

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

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени кандидата физико-математических наук

Научный руководитель:
доктор химических наук, профессор
Горин Дмитрий Александрович

Саратов - 2024

Работа выполнена в лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики» Научного медицинского центра Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского»

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	155
1.1. Гибридные органо-неорганические материалы для инженерии костной ткани	20
1.2. Структура костной ткани.....	22
1.3. Полимерные композиты.....	255
1.4. Композиты на основе гидрогелей	266
1.5. Биокерамические материалы.....	277
1.6. Карбонат кальция: структура, полиморфные модификации и свойства 3030	
1.7. Математическое моделирование процессов высвобождения биологически активных препаратов из биоматериалов <i>in vitro</i>	33
1.8. Исследование биологической реакции на имплантацию материалов.	37
1.9. Методы и модели исследования биологической реакции.....	4040
1.10. Заключение по главе 1	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	45
2.1. Материалы.....	45
2.2. Методики получения и модификации нетканых полимерных и гидрогелевых матриц.....	46
2.2.1. <i>Формирование однослойных нетканых полимерных матриц</i>	46
2.2.2. <i>Получение двухслойных нетканых полимерных матриц</i>	46
2.2.3. <i>Формирование ватеритного покрытия на нетканой полимерной матрице</i>	47
2.2.4. <i>Модификация гидрогелевых матриц частицами ватерита</i>	48
2.2.5. <i>Модификация однослойных нетканых ПКЛ-матриц частицами серебра</i>	49
2.2.6. <i>Иммобилизация таниновой кислоты в однослойные нетканые ПКЛ-матрицы</i>	49
2.2.7. <i>Иммобилизация щелочной фосфатазы в двухслойные нетканые ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием</i>	49
2.2.8. <i>Иммобилизация флуоресцентных красителей в однослойные нетканые ПКЛ-матрицы</i>	49
2.2.9. <i>Подготовка нетканых ПКЛ-матриц с ватеритным покрытием, содержащих чужеродный белок</i>	5050

2.2.10. Подготовка двухслойные ПКЛ-матриц, содержащих бактериальные липополисахариды	5050
2.3. Исследование адгезивных и биосовместимых свойств полученных нетканых полимерных матриц на культуре клеток нормальных дермальных фибробластов человека <i>in vitro</i>	51
2.3.1. Подготовка клеточной культуры	51
2.3.2. Оценка цитотоксичности нетканых ПКЛ-матриц без и с ватеритным покрытием	52
2.3.3. Исследование адгезии клеток к поверхности нетканых ПКЛ-матриц без и с ватеритным покрытием	52
2.4. Исследование биосовместимых и функциональных свойств полученных нетканых полимерных матриц <i>in vivo</i>	52
2.4.1. Соблюдение этических норм при проведении экспериментов с животными	52
2.4.2. Подкожная имплантация белым крысам.....	53
2.4.3. Имплантация ПКЛ-матриц без и с ватеритным покрытием в дефект бедренной кости белым крысам.....	54
2.5. Методы исследования и характеристики полученных полимерных матриц	56
2.5.1. Сканирующая электронная микроскопия и энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия	56
2.5.2. Порошковая рентгеновская дифракция.....	57
2.5.3. Исследование механических характеристик материалов	57
2.5.4. Спектрофотометрическое исследование	58
2.5.5. Гистологическое исследование	59
2.5.6. Спектроскопия комбинационного рассеяния	61
2.6. Статистические методы обработки данных.....	62
2.6.1. Определение размера волокон матриц по СЭМ изображениям	62
2.6.2. Расчет массы ватеритного покрытия матрицы	62
2.6.3. Оценка эффективности и ёмкости загрузки ТК в матрицы и расчет ошибки определения массы иммобилизованного вещества	62
2.6.4. Определение ёмкости загрузки ЩФ в ПКЛ-матрицы с ватеритными покрытиями.....	63
2.6.5. Однофакторный дисперсионный анализ	64
2.6.6. Количественный анализ изображений срезов костной ткани	64

ГЛАВА 3. ФОРМИРОВАНИЕ БИОМИМИТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦ И ИХ МОДИФИКАЦИЯ ЧАСТИЦАМИ ВАТЕРИТА ДЛЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ.....	66
3.1. Формирование ватеритных покрытий на однослойных полимерных матрицах и исследование их влияния на жизнедеятельность клеток.....	66
3.1.1. Влияние УЗ-воздействия на процесс формирования CaCO_3 -покрытия 677	
3.1.2. Влияние концентрации солей на процесс формирования ватеритного покрытия	71
3.1.3. Влияние повторений процедуры формирования ватеритного покрытия на ПКЛ-матрице	72
3.1.4. Исследование влияния полимерных матриц с ватеритными покрытиями на жизнедеятельность фибробластов	76
3.2. Использование нетканых полимерных матриц с ватеритным покрытием в качестве ГКР платформ для детектирования биомолекул	79
3.2.1. Повышение коэффициента усиления ГКР сигнала при модификации матриц ватеритными покрытиями.....	79
3.2.2. Детектирование органических молекул с помощью нетканой ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием и частицами серебра.....	82
3.3. Разработка подходов к модификации гидрогелевых матриц частицами ватерита	83
3.4. Выводы к главе 3	87
ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ ПРИ ПОДКОЖНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ ОДНОСЛОЙНЫХ НЕТКАННЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦ С ВАТЕРИТНЫМ ПОКРЫТИЕМ ..	900
4.1. Изучение биологической реакции тканей в ответ на подкожную имплантацию ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием <i>in vivo</i>	90
4.2. Исследование образцов тканей, извлеченных вместе с ПКЛ-матрицами, после подкожной имплантации	977
4.3. Иммобилизация капилляростабилизирующего БАВ в ватеритные покрытия однослойных нетканых ПКЛ-матриц и оценка его воздействия на васкуляризацию <i>in vivo</i>	100100
4.4. Выводы к главе 5	1055
ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ НЕТКАННЫХ ДВУХСЛОЙНЫХ МАТРИЦ С ВАТЕРИТНЫМ ПОКРЫТИЕМ В ДЕФЕКТ БЕДРЕННОЙ КОСТИ	1066

5.1. Формирование ватеритного покрытия на двухслойных нетканых полимерных матрицах и их характеристика	1088
5.2. Изучение биосовместимости двухслойных ПКЛ-матриц	1155
5.3. Изучение биологической реакции тканей в ответ на имплантацию двухслойных ПКЛ-матриц в дефект бедренной кости	1177
5.3.1. <i>Группа сравнения: ложная имплантация</i>	1188
5.3.2. <i>Имплантация двухслойной ПКЛ-матрицы, содержащей бактериальные липополисахариды, в дефект бедренной кости</i>	1199
5.3.3. <i>Имплантация двухслойной ПКЛ-матрицы без ватеритного покрытия в дефект бедренной кости</i>	1211
5.3.4. <i>Имплантация двухслойной ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием в дефект бедренной кости</i>	1233
5.3.5. <i>Имплантация двухслойной ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием и иммобилизованной ЩФ в дефект бедренной кости</i>	1255
5.4. Выводы к главе 5	1299
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.	1311
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	1311
СПИСОК РАБОТ АВТОРА, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ	1333
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	1377
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	1388
БЛАГОДАРНОСТИ	1599

ВВЕДЕНИЕ

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- $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$ и карбонатапатита $(Ca_{10}(PO_4)_6CO_3)$. 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 имплантата 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/см³).

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.

Основные 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 матрицах из поликапролактона 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.

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

Апробация работы

Результаты работы, представленные в форме устных и стендовых докладов, представлялись и обсуждались на российских и международных 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 № FSRR-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 155 наименований. Общий объем диссертации составляет 155 страниц, включая 38 рисунков и 8 таблиц.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Восстановление дефектов костей, являющихся последствиями травм, дегенеративных заболеваний костной ткани и суставов, инфекционных и воспалительных заболеваний, удаления новообразований и оперативных вмешательств, является актуальной проблемой для современной медицины. Частота операций по восстановлению дефектов костей, включая установку костных имплантатов и трансплантацию костной ткани, является второй по частоте процедурой по трансплантации тканей во всем мире, сразу после процедуры переливания крови [3]. Ежегодно во всем мире проводится более двух миллионов операций по трансплантации кости [4]. При этом, наблюдается тенденция к постоянному росту количества операций по трансплантации костнозамещающих материалов, что, в свою очередь, соответственно, инициирует постоянное повышение спроса на данные материалы. В соответствии с ежегодными отчетами компании «Orthoworld», мировые продажи костнозамещающих материалов в конце 2021 года достигли 54,5 млрд долларов (что на 14,6% выше по сравнению с прошлым годом) [5]. В России емкость рынка материалов для остеосинтеза составляет около 100 млрд рублей в год. По данным Минздравсоцразвития России, потребность в ортопедических изделиях и материалах для остеосинтеза превышает 3 млн единиц продукта в год. Кроме того, по оценке Минздравсоцразвития России, ежегодно 13 млн человек в стране страдает от травм, полученных в ДТП, на производстве, в спорте и быту. Таким образом, высокая и, при этом, неуклонно растущая потребность в остеопластических изделиях в совокупности с нехваткой эффективных материалов и подходов к успешной регенерации костных дефектов обуславливают высокий спрос на новые современные биомедицинские материалы и технологии, которые позволят удовлетворить эту потребность.

В настоящее время «золотым стандартом» остеопластики являются аутологические костнозамещающие материалы [6]. В данном случае забор костной ткани для трансплантации осуществляется у самого пациента, нуждающегося в замещении костного дефекта, т.е. пациент является донором сам

для себя. Аутотрансплантация, безусловно, является самым эффективным с точки зрения остеогенеза, широко применяющимся и безопасным с точки зрения иммунологического ответа подходом. Аутологичная костная ткань обладает всеми свойствами, необходимыми для естественного протекания регенерации дефекта: она является остеокондуктивной и остеоиндуктивной, в ней находятся факторы роста, остеогенные клетки. Важным свойством является органотопичность аутологичной ткани, то есть ее полное анатомо-морфологическое сходство с восстанавливаемой тканью, и, соответственно, отсутствие рисков, связанных с острой иммунной реакцией и переносом инфекционного заболевания. Однако аутотрансплантация обладает одним существенным недостатком, который способен перекрыть все ее преимущества, — это необходимость ее забора у пациента. С этим связана высокая ограниченность ресурсов аутологичной ткани, а также риск возникновения негативных эффектов в донорском участке пациента, включая болевой синдром, развитие воспаления или инфекционного заболевания, нейрососудистое повреждение, нарушение целостности кости, а также формирование косметического дефекта. Кроме того, забор аутологичного материала требует повышения количества операционных вмешательств [7,8].

В связи с этим, возникли альтернативы аутотрансплантации — аллотрансплантация (трансплантация материала, полученного от других доноров-людей) и трансплантация обработанного ксенологического материала (материал, донором которого является представитель другого биологического вида, отличного от человека; зачастую это материал, полученный из бычьих костей, подвергшийся обработке по удалению белков, способных вызвать острую иммунную реакцию). Основными недостатками данных материалов является генетическая несовместимость тканей донора и реципиента, риск переноса опасных вирусных инфекций, необходимость обработки материалов в жестких условиях (таких, как радиационное облучение, едкие химические вещества), которые могут оказывать разрушающее воздействие на сам материал или создавать токсичные примеси и загрязнения, и, таким образом, ухудшать его

функциональные свойства. Также существует вероятность низкой эффективности алло- и ксенологических материалов с точки зрения их остеокондуктивных и остеоиндуктивных свойств, что в большинстве случаев обусловлено биологическими особенностями ткани донора [8].

В последние годы активно развивается отрасль синтетических остеопластических материалов для костной трансплантации. Разработки в данной отрасли базируются на принципах и концепциях тесно взаимосвязанных и динамично развивающихся направлений науки – биофизики и биоматериаловедения [9–11]. Одна из основополагающих концепций биоматериаловедения – создание синтетического материала, который по своим структурно-морфологическим и функционально-биологическим свойствам в максимальной степени имитировал бы натуральные ткани, части органов или целые органы. В данном контексте, биоматериаловедение тесно переплетается с тканевой инженерией. Создание синтетических биоматериалов, которые бы по своим структуре и свойствам были подобны натуральной костной ткани пациента, позволит преодолеть большинство недостатков используемых в современной клинической практике ауто- и аллотрансплантантов, включая ограниченность ресурсов, иммунную реакцию, риск инфицирования, низкую остеогенную эффективность и риск отторжения импланта. Современные подходы к разработке синтетических биоматериалов позволяют создать остеопластические материалы с расширенным функционалом, включая возможность дополнительной терапии заболеваний, сопутствующих нарушениям костного аппарата, предупреждения развития осложнений, а также контроля течения репаративных процессов в области имплантации. Такие материалы способны стимулировать заданную желаемую биологическую реакцию организма в ответ на имплантацию, например, снижать иммунный ответ и повышать интенсивность регенеративного процесса. Интенсивность биологической реакции будет зависеть от свойств и структуры материала, которые обуславливают наличие тех или иных биофизических и биохимических стимулов (Рисунок 1).

