериментальные животные. Эксперименты выполнялись на SPF (specific-pathogen-free – животные, свободные от патогенов) самцах крыс линии Wistar массой 180-200 г., полученные из Пушинского питомника лабораторных животных ФИБХ РАН. Все процедуры и манипуляции с животными были одобрены Комитетом по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФГБУН Филиала Института Биоорганической Химии и проводились в соответствии с Директивой ЕС 2010/63/ЕС.

Культуры клеток. Независимые от прикрепления клетки острого миелоидного лейкоза человека линии ТНР-1 были получены из Всероссийской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде RPMI 1640/F12 (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (ФБС) (Gibco, США), 80 мкг/мл гентамицина, 24 мкг/мл флюконазола при 37°C, в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂). Зависимые от прикрепления эмбриональные мезенхимальные клетки мышей линии СЗН/10Т1/2 и остеобластоподобные клетки человека линии MG-63 были получены из ATCC (American Type Culture Collection, Манассас, США). Клетки культивировали в питательной среде EMEM (Sigma-Aldrich, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки и 40 мг/л гентамицина, в CO₂-инкубаторе (37°C, 5% CO₂).

Анализ цитотоксического действия КФС на клетки. Количество живых клеток после их инкубации с КФС оценивали с помощью флуоресцентного красителя резазурина – редокс-индикатора на NADH/H⁺ (AlamarBlue, Invitrogen, США) в сравнении с контролем (культуры без добавления КФС) с помощью планшетного ридера Infinity F200 (Tecan, Австрия).

Анализ жизнеспособности клеток и степени их распластывания методом флуоресцентной микроскопии. Жизнеспособность клеток после инкубации с КФС оценивали по прижизненному окрашиванию клеток флуоресцентными красителями Hoechst 33342 (1 мкг/мл), йодидом пропидия (1 мкг/мл) и кальцеином АМ (2 мкМ). Степень распластывания живых клеток оценивали по площади проекции их цитоплазмы, окрашенной кальцеином АМ на ростовую поверхность культурального сосуда. Использовали микроскопическую флуоресцентную станцию Nikon Eclipse Ti-E (Nikon, Япония) и программное обеспечение ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Микроскопические изображения оценивали не менее, чем по 10 полям зрения.

Проточная цитометрия. Для оценки содержания кислых компартментов клеток, потенциала митохондриальной мембраны и продукции активных форм кислорода в клетках после 96 ч совместной инкубации с КФС, культуры клеток трижды промывали фосфатно-солевым буфером (Sigma-Aldrich, США), затем открепляли от поверхности пластика с использованием раствора трипсин-ЭДТА (Gibco, США), окрашивали красителями LysoTracker Green DND-26, DiOC6(3), DCFH-DA, соответственно в течение 30 мин в CO₂-инкубаторе. Для измерений использовали проточный цитометр

BD Accuri C6 (BD Sciences, США). Для каждого образца анализировалось не менее $3 \cdot 10^4$ клеток.

Конфокальная микроскопия. Для цитотоксического теста и морфологического анализа клеточной адгезии использовали конфокальный микроскоп TCS SP5 (Leica, Германия). Для цифровой обработки конфокальных изображений применяли программное обеспечение ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij>).

Модель гетеротопической имплантации материалов. Параметры биосовместимости (показатели биологической безопасности, оцениваемые по местной реакции окружающей ткани), а также наличие или отсутствие остеокондуктивности и остеогенного потенциала материалов *in vivo* изучали в модели подкожной имплантации крысам в инфраскапулярную область спины. Образцы материалов имплантировали под общей анестезией ксилазином 13 мг/кг (Interchemie, Нидерланды) и зоветилом 7 мг/кг (Virbac, Carros, Франция).

Гистологический анализ. После гуманной эвтаназии диоксидом углерода (OpenScience, Россия) образцы имплантированных материалов с окружающими тканями промывали в течение 30 секунд холодным (14°C) физиологическим раствором и фиксировали в течение 48 ч в 10% нейтральном забуференном (pH=7,4) растворе формалина. После завершения фиксации фрагменты образцов материала с окружающими тканями промывали дистиллированной водой для удаления избытка фосфатов и помещали не менее чем на 12 часов в матричную среду для криотома О.С.Т. Tissue-Tek (Sakura, Япония). Поперечные срезы образцов толщиной 9 мкм получали с использованием криотома MEV (SLEE medical GmbH, Германия). Гистологические срезы окрашивали с использованием гематоксилина Майера и эозина Y, а также применяли дифференциальное окрашивание кальциевых отложений ализариновым красным S (по методу МакГи-Рассела) и коллагеновых/неколлагеновых структур (трихромным методом Лилли) Микрофотографии окрашенных препаратов были получены на микроскопической станции Eclipse Ti-E (Nikon, Япония) и обработаны с использованием ПО NIS Elements AR4.13.05 (Build 933) и ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij>). Для анализа использовали не менее 10 полей зрения на срез.

Статистический анализ. Для статистической обработки данных и визуализации полученных результатов использовали языки программирования Python 3 (версия 3.9.16) и R (версия 4.3.0) в средах разработки Spyder (версия 5.4.1) и RStudio (версия 2023.03.0+386), соответственно. Во всех экспериментах использовались статистические выборки с не менее чем 4 наблюдениями ($n \geq 4$). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$. Данные на графиках представлены либо как среднее значение \pm стандартное отклонение, либо в виде диаграмм размаха, на которых отражены минимальное и максимальное значения, а также 25-, 50 (медиана) и 75%-ные квартили.

Для сравнения двух независимых выборок использовался U-критерий Манна-Уитни. Перед проведением множественных сравнений между группами данные предварительно тестировали на нормальность распределения и равенство дисперсий с использованием критериев Шапиро-Уилка и Брауна-Форсайта, соответственно. Для данных с ненормальным распределением использовали Н-критерий Краскела-Уоллеса с последующим сравнением экспериментальных групп относительно контрольной с использованием теста Данна с поправкой Холма. Для данных с нормальным распределением использовали однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA) с последующим сравнением экспериментальных групп относительно контрольной с использованием теста Даннетта.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследование специфики биологической реакции клеток и тканей на пастообразные кальций-фосфатные ГАп-материалы, полученные методом высоко- и низкотемпературного синтеза *in vitro* и *in vivo*.

Сегодня среди остеопластических материалов наибольшую актуальность приобретает создание инъекционных паст или гелей для малоинвазивного хирургического лечения дефектов костной ткани [Harrison и др., 2021; Raucsi и др., 2020; Subbiah и др., 2023]. Наиболее часто используемые пасты представляют собой суспензию нано/микроразмерного гидратированного ГАп [Fox, Tran, Tran, 2012; Liu и др., 2022]. Однако влияние физико-химических свойств подобных материалов на целевые параметры биосовместимости остается неизученным, что приводит к непредсказуемым и противоречивым результатам их применения в клинической практике. В данном блоке работ исследовали влияние температуры синтеза подобных материалов на адгезию, расплывание и жизнеспособность клеток при контакте с образцами ГАп-паст *in vitro* и их остеокондуктивные свойства *in vivo*.

Исследовали адгезию клеток к образцам гидратированных ГАп-паст, полученных при 120°C (гКФП-ВТ) и при 20°C (гКФП-НТ), и имеющих ассоциированное с методом получения высокое и низкое содержание кристаллической фазы соответственно (Рис. 1).

