

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

На правах рукописи



САВЕЛЬЕВА МАРИЯ СЕРГЕЕВНА

**ВЛИЯНИЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ МАТЕРИАЛОВ
НА ОСНОВЕ КАРБОНАТА КАЛЬЦИЯ И ПОЛИКАПРОЛАКТОНА
НА РЕГЕНЕРАТИВНЫЕ ПРОЦЕССЫ *IN VIVO***

Специальность 1.5.2 – биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Саратов – 2024

Работа выполнена на базе лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики» научного медицинского центра Федерального Государственного Бюджетного Образовательного Учреждения Высшего Образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Научный руководитель:	Доктор химических наук, профессор центра фотоники и фотонных материалов автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий» Горин Дмитрий Александрович
Официальные оппоненты:	Доктор физико-математических наук, профессор кафедры физики полимеров и кристаллов, Московского Государственного Университета имени М.В. Ломоносова Галлямов Марат Олегович Кандидат химических наук, ведущий научный сотрудник лаборатории Биоорганических структур Отделения «Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова» Курчатовского комплекса кристаллографии и фотоники (КККиФ) НИЦ «Курчатовский институт» Паллаева Татьяна Николаевна
Ведущая организация:	Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова Российской академии наук

Защита состоится «25» декабря 2024 г. в 16:00 на заседании диссертационного совета 24.2.392.06 на базе Федерального Государственного Бюджетного Образовательного Учреждения Высшего Образования «Саратовский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского» по адресу: 410012 г. Саратов, ул. Астраханская, д.83, корпус 11, аудитория 515

С диссертацией можно ознакомиться в Зональной научной библиотеке имени В.А. Артисевич ФГБОУ ВО «Саратовский государственный научный исследовательской университет имени Н.Г. Чернышевского» и на сайте:
<https://www.sgu.ru/research/dissertation-council/24-2-392-06/vliyanie-nanostrukturirovannykh-materialov-na-osnove>

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.ф.-м.н., доцент



Генина Элина Алексеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Работа посвящена улучшению биосовместимости, остеогенеза, ангиогенеза и остеоинтеграции нетканых полимерных материалов на основе поликапролактона, предназначенных для замещения дефектов кости, путем разработки подходов к созданию остеокондуктивных покрытий для этих материалов. Были разработаны покрытия на основе пористого карбоната кальция в полиморфной модификации ватерита для нетканых полимерных материалов. Исследованы адгезия и выживаемость клеток нормальных дермальных фибробластов человека *in vitro* на поверхности нетканых полимерных материалов с ватеритными покрытиями в сравнении с материалами без покрытий. Исследована биосовместимость, а также процессы остеогенеза и ангиогенеза в тканях *in vivo* при имплантации нетканых полимерных материалов с ватеритными покрытиями на моделях подкожной имплантации и имплантации в дефект бедренной кости крысы.

Актуальность исследования

Поиск и разработка новых методов лечения нарушений и заболеваний костно-мышечной системы человека является актуальной задачей биомедицины. Она может быть решена благодаря созданию новых материалов, способных стимулировать регенеративные процессы в скелетной соединительной ткани. В современной травматологической практике пластика костных дефектов после переломов длинных костей требуется до 27% пациентов, а при лечении костных кист – в 20-25% случаев. Особый интерес для костной пластики представляют имплантационные материалы на основе биосовместимых полимеров, таких как, например, коллаген или поликапролактон (ПКЛ), способных к биорезорбции и трансформации в организме, что является их ключевым преимуществом. Также к достоинствам полимерных имплантатов стоит отнести гибкость в разработке структуры и состава полимерных композитов [1]. Одной из наиболее перспективных стратегий, направленных на улучшение регенеративных свойств имплантов, является разработка так называемых биомиметических, т.е. сходных по составу и структуре с костной тканью, материалов. Будучи имплантированными в дефект, биомиметики способны создать такую биологическую реакцию со стороны окружающих тканей, которая будет направлена на ускорение восстановления целостности дефекта.

Костная ткань имеет организованную композитную структуру, представляющую собой матрицу из волокон коллагена, между которыми находятся кристаллы гидрокси-($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) и карбонатапатита ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{CO}_3$). Синтез костного апатита на коллагеновых волокнах осуществляется с участием щелочной фосфатазы в процессе кальцификации коллагенового матрикса при захвате остеобластами ионов Ca^{2+} и PO_4^{3-} из межклеточного пространства. В связи с этим, особый интерес при создании матриксных материалов-биомиметиков для нужд костной инженерии представляет разработка новых полимер-минеральных композитов. В частности, перспективным являются композиционные материалы на основе нетканых полимерных матриц с неорганическим покрытием из CaCO_3 в полиморфной модификации ватерита, способные стимулировать остеогенез и обеспечивать улучшенную остеоинтеграцию.

Исследование биологической реакции организма при помещении импланта в мягкую или костную ткань является особенно важным этапом разработки новых имплантационных материалов. Эти исследования позволяют оценить местное патогенное действие материала на живую ткань (на макроскопическом и микроскопическом уровнях), общее системное токсическое действие на организм, а также эффективность материала при замещении и стимуляции восстановления структурно-функциональной целостности дефекта. Изучение процессов интеграции биоматериалов в структурно-функциональные системы организма и их влияние на процессы жизнедеятельности представляет большой

интерес при разработке новых биоматериалов и тканеинженерных конструкций [2]. С этой точки зрения, наноструктурные тканеинженерные конструкции на основе неорганических наночастиц, полимерных матриц и биологически активных молекул как потенциальные кандидаты для костных имплантов нового поколения представляют большой интерес для выяснения механизмов фундаментальных структурно-функциональных взаимосвязей в модельных и биологических системах.

Таким образом, разработка подходов к созданию новых функциональных композитных структур на основе биосовместимых и биомиметических компонентов и изучение биологической реакции организма на интеграцию данных структур в ткани, реализованные в ходе данной диссертационной работы, обладают актуальностью как с научной, так и с прикладной точки зрения, и являются перспективным направлением биофизических и биомедицинских исследований.

Цели и задачи исследования

На основе анализа научной литературы были сформулированы цель и задачи диссертационной работы:

Цель диссертационной работы – разработка подходов к повышению эффективности регенеративных процессов (остеогенеза, ангиогенеза) при имплантации нетканых полимерных матриц в дефект костной ткани за счет формирования на них биомиметических ватеритных покрытий.

Основные задачи диссертационного исследования:

1. Определить подходы к улучшению регенеративных свойств (биосовместимости, остеокондуктивности, и остеоинтеграции) нетканых полимерных матриц с помощью формирования на них биомиметического покрытия на основе ватерита и выявить условия воспроизводимости подхода к получению данных покрытий;

2. Исследовать влияние различных физических условий формирования ватеритных покрытий полимерной матрицы на их структуру, размер и массу.

3. Оценить эффективность иммобилизации, биологически активных веществ (БАВ) (таниновая кислота (ТК), щелочная фосфатаза (ЩФ)) в ватеритные покрытия, сформированные на нетканой полимерной матрице;

4. Исследовать цитотоксический эффект полимерных матриц с ватеритными покрытиями на примере клеточной линии нормальных дермальных фибробластов человека (НДФЧ) *in vitro*;

5. Исследовать процесс регенерации тканей на модели подкожной имплантации нетканых полимерных матриц и имплантации полимерных матриц в дефект бедренной кости на белых крысах *in vivo*;

6. Изучить влияние БАВ (таниновой кислоты, щелочной фосфатазы), иммобилизованных в ватеритные покрытия, сформированные на полимерной матрице, на процессы ангиогенеза, остеогенеза и остеоинтеграции *in vivo*.

7. Оценить эффективность применения разработанных нетканых полимерных матриц в качестве ГКР платформ при их модификации частицами серебра.

Научная новизна исследований

1. Показана возможность формирования сплошных покрытий на основе ватерита (фактор заполнения волокон ватеритом $92 \pm 2\%$) на поверхности нетканых матриц на основе поликапролактона с помощью ультразвуковой (УЗ) минерализации (в течение 30 с, при частоте 35 кГц и плотности мощности 0.64 Вт/см^3).

2. Продемонстрировано, что формирование ватеритного покрытия на поверхности волокон нетканых полимерных матриц обеспечивает повышение выживаемости клеток (нормальных дермальных фибробластов человека) *in vitro*.

3. Показано, что разработанные нетканые матрицы с ватеритными покрытиями обладают высокой степенью биосовместимости по сравнению с неткаными матрицами без ватеритного покрытия при подкожной имплантации белым крысам *in vivo*.

4. Продемонстрирована возможность нормализации интенсивности васкуляризации при иммобилизации таниновой кислоты в ватеритные покрытия нетканых полимерных матриц при их подкожной имплантации в область холки белым крысам *in vivo*.

5. Установлено, что имплантация нетканых полимерных матриц с ватеритным покрытием в зону дефекта бедренной кости белых крыс приводит к ускорению процесса образования новой костной ткани *in vivo* по сравнению с матрицами без ватеритного покрытия.

6. Показана возможность стимуляции остеогенеза при иммобилизации ЩФ в ватеритные покрытия нетканых полимерных матриц при их имплантации в дефект бедренной кости крыс *in vivo*.

7. Продемонстрировано, что ватеритные покрытия, модифицированные частицами серебра, на поверхности нетканых полимерных матриц позволяют повысить коэффициент усиления КР сигнала.

Научная и практическая значимость

Разработаны новые гибридные нетканые матрицы, обладающие высокими показателями биосовместимости, остеокондуктивности, остеоиндуктивности и остеоинтеграции за счет присутствия на поверхности их волокон ватеритного покрытия, которое выступает в роли биофизического и биохимического стимула, влияющего на биологическую реакцию организма. Данные матрицы могут быть использованы для создания новых функциональных имплантов, предназначенных для восстановления дефектов костной ткани. Иммобилизация биологически активных веществ в ватеритное покрытие матриц позволяет повысить регенеративный потенциал такого имплантационного материала. Так, например, ведение таниновой кислоты способно обеспечивать регуляцию интенсивности васкуляризации, а применение щелочной фосфатазы позволяет ускорять остеогенез и стимулировать восстановление структурно-функциональной целостности дефекта костной ткани.

Таким образом, результаты работы закладывают основу для создания новых перспективных материалов для нужд регенеративной медицины, а также создают предпосылки повышения эффективности терапии заболеваний опорно-двигательной системы.

Полученные данные о возможности усиления эффекта ГКР путем модификации разработанных гибридных нетканых матриц частицами серебра говорят о перспективности использования таких материалов в качестве платформ для идентификации и мониторинга молекул, участвующих в биологических процессах.