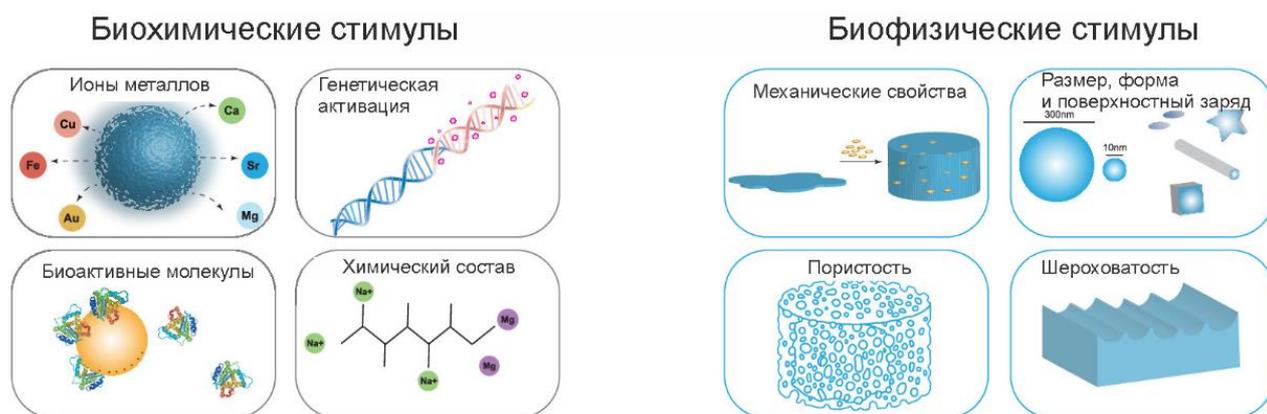


Рисунок 1. Биохимические и биофизические стимулы, определяющие характер взаимодействия материала с клетками и живой тканью [12].

Данные стимулы будут определять взаимодействие материала с сигнальными белковыми молекулами и далее с клетками тканей организма. Биофизические стимулы определяются физическими характеристиками биоматериалов: структурой и морфологией, размерными параметрами, поверхностным зарядом, молекулярным взаимодействием с водой, механическими свойствами и т. д. Например, поверхностный заряд материала будет влиять на адсорбцию белков (формирование так называемой протеиновой короны [13]). В целом, биофизические свойства биоматериалов будут стимулировать специфические клеточные сигналы, такие, как адсорбция белка, клеточная адгезия, пролиферация и дифференциация, морфология клеток. Таким образом, структура/свойства биоматериала и его биофизические и биохимические параметры определяют общую биологическую реакцию организма на него, определяя эффективность процесса регенерации тканей [11,12,14].

Таким образом, создание материала с необходимыми биофизическими стимулами и их исследование, а также изучение биологической реакции организма на данные стимулы являются актуальными задачами современной медицины, поиск решения которых находится на стыке биофизики и материаловедения.

На данном этапе развития материаловедения, синтетические биоматериалы создают базу для возникновения нового поколения «умных» остеопластических

материалов, способных преодолеть риски предыдущих кандидатов и удовлетворить растущие потребности современного общества.

Последнее официальное определение понятию «биоматериал» было дано в 2019 году профессором Д. Уиллиямсом [15]. Биоматериал был определен как «вещество, которое было разработано таким образом, что оно обладает способностью управлять протеканием терапевтических или диагностических процедур путем контролируемого взаимодействия с живыми системами». Предыдущая версия этого понятия, установленная в 1992 году также Д. Уиллиямсом, определяла биоматериал как «материал, предназначенный для взаимодействия с биологическими системами для оценки, лечения, увеличения или замещения каких-либо тканей, органов или функций тела». Данные определения биоматериала взаимно дополняют друг друга, причем понятие, установленное в 2019 году, отражает последние тенденции в области биоматериалов и тканевой инженерии, касающиеся создания новых «умных» материалов, которые способны имитировать живые ткани не только на структурном, но и на функциональном (биохимическом) уровне.

В настоящее время активно разрабатываются и исследуются материалы для имплантатов на основе биосовместимых полимеров (природных (коллаген [16]) и синтетических (поликапролактон [17]) и полимерно-минеральных композитов (в сочетании с фосфатами кальция и гидроксиапатитами [18–20]). Эти материалы представляют собой новое перспективное направление в регенеративной медицине и представляют собой группу имплантатов нового поколения. По сравнению с имплантатами на основе металлов, полимерные материалы способны к биоресорбции и трансформации в организме, что является их ключевым преимуществом. Также среди преимуществ полимерных имплантатов можно выделить вариативность выбора используемых полимеров, возможность модификации структуры полимера, а также гибкость в разработке структуры и состава полимерных смесей для получения материала с расширенной функциональностью и улучшенным регенераторным потенциалом. Таким образом, полимерные материалы наряду с отсутствием антигенной нагрузки,

воспалительных и аллергических реакций обладают прекрасными резорбционными свойствами, а также могут обладать биоактивными свойствами [21].

По сравнению с полимерами натурального происхождения, синтетические полимеры являются более эффективными кандидатами в силу их преимуществ перед натуральными, включая механическую прочность и эластичность, возможность контроля структуры, а также низкую степень иммуногенности при внедрении материала в организм. Одними из наиболее широко исследуемых и используемых в биомедицине синтетических биорезорбируемых полимеров являются поли(α -гидроксикислоты), также известные как полиэфиры. Поли(ϵ -капролактон) (ПКЛ) представляет собой алифатический полукристаллический полиэфир, который может быть сформован в различных формах (волокна, микросферы, пористые матрицы, смеси и композиты) в силу его высокой растворимости в различных органических растворителях. ПКЛ – это биосовместимый и биоразлагаемый полимер, одобренный Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) и широко используемый для восстановления костных дефектов и лечения заболеваний костной ткани [22,23]. Существуют подходы к повышению механической прочности, эластичности, а также терапевтической функциональности материалов на основе ПКЛ с помощью введения неорганических наполнителей (фосфат кальция $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, гидроксипатит кальция $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) и биомолекулы (костные морфогенетические белки), представленные в ряде исследований [24], т.е. создания так называемых гибридных материалов.

1.1. Гибридные органо-неорганические материалы для инженерии костной ткани

В последние десятилетия создание и исследование органо-неорганических гибридных материалов стали важным аспектом в области разработки биоматериалов. Органо-неорганические материалы в целом можно определить как многокомпонентные материалы, где по крайней мере один из компонентов

(неорганический) распределен в другом (органической матрице) на уровне субмикронного (нанометрового) диапазона [25]. Свойства данных гибридных материалов являются результатом не просто суммирования отдельных вкладов их составляющих компонентов, но также и их взаимного взаимодействия компонентов между собой. В связи с этим выделяют два класса гибридных материалов в зависимости от характера взаимодействия между органическими и неорганическими компонентами. К I классу относят гибридные материалы, в которых органические и неорганические компоненты взаимодействуют посредством слабых связей: Ван-дер-Ваальсовых, водородных или электростатических связей. Ко II классу относят гибридные материалы, в которых органические и неорганические компоненты связаны сильными ковалентными или ионными химическими связями. При этом, во многих типах гибридных материалов присутствуют как сильные, так и слабые взаимодействия между компонентами [25]. Включение неорганических компонентов в органическую матрицу осуществляется с целью придания ей желаемых свойств или улучшения ее функциональности. Зачастую, функционализацию полимерных материалов неорганическими компонентами проводят с целью улучшения механической прочности, проводимости, достижения определённых оптических и электрических свойств. В случае материалов, предназначенных для биомедицинского применения, проводится модификация с целью придания биологически активных свойств, включая стимулирующую, терапевтическую и антибактериальную функциональность. Т.е. свойства материала модулируются с целью **инициации требуемой биологической реакции со стороны организма** при взаимодействии материала с его тканями и органами. Концепция взаимодополнения и синергии свойств неорганических и органических компонентов в гибридных неорганно-органических материалах схематически представлена на рисунке 2 [26].

Антагонистические «Инь и Янь» свойства неорганических и органических компонентов



Рисунок 2. Антагонистические («Инь и Янь»), но взаимодополняющие друг друга свойства неорганических и органических компонентов, составляющих гибридные материалы [26]

Гибридные материалы сочетают в себе все функциональные свойства, обеспечиваемые составляющими их компонентами, благодаря чему они способны имитировать натуральную костную ткань как на структурном, так и на функциональном уровне [27,28]. Таким образом, в настоящее время такие гибридные материалы рассматриваются как наиболее перспективное решение для создания новых «умных» имплантатов для восстановления костной ткани.

1.2. Структура костной ткани

Кость представляет собой комплексную, твердую, сильно васкуляризованную соединительную ткань с иерархически организованной структурой, которая находится в процессе постоянного динамического развития и ремоделирования [29]. Костная ткань является полимерно-керамическим гибридным материалом, состоящим из различных компонентов: неорганических (гидроксиапатит), органической матрицы (коллаген), клеток (остеобласты, остеокласты, остециты) и воды. Неорганическая фаза представлена в основном гидроксиапатитом кальция $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ в сочетании с небольшим количеством свободных ионов Ca^{2+} , PO_4^{3-} и CO_3^{2-} [30]. Также, присутствуют малые количества Mg^{2+} , Fe^{2+} , F^- , Cl^- , Na^+ и K^+ . В органической фазе основным

компонентом является коллаген I типа. Минеральная фаза составляет около 65 % от общей массы костной ткани, а органическая фаза — около 25–30 % [31]. В свою очередь, органическая фаза на 90–96 мас. % состоит из коллагена, клеточных компонентов (остеокласты, остеобласты, остеоциты) и воды (9 мас. %).

Структура костной ткани представлена системой коллагеновых волокон (длина 300 нм и диаметр 1,5 нм), минерализованных кристаллами гидроксиапатита в виде пластин (70 нм × 1 нм) (рисунок 3) [32]. Пучки параллельно расположенных минерализованных коллагеновых волокон образуют костные пластинки, которые, в свою очередь, в результате своей концентрической организации образуют остеон (рисунок 3). Остеон – базовая структурная единица компактного вещества пластинчатой кости, имеющая цилиндрическую структуру, состоящую из концентрических, вставленных друг в друга костных пластинок. В центре остеона расположена трубчатая полость – гаверсов канал, в котором проходят кровеносные сосуды и нервы, а также локализуются мезенхимальные клетки и остеобласты. Между пластинками, составляющими остеон, расположены остеоциты. Один остеон может состоять из 5–20 костных пластинок, диаметр остеона варьируется от 100 до 500 мкм, а длина составляет несколько миллиметров. На рисунке 4 представлена микрофотография гистологического среза костной ткани, демонстрирующая характерное строение на основе структурных единиц – остеонов.

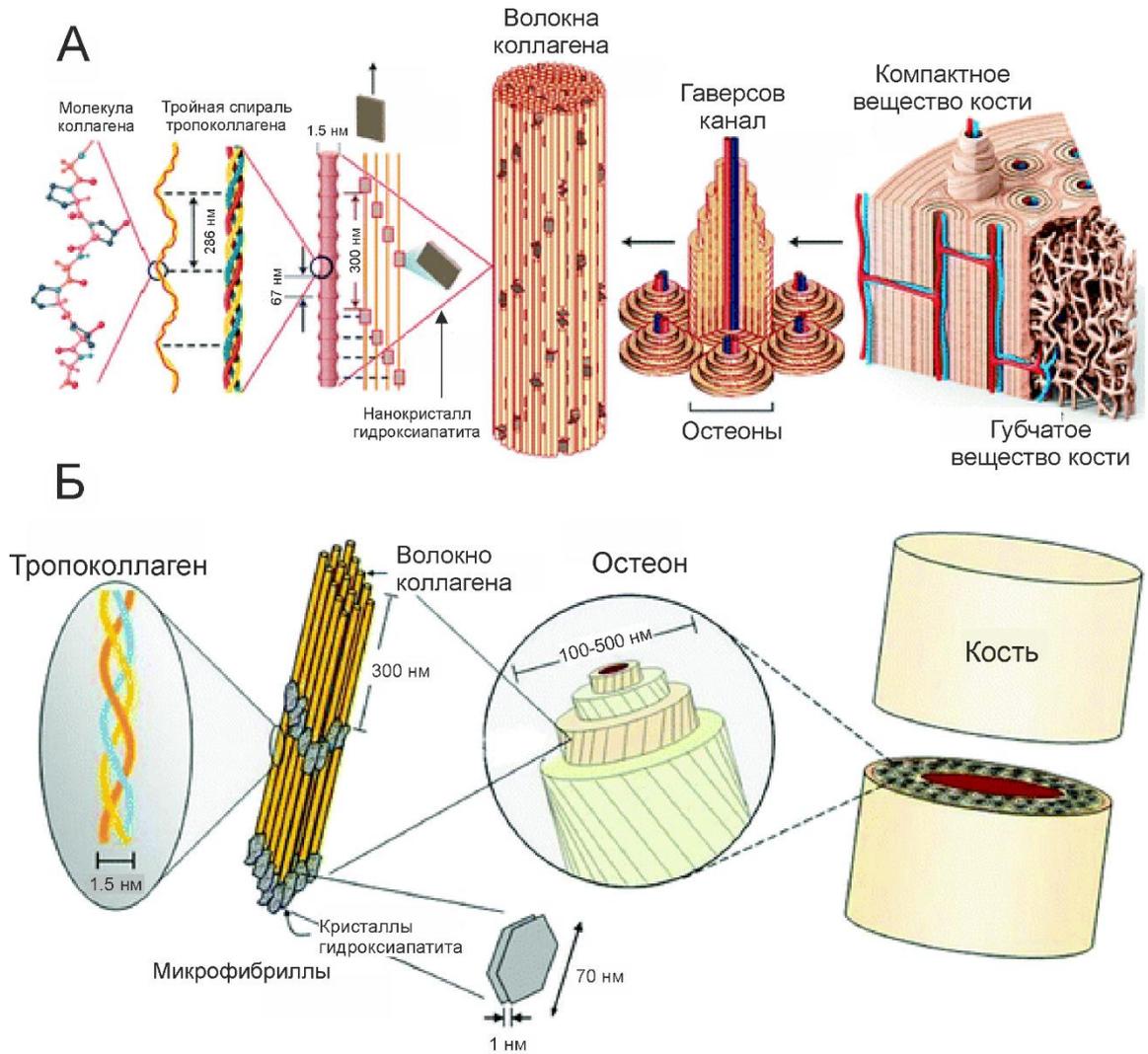


Рисунок 3. Иерархически организованная структура костной ткани. (а) – (справа налево) *макроструктура*, представленная компактным веществом костной ткани, состоящим из остеонов, *субмикроструктура*, представленная пучками коллагеновых волокон, *наноструктура*, представленная кристаллами гидроксиапатита и отдельными коллагеновыми волокнами, и *субнаноструктура*, представленная спиральями тропоколлагена и молекулами коллагена [33] (а). (б) – организация наноразмерных пластин гидроксиапатита с коллагеновыми волокнами [32].