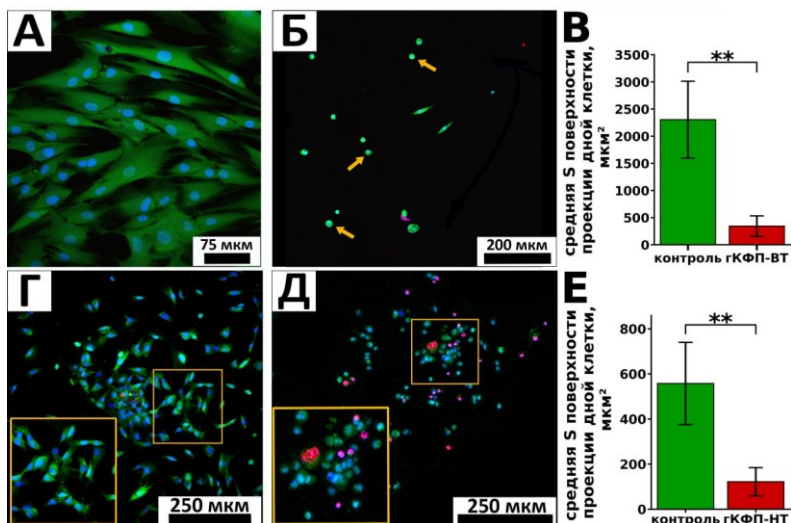


Рисунок 1 – Микрофотографии клеток, культивировавшихся в контрольных условиях (А, Г), на поверхности гКФП-ВТ (96 ч) (Б) и гКФП-НТ (6 ч) (Д). Конфокальная микроскопия. Окраска Hoechst 33342 – ядра живых и погибших клеток синего цвета, йодид пропидия – ядра погибших клеток красного цвета, кальцеин АМ – цитоплазма живых клеток зеленого цвета. Контроль – культура клеток СЗН/10Т1/2 на поверхности культурального пластика. В, Е – Сравнение средней площади проекции цитоплазмы одной клетки на культуральную поверхность сосуда, занимаемой в контроле (на культуральном пластике), на поверхности гКФП-ВТ (В) (96 ч) и гКФП-НТ (6 ч) (Е). Среднее ($n \geq 4$) \pm стандартное отклонение. ** – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни).

После 96 часов культивирования клеток линии СЗН10/Т1/2 на поверхности гКФП-ВТ наблюдалось значительно меньшее число прикреплённых клеточек (Рис. 1Б,В), по сравнению с контролем (на культуральном пластике). При этом клеточки, прикрепленные к поверхности гКФП-ВТ, приобретали шарообразную форму со средней площадью проекции цитоплазмы на культуральную поверхность сосуда $343 \pm 189 \text{ мкм}^2$, что было в 7 раз меньше, чем в контроле (Рис. 1А,В). Также у клеточек отмечалось уменьшение размера ядер, без нарушения целостности плазмалеммы. Это указывает на инициацию апоптотической гибели, одной из причин которой может быть нарушение адгезии клеточек к материалу.

Как показано на рисунке 1, на гКФП-НТ, также наблюдалась шарообразная форма клеточек, нарушение адгезии, распластывания и отсутствие ламеллоподий. Уже через 6 часов культивирования клеточек на поверхности гКФП-НТ материала, наблюдалось увеличение числа погибших клеточек, о чём свидетельствует окрашивание их ядер йодидом пропидия (Рис. 1Д). Столь быстрое проявление цитотоксического эффекта материала указывает на то, что её причиной было не нарушение адгезии, а иные факторы. В целом полученные данные указывают, что как гКФП-ВТ, так и гКФП-НТ не адгезивны для клеточек *in vitro*, и этот факт не позволяет рассчитывать на их остеогенные свойства *in vivo*.

Для исследования цитотоксичности, не связанной с адгезией, гКФП-НТ добавляли к клеткам, распластанным на культуральном пластике, через 1 сутки после посева. Через 24 ч инкубации клеточек с гКФП-НТ наблюдалась их полная гибель при концентрациях от 3 мг/мл и выше (Рис. 2).

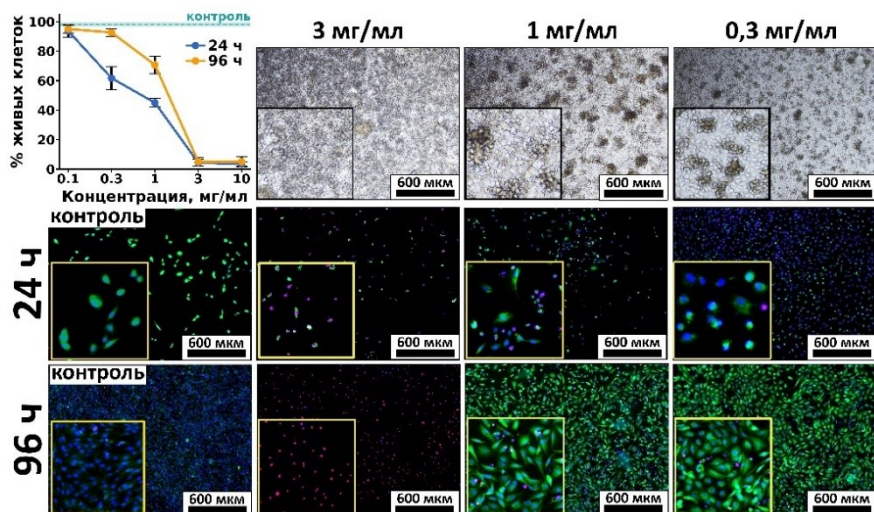


Рисунок 2 – Цитотоксическое действие гКФП-НТ, добавленной в клеточную культуру через 24 ч после посева клеточек СЗН/10Т1/2 плотностью 15 тыс. клеточек/см², после культивирования с ней в течение 24 и 96 часов. Световая и флуоресцентная микроскопия. Окраска Hoechst 33342 – ядра живых и погибших клеточек синего цвета, йодид пропидия – ядра погибших клеточек красного цвета, кальцеин АМ – цитоплазма живых клеточек зелёного цвета. Контроль – культура клеточек СЗН/10Т1/2 без добавления гКФП-НТ.

Количество живых клеток, сравнимое с контролем, выявлено при концентрации гКФП-НТ 0,1 мг/мл ($94\pm 4\%$). Через 96 ч культивирования полная клеточная гибель также наблюдалась при концентрациях 3 и 10 мг/мл. В то же время при концентрациях 1 и 0,3 мг/мл через 96 ч культивирования обнаружено большее количество живых клеток по сравнению с 24 ч их культивирования, что свидетельствовало об адаптации и пролиферативной активности клеток. Выявленный дозозависимый цитотоксический эффект в условиях *in vitro* может быть связан с несколькими причинами или их сочетанием. Повышение концентрации гКФП-НТ от 1 мг/мл до 3 мг/мл может нарушить псевдоподиальную активность клетки и соответственно её адгезию. Можно также предполагать влияние нарушения массообмена клеток со средой. Другой вероятной причиной может быть растворимость частиц гКФП-НТ, связанная с наличием в его составе аморфной фазы. При этом более высокая выживаемость клеток в присутствии этого материала в концентрации от 1 мг/мл и меньше указывала на потенциальную возможность его использования *in vivo*.

Для оценки биологической безопасности, остеокондуктивности и остеиндуктивности гКФП-ВТ и гКФП-НТ *in vivo* была проведена гетеротопическая имплантация материалов на срок 3 недели, охватывающий одновременно как воспалительную, так и пролиферативную стадии регенеративного процесса в организме реципиента (Рис. 3).

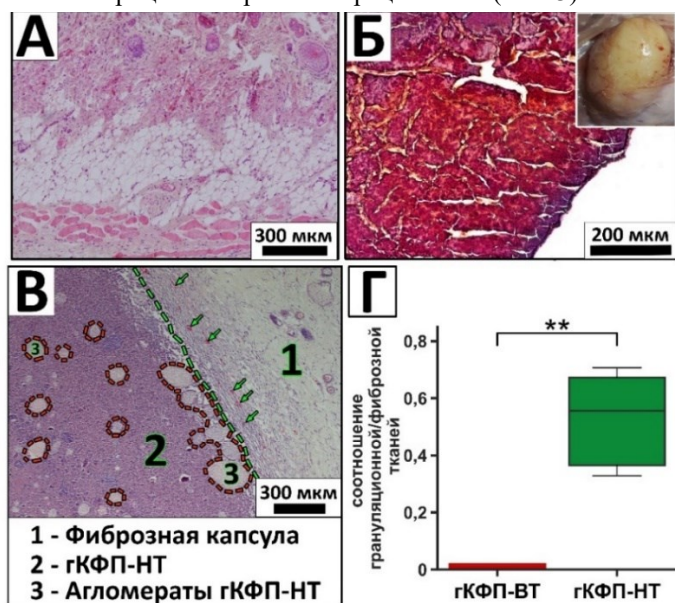


Рисунок 3 – Микрофотографии криосрезов образцов гКФП-ВТ и гКФП-НТ после 3 недели гетеротопической имплантации крысам. А – контроль (подкожное пространство без материала); Б – образцы гКФП-ВТ, вставка – макроскопический вид рамолиционной кисты вокруг гКФП-ВТ; В – образцы гКФП-НТ. А,В – Окрашивание гематоксилином и эозином: ядра клеток окрашены в синий цвет, эритроциты – в красный цвет, мышечная ткань – в розовый цвет. Стрелки – кровеносные сосуды; Б – Окраска по МакГи-Расселу: красным цветом окрашены отложения кальция, фиолетовым – клеточный дебрис. Г – график соотношения

грануляционной/фиброзной ткани в образцах гКФП-ВТ и гКФП-НТ: медиана ($n \geq 4$), интерквартильный размах, минимальное и максимальное значения ** – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни).