Положения, выносимые на защиту

1. Культивирование клеточной линии нормальных дермальных фибробластов человека на нетканых однослойных матрицах из поликапролактона без и с ватеритным покрытием показало, что последнее стимулирует пролиферацию и поддерживает жизнеспособность клеток. Жизнеспособность клеток линии нормальных дермальных фибробластов человека на матрицах из поликапролактона с ватеритным покрытием была выше в 1.2 раза, чем на ПКЛ-матрицах без ватеритного покрытия.

2. Нормализация интенсивности ангиогенеза достигается за 21 день при подкожной имплантации белым крысам нетканых матриц из поликапролактона с ватеритным

покрытием, содержащим таниновую кислоту (25 ± 6 масс.%) по сравнению с матрицами без таниновой кислоты.

3. Процесс высвобождения щелочной фосфатазы из нетканых матриц из поликапролактона с ватеритным покрытием в условиях *in vitro* описывается с помощью функции распределения Вейбулла и подчиняется закону диффузии Фика. В течение 96 часов высвобождается 22% от общего количества щелочной фосфатазы, содержащейся в матрице.

4. Ватеритное покрытие на нетканых матрицах из поликапролактона позволяет в 2 раза ускорить процесс формирования новой костной ткани при имплантации в дефект бедренной кости белым крысам по сравнению с нетканой матрицей из поликапролактона без ватеритного покрытия. Иммобилизация щелочной фосфатазы в ватеритное покрытие нетканых матриц дополнительно ускоряет процесс остеогенеза в 1.7 раз (по сравнению с нетканой матрицей из поликапролактона с ватеритным покрытием без щелочной фосфатазы).

Степень достоверности

Достоверность результатов исследования в диссертационной работе, сделанных выводов, обсуждений и заключения подтверждается:

1. Использованием современного научного поверенного оборудования и обработкой результатов измерений с использованием проверенных методов.

2. Объемом использованного в работе материала и применением традиционных статистических методов обработки результатов.

3. Воспроизводимостью экспериментальных и расчетных данных, а также их соответствием с литературными данными и данными других научных групп.

4. Опубликованием результатов в рецензируемых российских и международных научных журналах и апробацией на международных конференциях.

Апробация работы

Результаты работы докладывались и обсуждались на следующих конференциях: "Science of Future" (17-20 сентября 2014 г., Санкт-Петербург, Россия); 6th International Conference «Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: technology, properties, applications» (21-24 мая 2015 г., Саратов, Россия); 7th International Conference «Nanoparticles, nanostructured coatings and microcontainers: technology, properties, applications» (12-15 мая 2016 г., Томск, Россия); 5th Belgian Symposium on Tissue Engineering (4-5 мая 2017 г., Левен, Бельгия); 1st Nano Bio Materials and Raman Characterization Workshop & Raman4Clinics (13-15 сентября 2017 г., Гент, Бельгия); Nanomaterials in Biomedical Sciences. Flanders Training Network Life Sciences (f-Tales) (19-20 сентября 2017 г., Гент, Бельгия); 25th Anniversary Conference "Biomaterials in Medicine and Veterinary Medicine" (13-16 октября 2017 г., Ритро, Польша); British Council Researcher Links Workshop "Prevention of microbial contamination of biomaterials for tissue regeneration and wound healing" (1-3 октября 2018 г., Ланкастер, Великобритания); IV International Conference on Metamaterials and Nanophotonics, METANANO 2019 (15 - 19 июля 2019 г., Санкт-Петербург, Россия); UK-Russia Workshop "Patient-tailored biomaterials for tissue regeneration, combating microbial contamination and drug delivery" (2-4 октября 2019 г., Ланкастер, Великобритания); Saratov Fall Meeting'22, 10th International Symposium "Optics and Biophotonics" (26-30 сентября 2022 г. Саратов, Россия); Saratov Fall Meeting'23, 11th International Symposium "Optics and Biophotonics" (25-29 сентября 2023 г. Саратов, Россия).

Личный вклад диссертанта

Личный вклад автора состоит в самостоятельном выполнении представленных в диссертации экспериментальных исследований, разработке методик минерализации и

нанесения гибридных покрытий, исследовании образцов методами спектрофотометрии, инфракрасной спектроскопии, обработке и интерпретации полученных данных, а также проведении анализа литературы по соответствующей тематике. При использовании результатов, полученных в соавторстве, приведены ссылки на соответствующие источники.

Финансовая поддержка работы была представлена в рамках гранта Правительства Российской Федерации №14.Z50.31.0004 для государственной поддержки научных исследований, проводимых под руководством ведущих ученых в российских образовательных учреждениях высшего профессионального образования, научных учреждениях государственных академий наук и государственных научных центрах Российской Федерации, гранта Евросоюза и Правительства Российской Федерации ERA-Net joint project: Intelbiocomp «Fabrication and investigation of new hybrid scaffolds with controlled porosity hierarchy» (HybrBioScaf), гранта G-Risc при поддержке Немецкой службы академических обменов (DAAD), краткосрочной научно-исследовательской стипендии при поддержке Немецкой службы академических обменов (DAAD), гранта Министерства образования и науки РФ № FSRР-2020-0002 и грантов Российского научного фонда № 17-73-20172, № 21-75-10042, № 22-73-10194.

Публикации

По теме диссертации опубликовано 17 печатных работ, включая 14 статей в изданиях, входящих в перечень рекомендованных ВАК при Минобрнауки РФ и библиографические базы данных Web of Science и Scopus, и 3 тезисов докладов.

Структура и объем диссертации

Диссертация состоит из введения, 5 глав, заключения и списка использованных источников, состоящего из 219 наименований. Общий объем диссертации составляет 155 страниц, включая 38 рисунков и 8 таблиц.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во **введении** сформулированы цель и задачи исследования, обозначены актуальность, научная новизна, научная и практическая значимость исследований, представлены положения, выносимые на защиту.

Первая глава посвящена обзору литературных данных по теме диссертационной работы. Изучены современные данные о биологической реакции живых тканей и целого организма на интеграцию материалов. Изучены особенности регенерационных процессов в организме при нарушении структурно-функциональной целостности тканей, а также при замещении дефектов имплантатами. Изучено современное состояние исследований и существующие тенденции в области инженерии костной ткани и создания биоматериалов, используемых в медицинской практике. Дан обзор различных типов материалов для костных имплантатов. Особое внимание уделено биосовместимости и биомиметическим подходам к созданию композитных материалов с улучшенной функциональностью.

Во второй главе описаны использованные методики получения и модификации нетканых полимерных матриц, методы исследования и характеристики данных матриц, а также методы исследования адгезивных и биосовместимых свойств матриц на культуре клеток нормальных дермальных фибробластов человека *in vitro*, и методы исследования биосовместимых и функциональных свойств матриц *in vivo*.

В третьей главе описывается методика для получения однослойных нетканых ПКЛ-матриц и их модификации путем формирования покрытий на основе пористого карбоната кальция CaCO₃ в структуре ватерита. Формирование ватеритных покрытий было проведено методом соосаждения из смеси водных растворов солей, содержащих ионы Ca²⁺

и CO_3^{2-} . При этом волокна полимерной матрицы (рис. 1А) выступали в роли центров зародышеобразования кристаллов CaCO_3 . Было апробировано три подхода к модификации матриц с помощью CaCO_3 . В первом случае полимерная матрица погружалась на 10 мин в раствор, содержащий Ca^{2+} и CO_3^{2-} , что привело к формированию CaCO_3 в структуре кубических кристаллов кальцита на волокнах матрицы (рис. 1Б). Во втором случае время инкубации матриц в рабочем растворе было сокращено до 1 мин, что привело к формированию CaCO_3 в структуре ватерита (рис. 1В). Сокращение времени инкубации прерывает процесс формирования CaCO_3 , и в данном случае кристаллизация CaCO_3 останавливается на стадии метастабильной полиморфной модификации ватерита, который при нормальных условиях переходит в финальную стабильную фазу кальцита. В третьем случае, инкубация матрицы в рабочем растворе была проведена в течение 30 с при обработке раствора ультразвуковым (УЗ) облучением при частоте 35 кГц и плотности мощности 0.64 Вт/см^3 . Применение данной методики позволило получить сплошные покрытия на основе CaCO_3 в структуре ватерита на полимерных волокнах матрицы (рис. 1Г).

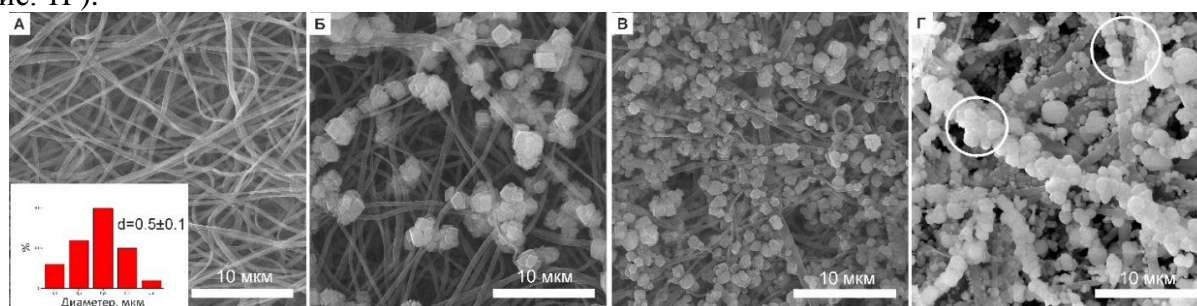


Рис. 1. СЭМ-изображения исходной полимерной матрицы ПКЛ (А) и матрицы ПКЛ, модифицированной с применением следующих подходов: инкубация в рабочем растворе в течение 10 мин (Б); инкубация в рабочем растворе в течение 30 с (В); инкубация в рабочем растворе в течение 30 с при УЗ облучении рабочего раствора (Г). Окружностями обозначены агломераты CaCO_3 , сформировавшие оболочку на полимерном волокне

Формирование ватеритных покрытий в виде оболочек на поверхности волокон матрицы обусловлено влиянием УЗ облучения на образование центров нуклеации и кристаллизации CaCO_3 . УЗ облучение рабочего раствора в процессе синтеза CaCO_3 способствует проникновению раствора во внутренний объем волокнистого материала, что способствует гомогенной минерализации матрицы. Данный эффект обеспечивается кавитацией, которая способствует ускорению процесса зародышеобразования, а также влияет на распределения и количество нуклеационных центров [3]. На рис. 2 схематически проиллюстрирован процесс формирования сплошных ватеритных покрытий на нетканой полимерной матрице с соответствующими СЭМ изображениями.