Рисунок 4. Оптическое изображение гистологического среза костной ткани.

Таким образом, на микроскопическом уровне костная ткань представляет собой минерализованную биополимерную матрицу с организованной структурой. Костная ткань является отличным примером природного гибридного биокompозитного материала с иерархической организацией структуры. Костная ткань, по сути, – идеальный образец материала для костного имплантата, так как у нее, естественно, присутствуют все необходимые качества для эффективного остеогенеза – она остеокондуктивна, остеоиндуктивна, и обладает необходимыми биомеханическими свойствами. Поэтому, на данный момент, современные исследователи стремятся максимально приблизиться к структуре, составу и свойствам натуральной костной ткани и используют их в качестве эталонной основы для создания синтетических биомиметических гибридных материалов.

1.3. Полимерные композиты

Среди различных методов формования полимерных материалов, электроформование (ЭФ) представляет повышенный интерес благодаря возможности формирования нетканых матриц с волокнистой структурой, обладающей высокой степенью пористости, подобной структуре натуральных внеклеточных матриц. Также к преимуществам ЭФ можно отнести вариативность в выборе параметров процесса и используемых полимеров, что позволяет получать материалы с различной структурой и свойствами.

Дополнительная модификация способна придать ЭФ матрицам дополнительную функциональность, направленную на улучшение качества имплантата на их основе и терапевтическую эффективность [34]. Выделяют следующие подходы к модификации ЭФ:

- (i) Модификация биологически активными и терапевтическими препаратами (включая как низкомолекулярные вещества (например, антибиотики) так и макромолекулярные (факторы роста, биополимеры)). Данные вещества могут быть включены внутрь полимерных волокон матрицы, либо иммобилизованы на их [35].
- (ii) Неорганические материалы (нано- и микрочастицы), которые также могут находиться внутри полимерных волокон, либо адсорбированы или выращены на их поверхности или поверхности матрицы [36–38];
- (iii) Формирование гибридных покрытий на поверхности матрицы [39,40];
- (iv) Живые клетки и слои клеток, выращенные в матрице [41].

Неорганические материалы для модификации матриц, как правило, включают в себя фосфаты кальция $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, гидроксиапатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, карбонаты кальция CaCO_3 и магния MgCO_3 , которые входят в состав матрикса натуральных минерализованных твердых тканей в организме млекопитающих (скелет, зубы), а также многих других живых существ (раковины) [42,43]. Было показано, что данные материалы способны стимулировать синтетическую активность остеобластов [44] и производство костного апатита [45]. Таким образом, данные неорганические материалы придают osteoconductive свойства полимерным матрицам. Пористая структура некоторых материалов, например, ватерита (метастабильной полиморфной модификации CaCO_3) позволяет их одновременно использовать как резервуары для иммобилизации функциональных веществ.

1.4. Композиты на основе гидрогелей

Гидрогели – материалы на основе трехмерной сети из связанных между собой полимерных молекул, содержащие большое количество молекул воды, заключенных в ячейки данной сети. Гидрогели способны впитывать и удерживать

воду, при этом сохраняя свою структуру. Данная трехмерная структура гидрогелей с высоким содержанием воды подобна структуре живых тканей, в связи с чем гидрогели успешно используются в качестве матриц для создания тканеинженерных структур, так как поддерживают необходимую среду для жизни клеток со свободной циркуляцией жидкости, обеспечивающей приток нутриентов и отток продуктов обмена клеток. Однако, довольно низкие механические свойства гидрогелей ограничивают их применение в качестве имплантов. Модификация структуры гидрогелей неорганическими материалами (биокерамические материалы, биостекло, углеродные нанотрубки) способна повысить их модуль упругости [46–48]. Создание гибридных материалов на основе гидрогелей с добавлением osteoconductive неорганических материалов (карбоната кальция [49,50], фосфата кальция [48,51]) позволяет улучшить их биоактивные и остеогенные свойства.

1.5. Биокерамические материалы

Биокерамика («биоактивное стекло») – неорганические керамические материалы, обладающие биосовместимыми и osteoconductive свойствами, предназначенные для применения в остеопластике и стоматологии. Разные виды биокерамических материалов различаются особенностями состава, который может включать в себя оксиды алюминия и циркония, диоксид кремния, гидроксиапатит, фосфаты кальция, ионы различных металлов (стронций, цинк) и т. д. [52]. Биокерамические мезопористые материалы, помимо их высоких osteoconductive свойств, способны служить резервуаром для иммобилизации биологически активных и терапевтических веществ и их доставки в целевые области (области дефекта/повреждения тканей). Тип взаимосвязи между веществами, которые могут представлять собой низкомолекулярные и макромолекулярные соединения, и неорганической биокерамической матрицей, в основном, носит характер физического взаимодействия (слабое электростатическое и ван-дер-ваальсово взаимодействия), и редко – химическая связь. Процесс иммобилизации и кинетика высвобождения активного

функционального вещества, загруженного в матрицу, будут зависеть от поверхностных свойств и структуры биокерамической матрицы.

Сочетание различных биокерамических материалов, включая фосфаты кальция, гидроксиапатиты и карбонаты кальция/магния с органическими материалами (полимеры, гидрогели, биомолекулы) и создание гибридных материалов с организованной структурой на базе этого сочетания позволит имитировать естественную костную ткань, что, в свою очередь, может быть использовано для создания новых интеллектуальных материалов для костных имплантатов.

В таблице 1 представлены основные самые распространенные типы гибридных материалов, предназначенные для остеопластики.

Таблица 1. Гибридные и биокерамические материалы, используемые для замещения дефектов костной ткани.

	Описание			Ссылка
	Органическая матрица	Неорганическая фаза	БАВ	
Полимерные композиты	Коллаген	-	Катехоламины	[16]
		Гидроксиапатит	-	[53–55]
		Фосфат кальция	-	[56]
	Поликапролактон	-	Костные морфогенетические белки	[18]
		Наночастицы CaCO ₃ (кальцит)	-	[20,57]
		Микрочастицы CaCO ₃ (ватерит)	-	[58]
		Фосфат кальция	-	[39,59]
		Гидроксиапатит	-	[57,58,60]
			Костные морфогенетические белки	[61,62]
		Наночастицы Ag, TiO ₂ , Na ₂ Ti ₆ O ₁₃	-	[63]

		Фосфосиликат кальция и натрия («биоактивное стекло» - Bioglass®)	-	[59,64–66]
	Полимолочная кислота	Частицы диоксида кремния («биоактивное стекло»)	-	[67,68]
		Микрочастицы CaCO ₃ (ватерит)	-	[69,70]
	Хитозан	Гидроксиапатит	-	[71,72]
Композиты на основе гидрогелей	Геллановая камедь	CaCO ₃ , MgCO ₃ , Mg-обогащенный CaCO ₃	-	[50,73–75]
		Трикальций фосфат Ca ₃ (PO ₄) ₂	-	[76]
		Zn- и Sr-обогащенные частицы диоксида кремния	-	[77]
		Углеродные нанотрубки	-	[78]
	Альгинат кальция	Микрочастицы CaCO ₃ (ватерит)	Щелочная фосфатаза	[79,80]
	Изолят сывороточного белка	Частицы диоксида кремния	-	[81]
	Гиалуроновая кислота	Микро- и нановолокна на основе «биоактивного стекла»	-	[82]

Биокерамика	Трикальций фосфат $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	-	[83,84]
	Гидроксиапатит	-	[85,86]
		Костные морфогенетические белки	
	Диоксид кремния/гидроксиапатит	-	[89]
	«Биоактивное стекло» - Bioglass®	-	[90–92]

1.6. Карбонат кальция: структура, полиморфные модификации и свойства

Карбонат кальция CaCO_3 является одним из наиболее распространенных минералов в природе и играет важную роль во многих процессах, включая глобальную циркуляцию CO_2 , связывание тяжелых металлов в окружающей среде, очистку воды, а также, разумеется, в качестве основного формирующего материала твердых минерализованных тканей живых организмов (скелеты и раковины). Таким образом, различные полиморфные модификации CaCO_3 , в особенности кальцит, были предметом различных научных исследований [93]. CaCO_3 имеет три полиморфные модификации – кальцит, арагонит и ватерит (рисунок 5 и 6). Кальцит – наиболее стабильная и распространенная в природе форма, представляет собой кубические кристаллы с гладкой поверхностью. Кальцит является продуктом биоминерализации и компонентом раковин и экзоскелетов морских животных (моллюсков, кораллов и т.д.), наряду с менее стабильным арагонитом. Кальцит и арагонит относительно стабильны при инкубации в воде (при $\text{pH}=7$ и выше) при нормальных условиях (при этом стабильность кальцита выше арагонита) [94]; их кристаллические структуры обладают схожестью. Атомы кальция расположены почти в одинаковых положениях кристаллической решетки в (001) слоях, чередуясь со слоями групп CO_3^{2-} . Основное отличие в структуре кальцита и арагонита заключается в организации и ориентации групп CO_3^{2-} (Рисунок 5) [95].

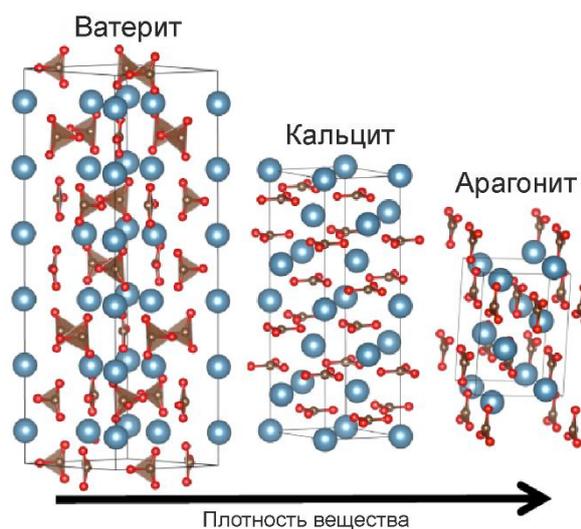


Рисунок 5. Схематическое изображение кристаллических решеток ватерита, кальцита и арагонита. CO_3^{2-} -группы заштрихованы. Атомы кальция представлены синими шарами, атомы кислорода – красными [96].

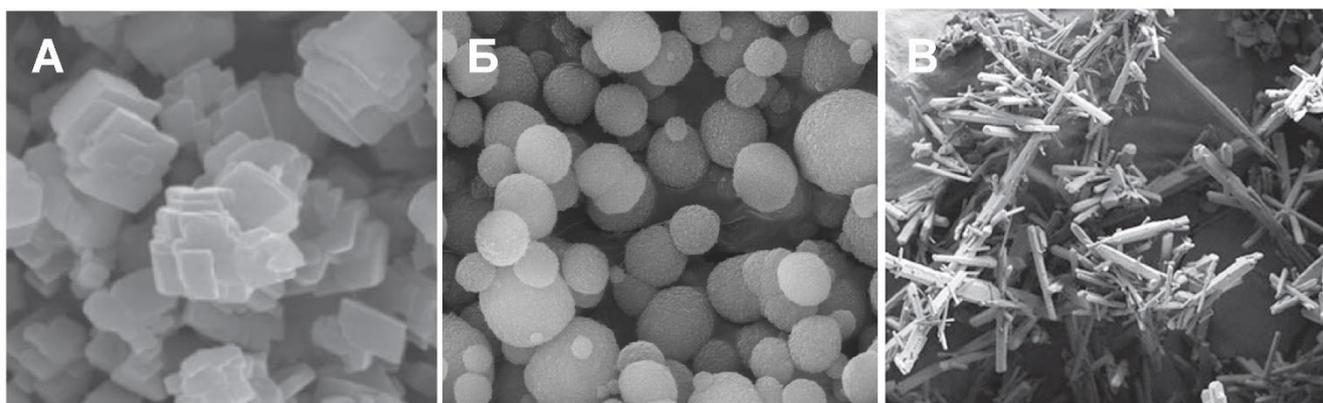


Рисунок 6. СЭМ изображения трех полиморфных модификаций CaCO_3 : кальцит (А), ватерит (Б) и арагонит (В) [97]

Ватерит – наименее стабильная форма карбоната кальция, которая в естественных природных условиях была обнаружена только в некоторых видах живых организмов (раковины гастроподов, листья камнеломки). Однако, последние два десятилетия ватерит является объектом повышенного научного интереса в силу его потенциала для биомедицинских и экологических применений благодаря его свойствам (таким как биосовместимость, высокая степень пористости, высокая скорость деградации *in vivo*, простота процедуры синтеза).