У контрольных животных, которым вводили физиологический раствор на всех сроках имплантации в месте инъекции не наблюдалось признаков воспаления (Рис. 3А). Для образцов гКФП-ВТ было затруднено получение гистологических срезов образцов, вследствие слияния материала в сплошной агломерат, блокировавший миграцию клеток и процессы неокollaгенеза на нём (Рис. 3Б). При этом для части образцов гКФП-ВТ наблюдалось развитие асептического воспаления и отторжение материала с формированием воспаленной рамолиционной кисты и чрезкожной фистулы (Рис. 3Б, вставка). Для образцов гКФП-НТ через три недели после имплантации наблюдалось формирование неокollaгеновой капсулы, насыщенной как незрелыми, так и дефинитивными микрососудами (Рис. 3В) без признаков гибели клеток внутри волокон капсулы с её постепенным отделением от материала и активной (сплошь) миграцией клеток внутрь образцов. Внутри капсулы наблюдалось формирование небольших рыхлых кальций-фосфатно-белковых агломератов с признаками физиологической резорбции данных депозитов мигрирующими клетками реципиента (Рис. 3В).

Полученные *in vivo* данные свидетельствуют о более высокой совместимости с клетками и тканями реципиента аморфной низкотемпературной гКФП-НТ в сравнении с высококристаллической высокотемпературной гКФП-ВТ. Это согласуется с литературными данными о том, что получаемая при помощи высокотемпературного спекания КФС-керамика не обладает необходимой биоактивностью и не способна резорбироваться остеокластами вследствие высокой степени кристалличности [Ginebra и др., 2018].

Исследование специфики биологической реакции клеток и тканей на предшественники ГАп – дигидрат дикальцийфосфата (ДКФД) и октакальций фосфат (ОКФ), а также самого ГАп, полученных методом низкотемпературного синтеза в форме порошков *in vitro* и *in vivo*.

Известно, что в процессе естественной биоминерализации костной ткани ГАп образуется из аморфного фосфата кальция, через ряд промежуточных КФС [Margolis и др., 2014]. Поскольку гКФП-НТ представляла собой смесь ГАп, аморфного фосфата кальция и других КФС было выдвинуто предположение, что его более благоприятные для клеток и тканей свойства могут быть объяснены наличием в составе иных КФС – прекурсоров ГАп. Для подтверждения этого предположения был выполнен низкотемпературный синтез и исследована специфика биологической реакции *in vitro* и *in vivo* известных предшественников ГАп – ДКФД и ОКФ. Исследование параметров адгезии, распластывания и жизнеспособности клеток *in vitro* и биологической безопасности, остеокондуктивности и остеоиндуктивности *in vivo* проводили в сравнении с образцами порошка аГАп-НТ, который представлял собой высушенный при 37°C пастообразный материал гКФП-НТ (Рис. 4).

Исследование цитотоксичности указанных КФС *in vitro* производилось с использованием независимых от прикрепления клеток линии ТНР-1 и зависимых от прикрепления клеток линии СЗН/10Т1/2.

Цитотоксическое действие исследуемых КФС на клетки ТНР-1 после 72 ч инкубации было обнаружено только для аГАп-НТ и только при максимальной концентрации частиц 10 мг/мл (Рис. 4). Остальные КФС во всём диапазоне использованных концентраций не оказывали токсического влияния на клетки ТНР-1.

Цитотоксическое действие КФС на зависимые от прикрепления клетки СЗН10Т1/2 после 96 ч культивирования было более выраженным, чем на клетки ТНР-1 (Рис. 4, ср. верхний и нижний график). ДКФД не проявлял цитотоксического эффекта во всём диапазоне исследованных концентраций. ОКФ и аГАп-НТ оказывали одинаковое дозозависимое цитотоксическое действие, начиная с концентрации 0,3 мг/мл, с особенно выраженным токсическим эффектом при концентрации 3 и 10 мг/мл.

На рисунке 4 также представлены микрофотографии культур клеток СЗН/10Т1/2 через 4 суток культивирования с указанными КФС в концентрации 10 мг/мл. Полученные данные свидетельствовали о меньшей цитотоксичности ДКФД по сравнению с ОКФ и аГАп-НТ.

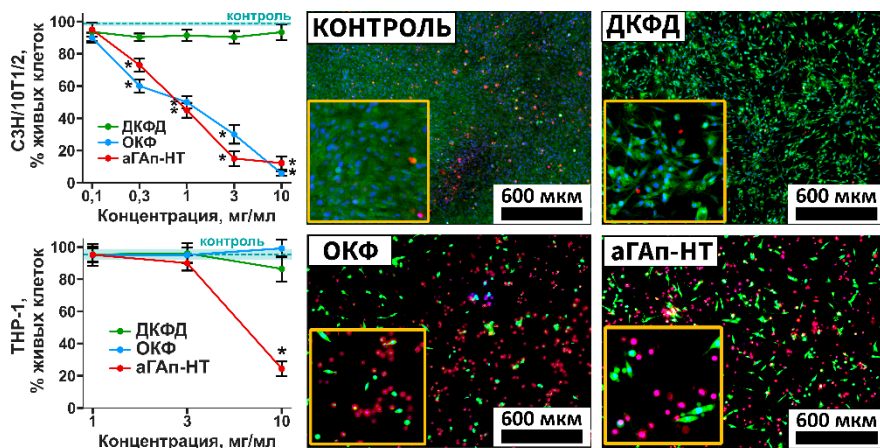


Рисунок 4 – Цитотоксический эффект КФС, добавленных в клеточную культуру через 24 ч после посева 15 тыс. клеток/см² независимых от прикрепления клеток СЗН/10Т1/2, после 96 ч культивирования клеток с ними. Среднее значение ($n \geq 4$) \pm стандартное отклонение. Флуоресцентные микрофотографии указанных порошков КФС при концентрации 10 мг/мл на клетках СЗН/10Т1/2 после 96 ч культивирования. Окраска Hoechst 33342 – ядра живых и погибших клеток синего цвета, йодид пропидия – ядра погибших клеток красного цвета, кальцеин АМ – цитоплазма живых клеток зелёного цвета. Контроль – культура клеток СЗН/10Т1/2 без добавления КФС. * – $p < 0,05$ относительно контроля (Н-критерий Краскела-Уоллеса, сравнение экспериментальных групп относительно контрольной с использованием теста Данна с поправкой Холма).

Как известно, растворимость ДКФД и ОКФ на порядок и более выше растворимости ГАп (ПР(ДКФД)= $10^{-6,73}$, ПР(ОКФ)= $10^{-98,6}$, ПР(ГАп)= $10^{-117,82}$ при 37°C) [Wang, Nancollas, 2008]. Следовательно, цитотоксичность различных КФС нельзя однозначно связать с их растворимостью. С другой стороны, тот факт, что независимые от прикрепления (неадгезивные к внеклеточному матриксу) клетки ТНР-1 менее чувствительны к цитотоксическому действию КФС, чем зависимые от прикрепления адгезивные клетки СЗН10Т1/2, дает основание предполагать, что цитотоксичность КФС связана с их адгезивностью к клеточной поверхности. Это предположение подтверждается представленными на рисунке 5 данными СЭМ о связывании различных КФС с поверхностью клеток СЗН10Т1/2, добавленных к культуре клеток в концентрации 1 мг/мл. Видно, что

значительно больше частиц аГАп-НТ и ОКФ прилипает к клеткам, чем частиц ДКФД, что соответствует отличию в их цитотоксичности (Рис. 5). Однако для ответа на вопрос, почему адгезивность частиц КФС к клеткам может быть фактором повышения их цитотоксичности, необходимы дальнейшие детализированные исследования.