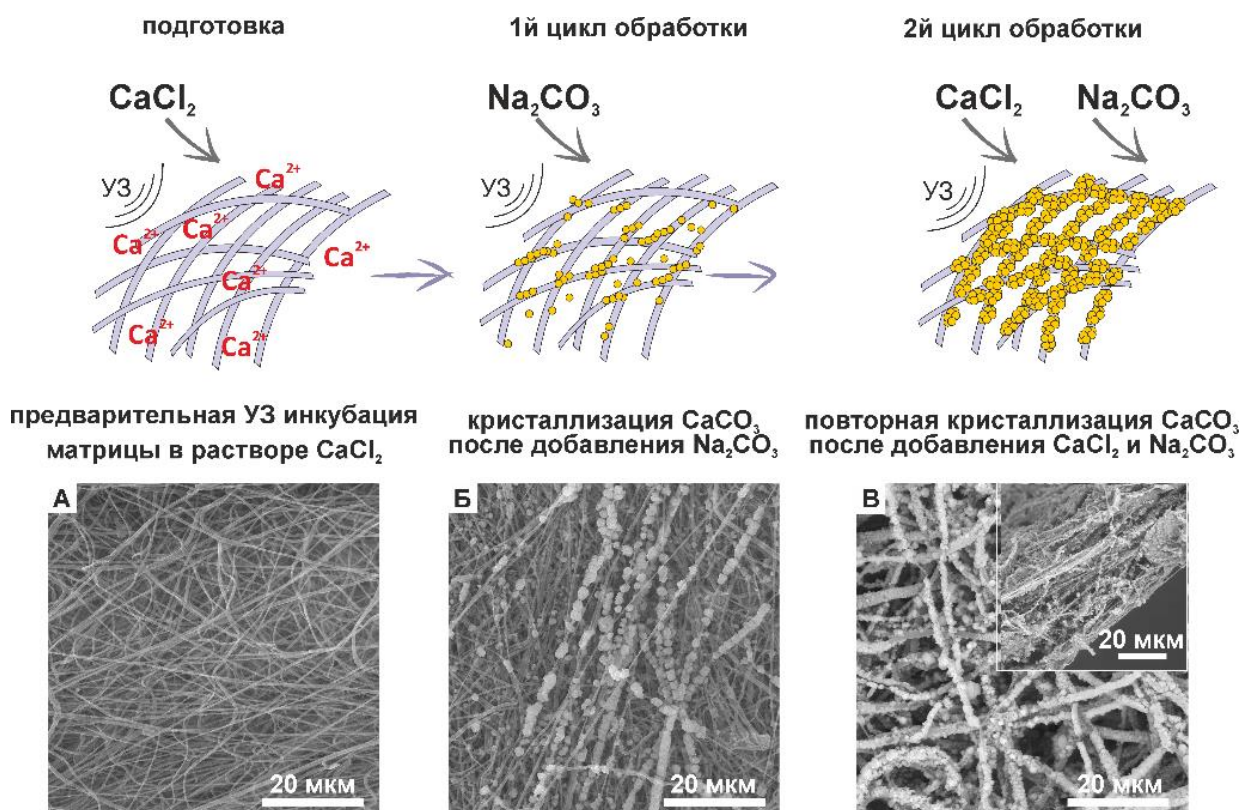


Рис. 2. Схема формирования ватеритных покрытий на поверхности волокон полимерной матрицы с помощью УЗ минерализации и соответствующие СЭМ изображения исходной полимерной матрицы ПКЛ (А), матрицы после первого цикла минерализации (Б) и матрицы с сформированным равномерным ватеритным покрытием после второго цикла минерализации. На вставке на (В) представлен поперечный срез данной матрицы.

На рис. 3А показана зависимость прироста массы CaCO_3 на ПКЛ-матрице в зависимости от количества циклов формирования ватеритного покрытия. Стоит отметить, что данная зависимость носит линейный характер. На рис. 3Б представлены дифрактограммы матриц ПКЛ/ CaCO_3 после 1, 2 и 3 циклов формирования покрытия, демонстрирующие, что в процессе поэтапной обработки на ПКЛ-матрицах образуются покрытия со структурой ватерита однако наличие пика небольшой интенсивности на углах $2\theta \sim 30^\circ$, характерного для структуры кальцита, говорит о незначительном присутствии второй фазы.

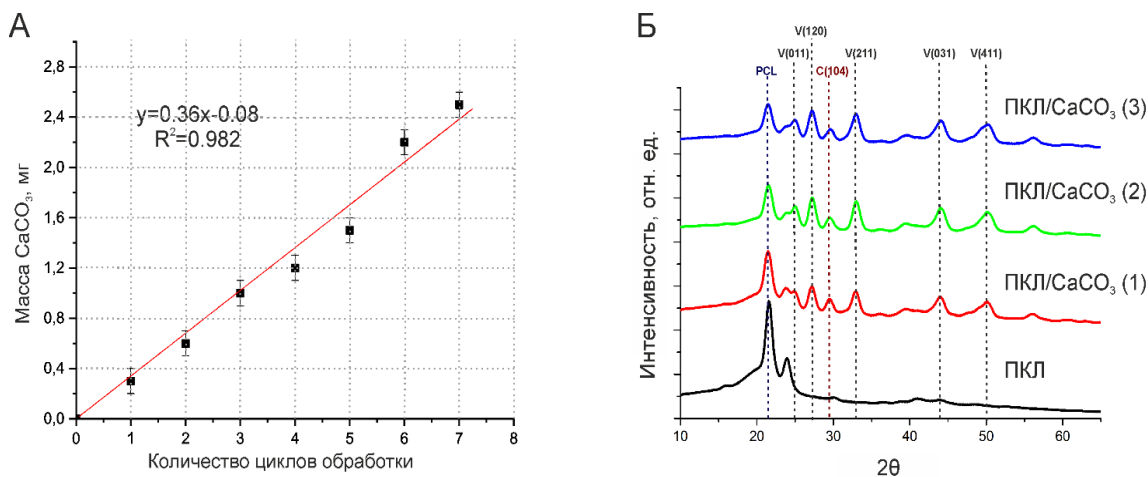


Рис. 3. Зависимость прироста массы CaCO₃ на ПКЛ-матрице (1 см × 1 см) от количества циклов формирования ватеритного покрытия (А), планки погрешностей показывают стандартное отклонение, рассчитанное по 5 измерениям для каждого образца на каждой стадии. Дифрактограммы ПКЛ матриц: исходной матрицы и матриц после одного, двух и трех циклов формирования покрытия (Б); показаны пики, соответствующие фазам ватерита (V), кальцита (C) и ПКЛ (PCL).

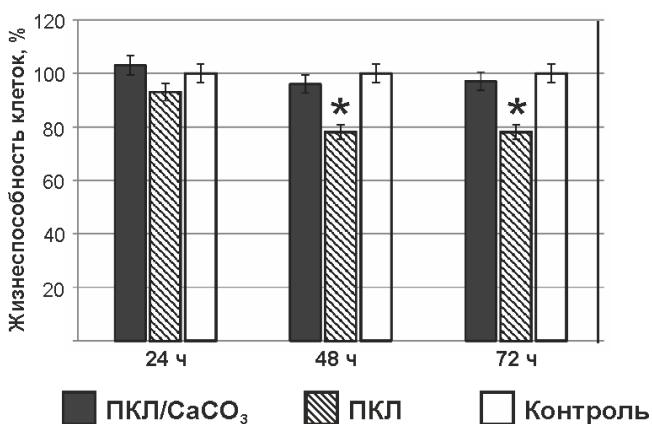


Рис. 4. Зависимость жизнеспособности клеток НДФЧ от длительности инкубации ПКЛ-матриц без (ПКЛ) и с ватеритным покрытием (ПКЛ/CaCO₃). Планки погрешностей отображают стандартное отклонение. Значения, отмеченные звездочкой (*), имеют статистически значимое отличие от контроля (клетки НДФЧ без ПКЛ-матриц) при p<0.05, согласно оценке с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

закрепленных и распростертых на субстрате фибробластов. Матрица ПКЛ/CaCO₃, минерализованная ватеритом, после 48-часовой культивации клеток (рис. 5 Д-Е), демонстрирует скопления клеток на поверхности и продукты клеточного метаболизма, что указывает на активность фибробластов, прикрепленных к матрице. В то же время, наличия подобных продуктов метаболизма на ПКЛ-матрице без ватеритного покрытия не наблюдалось (рис. 14 Ж, З). Таким образом, показано, что клетки обладают лучшей адгезией к ПКЛ-матрицам с ватеритным покрытием, по сравнению с матрицей без ватеритного покрытия.

Была исследована жизнеспособность клеток линии НДФЧ при их инкубации на ПКЛ-матрицах с ватеритным покрытием и без него. Жизнеспособность клеток на матрице ПКЛ/CaCO₃ была сравнима с результатами для контрольного образца (клетки на поверхности культурального пластика) в течение всего эксперимента длительностью 72 ч. В то же время неминерализованная матрица ПКЛ демонстрирует более низкий уровень жизнеспособности клеток по сравнению с минерализованной матрицей ПКЛ/CaCO₃ (в 1.2 раза) и контрольным образцом (в 1.3 раза) (рис. 4).