Согласно классической теории зародышеобразования и роста CaCO_3 в растворах [98,99], ватерит – промежуточная метастабильная фаза в процессе кристаллизации микрочастиц CaCO_3 , при обычных нормальных условиях переходящая в конечную фазу кальцита, наиболее термодинамически стабильную. Ватерит представляет собой поликристаллические частицы сферической формы, состоящие из кристаллитов с гексагональной кристаллической решеткой. Частицы ватерита имеют большую площадь поверхности в силу высокой степени пористости (до ~40 %) [100], со средним размером пор около 35 нм [101]. Размер частиц в зависимости от параметров их синтеза может варьироваться от 0.1 мкм до 50 мкм. Параметры синтеза (тип рабочего раствора, концентрации реагентов, время синтеза, температура, физическое воздействие (перемешивание, ультразвуковое облучение и проч., а также их параметры – скорость, интенсивность и проч.), присутствие модифицирующих агентов в растворе (наночастицы, макромолекулы и проч.) – обладают ключевой ролью для конечного размера, формы и морфологии получаемых частиц ватерита [100,102,103]. Пористая структура ватерита успешно используется для иммобилизации широкого ряда функциональных веществ, как низкомолекулярных, так и высокомолекулярных (лекарственные препараты, биомacroмолекулы, полимеры, флуоресцентные красители, квантовые точки, наночастицы металлов и их оксидов, и т. д.). Мягкие условия синтеза ватерита (водная среда, близкий к нейтральному рН, комнатная температура), а также относительно мягкие условия для его разрушения – все это позволяет использовать ватерит как биосовместимый и экологичный контейнер, позволяющий осуществить эффективную иммобилизацию веществ и их хранение, направленную доставку и высвобождение в физиологических условиях. При этом ватерит демонстрирует полное отсутствие токсичности. Высвобождение веществ из ватерита происходит путем естественного процесса перекристаллизации в кальцит, что приводит к диффузии молекул иммобилизованного вещества в среду в процессе реорганизации кристаллической решетки CaCO_3 . Другой альтернативой является растворение CaCO_3 в мягких условиях с рН ~ 7.4 и ниже.

В силу вышеупомянутых свойств, ватерит был широко исследован и применен в качестве микроконтейнера для доставки лекарств в большом количестве работ [104].

Метастабильность ватерита в водной среде обуславливает его высокую химическую активность и способность к быстрому растворению и перекристаллизации. Таким образом, ватерит может быть использован как обильный источник ионов Ca^{2+} , а также может быть быстро перекристаллизован в гидроксипатит и магний-замещенный гидроксипатит в присутствии фосфатных ионов и ионов магния [103,105]. Более того, было показано, что ватерит замещается натуральным костным апатитом *in vivo* при его имплантации в костную ткань у крыс [34,106]. Однако, остеогенный потенциал ватерита еще слабо изучен и представлен только в ряде исследований [79,106–109], в то время как синтетический гидроксипатит широко используется в качестве костнозамещающего материала. Преимущества ватерита, включающие в себя:

- (i) биосовместимость;
- (ii) способность к иммобилизации и высвобождению веществ;
- (iii) быстрая *in vivo* деградация без каких-либо токсических продуктов;
- (iv) обильный источник Ca^{2+} ионов;
- (v) трансформация в костной апатит;

- обуславливают перспективность ватерита как материала для создания новых эффективных гибридных материалов для регенерации костной ткани.

1.7. Математическое моделирование процессов высвобождения биологически активных препаратов из биоматериалов *in vitro*

Иммобилизация различных БАВ в имплантационные материалы позволяет придать дополнительную терапевтическую функциональность имплантам. В данном случае, критическое значение имеет возможность контроля и оптимизации профилей высвобождения БАВ из имплантов. Применение математических моделей для описания кинетических кривых высвобождения позволяет прогнозировать характер высвобождения и уровень концентрации БАВ

в среде [110]. Далее приведены основные математические модели, наиболее часто используемые в фармацевтике при исследовании терапевтических формуляций, а также имплантационных материалов, содержащих лекарственные препараты:

(i) Классическая модель Фика.

Высвобождение вещества из материала/контейнера в стабильных условиях можно описать с помощью процесса простой диффузии, зависящей от коэффициента диффузии данного вещества в среде. Данная модель применяется для простых типов контейнеров, содержащих вещество, покрытых однородной полимерной мембраной («мембранные системы»), а также для так называемых монолитных (матричных) систем. В общем случае, модель Фика описывается формулой (1):

$$M(t) = \frac{A D K (M_0 - M(t))}{L V} \quad (1)$$

где $M(t)$ - количество высвобождаемого вещества в зависимости от времени, M_0 — начальная масса вещества, V — объем контейнера, содержащего высвобождаемое вещество, A — площадь поверхности контейнера, а L — толщина полимерного покрытия на контейнере, которая отделяет внутренний объем контейнера от внешней среды, D — коэффициент диффузии вещества. В большинстве случаев, в этих системах скорость высвобождения считается постоянной, также как скорость диффузии и коэффициенты A , K , L и V . Следовательно, это уравнение в частных производных имеет линейное решение относительно переменной времени t [110].

(ii) Модель Хигучи

В своей первой интерпретации, данная модель позволяла количественно оценить высвобождение вещества из матричных систем, представляющих собой тонкие слои жидких или полутвердых терапевтических формуляций (мазей), содержащих данное вещество в мелкодисперсном состоянии. В дальнейшем, эта модель была адаптирована также и для других типов систем доставки, таких как накожные патчи и пластыри. Бейкер и Лонсдейл адаптировали модель Хигучи также для систем с другими геометрическими параметрами (например,

сферические) (модель Бейкера-Лонсдейла) [111]. Преимущество и интерес модели Хигучи заключается в ее простом уравнении, основанном на законе Фика и представляющим собой пропорциональную взаимосвязь между кумулятивным количеством высвобождаемого вещества и квадратным корнем из времени. Общий вид уравнения представляет собой (2):

$$M(t) = k\sqrt{t} \quad (2)$$

где k – константа Хигучи (3).

$$k = A\sqrt{2C_{ini}DC_s} \quad (3)$$

где A – геометрический параметр материала/контейнера, C_{ini} – начальная концентрация вещества, C_s – растворимость вещества в среде, D – коэффициент диффузии вещества. Таким образом, в уравнении (3) данные параметры поверхности материала, концентрации вещества и коэффициент диффузии предполагаются постоянными, и формируют уникальную константу k , называемую константой Хигучи. Возможность использования данной модели для описания процесса высвобождения вещества связана с конкретными условиями данного процесса; среди них начальная концентрация вещества C_{ini} должна быть выше, чем величина растворимости вещества C_s в конкретной матрице; более того, диффузия должна считаться однонаправленной и постоянной [112].

(iii) Модель Вейбулла

Данная модель используется для описания процессов высвобождения веществ из матриц в течение ограниченного во времени периода.

$$M(t) = A(1 - e^{-k(t-t_c)^d}) \quad (4)$$

где A – общее количество высвобожденного вещества, k – масштабный параметр, описывающий временную зависимость процесса, t_c – время задержки процесса высвобождения вещества, d – параметр, связанный с процессом диффузии вещества в среде при его высвобождении.

Модель Вейбулла находит применение для описания различных типов систем доставки веществ. Однако, наиболее эффективную аппроксимацию данная модель демонстрирует для наноструктурированных систем. В частности, она наиболее

часто применяется для описания высвобождения лекарств из гидрофобных полимерных матриц. Особенность этой модели заключается в том, что она не зависит от совокупных эффектов различных явлений, происходящих во время высвобождения [110,113].

(iv) Модель Пеппаса

Существует множество систем, в которых классическая модель Фика или модель Хигучи не применимы. Например, когда матрица-носитель лекарственного препарата состоит из материала, разбухающего в воде, необходимо учитывать диффузию жидкости в самом объеме матрицы. Для этих целей, Пеппасом и соавторами было получено уравнение, позволяющие анализировать процесс высвобождения лекарственных средств из матриц, имеющих как диффузионный (подчиняющийся закону Фика), так и релаксационный компонент, т.е. учитывающее транспорт воды в объеме полимера матрицы, релаксационное набухание материала, и временную зависимость поглощение воды (так называемый Case-II-транспорт) [114–116]. Модель Пеппаса описывает высвобождение препарата из набухающей матрицы как экспоненциальную функцию времени (5).

$$\frac{M(t)}{M_{\infty}} = Kt^n \quad (5)$$

$M(t)$ - количество препарата, высвобождаемое в момент времени t , M_{∞} - конечное количество препарата в состоянии равновесия, K — константа, зависящая от формы и геометрии матрицы-носителя препарата, n — показатель, связанный с механизмами высвобождения вещества, который определяется экспериментально (Таблица 2) [112].

Таблица 2. Показатель n в уравнении Пеппаса и механизм высвобождения вещества из полимерной матрицы трех типов геометрических форм.

Тонкая пленка	Цилиндр	Сфера	Механизм высвобождения вещества
Показатель n			
0.5	0.45	0.43	Диффузия по закону Фика

$0.5 < n < 1.0$	$0.45 < n < 0.89$	$0.43 < n < 0.85$	Диффузия, не подчиняющаяся закону Фика (аномальная диффузия)
1.0	0.89	0.85	Case-II-транспорт

1.8. Исследование биологической реакции на имплантацию материалов.

Эффективность использования импланта определяется характером его взаимодействия с тканями организма, что обусловлено тем, что живой организм реагирует на внедрение любого инородного объекта в свою систему изменением структуры собственных тканей в зоне внедрения. В случае негативной реакции организма на имплант может последовать его отторжение, в тяжелых случаях сопровождаемое разрушением собственных тканей организма в зоне имплантации. Поэтому, первостепенное значение имеет биосовместимость материала импланта, а именно его биохимическая и биомеханическая совместимость.

Биохимическая совместимость подразумевает отсутствие выраженного иммунного ответа и острых воспалительных реакций, которые могли бы привести к отторжению импланта. При этом важно учитывать тот факт, что полное отсутствие данных реакций при имплантации невозможно; и при внедрении материала даже с высокой степенью совместимости на начальных этапах всегда будет иметь место реакция организма различной степени выраженности [117,118]. Более того, было показано, что относительно умеренный воспалительный ответ на ранних стадиях имплантации является предшественником и стимулятором инициации начальных репаративных процессов, таких как ангиогенез [119,120]. Определение биосовместимости долгосрочных имплантируемых изделий было дано Д. Уилльямсом в 2008 году, который сформулировал его как «способность импланта осуществлять свои заданные функции при заданной степени внедрения в организме, при этом не вызывая нежелательных локальных или системных реакций» [121]. В этой же статье, профессор Уилльямс дает конкретизирующее

определение для биосовместимости тканеинженерных матриц, что очень важно в контексте настоящей работы: **«способность осуществлять функции субстрата для поддержания необходимой жизнедеятельности клеток, включая стимуляцию молекулярных и биомеханических сигнальных систем, в целях оптимизации процесса регенерации тканей, при этом не вызывая каких-либо нежелательных локальных и системных реакций в организме».**

С точки зрения биосовместимости, пригодными для имплантации является материалы, вызывающие минимальную степень воспалительной реакции с стороны тканей в зоне внедрения. При этом необходимо, чтобы данные материалы трансформировались в ходе репаративных процессов в соответствии с развитием, ростом и структурно-морфологическими особенностями тканей организма. Здесь имеет место биомеханическая совместимость имплантируемых материалов и тканей, которая предполагает максимальную степень подобия структурных и физико-механических свойств материала к свойствами ткани [122–124].

Воспалительный и регенеративный процессы являются двумя взаимосвязанными и неразрывными компонентами биологической реакции организма на имплантацию. Регенерация представляет собой комплекс биологических реакций тканей и организма в целом в ответ на повреждение. Регенераторная реакция направлена на восстановление структурно-функциональной целостности поврежденной области. В процессе регенерации костной ткани можно условно выделить отдельные фазы, учитывая тот факт, что костная регенерация является целостным и комплексным процессом, и все стадии в нем тесно связаны между собой. Рассматривая совокупность структурно-морфологических и биохимических изменений, возникающих в костном регенерате, исследователи выделяют следующие стадии регенерации [125,126]:

1. Катаболическая фаза, сопровождающаяся дезинтеграцией и деградацией структур, окружающих дефект и входящих в состав кости (1-2 дня после возникновения повреждения).

2. Пролиферация и дифференциация соединительнотканых элементов в зоне дефекта, сопровождающаяся выделением компонентов органической основы костного матрикса. На начальных стадиях – это нити фибрина, которые затем организуются в волокна коллагена. Данные процессы протекают в тесной взаимосвязи с воспалительным процессом. Вторая стадия длится от 3 до 8 дней.
3. Синтетическая стадия, в ходе которой образуется первичная костная структура в результате комплексных биохимических реакций, стимулирующих отложение минеральной фазы из их растворенного состояния на поверхности органической коллагеновой матрицы. Первичная костная ткань еще лишена своей характерной структуры – пластинчатого строения и организации в форме остеонов. Продолжительность стадии от 9 до 14 дней.
4. Стадия ремоделирования, в ходе которой формируется зрелая костная ткань, имеющая пластинчатую структуру и обеспечивающая восстановление формы и функции кости (15-21 день).
5. Стадия формирования костной мозоли (22-28 дней), которая в конечном итоге должна перестроиться в нормальную кость (до 1 года).

Формирование новой сосудистой системы и васкуляризация в зоне дефекта являются обязательным условием протекания остеогенеза [125]. Интенсивность регенерации костной ткани зависит от кровоснабжения, что было показано во множестве работ, посвященных исследованию репаративных процессов и приживлению костных имплантов [119,127–132]. Васкуляризация зон постравматического остеогенеза стимулирует дифференциацию клеточных элементов в остеобласты [133].

На основании вышеописанных фактов, становится очевидной первостепенная важность исследования биологической реакции организма при разработке новых материалов для регенерации костной ткани.

1.9. Методы и модели исследования биологической реакции.

Оценка биологической реакции организма в ответ на имплантацию материала включает в себя два обязательных аспекта – это оценка местной реакции тканей и оценка системной реакции организма. Оценка местной реакции тканей проводится в ходе морфологического (гистологического) исследования тканей, содержащих имплант и забранных из зоны имплантации в определенные промежутки времени эксперимента. Гистологическое исследование является обязательным и самым распространённым методом исследования биологической реакции.

Для исследования системной реакции организма предпочтительным методом является биохимический анализ крови, позволяющий провести полноценную и надежную оценку общего состояния организма и метаболических процессов. Проводится мониторинг биохимических маркеров костного метаболизма, минерального обмена, гомеостаза, а также маркеров фактора роста эндотелия сосудов.