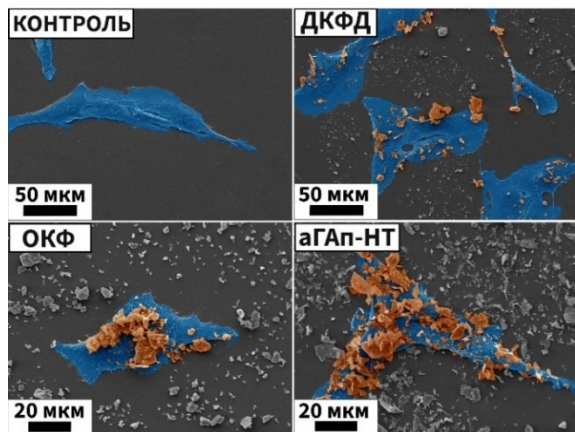


Рисунок 5 – Адгезия КФС к поверхности зависимых от прикрепления клеток СЗН10Т1/2 через 96 ч совместного культивирования с ДКФД, ОКФ и аГАп-НТ. Синий цвет – клетки СЗН10Т1/2, оранжевый – КФС на поверхности клеток. Сканирующая электронная микроскопия.

Для оценки параметров биосовместимости ДКФД, ОКФ и аГАп-НТ в условиях *in vivo* была проведена подкожная имплантация материалов крысам также на срок 3 недели (Рис.6). Вокруг образцов ДКФД формировалась наиболее тонкая и рыхлая фиброзная капсула с признаками активной инволюции данной капсулы, свидетельствующие вкпе о выраженных признаках биологической безопасности, биорезорбции и остеокондукции данного материала. Вокруг ОКФ формировалась плотная многослойная фиброзная капсула без признаков слияния волокон, содержащая небольшое количество зрелых мелких кровеносных сосудов. При этом сами образцы ОКФ представляли собой агрегировавшие в плотный слой и практически бесклеточные агломераты с четкой каймой гистио-лимфоцитарных клеток на периферии, но без обширного клеточного дебриса в структуре данных агломератов.

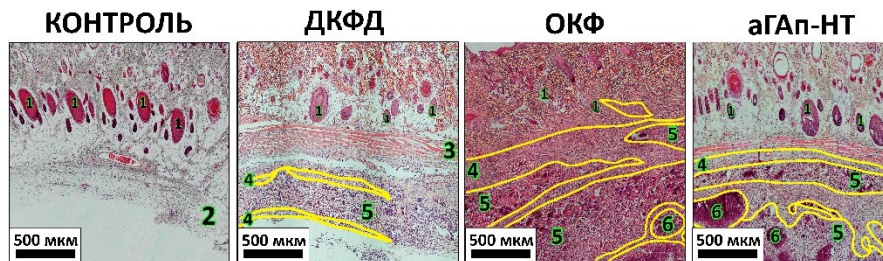


Рисунок 6 – Микрофотографии препаратов тканей перимплантного ложа и образцов материалов ДКФД, ОКФ и аГАп-НТ, полученных после 3 недель подкожной имплантации крысам. Окраска гематоксилин-эозином (ядра клеток окрашены в синий цвет, эритроциты – в красный цвет, а мышечная ткань – в розовый цвет, агломераты КФС окрашены в цвет от розового до фиолетового). Желтой

линией выделены зоны фиброзных капсул, образованных в месте контакта с материалом (области фиброзной трансформации капсул вокруг материалов). 1 – волосяные фолликулы; 2 – рыхлая волокнистая соединительная ткань; 3 – мышечная ткань; 4 фиброзная ткань; 5 – грануляционная ткань; 6 – КФС.

В образцах аГАп-НТ была выявлена наиболее толстая, местами многослойная и практически не содержащая зрелых дефинитивных сосудов фиброзная капсула в зоне контакта с материалом, состоящая из зрелых слившихся коллагеновых волокон, свидетельствующая о наименьшей степени биосовместимости данного материала, содержащего к тому же в значительном количестве иммунные клетки в контактной зоне, что на данном сроке имплантации свидетельствует о проинфламаторном эффекте аГАп-НТ. Соотношение грануляционной/фиброзной тканей было в 2,5 раза меньше, чем для ОКФ, что свидетельствовало о фиброзно-рубцовой трансформации грануляционной ткани (Рис. 7Д,Ж).

Сами образцы аГАп-НТ представляли собой плотные агрегаты частиц, покрытые слоями клеточного дебриса, сформировавшегося из мигрирующих и погибающих при контакте с материалом иммунных клеток. Всё это свидетельствует о наименее благоприятной реакции со стороны организма на аГАп-НТ среди всех исследованных *in vivo* КФС.

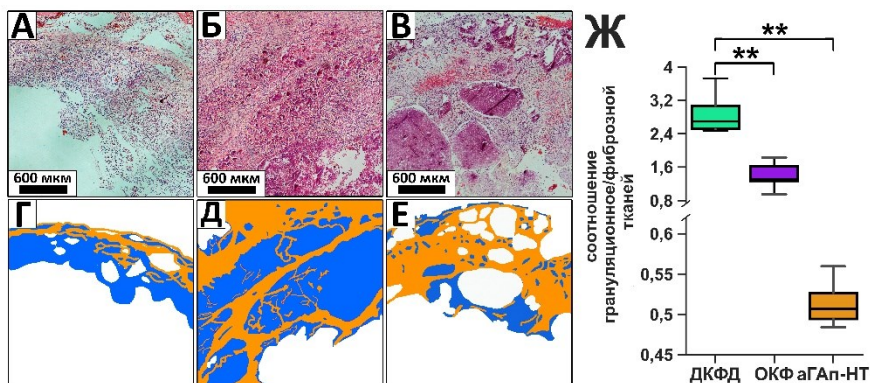


Рисунок 7 – Микрофотографии препаратов ДКФД (А), ОКФ (Б) и а-ГАп-НТ (В), капсул и тканей периимплантатного ложа после 3 недель гетеротопической имплантации крысам. Окраска гематоксилин-эозином (ядра клеток окрашены в синий цвет, эритроциты – в красный цвет, а мышечная ткань – в розовый цвет, агломераты КФС окрашены в цвет от розового до фиолетового). Г,Д,Е – Маски, наложенные на области грануляционной (синий) и фиброзной (оранжевый) тканей препаратов ДКФД (Г), ОКФ (Д) и а-ГАп-НТ (Е), полученные с использованием ImageJ. Ж – График соотношения грануляционной/фиброзной ткани в образцах ОКФ и а-ГАп-НТ. Медиана ($n \geq 4$), интерквартильный размах, минимальное и максимальное значения ** – $p < 0,01$ относительно контроля (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), сравнение групп ОКФ и аГАп-НТ относительно ДКФД с использованием теста Даннетта).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют, что все исследованные материалы проявляли признаки биологической безопасности и остеокондуктивности *in vivo*, при этом наибольшая степень совместимости с клетками и тканями реципиента среди исследованных КФС была выявлена для ДКФД, а наименьшая – для аГАп-НТ.

Исследование влияние частичной замены Ca^{2+} на Sr^{2+} в структуре ОКФ на его цитотоксические и остеокондуктивные свойства *in vitro* и *in vivo*.

В связи с нестабильностью ДКФД, который, как известно, трансформируется при хранении в безводный дикальций фосфат, а также выявленной сравнительно большей остеокондуктивностью высокостабильного ОКФ по сравнению с аГАп-НТ, в дальнейшей работе была оценена возможность увеличения биосовместимости ОКФ за счет подхода частичного катион-замещения (Рис. 8). Поскольку цитотоксический эффект ОКФ может быть связан с локальным повышением $[\text{Ca}^{2+}]$, образующегося в ходе растворения ОКФ, был предложен подход увеличения совместимости ОКФ с клетками путём частичного замещения Ca^{2+} в его кристаллической структуре на ионы других металлов. Для замещения ионов Ca^{2+} использовали Sr^{2+} . Известно, что антиостеопоротический препарат ранелат стронция обладает остеоиндуктивным эффектом и способствует повышению выживаемости остеобластов в костной ткани за счет присутствия в его составе биоактивных ионов Sr^{2+} [Borciani и др. 2022].