На СЭМ-изображениях матриц (рис. 5) можно наблюдать клетки с морфологией, типичной для

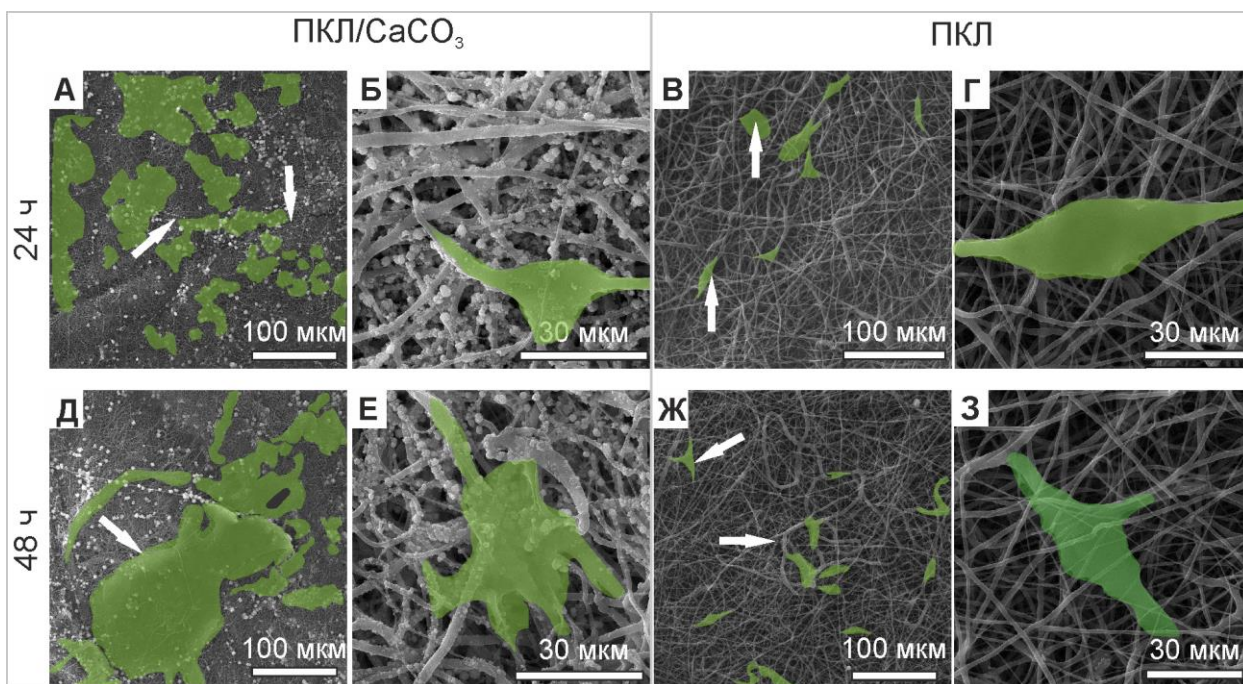


Рис. 5. СЭМ-изображения ПКЛ-матриц с ватеритным покрытием (ПКЛ/ CaCO_3) после инкубации с клетками НДФЧ в течение 24 ч (А, Б) и 48 ч (Д, Е); а также контрольной матрицы (ПКЛ) без ватеритного покрытия после инкубации с клетками НДФЧ в течение 24 ч (В, Г) и 48 ч (Ж, З). Стрелки указывают на клетки (выделены зеленым цветом) и их скопления на матрицах.

Таким образом, разработанная методика синтеза, включающая УЗ облучение рабочего раствора в процессе формирования CaCO_3 , позволила получить непрерывные покрытия на основе CaCO_3 в структуре ватерита на волокнах нетканой полимерной матрицы. Продемонстрировано, что данная модификация полимерной матрицы ватеритными покрытиями позволяет улучшить адгезию и пролиферацию фибробластов в матрице *in vitro*.

В четвертой главе описано исследование местной биологической реакции тканей после имплантации матриц ПКЛ/ CaCO_3 подкожно в область холки белым крысам. Данное исследование является закономерным шагом по апробации матричного материала для его применения в живых системах *in vivo* и включает в себя изучение биосовместимости и процесса регенерации в зоне имплантации, в частности, васкуляризации (ГОСТ ISO 10993-6-2011 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации» [4]). Для имплантации были использованы образцы матриц в форме диска диаметром 1 см и толщиной 100 мкм. Спустя 21 день матрицы были извлечены для проведения исследований их структуры, состава и морфологии. Размеры имплантируемых материалов и период имплантации были определены в соответствии с вышеупомянутым стандартом ГОСТ ISO 10993-6-2011.

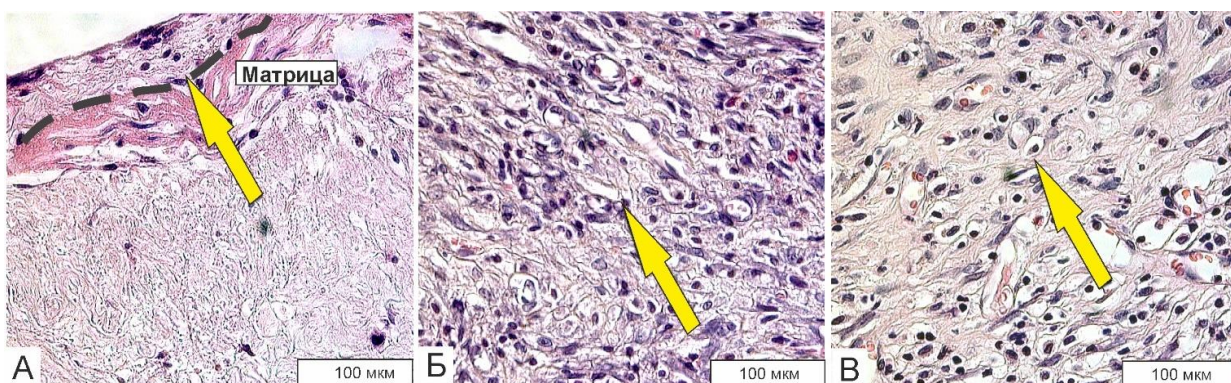


Рис. 6. Оптические изображения гистологических срезов тканей с однослойной нетканой ПКЛ-матрицей без ватеритного покрытия (контрольная группа) на 7й (А), 14й (Б) и 21й день (В) после подкожной имплантации. Черной пунктирной линией выделена граница матрица-ткань, стрелки указывают на фибробласты в области контакта матрица-ткань. Окраска срезов: гематоксилин-эозин.

Биологическая реакция тканей на интеграцию матрицы оценивалась по срезам биологического материала, содержащего матрицу, изъятых из области имплантации. На рис. 6 представлены изображения срезов с контрольной ПКЛ матрицей без ватеритных покрытий, на рис. 7 – с матрицей ПКЛ/СаСО₃.

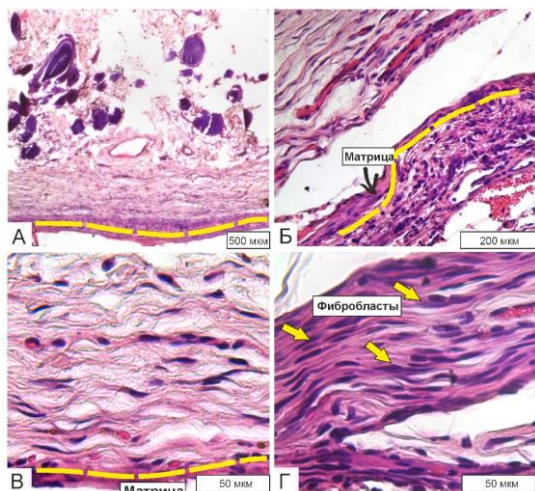


Рис. 7. Оптические изображения гистологических срезов тканей с однослойной нетканой ПКЛ-матрицей с ватеритным покрытием ПКЛ/СаСО₃ (экспериментальная группа) на 21^й день после подкожной имплантации. Желтой пунктирной линией выделена граница матрица-ткань (А-В); желтые стрелки указывают на фибробласты в области границы матрица-ткань (Г). Окраска срезов: гематоксилин-эозин.

При морфологическом анализе срезов обоих типов матриц не наблюдалось признаков воспаления в окружающих тканях (рис. 6 А-В, рис. 7А). Матрица ПКЛ/СаСО₃ была интенсивно колонизирована фибробластами (рис. 7 Б, В); также было отмечено большое количество микрососудов в области матрицы ПКЛ/СаСО₃ (рис. 7 В, Г). Таким образом, результаты гистологического исследования подтвердили способность матрицы ПКЛ/СаСО₃ поддерживать колонизацию фибробластами и фибробластическими элементами, а также способность к эффективной васкуляризации без воспалительной реакции в окружающих тканях. Также показано, что ватерит в составе ПКЛ матриц не оказывает влияние на их биосовместимость, и, следовательно, матрица ПКЛ/СаСО₃ обладает высокой степенью биосовместимости *in vivo*.

Присутствие СаСО₃ на волокнах эксплантированных матриц было подтверждено данными энергодисперсионного анализа, демонстрирующими присутствие атомов Са на них. СЭМ изображение поперечного сечения ПКЛ/СаСО₃ матрицы, извлеченной через 21 день после подкожной имплантации крысам экспериментальной группы демонстрирует СаСО₃ частицы с указанием массовых долей атомов Са, присутствующих в них (рис. 8А). Исследование фазового состава ватеритного покрытия данных матриц далее проводили с помощью рентгеновской дифрактометрии (рис. 8Б). На дифрактограмме исходной матрицы ПКЛ/СаСО₃ наблюдаются пики, соответствующие фазам как ватерита (220, 20, 11), так и кальцита (104, 113). На дифрактограмме эксплантированной матрицы ПКЛ/СаСО₃ присутствуют

выраженные пики кальцита; в то же время отсутствуют некоторые пики ватерита, которые наблюдаются для исходной ПКЛ/ CaCO_3 матрицы. Это может быть связано с тем, что произошла перекристаллизация ватерита в кальцит в течение 21 дня имплантации. В случае негативного контроля (матриц, содержащих овальбумин (ОВА) ПКЛ/ CaCO_3 /ОВА), помимо указанных пиков, присутствуют также пики, характерные для гидроксиапатита (005, 203, 232).

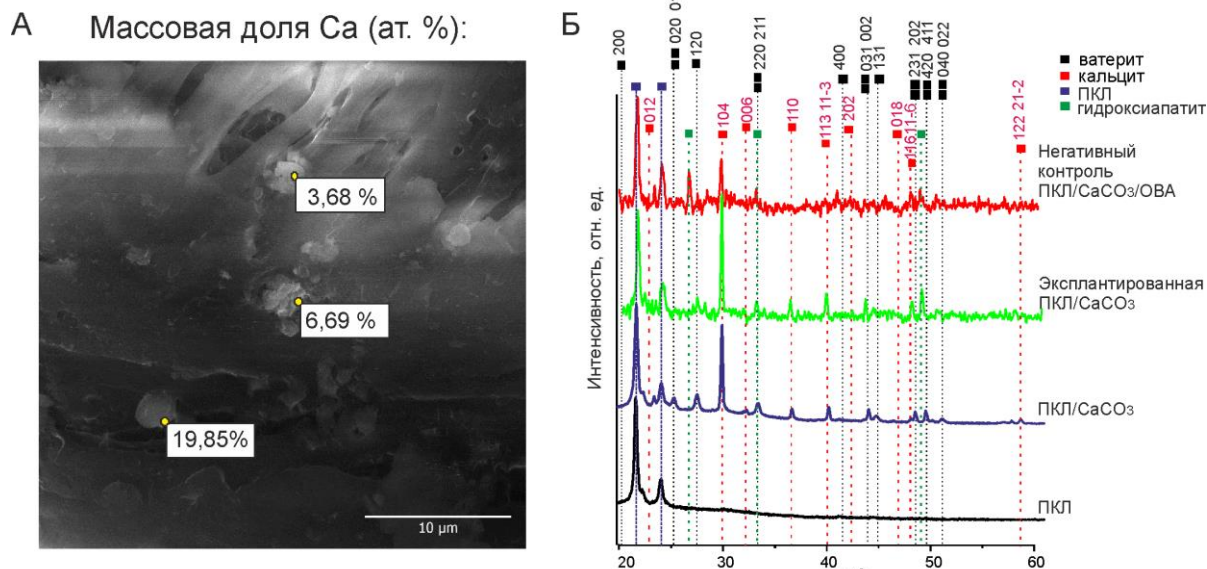


Рис. 8. СЭМ-изображение поперечного среза однослойной нетканой ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 в экспериментальной группе, извлеченного на 21 день подкожной имплантации, с указанием массовых долей атомов Са в обозначенных точках среза (А). Дифрактограммы исходных ПКЛ-матрицы без (ПКЛ) и с ватеритным покрытием (ПКЛ/ CaCO_3), а также эксплантированных ПКЛ/ CaCO_3 и негативного контроля (матриц ПКЛ/ CaCO_3 /ОВА), извлеченных после 21-дневной подкожной имплантации, с указанием пиков, соответствующих фазам ватерита, кальцита, гидроксиапатита и ПКЛ (Б).