При проведении исследования биологической реакции на имплантацию возникает задача выбора оптимальной модели для тестирования материалов, которая дала бы возможность адекватно транслировать полученные данные на клинические случаи у человека.

In vitro исследование является первым этапом оценки и пригодности материала для контакта с живой тканью. Данное исследование дает информацию о цитотоксичности, генотоксичности, клеточной совместимости материала, пролиферации и дифференцировке клеток в контакте с материалом [134], а также позволяет определить токсичность отдельных компонентов материала [135]. В последнее время многие исследователи работают в направлении разработки новых комплексных моделей *in vitro* апробации материалов для имплантации, которые способны бы были дать больший и разносторонний объем данных, необходимый для трансляции на организм человека, и таким образом уменьшить необходимость неоправданного использования животных в качестве *in vivo* моделей, или хотя бы снизить их количество. Однако, на данный момент,

современные *in vitro* модели пока еще не способны дать оценку биологических реакций костной ткани. Главный ограничительный фактор – существенные различия в поведении клеточных культур в условиях *in vitro* и *in vivo*, обусловленные, главным образом, отсутствием необходимой клеточной и тканевой архитектуры, биохимической и биомеханической сигнальной системы, системных факторов организма, отличием степени дифференцировки клеток, их функционирования и др. Огромную сложность представляет воссоздание межклеточных взаимодействий и динамических свойств клеточной системы, которые бы соответствовали условиям *in vivo* [136]. Также невозможно полностью воспроизвести механические нагрузки в клеточных культуральных системах, имитирующих *in vivo* процессы, что необходимо для биомеханического регулирования развития костной ткани [137]. Поэтому, на данный момент развития науки о тканевой инженерии для проведения полноценного исследования биологической реакции и адекватной трансляции исследований на человека необходимо использование моделей на животных [138].

При выборе моделей экспериментальных животных учитывается ряд факторов. Определяющий и первостепенный фактор – конкретно сформулированная задача исследования. Вторым определяющим фактором является схожесть структурных и функциональных особенностей костной ткани конкретной животной модели с тканью человека. Также выбор модели животных определяют стоимость и доступность их приобретения, ухода и содержания [138]. Множество различных моделей животных было исследовано в костной пластике. Овцы, козы, собаки, свиньи и кролики были признаны как подходящие экспериментальные модели с костным аппаратом, наиболее сходным по строению и физиологическим качествам с человеком [139,140]. В современной травматологии данные модели до сих пор используются в качестве стандарта для доклинических исследований остеопластических материалов и подходов. При этом все еще не существует единой экспериментальной модели, которая удовлетворяла бы всем требованиям для полноценного исследования биологического влияния имплантации материала. Кроме того, данные модели крупных животных часто демонстрируют низкую

степень воспроизводимости и статистических показателей. Манипуляции с данными животными, включая их содержание, представляют большие трудности и затраты. Особое внимание заслуживает этическая сторона вопроса использования крупных животных в экспериментах. В директиве Европейского Союза 2010/63/EU были установлены строгие стандарты контроля по использованию животных в научных целях, предусматривающие сокращение количества животных в экспериментах и поиск альтернативных методов исследования [141].

В последние годы особое внимание уделяется разработке валидных и адекватных моделей для костной пластики среди животных малого размера – грызунов, включая крыс и мышей. Данные животные отличаются большей воспроизводимостью и легкостью в содержании, а также большей устойчивостью в экспериментальных манипуляциях. Ранее модели крыс в большинстве своем считались непригодными для остеопластических исследований в силу значительных физиологических отличий в плане костного аппарата от человека. Однако во многих недавних работах было показано преимущество моделей крыс для исследования влияния материалов на остеогенез и остеоинтеграцию как наиболее быстро осуществимых, воспроизводимых и надежных [142–146]. Крысиные модели успешно используются для гистологических исследований динамического развития тканей при регенерации, обеспечивая достаточную статистическую значимость и доклиническую релевантность [147–149]. Были разработаны различные модели с воспроизводимыми дефектами в различных областях скелета. Дефекты костей свода черепа, большеберцовой, бедренной и нижней челюсти критических размеров у крыс были использованы в различных исследованиях для изучения новых подходов к регенерации костной ткани, таких как факторы роста, новые материалы, клеточная или тканевая имплантация или их сочетание [142,150–152]. Крысиные модели являются наиболее распространенными моделями сегментарных дефектов бедренной кости. Анатомически бедренная кость крысы напоминает бедренную кость человека. Закрытие зон роста бедренной и большеберцовой костей у крыс и мышей по

продолжительности жизни пропорционально с человеком [153]. Таким образом, экспериментальная модель крыс может быть успешно использована для фундаментальных и прикладных трансляционных исследований процессов регенерации костной ткани и биологической реакции в ответ на имплантацию материалов, в частности биосовместимости, морфологической оценки тканей, остеокондукции и остеоиндукции, а также деградации материалов *in vivo*. К настоящему моменту, модели крыс рекомендуются для оценки биологической реакции в международном стандарте ISO 10993-6: 2016 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия. Часть 6. Исследования местного действия после имплантации» [154]. Некритический дефект бедренной кости у крыс является наиболее воспроизводимой и реализуемой моделью для оценки влияния материалов на остеогенез и ангиогенез *in vivo*, в соответствии с данным стандартом [154].

1.10. Заключение по главе 1

В приведенном литературном обзоре представлено современное состояние исследований и разработок в области синтетических материалов для остеопластики костных дефектов. Показано, что для создания эффективных и функциональных остеопластических материалов необходимо использование принципов и подходов различных смежных областей науки, и в особенности – биофизики и биоматериаловедения. Свойства материала, такие как его структура, морфология, поверхностные свойства, присутствие определенных ионов металлов и определенных «сигнальных» молекул белков являются биофизическими и биохимическими стимулами, которые будут определять биологическую реакцию организма на данный материал. Приведены основные понятия биосовместимости и параметров, которым должен соответствовать материал для создания требуемой биологической реакции, которая приведет в конечном итоге к эффективному восстановлению структурно-функциональной целостности дефекта костной ткани. Показано, что гибридные органо-неорганические материалы являются лучшими кандидатами вследствие их биомиметичности и схожестью с натуральной костной тканью. Описаны основные классы современных гибридных

остеопластических материалов. Также приведены основные подходы и модели исследования биологической реакции на внедрение остеопластических материалов.

Карбонат кальция в метастабильной полиморфной модификации ватерита обладает большим потенциалом в качестве компонента полимерных гибридных материалов для замещения костных дефектов и повышения эффективности регенерации костной ткани.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Материалы

Дигидрат хлорида кальция ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), карбонат натрия (Na_2CO_3), поликапролактон (ПКЛ, $M_w = 80$ кДа), нитрат серебра (AgNO_3), таниновая кислота (ТК, $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$), геллановая камедь (ГК), щелочная фосфатаза (ЩФ, $M_w \sim 160$ кДа), п-нитрофенилфосфат, среда для культивирования клеток Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), L-глутамин, пенициллин-стрептомициновый коктейль, флуоресцентный краситель AlamarBlue, родамин 6G, 4-меркаптобензойная кислота (4-МБК), тетраметилродамин-бычий сывороточный альбумин (ТРИТС-БСА), геллановая камедь (ГК) все Sigma-Aldrich (Германия).

Дихлорметан (ДХМ, CH_2Cl_2), N,N-диметилформамид (ДМФА, $\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}$), хлороформ (CHCl_3), этанол (70%), все Компонент-Реактив (Россия).

Соляная кислота (HCl), гидроксид натрия (NaOH), все СигмаТек (Россия).

Гидроксид аммония NH_4OH , Химреактив (Россия).

Контрольные штаммы микроорганизмов Microtrol discs, Becton Dickinson (США).

Питательный бульон для культивирования микроорганизмов, ФБУН ГНЦ ПМБ (Россия).

Трипсин, Life technologies (США).

Натрий-фосфатный буфер (PBS, 1X), Thermo Fisher Scientific (США).

Фетальная бычья сыворотка (ФБС), Hyclone (США).

Золетил, Virbac Sante Animale (Франция).

Ксилазин, Interchemie (Нидерланды).

Шовный материал «Резопрен», RESORBA Medical GmbH (Германия).

Формалин, красители гематоксилин и эозин Mayer, «БиоВитрум» (Россия).

Синтетическая монтирующая среда для заключения гистологических препаратов Bio-Mount, BioOptica (Италия).

Нормальные дермальные фибробласты человека (НДФЧ), предоставлены отделом клеточной инженерии Образовательного и научно-исследовательского института наноструктур и биосистем СГУ им. Н.Г. Чернышевского.

На этапах проведения экспериментов была использована деионизованная вода ($18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$), полученная на установке водоочистки Millipore Milli-Q Plus 185 (США, Канада).

2.2. Методики получения и модификации нетканых полимерных и гидрогелевых матриц

2.2.1. Формирование однослойных нетканых полимерных матриц

Формирование нетканых полимерных ПКЛ матриц было осуществлено методом электроспиннинга [155] из раствора ПКЛ с концентрацией 9.4 мас. %. Для этого гранулы ПКЛ были растворены в смеси ДХМ и ДМФА (массовое соотношение ДХМ:ДМФА=77:23) с последующим перемешиванием в течение 3 ч при комнатной температуре до достижения гомогенного прядильного раствора. Затем полученную смесь размещали в пластиковом шприце объемом 10 мл, который помещали в экспериментальную установку для электроформования. Формирование нетканого материала проводили в течение 3 ч при напряжении 17 кВ и скорости подачи раствора 0.5 мл/ч. Расстояние между иглой и осадительным электродом было 25 см. После завершения процесса формирования полученную нетканую однослойную ПКЛ матрицу снимали с осадительного электрода и хранили при комнатной температуре.

2.2.2. Получение двухслойных нетканых полимерных матриц

Получение двухслойных нетканых полимерных матриц было осуществлено методом электроспиннинга в два этапа.

Первый этап формирования нетканых полимерных матриц проводился на экспериментальной установке для электроформования Томского политехнического университета. Для этого путем растворения гранул ПКЛ в хлороформе был получен раствор ПКЛ с концентрацией 9 мас. %, перемешивание которого осуществлялось в течение 3 ч при комнатной температуре до достижения гомогенного прядильного раствора. Полученный раствор помещали в пластиковый шприц объемом 10 мл с иглой из нержавеющей стали (диаметр 0.58

мм), который затем размещали в установке для электроспиннинга. Скорость подачи раствора составляла 3.6 мл/ч, приложенное напряжение соответствовало 8 кВ. Формирование материала происходило на заземленном барабанном коллекторе (скорость вращения 600 об/мин), расположенном на расстоянии 8 см от кончика иглы. В результате на данном первом этапе были получены нетканые ПКЛ матрицы толщиной 1 мм.

На втором этапе на полученном субстрате осуществляли формирование второго слоя нетканой полимерной матрицы. Формование проводилось на базе СГУ им. Н.Г. Чернышевского с использованием лабораторной установки для электроспиннинга NanoSpider NS 200 (Elmarco, Чехия). Раствор ПКЛ для формирования второго слоя был приготовлен так же, как описано в *разделе 2.2.1*. Матрица-субстрат толщиной 1 мм была закреплена в лабораторной установке на поверхности осадительного четырехпроводного электрода. Расстояние между прядильной головкой и осадительным электродом составляло 150 мм, напряжение между электродами соответствовало 80 кВ. Формирование происходило в течение 3 ч. После этого, полученная нетканая двухслойная 2ПКЛ матрица снимали с осадительного электрода и далее хранили при комнатной температуре.

2.2.3. Формирование ватеритного покрытия на нетканой полимерной матрице

Нетканые ПКЛ матрицы размером 1 см × 1 см помещали в пробирку типа «Эппендорф» с 1 мл водного раствора 1 М CaCl₂, которую затем размещали в УЗ-ванне («Сапфир», Россия). УЗ-обработка проводилась в течение 10 мин на рабочей частоте 35 кГц и интенсивности излучения 0.64 Вт/см². Затем в пробирку добавляли 1 мл водного раствора 1 М Na₂CO₃, и повторно подвергали обработке в течение 30 с при тех же параметрах УЗ-воздействия. После этого пробирку оставляли на 1 мин для завершения процесса формирования карбоната кальция. Модифицированную карбонатом кальция ПКЛ-матрицу (ПКЛ/CaCO₃) промывали 2 раза деионизованной водой и 1 раз этанолом (концентрация 70%), и сушили в сушильном шкафу (Snol, Литва) при 40 °С в течение 30 мин.

Формирование равномерных покрытий карбоната кальция на волокнах ПКЛ-матрицы осуществлялось путем многократной обработки матрицы с использованием равных объемов (по 1 мл) эквимольных растворов солей (1 М CaCl_2 и 1 М Na_2CO_3). Число циклов обработки варьировалось от 1 до 7. Масса образца контролировалась на каждом этапе обработки. Измерения массы образцов проводились на микроаналитических весах GR-200 (A&D Company Ltd, Япония).

С использованием данной методики были получены ватеритные покрытия как на однослойных, так и на двухслойных ПКЛ-матрицах.

2.2.4. Модификация гидрогелевых матриц частицами ватерита

Модификация гидрогелевых матриц на основе геллановой камеди (ГК) частицами ватерита CaCO_3 осуществлялась с использованием методики синтеза CaCO_3 частиц в присутствии УЗ обработки, описанной в пункте 2.2.3. На первом этапе был сформирован исходный гидрогель ГК. Для этого был приготовлен водный раствор ГК с концентрацией 0.8 % масс. Гелефикация ГК была проведена при смешивании раствора ГК и водного раствора CaCl_2 (концентрация 0.02 М); смесь перемешивалась в течение 30 с и температуре +70 °С. После этого, полученный раствор охлаждался при температуре +22 °С, в результате чего происходило затвердевание полученного геля.