Было выявлено, что замена до 10% Ca^{2+} на Sr^{2+} в ОКФ незначительно уменьшала его цитотоксический эффект на клетки линии СЗН/10Т1/2 в сравнении с чистым ОКФ (Рис. 8). При этом увеличение замены Ca^{2+} на Sr^{2+} в ОКФ от 20 до 50% значительно уменьшало цитотоксическое действие ОКФ: величина IC_{50} (концентрация ОКФ-Sr, при которой живых клеток было в 2 раза меньше, чем в контроле, без ОКФ) увеличилась с 0,3 мг/мл до 3 мг/мл.

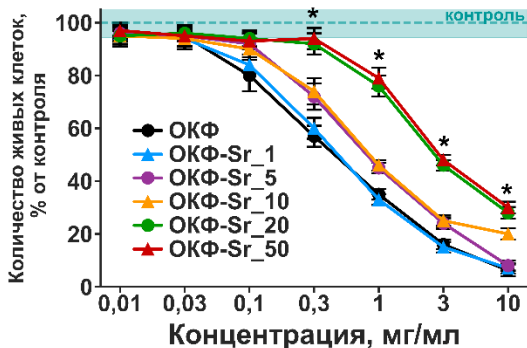


Рисунок 8 – Цитотоксический эффект ОКФ и ОКФ-Sr через 4 суток после их добавления к распластанным клеткам СЗН/10Т1/2 (ОКФ и ОКФ-Sr добавлялся в культуру через 1 сутки после посева плотностью 15 тыс. клеток/см²) Среднее значение (n≥4) ± стандартное отклонение. * – p < 0,05 между ОКФ и ОКФ-Sr 50 (U-критерий Манна-Уитни).

Для понимания причин этого эффекта исследовали влияние ОКФ и ОКФ-Sr на такие физиологические параметры клетки как содержание кислых компартментов (лизосомы, эндолизосомы, эндосомы), а также потенциал митохондриальной мембраны и продукцию активных форм кислорода (АФК). ОКФ достоверно увеличивал содержание кислых компартментов в клетке, что может указывать на усиления процессов аутолиза или эндоцитоза (Рис. 9А). При этом ОКФ-Sr_10 и ОКФ-Sr_50 не вызывали увеличения содержания кислых компартментов (Рис.9А), что согласуется с более низкой цитотоксичностью в сравнении с ОКФ (Рис. 8).

ОКФ и все варианты ОКФ-Sr в одинаковой степени снижали мембранный потенциал митохондрий (Рис. 9Б). Наиболее сильный эффект ОКФ-Sr_50 в отличие от ОКФ, ОКФ-Sr_10 и контроля проявлялся в виде 3-х кратного подавления окислительной активности в клетках (Рис. 9В).

В совокупности представленные данные указывают на то, что цитопротекторное действие Sr^{2+} в ОКФ реализуется путем подавления

окислительной активности в клетках и, возможно, в сочетании со стабилизацией процессов аутолиза. Можно предполагать, что механизм цитопротекторного действия при замещении Ca^{2+} на Sr^{2+} в ОКФ связан с известной конкуренцией ионов этих металлов в системах транспорта кальция в клетку и в самой клетке [Yuan и др., 2017]. Выяснение детального механизма данного явления требует отдельного исследования.

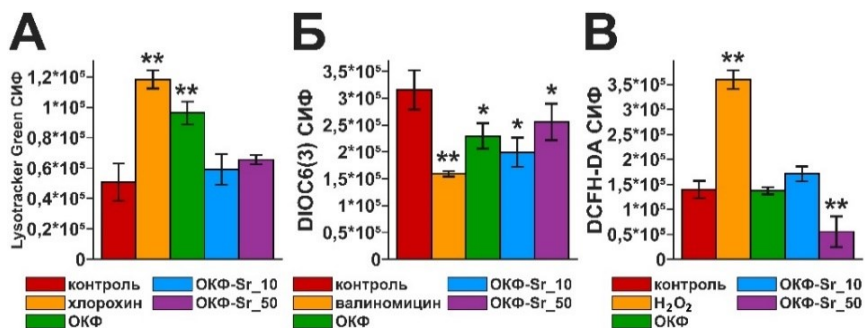


Рисунок 9 – Влияние ОКФ и Sr-ОКФ на содержание кислых компартментов (А), потенциал mitochondrialной мембраны (Б) и активных форм кислорода (В) в клетках СЗН/10Т1/2. КФС добавляли в клеточные культуры по 1 мг/мл через 1 сутки после посева клеток, инкубировали 4 суток открепляли, окрашивали соответствующими флуоресцентными красителями и анализировали на проточном цитометре. СИФ – средняя интенсивность флуоресценции. * – $p < 0,05$ относительно контроля; ** – $p < 0,01$ относительно контроля (однофакторный дисперсионный анализ (ANOVA), сравнение экспериментальных групп относительно контрольной с использованием теста Даннетта).

В дальнейшем был выполнен сравнительный анализ степени биосовместимости ОКФ-Sr 50 и ОКФ после подкожной имплантации крысам стока Wistar также на срок 3 недели (Рис. 10).

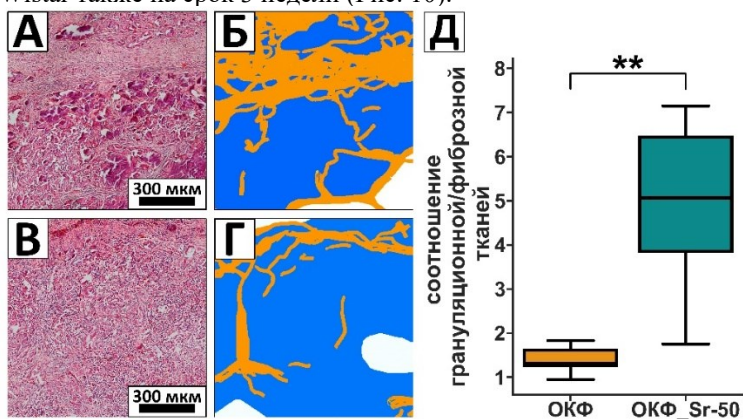


Рисунок 10 – Микрофотографии препаратов ОКФ (А) и ОКФ-Sr 50 (Б), капсул и тканей перимплантатного ложа после 3 недель гетеротопической имплантации крысам. Окраска гематоксилин-эозином (ядра клеток окрашены в синий цвет,

эритроциты – в красный цвет, а мышечная ткань – в розовый цвет, агломераты КФС окрашены в цвет от розового до фиолетового). Б, Г – Маски, наложенные на области грануляционной (синий цвет) и фиброзной (оранжевый цвет) тканей препаратов ОКФ (Б) и ОКФ-Sr₅₀ (Г), полученные с использованием программного обеспечения ImageJ. Д – График соотношения грануляционной/фиброзной ткани в образцах ОКФ и ОКФ-Sr-50. Медиана (n≥4), интерквартильный размах, минимальное и максимальное значения ** – p < 0,01 (U-критерий Манна-Уитни).

Для образцов ОКФ наблюдалось формирование выраженной многоуровневой (прорастающей внутрь) реактивно-измененной фиброзной ткани, содержащей как фибробласты, так и реактивные иммунные клетки гистио-лимфоцитарного звена (Рис. 10). Капсула вокруг ОКФ-образцов была значительно толще и плотнее, чем вокруг ОКФ-Sr, а также содержала небольшое количество зрелых мелких кровеносных сосудов, что указывает на фиброзно-рубцовый характер трансформации грануляционной ткани. При этом сами образцы ОКФ, в отличие от ОКФ-Sr, представляли собой агрегировавшие в плотный слой и практически бесклеточные агломераты с четкой каймой вокруг данных агломератов гистио-лимфоцитарных клеток.