В ходе анализа гистологических срезов было выявлено избыточное кровенаполнение микрососудов, находящихся непосредственно на границе с матрицей (см. рис. 7Б), в то время как сосуды в перифокальной зоне матрицы ПКЛ/ CaCO_3 продемонстрировали умеренный кровоток (см. рис. 7А), что свидетельствует о различии в стабильности сосудистой сети зоны имплантации. Также наблюдались множественные кровоизлияния и диапедез эритроцитов в соединительной ткани на границе с матрицей ПКЛ/ CaCO_3 . Хрупкость капилляров и кровоизлияния после эксплантации матрицы, вероятно, свидетельствуют о незавершенности ангиогенного процесса при его высокой интенсивности и обильной васкуляризации. Это обуславливает необходимость оптимизации ангиогенеза и стабилизации сосудистой сетки в матрице. С этой точки зрения, иммобилизация таниновой кислоты (ТК) в ватеритные покрытия матриц очень перспективна для регуляции ангиогенных процессов и стабильности сосудов. Было показано, что ТК способствует стабилизации сосудистых стенок и процесса васкуляризации посредством понижения концентрации свободных радикалов в тканях, что играет ключевую роль в ангиогенезе [5].

ТК была иммобилизована в ватеритные покрытия ПКЛ-матриц методом адсорбции. Сравнение ёмкости загрузки ТК для ПКЛ/ CaCO_3 (25 ± 6 %) и ПКЛ (4 ± 2 %) матриц демонстрирует преимущество пористых ватеритных покрытий для иммобилизации БАВ в полимерные матрицы. Результаты гистологического исследования матрицы и прилежащих тканей в зоне имплантации показали сокращение васкуляризации матрицы, а также

отсутствие кровотоков и диапедеза эритроцитов. При этом колонизация фибробластами происходила только на периферических частях матрицы (рис. 9Б, В, Д, Е).

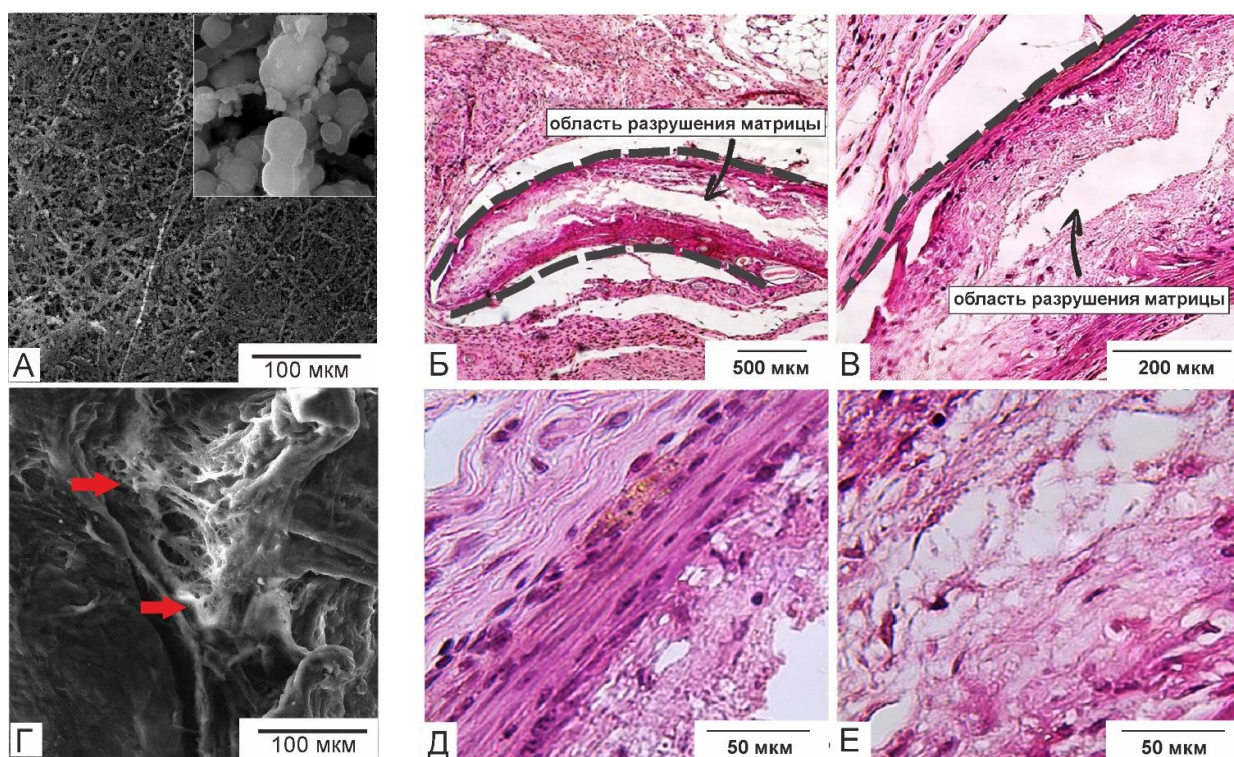


Рис. 9. СЭМ-изображения однослойной нетканой ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием и иммобилизованной ТК (ПКЛ/CaCO₃/ТК) до подкожной имплантации (А) и извлеченной на 21 день после подкожной имплантации (Г). Красные стрелки указывают на область разрушения матрицы. Оптические изображения гистологических срезов ПКЛ/CaCO₃/ТК матрицы на 21 день после подкожной имплантации (Б, В, Д, Е). Окраска срезов: гематоксилин-эозин. Черной пунктирной линией выделена граница матрица-ткань; черные стрелки указывают на область разрушения матрицы.

Данные результаты согласуются с предыдущими исследованиями влияния ТК на жизнедеятельность эндотелиальных клеток *in vitro* [6,7] и могут быть обусловлены ее антиоксидантными свойствами, а также ее антиангиогенной активностью [8]. Полученные результаты свидетельствуют о перспективах применения ватеритных покрытий для иммобилизации БАВ в полимерные матрицы, с одной стороны, и о преимуществах использования ТК в тканевой инженерии в качестве агента, контролирующего процесс васкуляризации в имплантатах и тканях.

Таким образом, в результате исследования местной биологической реакции тканей, вызванной имплантацией матрицы ПКЛ/CaCO₃, было показано, что данные матрицы обладают высокой степенью биосовместимости. ПКЛ-матрицы позволяет осуществлять иммобилизацию функциональных БАВ (на примере ТК) и их доставку в область имплантации. Иммобилизация различных БАВ в ватеритное покрытие волокон ПКЛ-матриц способна инициировать требуемую биологическую реакцию со стороны прилежащих тканей и организма, в зависимости от типа БАВ.

В пятой главе описано исследование местной биологической реакции костной ткани в результате имплантации двухслойных матриц ПКЛ/CaCO₃ в дефект бедренной кости белых крыс в течение 28 дней. Оценка местной реакции ткани на имплантацию, а также продолжительность периода имплантации были проведены в соответствии с международным стандартом ГОСТ ISO 10993-6-2011 [4]. Исследование механических свойств однослойных матриц ПКЛ/CaCO₃ на основе «тонких» волокон (0.7 ± 0.3 мкм)

показало, что значение модуля Юнга составляет 0.4 МПа, что является недостаточным для применения в инженерии костной ткани. Увеличение диаметра волокон («толстые» волокна, 9.7 ± 2.5 мкм) привело к повышению модуля упругости ($E = 6.5$ МПа). Однако, толстоволоконная матрица вызывает сильную воспалительную реакцию при подкожной имплантации крысам. Формирование двухслойных ПКЛ-матриц на основе нетканой толстоволоконной матрицы-субстрата и нетканой тонковолоконной ПКЛ-матрицы (рис. 10А-Г) обеспечило необходимые механические свойства ($E = 4.3$ МПа) с сохранением биосовместимости. Поэтому, матрицы с данной структурой были выбраны для исследования биологической реакции костной ткани в результате их имплантации.

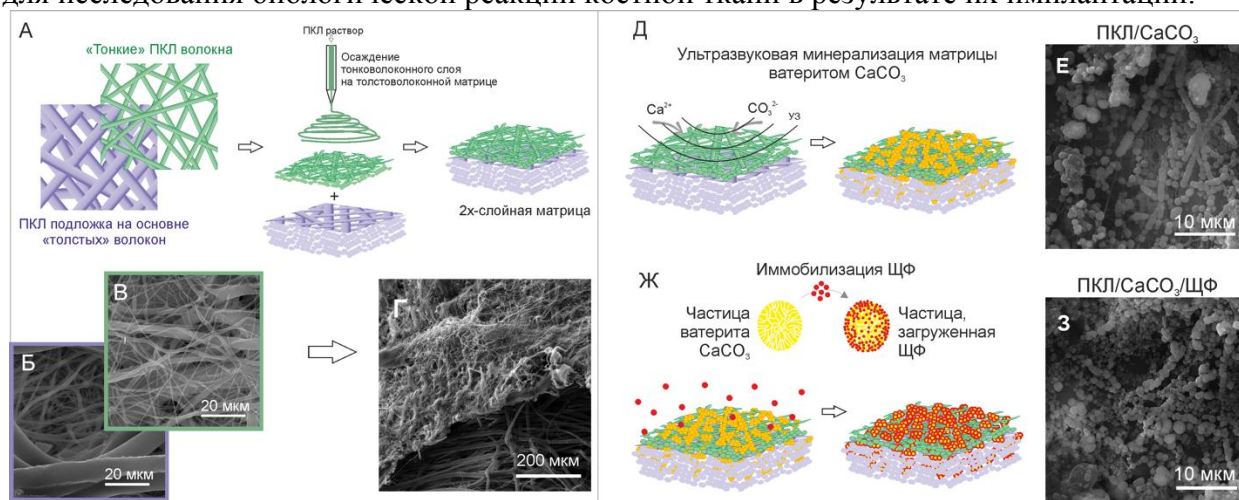


Рис. 10. Схема формирования двухслойной матрицы на основе слоев, состоящих из нетканой толстоволоконной матрицы-субстрата и нетканой тонковолоконной матрицы (А). СЭМ изображения нетканой толстоволоконной матрицы-субстрата (Б), нетканой тонковолоконной матрицы (В) и двухслойной матрицы (Г). Схема минерализации ватеритом двухслойной матрицы (Д) и СЭМ изображение данной матрицы ПКЛ/ CaCO_3 (Е). Схема иммобилизации ЩФ в ватеритные покрытия матриц ПКЛ/ CaCO_3 (Ж) и СЭМ изображение данной матрицы ПКЛ/ CaCO_3 /ЩФ (З).