Для модификации ГК частицами ватерита, образцы гидрогеля погружали в 1 мл водного раствора 0,33 М CaCl_2 в пробирке, которую затем помещали в УЗ ванну. Образец гидрогеля предварительно обрабатывался в данном растворе CaCl_2 при УЗ облучении (рабочая частота 35 кГц и интенсивность излучения 0,64 Вт/см²) в течение 1 мин. Затем к раствору 0,33 М CaCl_2 при непрерывной УЗ-обработке добавляли водный раствор 0,33 М Na_2CO_3 . Синтез частиц CaCO_3 в гидрогеле ГК проводился в течение 1 мин в присутствии УЗ-обработки.

Все полученные образцы гидрогелей хранили в холодильнике при температуре +5°С.

2.2.5. Модификация однослойных нетканых ПКЛ-матриц частицами серебра

Модификация образцов матриц (ПКЛ и ПКЛ/CaCO₃) частицами серебра была проведена с помощью реакции «серебряного зеркала» при использовании реактива Толленса (смесь 0.5 М AgNO₃ и 0.5 М NH₄OH в объемном соотношении 1:1). Образец размером 1 см × 1 см инкубировали в растворе реактива Толленса объемом 5 мл в течение 10 мин. После этого образец помещали в 40% раствор D-глюкозы на 10 мин, затем промывали деионизованной водой 3 раза и выдерживали в сушильном шкафу при 40°C в течение 20 мин. В результате были получены образцы ПКЛ/Ag, ПКЛ/CaCO₃/Ag.

2.2.6. Иммуобилизация таниновой кислоты в однослойные нетканые ПКЛ-матрицы

Иммуобилизацию ТК проводили методом адсорбции из водного раствора [156]. Для этого образцы матриц (ПКЛ и ПКЛ/CaCO₃) размером 2 см × 2 см инкубировали в 4 мл водного раствора ТК с концентрацией 1 мг/мл в течение 1 ч. Затем матрицы отделяли от супернатантов, промывали 2 раза деионизованной водой и выдерживали в сушильном шкафу при 40 °C в течение 30 мин. В результате были получены образцы ПКЛ/ТК и ПКЛ/CaCO₃/ТК.

2.2.7. Иммуобилизация щелочной фосфатазы в двухслойные нетканые ПКЛ-матрицы с ватеринным покрытием

Иммуобилизацию ЩФ проводили методом адсорбции из водного раствора [156]. Для этого ПКЛ/CaCO₃ матрицы инкубировали в водном растворе ЩФ с концентрацией 1 мг/мл в течение 20 мин, затем отделяли от супернатанта, промывали 2 раза деионизованной водой и выдерживали в сушильном шкафу при 35 °C в течение 30 мин. В результате были получены образцы ПКЛ/CaCO₃/ЩФ.

2.2.8. Иммуобилизация флуоресцентных красителей в однослойные нетканые ПКЛ-матрицы

Образцы матриц (ПКЛ, ПКЛ/CaCO₃, ПКЛ/Ag, ПКЛ/CaCO₃/Ag) размером 2 см × 2 см последовательно инкубировали в 2 мл водного раствора ТРИТС-БСА (0.5 мг/мл) и 2 мл родамина 6G (0.5 мг/мл) в течение 20 мин для каждого раствора. По завершении каждого процесса инкубации, матрицы отделяли от супернатантов, которые сохраняли для дальнейшего анализа. Затем, матрицы выдерживали в сушильном шкафу при 40 °С в течение 30 мин.

2.2.9. Подготовка нетканых ПКЛ-матриц с ватеритным покрытием, содержащих чужеродный белок

Образцы однослойных матриц ПКЛ/CaCO₃ в форме диска диаметром 1 см инкубировали в водном растворе овальбумина (ОВА) с концентрацией 1 мг/мл. В результате были получены образцы ПКЛ/CaCO₃/ОВА.

2.2.10. Подготовка двухслойные ПКЛ-матриц, содержащих бактериальные липополисахариды

Предварительно была подготовлена суспензия микроорганизмов *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, и *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923 в стерильном питательном бульоне в соотношении 1:1:1. ПКЛ-матрицы засеивали полученной смешанной культурой микроорганизмов и инкубировали при 37 °С в течение 24 ч в чашках Петри с питательным агаром. Рост бактерий контролировался визуально. Спустя 24 ч матрицы инкубировали в 70%-ном этаноле в течение 48 часов для лизирования и подавления роста патогенов. Таким образом, после лизиса достигалось образование бактериальных липополисахаридов (ЛПС) в матрице. Стерильность полученных образцов была подтверждена отсутствием роста бактерий при инкубации при 37°С в течение 72 ч на питательном агаре. В результате были получены образцы ПКЛ/ЛПС.

В таблице 3 представлено описание всех типов образцов, полученных в ходе экспериментальных работ.

Таблица 3. Описание всех образцов, использованных в исследованиях

Аббревиатура	Описание образца
ПКЛ	Нетканая ПКЛ-матрица без ватеритного покрытия
ПКЛ/CaCO ₃	Нетканая ПКЛ-матрица, с ватеритным покрытием
ПКЛ/Ag	Нетканая ПКЛ-матрица без ватеритного покрытия, модифицированная частицами серебра
ПКЛ/CaCO ₃ /Ag	Нетканая ПКЛ-матрица, с ватеритным покрытием, модифицированная частицами серебра
ПКЛ/CaCO ₃ /ТК	Нетканая ПКЛ-матрица, с ватеритным покрытием и иммобилизованной ТК
ПКЛ/CaCO ₃ /ОВА	Нетканая ПКЛ-матрица, с ватеритным покрытием и иммобилизованным чужеродным белком ОВА
ПКЛ/CaCO ₃ /ЩФ	Нетканая ПКЛ-матрица, с ватеритным покрытием и иммобилизованной ЩФ
ПКЛ/ЛПС	Нетканая ПКЛ-матрица без ватеритного покрытия и содержащая бактериальные липополисахариды

2.3. Исследование адгезивных и биосовместимых свойств полученных нетканых полимерных матриц на культуре клеток нормальных дермальных фибробластов человека *in vitro*

2.3.1. Подготовка клеточной культуры

Клетки HDFЧ культивировались в среде DMEM, содержащей 10% ФБС, 2 мМ L-глутамина и 1% пенициллин-стрептомициновый коктейль, при 37 °С и 5% CO₂. Среду заменяли каждые 3 дня. Культуры клеток с 75–85% конфлюэнтностью собирали с использованием 0.25% трипсина, подсчет проводили с помощью гемоцитометра. Все материалы стерилизовали 70% этанолом в течение 30 мин, сушили на воздухе в асептических условиях и трижды промывали стерильным раствором PBS.

2.3.2. Оценка цитотоксичности нетканых ПКЛ-матриц без и с ватеритным покрытием

Клетки высевали в 24-луночные планшеты для культивирования в количестве 10^5 клеток на лунку. Через 24 ч в планшет с клетками помещали образцы нетканых ПКЛ-матриц без и с ватеритным покрытием (ПКЛ и ПКЛ/ CaCO_3) размером 1 см^2 и инкубировали в культуральной среде при $37 \text{ }^\circ\text{C}$ и $5\% \text{ CO}_2$. Исследование цитотоксичности матриц проводилось в течение 3 дней. Для этого в фиксированные временные точки (24, 48 и 72 ч) в лунки с исследуемыми матрицами добавляли по 100 мкл флуоресцентного красителя AlamarBlue и измеряли интенсивность флуоресценции (540/610 нм) с помощью планшетного ридера (Synergy H1 Multi-Mode Reader).

2.3.3. Исследование адгезии клеток к поверхности нетканых ПКЛ-матриц без и с ватеритным покрытием

Для изучения адгезии и распределения клеток на нетканых ПКЛ-матрицах без и с ватеритным покрытием (ПКЛ и ПКЛ/ CaCO_3) осуществляли инкубацию данных матриц с НДФЧ в течение 24 и 48 ч. Далее проводили фиксацию клеток 4% формалином в течение 20 мин при комнатной температуре, после чего образцы однократно промывали раствором PBS и деионизованной водой, затем высушивали при $40 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 30 мин.

2.4. Исследование биосовместимых и функциональных свойств полученных нетканых полимерных матриц *in vivo*

2.4.1. Соблюдение этических норм при проведении экспериментов с животными

Исследования свойств полученных функциональных ПКЛ-матриц проводились на белых лабораторных крысах *in vivo* на базе вивария Саратовского государственного медицинского университета (СГМУ) им. В.И. Разумовского. Все эксперименты, уход и содержание животных осуществлялись в соответствии с принципами биоэтики и конвенциями по защите животных, используемых в экспериментах и для других научных целей (принятыми Советом Европы в 2010 году), приказом Минздрава России (№ 267 от 19 июня 2003 г. «Об утверждении

Правил надлежащей лабораторной практики»), а также в соответствии с Руководством NIH по уходу и использованию лабораторных животных [52–54]. Протокол имплантации был утвержден этической комиссией СГМУ 19 декабря 2016 г. (протокол № 6 от 06.02.2018 г.).

2.4.2. Подкожная имплантация белым крысам

Эксперимент проводился с однослойными неткаными полимерными матрицами.

В эксперименте приняли участие 24 самца белых нелинейных крыс (масса 200–260 г). Экспериментальные животные были разделены на 4 группы (Таблица 4).

Животные подвергались анестезии путем внутримышечного введения комбинации золетила в дозе 0.1 мл/кг и ксилазина в дозе 1 мг/кг за 5 мин до хирургического вмешательства. После анестезии межлопаточная область животных была тщательно выбрита без каких-либо видимых повреждений и обработана 70% этанолом, затем был проведен линейный разрез кожи длиной 1.5 см. Образец нетканой ПКЛ-матрицы без и с ватеритным покрытием в форме диска диаметром 10 мм помещали в подкожный карман размером примерно 1.5 × 1.5 см, который был сформирован тупым рассечением с помощью губок пинцета. После этого рана ушивалась нерассасывающейся нитью «Резопрен» M2 (3/10) с иглой 27 мм (RESORBA Medical GmbH, Германия). После наложения швов рану обрабатывали 70% этанолом.

Таблица 4. Описание серий животных, участвовавших в эксперименте по подкожной имплантации.

Группа	№ группы	Описание группы	Количество животных
Группа сравнения	1	Имплантация ПКЛ-матриц без ватеритного покрытия	6
Негативный контроль	2	Имплантация ПКЛ-матриц с ватеритным покрытием и иммобилизованным чужеродным белком ПКЛ/CaCO ₃ /ОВА	6
Экспериментальная группа (влияние ватеритного	3	Имплантация матриц с ватеритным покрытием	6

покрытия)		ПКЛ/CaCO ₃	
Экспериментальная группа (влияние ТК в составе матриц)	4	Имплантация матриц с ватеритным покрытием и иммобилизованной ТК ПКЛ/CaCO ₃ /ТК	6

2.4.3. Имплантация ПКЛ-матриц без и с ватеритным покрытием в дефект бедренной кости белым крысам

Эксперимент проводился с двухслойными неткаными полимерными матрицами.

В эксперименте принимали участие 83 самца белых нелинейных крыс массой 200–260 г. Эксперимент состоял из 4 серий. Животные были разделены на 11 групп (Таблица 5).

Таблица 5. Описание серий и групп животных, участвовавших в эксперименте по костной имплантации.

Экспериментальная серия	№ группы	Описание группы	Количество животных
Первая серия (контрольная группа и группа сравнения)	0	Интактные животные	8
	1	Ложная имплантация (выведены из эксперимента на 7й день)	7
	2	Ложная имплантация (выведены из эксперимента на 28й день)	8
Вторая серия (негативный контроль)	3	Имплантация ПКЛ-матриц без ватеритного покрытия, содержащих бактериальные липосахариды (выведены из эксперимента на 7й день) ПКЛ/ЛПС	7
	4	Имплантация ПКЛ-матриц без ватеритного покрытия, содержащих бактериальные липосахариды (выведены из эксперимента на 28й день) ПКЛ/ЛПС	8
Третья серия (влияние ватеритного покрытия)	5	Имплантация ПКЛ-матриц без ватеритного покрытия (выведены из эксперимента на 7й день)	7
	6	Имплантация ПКЛ-матриц без ватеритного покрытия (выведены из эксперимента на 28й день)	8
	7	Имплантация ПКЛ-матриц с	7

		ватеритным покрытием (выведены из эксперимента на 7й день) ПКЛ/CaCO ₃	
	8	Имплантация ПКЛ-матриц с ватеритным покрытием (выведены из эксперимента на 28й день) ПКЛ/CaCO ₃	8
Четвертая серия (влияние ЩФ, иммобилизованной в ватеритное покрытие)	9	Имплантация ПКЛ-матриц с ватеритным покрытием и иммобилизованной ЩФ (выведены из эксперимента на 7й день) ПКЛ/CaCO ₃ /ЩФ	7
	10	Имплантация ПКЛ-матриц с ватеритным покрытием и иммобилизованной ЩФ (выведены из эксперимента на 28й день) ПКЛ/CaCO ₃ /ЩФ	8

Анестезия была проведена так же, как описано в *разделе 2.4.1*. После анестезии волосяной покров на боковой поверхности бедра животных осторожно сбривали без повреждений кожи. Операционное поле обрабатывали 70% этанолом, затем проводили линейный разрез кожи длиной 3.5 см. Был выполнен продольный разрез мышц бедра (рис. 7 А), затем был сформирован экспериментальный дефект в диафизе бедренной кости, представляющий собой линейный пропил в продольном направлении шириной 2 мм, длиной 2-7 мм и глубиной 2-3 мм до полости костного мозга (рис. 7 С). Для формирования дефекта использовались портативная электрическая дрель и стерильный мини-диск диаметром 22 мм с алмазным покрытием (рис. 7 В). Имплантируемая матрица имела форму пластины шириной 3 мм, длиной 5 мм и толщиной 2 мм в глубину и была имплантирована в дефект бедренной кости (рис. 7 D). Масса матрицы с данными размерами составляла 1.5 ± 0.1 мг и 1.8 ± 0.1 мг для нетканых ПКЛ-матриц без и с ватеритным покрытием, соответственно. Направление длинной оси матрицы было параллельно оси диафиза, а плоскость контакта толстоволокнистого и тонковолокнистого слоев располагалась радиально относительно оси диафиза.