Для образцов ОКФ-Sr отмечалась значительно более выраженная и развитая грануляционная ткань с меньшей по площади фиброзной неокollaгеновой капсулой вокруг образцов без признаков слияния волокон и гибели клеток в ней, содержащей к тому же большое количество мелких и дефинитивных кровеносных сосудов, что свидетельствовало о физиологических процессах репаративного гистогенеза в месте имплантации и отсутствии фиброзно-рубцовой трансформации в образцах и тканях реципиентного ложа. Стоит также отметить, что образцы ОКФ-Sr значительно быстрее подвергались резорбции, чем образцы ОКФ. При этом резорбция материалов не сопровождалась фиброзным замещением, о чём свидетельствует соотношение грануляционной/фиброзной тканей, которое для образцов ОКФ-Sr было в 6 раз больше, по сравнению с ОКФ (Рис. 10Д). Всё это свидетельствовало о выраженном повышении признаков биологической безопасности и остеокондуктивности ОКФ при допировании ионами Sr²⁺. Однако, на основании всех полученных выше результатов необходимо отметить, что все исследованные КФС не обладали признаками остеиндуктивного или остеогенного потенциала.

Разработка подхода повышения биосовместимости КФС, полученных методом низкотемпературного синтеза, в составе композитных материалов.

Несмотря на то, что ДКФД обладал наибольшими среди всех исследованных КФС признаками совместимости с клетками и тканями реципиента, остеогенных признаков для данного материала обнаружено не было. В этой связи в дальнейшем оценивали возможность повышения остеогенных свойств ДКФД в композиции с деминерализованным костным матриксом (ДКМ/ДКФД). ДКФД осаждали на поверхности трабекул высококачественного ДКМ с интактной ультраструктурой коллагенового матрикса, создавая таким образом реминерализованный биомиметический композит (Рис. 11, 12).

Исследование адгезивных и цитотоксических свойств ДКМ до осаждения ДКФД *in vitro* показало, что через 24 часа после посева клеток на ДКМ все клетки были прикреплены к поверхности ДКМ (Рис. 11), а количество погибших клеток не отличалось от контрольных условий. Через 72 часа наблюдалось достижение клетками плотного монослоя на поверхности трабекул, что свидетельствовало о выраженной биосовместимости и пролиферативной активности клеток на матриксе.

При исследовании структуры композита ДКМ/ДКФД методом сканирующей электронной микроскопии было показано равномерное распределение осадка на поверхности коллагеновых трабекул ДКМ (Рис. 12В). Гистологический анализ реминерализованного ДКМ до имплантации выявил осаждение КФС на трабекулярной поверхности, без его проникновения в трабекулы (Рис. 12В вставка).

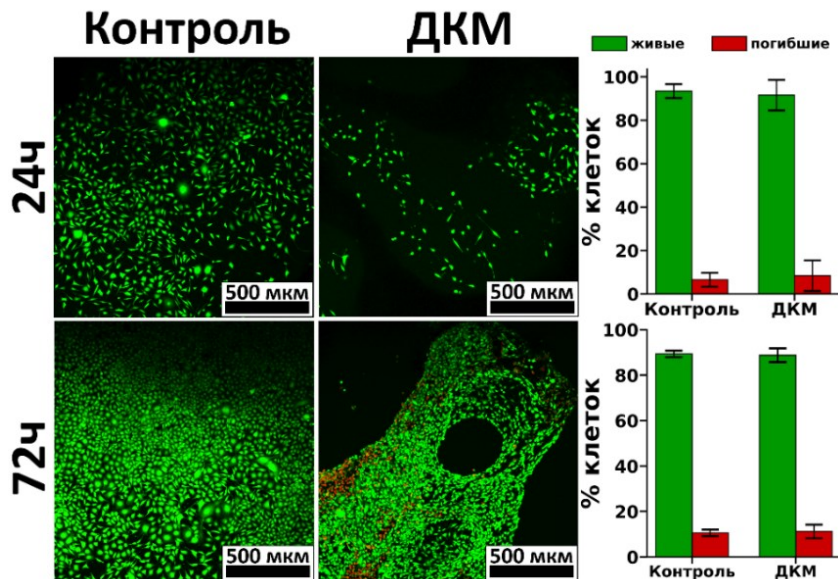


Рисунок 11 – Цитотоксичность ДКМ через 24 и 72 часа культивирования на нем клеток линии MG-63. Контроль – клетки С3Н/10Т1/2, культивировавшиеся на пластике. Конфокальная микроскопия. Окраска йодидом пропидия и кальцеином АМ. Ядра погибших клеток – красного/оранжевого цвета, цитоплазма живых клеток - зелёного цвета.

Для исследования биосовместимости и остеогенных свойств полученных материалов *in vivo* была проведена гетеротопическая (подкожная) имплантация крысам Wistar сроком на 7 недель. Через 7 недель образцы ДКФД полностью резорбировались в организме без каких-либо признаков инкапсуляции, асептического кальциноза здоровых тканей или фиброза в месте имплантации (в связи с этим результаты гистологического анализа не представлены). Полученные данные свидетельствовали об отсутствии остеогенного эффекта ДКФД в организме.

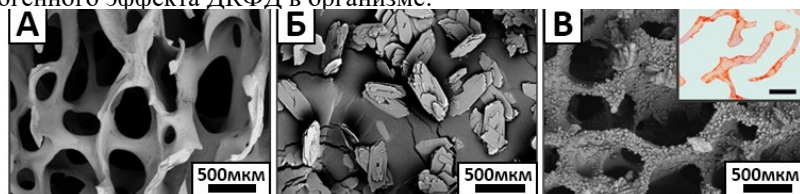


Рисунок 12 – Морфологический анализ образцов ДКФД и ДКМ/ДКФД; А – ДКМ до реминерализации; Б – ДКФД; В – ДКМ/ДКФД, внутренние вставки,

поперечное сечение реминерализованного ДКМ, окраска ализариновым красным S (метод МакГиРассела, отложения кальция окрашены в оранжево-красный цвет, шкала 500 мкм). Сканирующая электронная микроскопия.

Для образцов ДКМ без ДКФД-покрытия через 7 недель после имплантации была выявлена высокая степень биосовместимости на фоне полного отсутствия остеоиндуктивного и остеогенного потенциала (Рис. 13А).

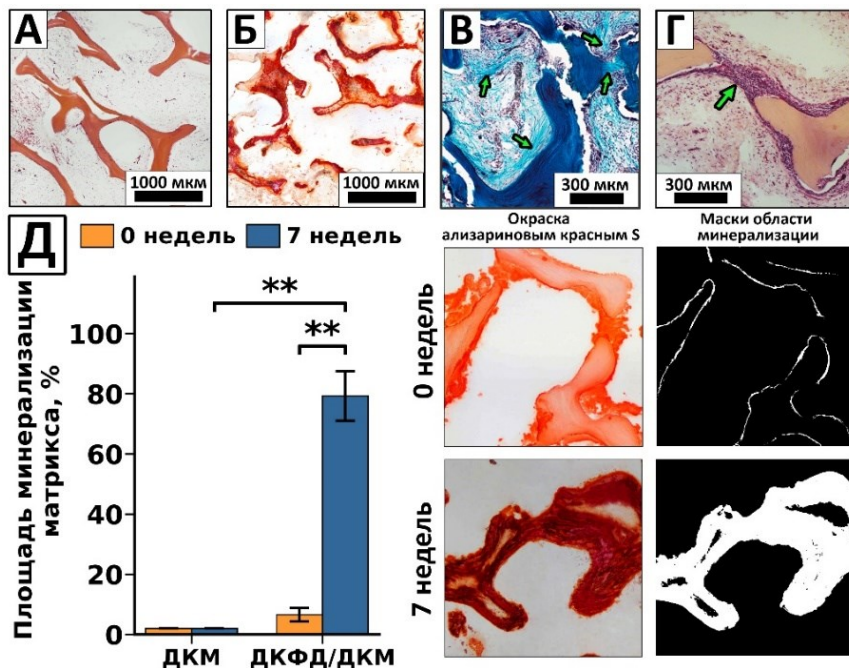


Рисунок 13 – Гистологический анализ образцов ДКМ и ДКМ/ДКФД через 7 недель после имплантации. **А** – образцы ДКМ. **Б-Г** – образцы ДКМ/ДКФД. Световая микроскопия. **А, Г** – окраска гематоксилином и эозином (ядра клеток окрашены в синий цвет, эритроциты – в красный цвет, а мышечная ткань – в розовый цвет, новообразованные трабекулоподобные структуры указаны стрелками); **Б** – окрашивание ализариновым красным S (отложения кальция окрашены в оранжево-красный цвет); **В** – трихромная окраска по Лилли (коллаген окрашен в синий цвет, мышцы и другие ткани – в красный цвет, ядра клеток – в коричневый цвет), **Д** – результаты измерения площади внутритрабекулярной минерализации в образцах ДКМ и ДКМ/ДКФД, посчитанные по маскам микрофотографий срезов, полученных с использованием программного обеспечения ImageJ. Среднее значение ($n \geq 4$) \pm стандартное отклонение. ** – $p < 0,01$ (U-критерий Манна-Уитни).