На поверхности волокон двухслойной ПКЛ-матрицы были сформированы ватеритные покрытия (ПКЛ/ CaCO_3) (рис. 10 Д). СЭМ изображения минерализованной ватеритом ПКЛ/ CaCO_3 -матрицы и минерализованной ватеритом ПКЛ/ CaCO_3 /ЩФ-матрицы с щелочной фосфатазой, иммобилизованной в ватеритные покрытия, представлены на рис. 10 Е и рис. 10 З, соответственно. Активный фермент щелочная фосфатаза (ЩФ) была иммобилизована методом адсорбции в ватеритные покрытия ПКЛ-матриц (ПКЛ/ CaCO_3 /ЩФ) (емкость загрузки составила 6.0 ± 0.1 (мас.%) (рис. 10 Ж). Было проведено изучение кинетики высвобождения активной формы ЩФ из матрицы ПКЛ/ CaCO_3 /ЩФ в деионизированной воде, путем спектрофотометрического определения количества продукта ферментативной реакции ЩФ со специфичным субстратом (рис. 11 А). Кинетическая кривая достигает насыщения через 96 ч инкубации и не превышает 22% от общего количества активной ЩФ, иммобилизованной в матрицу. Такой невысокий процент может быть объяснен частичной потерей активности фермента ЩФ за время эксперимента. На рис. 11 Б представлены СЭМ изображения, соответствующие кривой кинетики, отражающие полиморфный переход ватерита в кальцит в процессе инкубации. Полное замещение фазы ватерита фазой кальцита происходит спустя 24 ч инкубации, что соответствует началу выхода кривой кинетики высвобождения на насыщение. Данное соответствие подтверждает тот факт, что высвобождение ЩФ из CaCO_3 происходит в результате полиморфного перехода из ватерита в кальцит во время перекристаллизации CaCO_3 .

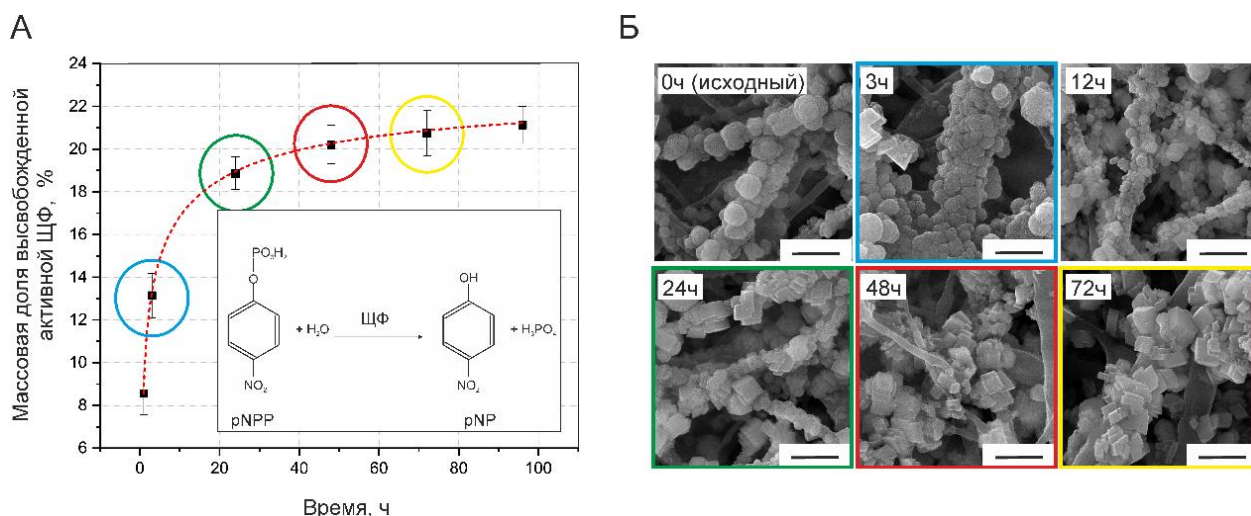


Рис. 11. Кинетика высвобождения ЩФ из матрицы ПКЛ/СаСО₃/ЩФ в деионизованной воде; схема ферментативной реакции (на вставке) (А). СЭМ изображения матриц ПКЛ/СаСО₃/ЩФ в процессе инкубации в деионизованной воде в течение 0, 3, 12, 24, 48 и 72 ч. Масштабный отрезок составляет 2 мкм (Б).

Кривая кинетики высвобождения ЩФ была аппроксимирована с помощью функции распределения Вейбулла, адаптированной для моделирования процессов высвобождения веществ из матриц-носителей:

$$C = A(1 - e^{-k(t-t_c)^d}), \quad (1)$$

где A – общее количество высвобожденного вещества, t_c – время задержки процесса высвобождения вещества, k – масштабный параметр, описывающий временную зависимость процесса, d – параметр, связанный с процессом диффузии вещества в среде при его высвобождении. В Таблице 1 приведены параметры, полученные при аппроксимации. Значение параметра $d=0.33$ указывает на то, что механизм высвобождения ЩФ из матрицы ПКЛ/СаСО₃/ЩФ в деионизованной воде подчиняется закону диффузии Фика.

Таблица 1. Параметры уравнения Вейбулла, полученные при аппроксимации экспериментальных данных высвобождения ЩФ

A	k	d	t_c
22.24	0.29	0.33	0.63

Для исследования особенностей местной биологической реакции костной ткани на ватеритные покрытия и ватеритные покрытия с иммобилизованной ЩФ в составе матриц, была проведена имплантация нескольких типов матриц (неминерализованная матрица ПКЛ, минерализованная ватеритом матрица ПКЛ/СаСО₃ и минерализованная ватеритом матрица с щелочной фосфатазой, иммобилизованной в ватеритные покрытия, ПКЛ/СаСО₃/ЩФ, в дефект бедренной кости крысы. Поперечные срезы бедренной кости с имплантированными матрицами были выполнены на 28-й день после имплантации для проведения структурно-морфологического анализа и оценки структуры новых сформированных тканей в области дефекта.

Неминерализованные матрицы ПКЛ продемонстрировали биосовместимость, отсутствие выраженных признаков воспаления и отсутствие фиброзной капсулы вокруг матрицы. Матрица ПКЛ способствовала пролиферации остеобластов *in vivo*, что подтверждается вновь сформированными трабекулами, наблюдаемыми в матрице (рис. 12 Ж-И). При этом 17.5% площади матрицы и дефекта было заполнено новой сформированной костной тканью (рис. 13). Однако следует отметить, что

остеоиндуктивные свойства матриц ПКЛ нуждаются в улучшении, поскольку уровень остеокальцина и синтетическая активность остеобластов у животных с имплантированными матрицами ПКЛ находились на нормальном уровне относительно контрольной группы, и не было выявлено какой-либо стимуляции остеогенеза. Морфологический анализ выявил низкую степень остеоинтеграции матриц с краями дефекта в кортикальной пластине (рис. 12 Ж-И).