После имплантации рану послойно ушивали нерассасывающейся нитью «Резопрен» M2 (3/10) с иглой 27 мм (RESORBA Medical GmbH, Германия).

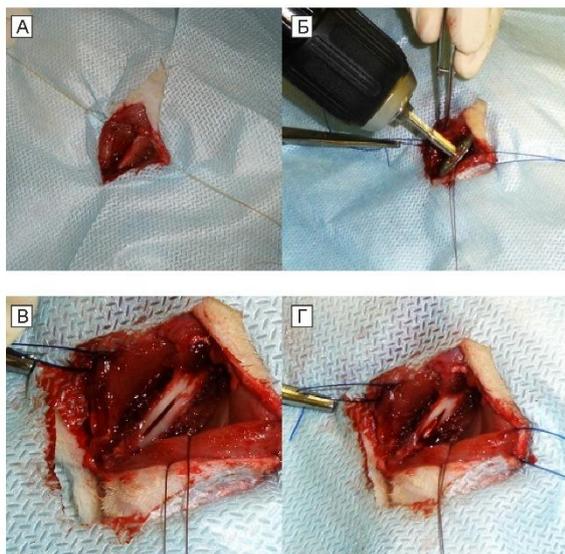


Рисунок 7. Проведение костной имплантации: (А) – бедренная кость крысы; (Б) – создание экспериментального дефекта в бедренной кости; (С) – экспериментальный дефект бедренной кости; (D) – имплантация матрицы в дефект бедренной кости.

2.5. Методы исследования и характеристики полученных полимерных матриц

2.5.1. Сканирующая электронная микроскопия и энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия

Морфология и структура поверхности образцов была исследована методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (MIRA II LMU, Tescan, Чехия) при рабочем напряжении 30 кВ и токе зонда 40 А.

Образцы ПКЛ-матриц без предварительной подготовки фиксировались на углеродный проводящий скотч на предметном столике.

Образцы гидрогелевых матриц предварительно высушивались в сушильном шкафу при $+60\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 4 часов, затем фиксировались на углеродный проводящий скотч на предметном столике.

Образцы, эксплантированные из экспериментальных животных, были исследованы после предварительной фиксации в 10% формалине и высушивания в сушильном шкафу при $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 мин, затем фиксировались на углеродный проводящий скотч на предметном столике.

Перед исследованием на поверхность всех образцов было проведено напыление контактного золотого слоя.

Элементный состав образцов исследовался с помощью энергодисперсионной системы рентгеновского анализа EDX INCA ENERGY 350, «Oxford Instruments».

2.5.2. Порошковая рентгеновская дифракция

Рентгеноструктурный анализ образцов проводили на дифрактометре Rigaku Miniflex-600 (Rigaku Corporation, Токио, Япония). Данные регистрировали с использованием $\text{Cu-K}\alpha$ излучения (40 кВ, 15 мА, фильтр $\text{Ni-K}\beta$) в диапазоне углов 2θ $5\text{--}60^{\circ}$ при скорости сканирования 1 град/мин. Рентгенофазовый анализ проводился с использованием интегрированного программного обеспечения PDXL: Rigaku Diffraction Software и баз данных ICDD PDF-2 (Release 2014 RDB). Полученные дифрактограммы сравнивали с литературными данными для гидроксиапатита [157], ватерита [158] и кальцита [159].

2.5.3. Исследование механических характеристик материалов

При исследовании механических свойств нетканых ПКЛ-матриц без и с ватеритным покрытием были проведены испытания матриц на растяжение с помощью универсальной испытательной машины LS1 (1 кН) Material Tester (Lloyd Instruments, Inc., Ametek, PA, США). Исследуемые матрицы были подготовлены в виде образцов с размерами $5 \times 30\text{ мм}^2$, которые были помещены между механическими зажимными устройствами с учетом измерительной длины

16 мм для растягивающей нагрузки. Скорость движения траверсы составляла 20 мм/мин. По полученным кривым зависимости напряжения от деформации был рассчитан модуль Юнга (E) как тангенс угла наклона кривой:

$$E = \frac{S}{\varepsilon}, \quad (6),$$

где S – напряжение, ε – деформация материала при соответствующем приложенном напряжении. Средние значения модуля Юнга были получены по результатам пяти испытаний и выражены как среднее значение \pm стандартное отклонение.

Среднеквадратическое отклонение (σ) значений величины модуля Юнга E рассчитывалось для оценки ошибки измерений. Для каждого типа образца было проведено 5 независимых испытаний. Величина E приведена в виде:

$$E = \bar{E} \pm \sigma, \quad (7)$$

где \bar{E} – среднее значение величины.

2.5.4. Спектрофотометрическое исследование

Для определения количества активной ЩФ в ПКЛ-матрицах с ватеритным покрытием была проведена ферментативная реакция с П-нитрофенилфосфатом, приводящая к образованию продукта реакции П-нитрофенола. Для этого образцы матриц размером 1 см² инкубировали в водном растворе П-нитрофенилфосфата с концентрацией 1 мг/мл (при уровне pH 9.8) при комнатной температуре и непрерывном встряхивании в термошейкере Drybath (Thermo Scientific, США) в течение 1 ч при 500 об/мин. В результате реакции П-нитрофенилфосфата и ЩФ происходил его гидролиз до П-нитрофенола и неорганического фосфата. После этого, супернатанты отделяли от матриц и смешивали с равным объемом раствора 0.1 М NaOH для остановки реакции. Исследование оптических плотностей растворов П-нитрофенола проводилось с помощью микропланшетного ридера Synergy H1 (BioTek, США) на длине волны 405 нм.

Для исследования кинетики высвобождения ЩФ из матриц ПКЛ/CaCO₃/ЩФ размером 1 см² осуществляли их инкубацию в 1 мл деионизованной воды (при

pH 9.8) при комнатной температуре и непрерывном перемешивании в термошейкере со скоростью 500 об/мин. В течение 96 ч инкубации растворы собирали в фиксированные моменты времени (5 мин, 8 ч, 24 ч, 48 ч, 72 ч и 96 ч). Ферментативная активность ЩФ в данных растворах определялась по ферментативной реакции, описанной выше. Исследование оптических плотностей растворов П-нитрофенола проводилось с помощью микропланшетного ридера Synergy H1 на длине волны 405 нм.

Исследование оптических плотностей растворов ТК, а также флуоресцентных красителей ТРИТС-БСА и родамина 6G проводилось с помощью прибора Uvicon XL Secomam (NorthStar Scientific, Великобритания). Были исследованы следующие растворы:

- 1) Супернатанты, собранные после инкубации матриц (ПКЛ и ПКЛ/CaCO₃) в растворе ТК (описание методики инкубации приведено в *разделе 2.2.5*). Оптическая плотность измерялась на длине волны 329 нм.
- 2) Супернатанты, полученные после растворения CaCO₃-покрытий матриц с иммобилизованной ТК (ПКЛ/CaCO₃/ТК). Растворение проводили путем инкубации матриц размером 1 см × 1 см в 2 мл раствора 1 М HCl в течение 10 мин. Оптическая плотность измерялась на длине волны 329 нм.
- 3) Супернатанты, собранные после последовательной инкубации матриц (ПКЛ, ПКЛ/CaCO₃, ПКЛ/Ag, ПКЛ/CaCO₃/Ag) в растворах ТРИТС-БСА и родамина 6G (описание методики инкубации приведено в *разделе 2.2.7*). Оптическая плотность измерялась на длине волны 567 нм для ТРИТС-БСА и родамина 6G.

2.5.5. Гистологическое исследование

Перед проведением морфологических исследований эксплантированных биоматериалов животных выводили из эксперимента при инъекции летальной дозы анестезирующего препарата.

Исследование образцов, полученных после подкожной имплантации. Область ткани с матрицей выделяли из области имплантации. Образцы для морфологического исследования фиксировали в 10% формалине, проводили

дегидратацию в серии растворов этанола, заливали в парафиновый воск и делали срезы толщиной 5–7 мкм на полуавтоматическом микротоме RMD 3000 (Mt Point, Россия-Австралия). Срезы окрашивали раствором гематоксилина и эозина и фиксировали в закрепляющей среде Bio-Mount. Визуальную оценку полученных препаратов ткани выполняли на микроскопе AxioImager Z2 (Carl Zeiss, Германия) оснащенным $\times 63$ объективом. Оценивались структура, клеточный состав, состояние микрососудов в мягких тканях, окружающих матрицу, динамику заселения матрицы клеточными элементами и состав клеточных популяций в матрице.

Исследование образцов, полученных после имплантации в кость. Бедренные кости с имплантированными матрицами фиксировали в 10% формалине. После деминерализации и дегидратации биоматериал заливали парафином и выполняли срезы толщиной 5-7 мкм на полуавтоматическом микротоме RMD 3000. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином и фиксировали закрепляющей средой. Визуальный анализ препаратов осуществлялся с помощью микроскопа AxioImager Z2. Проводилось выявление пери- и эндостальных реакций, соединительнотканых барьеров вокруг матриц, преобладающих типов клеток, кровеносных сосудов и костных трабекул внутри матриц. Заключение о биосовместимости матриц основывалось на количественной оценке полиморфноядерных лейкоцитов и многоядерных гигантских клеток в матрице. Расчет среднего количества клеток на поле зрения производился на основе 5 полей зрения (снятых с помощью объектива $\times 40$). Оценка остеоинтеграции матриц осуществлялась на основе степени связывания границ матрицы с краями дефекта кортикальной пластинки с помощью костных трабекул. Для характеристики остеоиндуктивных свойств матриц рассчитывалась доля площади, которая была занята новыми сформированными костными трабекулами в матрице. Описание методик количественной характеристики приведено в *пункте 2.6.5.*

2.5.6. Спектроскопия комбинационного рассеяния

Исследование спектров комбинационного рассеяния и гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) проводилось с использованием спектрометра Renishaw inVia (Великобритания) с длиной волны лазера 785 нм и объективом $\times 50$ (Leica N PLAN 0.5 N.A.).

Раствор 4-меркаптобензойной кислоты (4-МБК) в 70% этаноле (концентрации 10^{-3} , 10^{-4} и 10^{-5} М) использовали в качестве аналита. Перед измерениями исследуемые образцы (1 см^2) помещали в 1 мл раствора 4-МБК на 20 мин, после чего промывали этанолом. Спектры комбинационного рассеяния 4-МБК (10^{-3} М) матриц были зарегистрированы при мощности лазера 10 мВт. Каждый спектр записывался в течение 5 сек. ГКР картирование ($20 \times 20 \text{ мкм}$) было выполнено для 4-МБК (концентрации 10^{-3} , 10^{-4} , и 10^{-5} М) при мощности лазера 10 мкВт и скорости измерения 5 с на спектр. Коэффициенты усиления (КУ) были рассчитаны в соответствии с уравнением:

$$\text{КУ} = \frac{I_{\text{ГКР}}}{I_{\text{КР}}} \cdot \frac{P_{\text{КР}}}{P_{\text{ГКР}}} \cdot \frac{C_{\text{КР}}}{C_{\text{ГКР}}}, \quad (8)$$

где $I_{\text{ГКР}}$ и $I_{\text{КР}}$ — интенсивность сигнала на полосе 1580 см^{-1} для ГКР и КР соответственно; $P_{\text{ГКР}}$ и $P_{\text{КР}}$ — мощность лазера, $C_{\text{ГКР}}$ и $C_{\text{КР}}$ — концентрация 4-МБК для ГКР и КР соответственно. Данные для $I_{\text{ГКР}}$ и КУ представлены в виде диаграмм «ящик с усами» с межквартильным размахом (25-75%).

Спектры КР для ТРИТ-БСА и родамина 6G на матрицах, содержащих серебряные частицы, были получены при мощности лазера 0.5 мВт и скорости записи 0.1 с на спектр. Для матриц без серебряных частиц спектры КР были получены при мощности 50 мВт и скорости записи 0.1 с. ГКР картирование ($20 \times 20 \text{ мкм}$) было выполнено при мощности лазера 0.5 мкВт и скорости записи 0,1 сек. КУ оценивался по формуле (8) для интенсивности сигнала на полосе 1513 см^{-1} .

2.6. Статистические методы обработки данных

2.6.1. Определение размера волокон матриц по СЭМ изображениям

Оценка толщины волокон матриц проводилась на СЭМ изображениях матриц с помощью программы для анализа и обработки изображений Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>). Были проанализированы по 10 изображений для каждого типа матрицы, при этом на каждом изображении было измерено по 10 волокон. Далее был проведен расчет среднего размера волокон \bar{D} с помощью уравнения:

$$\bar{D} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n D_i \dots \dots \dots (9),$$

где n – количество измерений волокон (в нашем случае $n=100$). Для оценки ошибки измерений рассчитывалось среднеквадратическое отклонение (σ) значений величины D . Величина D приведена в виде:

$$D = \bar{D} \pm \sigma , \quad (10)$$

2.6.2. Расчет массы ватеритного покрытия матрицы

Масса ватеритного покрытия M_v матриц ПКЛ/ CaCO_3 после процедуры его формирования была рассчитана следующим образом:

$$M_v = M_{\text{общ}} - M_m \dots \dots \dots (11),$$

где M_m – масса исходной ПКЛ-матрицы без ватеритного покрытия, $M_{\text{общ}}$ – общая масса матрицы ПКЛ/ CaCO_3 .