Для образцов ДКМ также выявлено полное отсутствие гигантских клеток инородных тел, признаков лейкоцитарной инвазии и дегранированных тучных клеток. Наблюдалось крайне слабое прорастание реактивно-измененной соединительной ткани внутри образца из тканей перимплантного ложа и практически полная инволюция фиброзной капсулы. Как синтетической, так и минерализующей активности клеток выявлено не было. Таким образом, как низкотемпературный ДКФД, так и ДКМ сами по себе не обладали остеогенным потенциалом.

В ДКМ/ДКФД-образцах выявлены выраженные процессы гаптотаксиса, стимуляции пролиферации и синтетической активности клеток внутри имплантированных материалов, сопровождающиеся выраженными процессами ремоделирования ДКМ (Рис. 13В, стрелки), а также признаки выраженной синтетической активности клеток и формирование возле и между трабекул ориентированного неоколлагена *de novo* с построением новых трабекулоподобных структур (Рис. 13Г). Также в ДКМ/ДКФД выявлено достоверное повышение степени минерализации ДКМ, при этом характер минерализации был физиологическим и внутритрабекулярным, а признаков утилизационного кальциноза не наблюдалось (Рис. 13Б).

Новообразованный коллагеновый матрикс содержал дефинитивные кровеносные сосуды, что свидетельствует о том, дифференцированные в матриксе остеообласты также продуцировали факторы ангиогенеза. Среди мигрировавших клеток не наблюдалось гистио-лимфоцитарных клеток, тучных клеток или гигантских клеток инородного тела; все клетки, наблюдаемые в матриксе, принадлежали к мезенхимальным клеткам. Полученные результаты в совокупности указывают на выраженное остеогенное действие композита ДКМ/ДКФД.

Исходя из полученных данных можно заключить, что реминерализация ДКМ с помощью ДКФД позволяет получать композитный материал с остеогенными свойствами.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты показывают, что использование низкотемпературного синтеза кальций-фосфатных материалов позволяет в значительной степени повысить их биологическую безопасность и остеокондуктивность.

Пастообразные гидратированные ГАп-материалы неадгезивны для клеток *in vitro* и не проявляют остеоиндуктивных свойств *in vivo*. При этом в модели гетеротопической имплантации *in vivo* полученная высокотемпературным синтезом кальций-фосфатная паста вызывала асептическое воспаление и отторжение организмом реципиента, в то время как низкотемпературная низкокristаллическая кальций-фосфатная паста обладала всеми необходимыми признаками биологической безопасности и остеоиндукции. Полученные данные указывают на то, что биосовместимость пастообразных гидратированных КФС-материалов зависит от температуры их синтеза, непосредственно влияющей на их фазовый состав и содержание различных кальций-фосфатов – прекурсоров ГАп.

Принимая во внимание гетерогенность состава низкотемпературного пастообразного материала, содержащего различные КФС, представляло интерес исследование полученных при физиологической температуре предшественников гидроксипатита, таких как дигидрат дикальцийфосфата и октакальций фосфат для выявления наиболее биосовместимого кальций-фосфатного соединения. На основании проведенных исследований биологическую безопасность и остеокондуктивность данных соединений можно выстроить в ряд ДКФД > ОКФ > аГАп-НТ.

Поскольку один из возможных механизмов цитотоксичности КФС может быть связан с выходом большого количества ионов Ca^{2+} из материала, был предложен способ повышения биосовместимости октакальций фосфата путём замещения в нем части ионов Ca^{2+} на Sr^{2+} . Предложенный подход позволил значительно повысить биологическую безопасность и остеокондуктивность октакальций фосфата *in vitro* и *in vivo*.

Поскольку в проведенных исследованиях даже кондуктивные кальций-фосфаты не проявляли необходимых остеогенных свойств был предложен

подход радикального повышения остеогенного потенциала КФС за счет их сочетания с деминерализованным костным матриксом. Был разработан подход получения биомиметического реминерализованного композита за счет осаждения дигидрата дикальцийфосфата на поверхность трабекул деминерализованного костного матрикса и показаны его выраженные остеогенные свойства *in vivo*.

Таким образом, представленные в работе подходы открывают новые возможности для создания высокоэффективных остеопластических материалов для регенерации костной ткани.

ВЫВОДЫ

1. Пастообразный гидратированный кальций-фосфатный ГАп-материал, полученный в результате низкотемпературного синтеза (20°C), обладает более выраженными признаками биологической безопасности и остеокондуктивности, чем его аналог после высокотемпературного синтеза (120°C);

2. Цитотоксический эффект *in vitro* различных кальций-фосфатных соединений (ДФФД, ОКФ и аГАп-НТ) наиболее проявляется для зависимых от прикрепления клеток, а их биологическая безопасность и остеокондуктивность *in vivo* убывает в ряду ДКФД>ОКФ>аГАп-НТ;

3. Частичное замещение ионов Ca^{2+} на Sr^{2+} в структуре ОКФ значительно снижает степень его цитотоксичности *in vitro*, а также повышает его биологическую безопасность и остеокондуктивность *in vivo*;

4. Биомиметическая низкотемпературная реминерализация коллагенового костного матрикса посредством осаждения на его поверхность дигидрата дикальцийфосфата позволяет получать композитный материал с остеогенными свойствами.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи:

1. **Minaychev V.** Composite Remineralization of Bone-Collagen Matrices by Low-Temperature Ceramics and Serum Albumin: A New Approach to the Creation of Highly Effective Osteoplastic Materials / Minaychev V.V., Teterina A.Y., Smirnova P.V., Menshikh K.A., Senotov A.S., Kobyakova M.I., Smirnov I.V., Pyatina K.V., Krasnov K.S., Fadeev R.S., V. S. Komlev, I. S. Fadeeva // Journal of Functional Biomaterials. – 2024. – V. 15. – №2. DOI: 10.3390/jfb15020027.

2. **Minaychev V.** Low-Temperature Calcium Phosphate Ceramics Can Modulate Monocytes and Macrophages Inflammatory Response In Vitro / Minaychev V. V., Smirnova P. V., Kobyakova M. I., Teterina A. Y., Smirnov I. V., Skirda V. D., Alexandrov A. S., Gafurov M. R., Shlykov M. A., Pyatina K. V., Senotov A. S., Salyntin P. S., Fadeev R. S., Komlev V. S., Fadeeva I. S. // Biomedicines. – 2024. – V. 12. – №2. DOI: 10.3390/biomedicines12020263.

3. Teterina A. Injectable Hydrated Calcium Phosphate Bone-like Paste: Synthesis, In Vitro, and In Vivo Biocompatibility Assessment / A. Y. Teterina, **V. V. Minaychev**, P. V. Smirnova, M. I. Kobiakova, I. V. Smirnov, R. S. Fadeev, A. A. Egorov, A. A. Ashmarin, K. V. Pyatina, A. S. Senotov, I. S. Fadeeva, V. S. Komlev // Technologies. – 2023. – V. 11. – № 77. DOI: 10.3390/technologies11030077.

4. Fadeeva I. Biomimetic Remineralized Three-Dimensional Collagen Bone Matrices with an Enhanced Osteostimulating Effect / I.S. Fadeeva, A. Y. Teterina, **V. V. Minaychev**, A. S. Senotov, I. V. Smirnov, R. S. Fadeev, P. V. Smirnova, V. O. Menukhov, Y. V. Lomovskaya, V. S. Akatov, S. M. Barinov, V. S. Komlev // Biomimetics. – 2023. – V. 8. – № 91. DOI: 10.3390/biomimetics8010091.