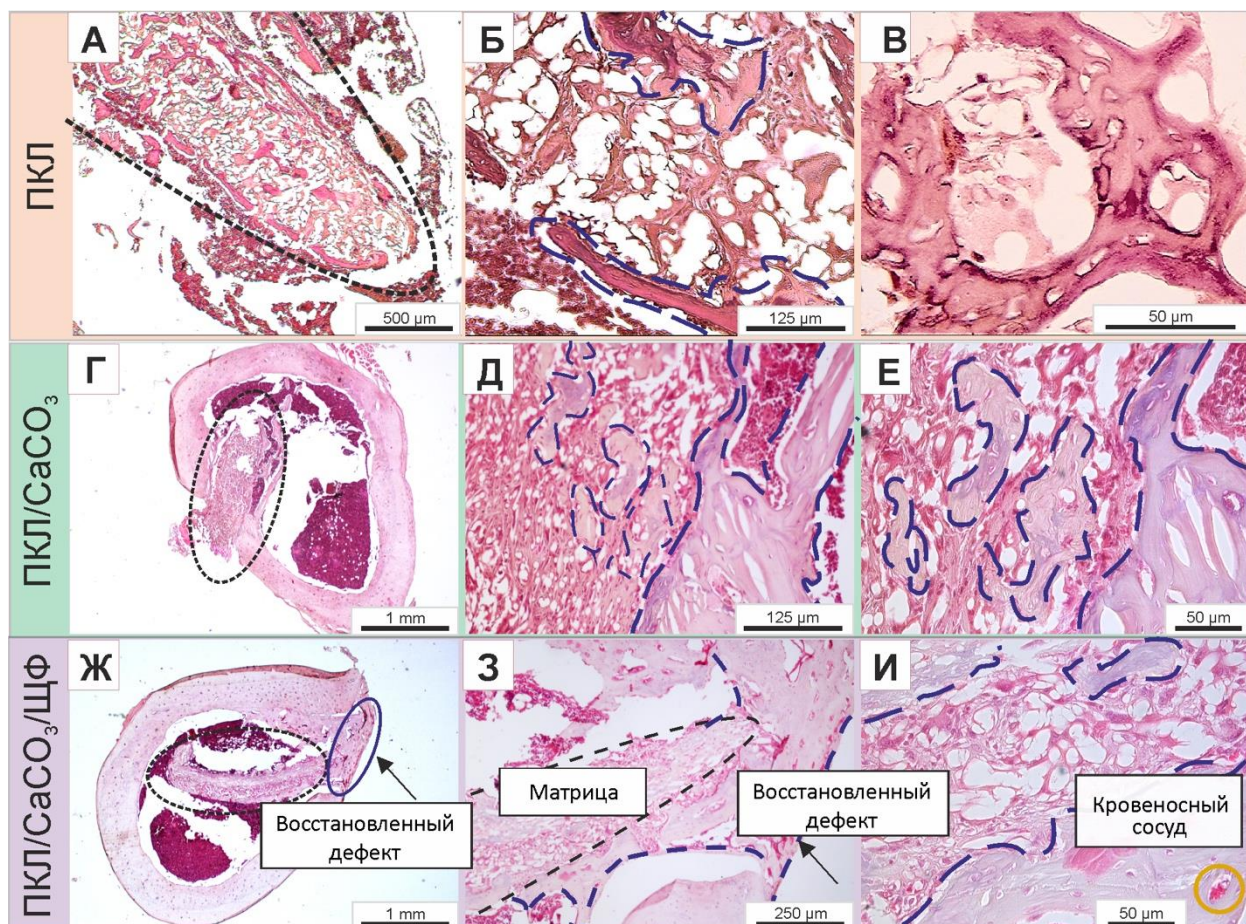


Рис. 12. Поперечные срезы бедренной кости крысы с имплантированными матрицами различных типов после 28-дневного периода имплантации. Черные пунктирные линии на А, Г, Ж, обозначают имплантированную матрицу. Синие пунктирные линии в точках Б, Д, Е, Ж, З, И указывают области вновь сформированной костной ткани. Области пурпурного цвета (обозначенные синими пунктирными линиями) представляют зрелую новообразованную костную ткань. Красная пунктирная линия в изображении И указывает на кровеносный сосуд в новообразованной костной ткани.

Наличие минеральной фазы в матрицах имеет большое значение для регенерации костной ткани, поскольку межклеточное вещество в костном матриксе содержит большой процент неорганической фазы; следовательно, наличие в материале импланта ионов, необходимых для метаболизма кости, может эффективно стимулировать образование новой костной ткани [9,10]. Полученные результаты показывают, что модификация волокон ПКЛ-матрицы ватеритом не оказывает отрицательного влияния на биосовместимость, но при этом значительно усиливает их остеоиндуктивные свойства. Интенсивное образование трабекул в матрицах ПКЛ/ CaCO_3 , а также выраженная остеоинтеграция с краями дефекта в кортикальной пластине подтверждают улучшенную остеоиндуктивность матриц ПКЛ/ CaCO_3 по сравнению с ПКЛ-матрицей без ватеритного покрытия (рис. 12 А-В). В данном случае 37.3% площади матрицы и дефекта заполнено новой сформированной костной тканью (рис. 13). Улучшенные остеоиндуктивные

свойства матриц ПКЛ/СаСО₃ могут быть объяснены способностью ватерита стимулировать пролиферацию остеобластов, а также их дифференциацию [11,12].

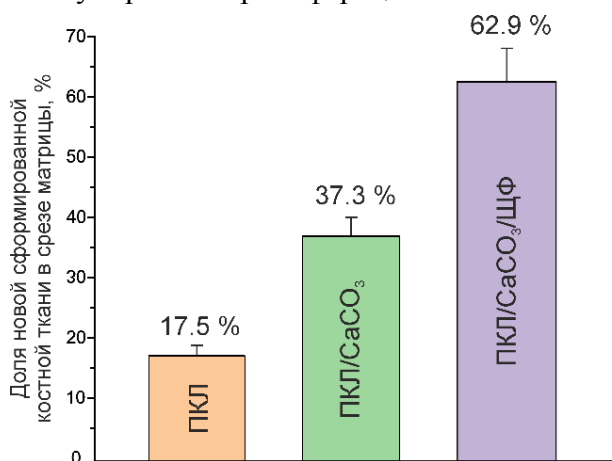


Рис. 13. Процент новой сформированной костной ткани в матрицах после 28-дневного периода имплантации.

Использование ЩФ в качестве БАВ компонента матриц для восстановления костей представляет многообещающие перспективы для стимуляции регенерации костной ткани, поскольку данный фермент играет решающую роль на ранних стадиях минерализации [13,14]. Показано, что иммобилизация ЩФ в ватеритное покрытие матрицы не индуцирует воспалительных изменений после имплантации [15]. Наиболее благоприятным эффектом ЩФ в составе матрицы ПКЛ/СаСО₃/ЩФ является высокая интенсивность остеогенеза в области дефекта, что в результате привело к заполнению 62.9% площади матрицы и

дефекта новой сформированной костной тканью (рис. 12 Ж-И, рис. 13); а также значительно улучшенной остеоинтеграции матрицы. Остеоинтеграция матрицы с краями дефекта в кортикальной пластине оказалась максимальной (рис. 12 Ж, З) в случае ПКЛ/СаСО₃/ЩФ по сравнению со всеми другими типами матриц в данном исследовании. В некоторых случаях она была настолько эффективной, что дефекты были полностью восстановлены (щель в кортикальной пластине полностью закрывалась), что свидетельствует о высоком регенеративном потенциале этого типа матриц и подтверждает перспективность их применения в качестве материалов для тканевой инженерии и для эффективной стимуляции регенерации костной ткани.

Таким образом, было продемонстрировано ускорение процесса формирования новой костной ткани в 2 раза при имплантации нетканых полимерных матриц ПКЛ/СаСО₃ в дефект бедренной кости крыс по сравнению с имплантацией матриц ПКЛ без ватеритного покрытия. Иммобилизация БАВ (ЩФ) в ватеритные покрытия матриц (ПКЛ/СаСО₃/ЩФ) позволяет дополнительно ускорить процесс остеогенеза (в 1.7 раза по сравнению с матрицей ПКЛ/СаСО₃ и в ~4 раза по сравнению с матрицей ПКЛ). Таким образом, имплантация данных матриц ПКЛ/СаСО₃ в дефект кости позволяет повысить эффективность стимуляции регенерационных процессов тканей в области имплантации.

В **заключении** сформулированы основные результаты и выводы диссертационной работы.

Основные результаты и выводы

1. Ультразвуковая обработка нетканой ПКЛ-матрицы (30 с, частота 35 кГц и плотность мощности 0.64 Вт/см³) в растворе, содержащем ионы Са²⁺ и СО₃²⁻ в эквимолярной концентрации (1 моль/л), способствует формированию равномерного ватеритного покрытия на поверхности волокон (диаметр 0.5±0.1 мкм) ПКЛ-матрицы.
2. Нетканые матрицы из поликапролактона со сплошным ватеритным покрытием волокон матрицы, полученным при ультразвуковой обработке (30 с, частота 35 кГц и плотность мощности 0.64 Вт/см³) в растворе, содержащем ионы Са²⁺ и СО₃²⁻ в эквимолярной концентрации (1 М), обладают свойством биосовместимости, поддерживают колонизацию эпителиальными клетками и васкуляризацию при подкожной имплантации данных матриц белым крысам.

3. Формирование ватеритного покрытия на поверхности волокон нетканых ПКЛ-матриц позволяет повысить эффективность иммобилизации. БАВ. Показано, что эффективность иммобилизации ТК в ПКЛ-матрицы была увеличена с 4 ± 2 масс. % до 40 ± 10 масс. % при покрытии ватеритом.

4. Однослойные нетканые ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием являются биосовместимыми при подкожной имплантации белым крысам *in vivo*, интенсивно колонизируются клетками соединительной ткани (фибробластами и фиброцитами) и васкуляризируются, не вызывая какой-либо воспалительной реакции в окружающих тканях. Иммобилизация таниновой кислоты в такой матриксный материал обеспечивает возможность стабилизации стенок новообразованных кровеносных сосудов.

5. Сочетание ПКЛ-матриц с волокнами микронного (0.7 ± 0.3 мкм) и субмикронного (9.7 ± 2.5 мкм) диаметра позволяет повысить устойчивость матриксного материала к деформации. Показано, что модуль Юнга двухслойной нетканой матрицы, комбинирующей волокна субмикронного и микронного диаметра, в 8 раз превосходит значение данной величины для однослойной тонковолокнистой ПКЛ-матрицы (4.0 ± 0.5 МПа против 0.5 ± 0.1 МПа). При этом, данный двухслойный матриксный материал обладает высокой степенью биосовместимости при подкожной имплантации белым крысам *in vivo*.

6. Наличие ватеритного покрытия на двухслойных нетканых ПКЛ-матрицах способствует интенсификации процесса формирования новой костной ткани при имплантации в дефект бедренной кости белых крыс *in vivo*, а также улучшает остеоинтеграцию матрицы с краями дефекта (по сравнению с двухслойными матрицами без ватеритного покрытия).

7. Формирование ватеритного покрытия на двухслойных ПКЛ-матрицах обеспечивает возможность иммобилизации активного фермента в матриксный материал. Показано, что эффективность иммобилизации ЩФ в матрицу составляет 6.0 ± 0.1 мас.%. Наличие ЩФ в матриксном материале обеспечивает закрытие дефекта в кортикальной пластине и заполнение 63.0 % матрицы новой костной тканью на 28 день после имплантации в дефект бедренной кости белой крысы.

8. Модификация нетканых ПКЛ-матриц частицами Ag позволяет осуществлять детекцию молекул как низкой (Родамин 6G – 479 Da), так и высокой молекулярной массы (ТРИТЦ-БСА - 70 kDa). Наличие ватеритного покрытия на ПКЛ-матрицах обеспечивает повышение коэффициента усиления ГКР сигнала, по сравнению с неминерализованными матрицами, за счет формирования частиц Ag меньшего размера (при использовании модельного анализита 4-меркаптобензойной кислоты).

Список основных публикаций по теме диссертации:

1. **M. S. Savelyeva**, A. A. Abalymov, G. P. Lyubun, I. V. Vidyasheva, A. M. Yashchenok, T. E. L. Douglas, D. A. Gorin, B. P. Parakhonskiy. Vaterite coatings on electrospun polymeric fibers for biomedical applications //Journal of Biomedical Materials Research Part A. – 2017. – Т. 105. – №. 1. – С. 94-103.
2. A. N. Ivanov, **M. S. Saveleva**, M. N. Kozadaev, O. V. Matveeva, Yu. E. Sal'kovskiy, G. P. Lyubun, D. A. Gorin, I. A. Norkin. New Approaches to Scaffold Biocompatibility Assessment //BioNanoScience. – 2019. – Т. 9. – №. 2. – С. 395-405.
3. A. N. Ivanov, **M. S. Saveleva**, M. O. Kurtukova, S. V. Kustodov, E. V. Gladkova, V. V. Blinnikova, I. V. Babushkina, B. V. Parakhonskiy, V. Yu. Ulyanov, I. A. Norkin. Particularities of bone regeneration in rats after implantation of polycaprolactone scaffold

- mineralized with vaterite with adsorbed tannic acid //Bulletin of experimental biology and medicine. – 2019. – Т. 167. – №. 2. – С. 275-278.
4. A. N. Ivanov, Y. A. Chibrikova, **M. S. Saveleva**, V. V. Ostrovskij, I. A. Norkin. Effect of local modulation in enzymatic homeostasis on bone turnover marker dynamics in blood at substituting femur defects with vaterite scaffolds // Russian Open Medical Journal. - 2020. – V. 9. - I. 4. – С. 1-4.
 5. A. N. Ivanov, Y. A. Chibrikova, **M. S. Saveleva**, A. S. Rogozhina, I. A. Norkin, Biocompatibility of Polycaprolactone Scaffold Providing Targeting Delivery of Alkaline Phosphatase // Cell and Tissue Biology. -2021.-V. 15. – I.3. - С. 301-309.
 6. **M. S. Saveleva**, A. N. Ivanov, M. O. Kurtukova, V. S. Atkin, A. G. Ivanova, G. P. Lyubun, A. V. Martuyukova, E. I. Cherevko, A. K. Sargsyan, A. S. Fedonnikov, I. A. Norkin, A. G. Skirtach, D. A. Gorin, B. V. Parakhonskiy. Hybrid PCL/CaCO₃ scaffolds with capabilities of carrying biologically active molecules: Synthesis, loading and in vivo applications //Materials Science and Engineering: C. – 2018. – Т. 85. – С. 57-67.
 7. И. А. Норкин, Иванов А. Н., М. О. Куртукова, **М. С. Савельева**, А. В. Мартюкова, Д. А. Горин, Б. В. Парахонский. Особенности микроциркуляторных реакций при субкутанной имплантации поликапролактоновых матриц, минерализованных ватеритом// Саратовский научно-медицинский журнал – 2018. - Т. 14 - №1. - С. 35-41.
 8. C. Mderrisoglu, **M. S. Saveleva**, A. A. Abalymov, L. V. d. Meeren, A. Ivanova, V. S. Atkin, B. V. Parakhonskiy, A. G. Skirtach Nanostructured Biointerfaces Based on Bioceramic Calcium Carbonate/Hydrogel Coatings on Titanium with an Active Enzyme for Stimulating Osteoblasts Growth// Advanced Materials Interfaces – 2018. - Т. 5. – №. 19. – С. 1800452.
 9. A. A. Ivanova, D. S. Syromotina, S. N. Shkarina, R. Shkarin, A. Cecilia, V. Weinhardt, Tilo Baumbach, **M. S. Saveleva**, D. A. Gorin, T. E. L Douglas, B. V. Parakhonskiy, A. G. Skirtach, P. Cools, N. Geyter, R. Morent, C. Oehr, M. A. Surmeneva, R. A. Surmenev. Effect of low-temperature plasma treatment of electrospun polycaprolactone fibrous scaffolds on calcium carbonate mineralisation //RSC advances. – 2018. – Т. 8. – №. 68. – С. 39106-39114.
 10. А. Н. Иванов, М. О. Куртукова, М. Н. Козадаев, Д. А. Тяпкина, С. В. Кустодов, **М. С. Савельева**, И. О. Бугаева, Б. В. Парахонский, Е. А. Галашина, Е. В. Гладкова, И. А. Норкин. Оценка биосовместимости поликапролактоновых матриц, минерализованных ватеритом, при субкутанных имплантационных тестах у белых крыс// Саратовский научно-медицинский журнал – 2018. - Т. 14 - №3. - С. 451-456.
 11. **M. S. Saveleva**, A. Vladescu, C. Cotrut, L. V. d. Meeren, M. Surmeneva, R. Surmenev, B. Parakhonskiy, A G Skirtach. The effect of hybrid coatings based on hydrogel, biopolymer and inorganic components on the corrosion behavior of titanium bone implants //Journal of Materials Chemistry B. – 2019. – Т. 7. – №. 43. – С. 6778-6788.
 12. **M. S Saveleva**, K. Eftekhari, A. A. Abalymov, T. E. L. Douglas, D. V. Volodkin, B. V Parakhonskiy, A. G Skirtach. Hierarchy of hybrid materials—The place of inorganics-inorganics in it, their composition and applications //Frontiers in chemistry. – 2019. – Т. 7. – С. 179.
 13. **M. S. Saveleva**, E. S. Prikhozhenko, D. A. Gorin, A. G Skirtach, A. M. Yashchenok, B. V. Parakhonskiy. Polycaprolactone-based, porous CaCO₃ and Ag nanoparticle modified scaffolds as a SERS platform with molecule-specific adsorption //Frontiers in Chemistry. – 2020. – Т. 7. – С. 888.

14. **M. S. Saveleva**, E. V. Lengert, D. A. Gorin, B. V. Parakhonskiy, A. G. Skirtach. Polymeric and lipid membranes—from spheres to flat membranes and vice versa // *Membranes*. – 2017. – Т.7. - № 3. – С. 44.
15. **M. S. Saveleva**, A. N. Ivanov, E. S. Prikhozhenko, A. M. Yashchenok, B. V. Parakhonskiy, A. G. Skirtach, Y. I. Svenskaya. Hybrid functional materials for tissue engineering: synthesis, in vivo drug release and SERS effect // *JPhCS*. – 2020. – Т. 1461. – №. 1. – С. 012150.
16. **M. S. Saveleva**, A. N. Ivanov, J. A. Chibrikova, A. A. Abalymov, M. A. Surmeneva, R. A. Surmenev, B. V. Parakhonskiy, M. V. Lomova, A. G. Skirtach, I. A. Norkin. Osteogenic Capability of Vaterite-coated Nonwoven Polycaprolactone Scaffolds for in vivo Bone Tissue Regeneration // *Macromolecular Bioscience*. – 2021. -DOI: 10.1002/mabi.202100266.
17. **M. S. Saveleva**, P. A. Demina. Composite hydrogel gellan gum-based materials with CaCO₃ vaterite particles // *Известия Саратовского университета. Новая серия. Серия Физика*. – 2023. – Т. 23. – №. 3. – С. 245-253.

Список литературы, цитируемой в автореферате

1. Coombes A.G.A. et al. Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery // *Biomaterials*. 2004. Vol. 25, № 2. P. 315–325.
2. Klopffleisch R., Jung F. The pathology of the foreign body reaction against biomaterials // *J. Biomed. Mater. Res. Part A. Wiley Online Library*, 2017. Vol. 105, № 3. P. 927–940.
3. Xu H., Zeiger B.W., Suslick K.S. Sonochemical synthesis of nanomaterials // *Chem. Soc. Rev. Royal Society of Chemistry*, 2013. Vol. 42, № 7. P. 2555–2567.
4. ISO/EN10993-6:2016. Biological evaluation of medical devices — Part 6: Tests for local effects after implantation // *Int. Organ. Stand. International Standardization Organization Geneva, Switzerland*, 2016. Vol. 2 ED. P. 21.
5. Mittal M. et al. Novel role of reactive oxygen species-activated trp melastatin channel-2 in mediating angiogenesis and postischemic neovascularization // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2015.
6. Goutzourelas N. et al. Grape pomace extract exerts antioxidant effects through an increase in GCS levels and GST activity in muscle and endothelial cells // *Int. J. Mol. Med*. 2015. Vol. 36, № 2. P. 433–441.
7. Goutzourelas N. et al. Effects of polyphenolic grape extract on the oxidative status of muscle and endothelial cells // *Hum. Exp. Toxicol. SAGE Publications*, 2014. Vol. 33, № 11. P. 1099–1112.
8. Chen X. et al. Tannic Acid Is an Inhibitor of CXCL12 (SDF-1 α)/CXCR4 with Antiangiogenic Activity // *Clin. Cancer Res*. 2003. Vol. 9, № 8. P. 3115.
9. Rogowska-Tylman J. et al. In vivo and in vitro study of a novel nanohydroxyapatite sonocoated scaffolds for enhanced bone regeneration // *Mater. Sci. Eng. C. Elsevier Ltd*, 2019. Vol. 99. P. 669–684.
10. Donate R. et al. Comparison between calcium carbonate and β -tricalcium phosphate as additives of 3D printed scaffolds with polylactic acid matrix // *J. Tissue Eng. Regen. Med. John Wiley and Sons Ltd*, 2020. Vol. 14, № 2. P. 272–283.
11. Schröder R. et al. Particles of vaterite, a metastable CaCO₃ polymorph, exhibit high biocompatibility for human osteoblasts and endothelial cells and may serve as a biomaterial for rapid bone regeneration // *J. Tissue Eng. Regen. Med. John Wiley and Sons Ltd*, 2018. Vol. 12, № 7. P. 1754–1768.
12. Stengelin E. et al. Bone Scaffolds Based on Degradable Vaterite/PEG-Composite Microgels // *Adv. Healthc. Mater. Wiley-VCH Verlag*, 2020. Vol. 9, № 11. P. 1901820.

13. Golub E.E., Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization // Curr. Opin. Orthop. 2007. Vol. 18, № 5. P. 444–448.
14. Millán J.L. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization // Calcif. Tissue Int. Springer, 2013. Vol. 93, № 4. P. 299–306.

Благодарности

Автор выражает признательность научному руководителю Горину Дмитрию Александровичу за помощь на всех этапах выполнения диссертационной работы и чуткое руководство. Автор благодарит Парахонского Богдана Владиславовича и Скиртача Андрея Геннадьевича за помощь в постановке и осуществлении задач, и выполнении экспериментальной работы. Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики» и лаборатории биомедицинской фотоакустики Саратовского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского за помощь и поддержку в течение всего обучения и работы. Автор благодарит Иванова Алексея Николаевича и сотрудников Центральной научно-исследовательской лаборатории Саратовского государственного медицинского университета им. В. И. Разумовского за проведение медико-биологических исследований и плодотворное сотрудничество.

Подписано в печать 21.10.2024.
Формат 60x84 ¹/₁₆. Бумага офсетная. Гарнитура Times.
Объем 1,0 печ. л. Тираж 100 экз. Заказ 52895.

Типография «Техно-Декор»
Саратов, ул. Московская, 160
тел.: (845-2) 77-08-48