5. Teterina A. Octacalcium Phosphate for Bone Tissue Engineering:

Synthesis, Modification, and In Vitro Biocompatibility Assessment / A. Y. Teterina, I. V. Smirnov, I. S. Fadeeva, R. S. Fadeev, P. V. Smirnova, **V. V. Minaychev**, M. I. Kobyakova, A. Y. Fedotov, S. M. Barinov, V. S. Komlev // International Journal of Molecular Sciences. – 2021 – V. 22. – № 23. DOI: 10.3390/ijms222312747.

6. **Minaychev V. V.** Aggregation of Hydroxyapatite Particles and Inhibition of Cell Adhesion on this Bio-Active Material as Key Factors that Limit its Biointegration / Minaychev V.V. Kirsanova P.O., Zvyagina A.I., Odintsova A.S., Fadeeva I.S., Akatov V.S. // Biophysics. – 2019. – V. 64. №5. DOI: 10.1134/S0006350919050154.

7. Teleshev A.T. Hydroxyapatite for Filling Bone Tissue Defects. / Teleshev A.T, Gorshenev V.N., Yakovleva M.A., Fomichev V.A., Fadeev R.S., **Minaychev V.V.**, Akatov V.S. // Biomed Eng. – 2018. – V. 52. DOI: 10.1007/s10527-018-9773-4.

8. Панкратов А. Проблемы биоинтеграции микро- и нанокристаллического гидроксипатита и подходы к их решению / А.С. Панкратов, И. С. Фадеева, **В. В. Минайчев**, П. О. Кирсанова, А. С. Сенотов, Ю. Б. Юрасова, В. С. Акатов В С. // Гены и Клетки. – 2018. – Т.13. – № 3. DOI: 10.23868/201811032.

Патенты:

Сенотов А.С., Акатов В.С., Фадеева И.С., Кирсанова П.О., **Минайчев В.В.**, Фадеев Р.С. «Способ изготовления остеопластического материала из костной ткани». Патент на изобретение РФ №2686309 от 25.04.2019, Бюл. №12.

По результатам работы опубликовано 11 тезисов в сборниках материалов конференций:

1. **Minaichev V.** Remineralization of Demineralized Bone Matrixes with Preserved Fibrillary Structure as a Promising Approach to Obtain Highly Effective Osteoplastic Materials / V. Minaichev, P. Smirnova, A. Senotov, A. Teterina, I. Fadeeva // BIO Web of Conferences. – 2023. – Т. 57. – № 04001;

2. **Minaychev V.** Limitation of biocompatibility of hydrated nanocrystalline hydroxyapatite / V. V. Minaychev, A. T. Teleshev, V. N. Gorshenev, M. A. Yakovleva, V. A. Fomichev, A. S. Pankratov, K. A. Menshikh, R. S. Fadeev, I. S. Fadeeva, A. S. Senotov, M. I. Kobyakova, Y. B. Yurasova, V. S. Akatov // IOP Conf. Series: Materials Science and Engineering. – 2018. – Т. 347. – № 1;

3. Смирнова П.В. Разработка минерал-полимерных материалов, предназначенных для восстановления и регенерации утраченных костных тканей / Смирнова П.В., Смирнов И.В., Тетерина А.Ю., **Минайчев В.В.**, Фадеева И.С., Комлев В.С. // V Конгресс по регенеративной медицине. Гены и Клетки. Научно-практический журнал. Том XVII. Приложение, 2022, 23–25 ноября 2022 г., Москва, Россия, стр. 216.

4. **Минайчев В.В.** Исследование влияния кальцийфосфатных соединений, полученных методом низкотемпературной химической трансформации, на жизнеспособность клеток *in vitro* / Минайчев В. В., Фадеева И.С., Смирнов И.В., Тетерина А.Ю., Фадеев Р.С., Михеева П.В., Кобякова М.И., Звягина А.И., Акатов В.С. // III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов. X российский симпозиум «Белки и пептиды». VII съезд физиологов СНГ. Том 2., 3-8 октября 2021 г., Сочи-Дагомыс, Россия, стр. 194.

5. **Minaychev V.V.**, Fadeeva I.S., Kirsanova P.O., Menshikh K.A., Senotov A.S., Akatov V.S. Aggregation of nanosized hydroxyapatite particles as the main limiting factor of nanosized hydroxyapatite based osteoplastic materials biointegration. / Minaychev V.V., Fadeeva I.S., Kirsanova P.O., Menshikh K.A., Senotov A.S., Akatov V.S. // Биологическая подвижность. Материалы XII Всероссийского симпозиума, 17-19 мая 2019 г., Пушкино, Россия, стр. 178-181.

6. **Минайчев В.В.** Повышение остеоиндуктивных свойств наноразмерного гидроксиапатита в его сочетании с остеокондуктивным коллагеновым матриксом / Минайчев В. В., Теплова П. О., Меньших К. А., Фадеева И. С., Звягина А. И., Одинцова А. С., Акатов В. С. // Материалы IV Национального конгресса по регенеративной медицине. Гены и Клетки. Научно-практический журнал. Том XIV. Приложение, 20–23 ноября 2019 г., Москва, Россия, стр. 152.

7. **Минайчев В.В.** Слабые адгезионные свойства и агрегация как основные лимитирующие факторы биоинтеграции наноразмерного гидроксиапатита в организме / Минайчев В.В., Кирсанова П.О., Краснов К.С., Фадеева И.С., Акатов В.С. // Материалы VI Съезда биофизиков России, 16-21 сентября 2019 г., Сочи, Россия, стр. 158.

8. **Минайчев В.В.** Дозозависимый эффект наноразмерного гидроксиапатита в остеопластических материалах / Минайчев В.В., Кирсанова П. О., Фадеева И.С., Краснов К.С., Акатов В. С. // Сборник тезисов докладов VII научной молодежной школы-конференции «Химия, физика, биология: пути интеграции», 17-19 апреля 2019 г, Москва, Россия, стр. 52.

9. Меньших К.А. Реминерализация костных матриц фосфатами кальция как способ повышения остеоиндуктивности / Меньших К. А., Сенотов А. С., **Минайчев В. В.**, Фадеева И. С., Фадеев Р. С., Кирсанова П. О., Акатов В. С. // Материалы 22 международной Пущинской школы-конференции молодых ученых «Биология – наука XXI века», 23-27 апреля 2018 г., Пущино, Россия, стр. 229;

10. **Минайчев В.В.** Синтез и свойства *in vivo* нанопасть на основе гидроксиапатита, предназначенных для реконструктивной хирургии костной ткани / Минайчев В.В., Сенотов А. С., Меньших К. А., А. И. Звягина А. И., Фадеева И. С., Акатов В. С. // Сборник тезисов X Всероссийского конгресса молодых ученых-биологов «Симбиоз-Россия», 25-28 октября 2017 г., Казань, Россия, стр. 44-46;

11. **Минайчев В.В.** Исследование биосовместимости паст на основе наноразмерного гидроксиапатита, разрабатываемых для малоинвазивной хирургии костной ткани / Минайчев В.В., Меньших К.А., Сенотов А.С., Кирсанова П.О., Звягина А.И., Фадеева И.С., Телешев А.Т., Акатов В.С. // Материалы третьего междисциплинарного молодежного научного форума с международным участием «Новые материалы», 21-24 ноября 2017 г., Москва, Россия, стр. 780-782.

Связь работы с научными программами.

Диссертационная работа выполнена в рамках Гос.задания ИТЭБ РАН (темы НИР №№ АААА-А18-118040990028-2, 122012000066-8 и 124013000613-9) и поддержана грантами Российского научного фонда №21-73-20251 «Влияние структурных и фазовых трансформаций кальцийфосфатных соединений на механизмы биоинтеграции или отторжения материалов, предназначенных для регенерации костной ткани» (руководитель – Баринов С.М.) и №22-73-00215 «Биосперированные минерал-полимерные материалы для направленной регенерации костной ткани» (руководитель – Тетерина А.Ю.), Фонда содействия инновациям в рамках Программ «Развитие» №221АГР/19286 «Высокоэффективные остеопластические материалы на основе ксеногенных матриц для восстановительной хирургии костной ткани» (руководитель – Сенотов А.С.) и «У.М.Н.И.К» №13194ГУ/2018 «Разработка гибридного остеопластического материала, предназначенного для малоинвазивных хирургических вмешательств» (руководитель – Минайчев В. В.), а также Совета по грантам Президента Российской Федерации в рамках Стипендии Президента РФ (СП-1275.2019.4).