Среднеквадратическое отклонение (σ) значений M_v рассчитывалось для оценки ошибки измерений в ходе определения данных величин. 5 независимых измерений проводилось для каждого образца. Величина M_v приведена в виде:

$$M_v = \bar{M}_v \pm \sigma , \quad (12)$$

где \bar{M}_v – среднее значение величины.

2.6.3. Оценка эффективности и ёмкости загрузки ТК в матрицы и расчет ошибки определения массы иммобилизованного вещества

Были рассчитаны эффективность и ёмкость загрузки ТК в ПКЛ и ПКЛ/ CaCO_3 матрицах. Количество ТК в растворах определялось спектрофотометрически (см. раздел 2.5.4).

Для расчета величины эффективности загрузки ($X_{эф}$) в масс. %, масса ТК в растворах, собранных после инкубации матриц, была нормирована на массу ТК в исходном водном растворе ТК, из которого проводилась иммобилизация в матрицы. Величина $X_{эф}$ рассчитывалась по формуле:

$$X_{эф} = \frac{M_{исх} - M_{ост}}{M_{исх}} \times 100\% , \quad (13)$$

где $M_{исх}$ – масса ТК, содержащаяся в объеме исходного раствора ТК, в котором проводилась инкубация матриц, $M_{ост}$ – масса ТК в растворах, собранных после инкубации матриц.

Масса ТК в ПКЛ/ CaCO_3 /ТК матрицах определялась путем измерения спектров поглощения растворов, собранных после растворения CaCO_3 покрытий данных матриц (см. раздел 2.5.4). Величина ёмкости загрузки ($X_{ем}$) в масс. %, рассчитывалась по формуле:

$$X_{ем} = \frac{M_{им}}{M_{матрицы}} \times 100\% , \quad (14)$$

где $M_{им}$ – масса ТК, содержащейся в матрицах ПКЛ/ CaCO_3 /ТК, $M_{матрицы}$ – масса матрицы ПКЛ/ CaCO_3 /ТК.

Среднеквадратическое отклонение (σ) значений $X_{эф}$ и $X_{ем}$ рассчитывалось для оценки ошибки измерений в ходе определения данных величин. 5 независимых измерений проводилось для определения каждой величины. Каждая рассчитанная величина X приведена в виде:

$$X = \bar{X} \pm \sigma , \quad (15)$$

где \bar{X} – среднее значение величины.

2.6.4. Определение ёмкости загрузки ЩФ в ПКЛ-матрицы с ватеритными покрытиями

Масса активной ЩФ в ПКЛ/ CaCO_3 /ЩФ матрицах определялась по количеству П-нитрофенола в растворах после инкубации матриц с П-нитрофенилфосфатом с

использованием калибровочных зависимостей (см. раздел 2.5.4). Для расчета емкости иммобилизации активной ЩФ $X_{акт}$ использовалось следующее уравнение:

$$X_{акт} = \frac{M_{акт}}{M_{матрицы}} \times 100\% , \quad (16)$$

где $M_{акт}$ – масса активной ЩФ в матрице ПКЛ/СаСО₃/ЩФ размером 1 см², $M_{матрицы}$ – масса матрицы ПКЛ/СаСО₃/ЩФ.

Среднеквадратическое отклонение (σ) значений $X_{акт}$ рассчитывалось для оценки ошибки измерений в ходе определения данных величин. 5 независимых измерений проводилось для определения каждой величины. Величина $X_{акт}$ приведена в виде:

$$X_{акт} = \overline{X_{акт}} \pm \sigma , \quad (17)$$

где $\overline{X_{акт}}$ – среднее значение величины.

2.6.5. Однофакторный дисперсионный анализ

Статистическая значимость результатов исследования цитотоксического эффекта матриц на НДФЧ, полученных в разделе 2.3.2., оценивалась с использованием однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA). Уровень значимости соответствовал $p < 0.05$. Индексы Фишера рассчитывались для оценки различия средних между группами ПКЛ, ПКЛ/СаСО₃, и культуральная среда (контроль) для каждой временной точки отдельно. Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием Microsoft Excel.

2.6.6. Количественный анализ изображений срезов костной ткани

Оценка остеоинтеграции и остеоиндуктивных свойств матриц проводилась на основе оптических изображений окрашенных срезов бедренной кости с использованием программы Image J.

Для оценки остеоинтеграции в областях матрицы, которые расположены в костномозговой полости за пределами дефекта кортикальной пластинки, было рассчитано среднее минимальное расстояние между краями матрицы и

прилегающими костными трабекулами. Оценка поперечных срезов тканей проводилась в 3 точках: для двух краев и центральной области матрицы, наиболее глубоко расположенных в костномозговой полости. Оценку проводили как минимум по трем изображениям. Полученные данные не соответствовали нормальному распределению, в связи с этим были рассчитаны медиана (M), а также первый ($Q1$) и третий квантили ($Q3$). Данные были представлены как медиана и межквартильный размах ($M, (Q1; Q3)$). Оценку статистической значимости между группами животных проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни при уровне значимости $p < 0.05$. Статистическая обработка экспериментальных данных проводилась с использованием программы Statistica 10 (StatSoft, США).

Для оценки остеоиндуктивных свойств матриц определяли степень их заполнения новой сформированной костной тканью после 28-дневного периода имплантации. Для этого рассчитывалась доля площади матриц, которая была занята новыми сформированными костными трабекулами на оптических изображениях срезов кости с помощью инструментов Image J. Области новой сформированной костной ткани были выделены из общей площади матрицы с использованием функции выбора площади. Затем с помощью статистических инструментов рассчитывалась доля площади ω , заполненная новой сформированной костной тканью:

$$\omega = \frac{S_{кт}}{S_{общ}} * 100\% , \quad (18)$$

где $S_{кт}$ – площадь матрицы, заполненная новой сформированной костной тканью, $S_{общ}$ – общая площадь матрицы. Для каждого типа матрицы было проанализировано как минимум 3 изображения. Для оценки ошибки измерений рассчитывалось среднеквадратическое отклонение (σ) значений величины ω . Величина ω приведена в виде:

$$\omega = \bar{\omega} \pm \sigma , \quad (19)$$

где $\bar{\omega}$ – среднее значение величины.

ГЛАВА 3. ФОРМИРОВАНИЕ БИОМИМИТИЧЕСКИХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦ И ИХ МОДИФИКАЦИЯ ЧАСТИЦАМИ ВАТЕРИТА ДЛЯ ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ

3.1. Формирование ватеритных покрытий на однослойных полимерных матрицах и исследование их влияния на жизнедеятельность клеток

Нетканая полимерная матрица является биомиметической, т. е. подобной по своей структуре натуральным внеклеточным каркасам в живых тканях, в которых коллагеновые волокна имеют диаметр от 50 до 500 нм [160]. Как говорилось ранее (см. *глава 1*), ПКЛ – полимер, обладающий полной биосовместимостью, способностью к биорезорбции и хорошими механическими свойствами [22,23]. Формирование неорганических пористых покрытий на нетканой полимерной матрице меняют ее поверхностные свойства (поверхностный заряд, гидрофильность, площадь поверхности и др.), создавая эффективный биофизический стимул, способствующий лучшей адсорбции молекул сигнальных протеинов и адгезии клеток на поверхности матриц [161,162].

В качестве такого пористого неорганического покрытия в данной работе впервые был использован карбонат кальция с кристаллической модификацией ватерита, который является биосовместимым неорганическим материалом, способным к быстрой биорезорбции [163], благодаря чему выступает в роли источника ионов Ca^{2+} . Они, в свою очередь, выступают в качестве мощного биохимического стимула для метаболической и остеогенной активности остеобластов, отвечающих за образование новой костной ткани [164–166]. Более того, пористая структура ватерита позволяет осуществлять иммобилизацию различных БАВ (инсулин [167], терапевтические ферменты [168], доксорубин [169], фотосенсибилизаторы [163,170,171]) в его объем, что позволяет его успешно использовать в качестве системы для доставки лекарств [101,170–172]. Таким образом, формирование ватеритного покрытия на волокнах ПКЛ-матрицы может создать биофизические и биохимические стимулы для улучшения и

поддержания жизнеспособности клеток в матрице, а также обеспечить дополнительную функцию доставки БАВ в область имплантации.

Ватеритные покрытия на ПКЛ волокнах формировали методом соосаждения из смеси водных растворов солей, содержащих ионы Ca^{2+} и CO_3^{2-} [156,173]. При этом полимерные волокна играли роль центров для гетерогенного зародышеобразования CaCO_3 .

Для изучения влияния нетканых полимерных матриц без и с ватеритным покрытием на жизнедеятельность клеточной линии НДФЧ в качестве подложки-субстрата использовались полученные методом электроспиннинга однослойные матрицы ПКЛ толщиной 100 мкм, состоящие из тонких волокон со средним диаметром 0.5 ± 0.1 мкм (рисунок 8 А).

3.1.1. Влияние УЗ-воздействия на процесс формирования CaCO_3 -покрытия

На рисунке 8 Б-Г представлены СЭМ-изображения матриц, на которых проводилось формирование ватеритного покрытия при различных экспериментальных условиях (время инкубации, УЗ-воздействие). Данные изображения наглядно демонстрируют полиморфные и морфологические различия CaCO_3 -структур, полученных при варьировании условий эксперимента.

Установлено, что инкубация матрицы в рабочем растворе, содержащем ионы Ca^{2+} и CO_3^{2-} , в течение 10 мин и без УЗ-воздействия, приводит к образованию кубических кристаллов на волокнах матрицы (рисунок 8 Б), соответствующих полиморфной модификации кальцита [163]. Кальцит является термодинамически стабильной модификацией CaCO_3 и, поэтому, получил наибольшее распространение в природе. Однако, отсутствие пористой структуры у кальцита делает его менее перспективной (по сравнению с ватеритом) модификацией для формирования покрытий на матрицах.

Уменьшение времени инкубации до 30 с (без УЗ-воздействия) позволило предотвратить формирование частиц кальцита (рисунок 8 В) [163]. Это может быть связано с тем, что за 30 с процесс кристаллизации CaCO_3 останавливается на

формировании метастабильной ватеритной модификации, что приводило к осаждению сферических частиц ватерита на волокнах матрицы.

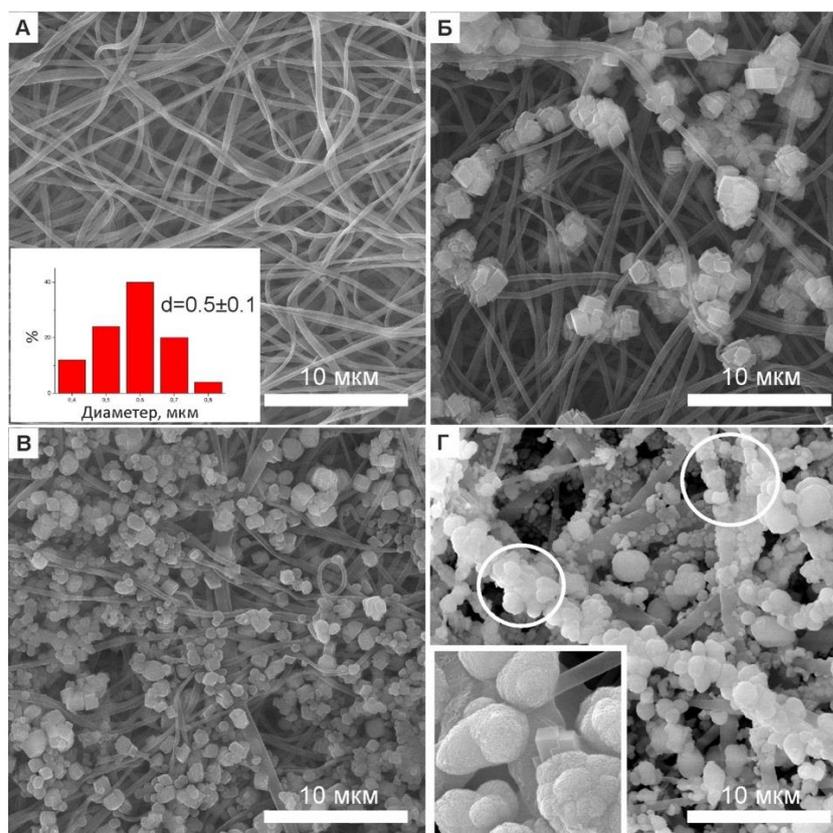


Рисунок 8. СЭМ-изображения исходной ПКЛ матрицы-субстрата (А); матриц ПКЛ с CaCO_3 -покрытиями: инкубация в рабочем растворе в течение 10 мин (Б) без УЗ-воздействия; инкубация в рабочем растворе в течение 30 с без УЗ-воздействия (В); инкубация в рабочем растворе в течение 30 сек с УЗ-воздействием (Г). На вставке (А) приведено распределение по размерам волокон ПКЛ-матрицы. На вставке (Г) представлено увеличенное изображение, позволяющее сделать вывод о пористой структуре ватерита; кругами выделены агрегаты частиц ватерита, сформированные на волокнах.

Стоит отметить, что без УЗ-воздействия ватеритные частицы распределены в матрице в хаотичном порядке – только небольшая часть частиц расположена вдоль волокон; большинство частиц не связаны с поверхностью волокна и находятся в промежутках между волокнами. Можно сделать вывод, что формирование большинства частиц происходило в объеме рабочего раствора, а затем частицы осаждались на волокнах матрицы. Это подтверждается тем фактом, что осажденные CaCO_3 -частицы расположены только на внешних поверхностных

волокнах матрицы, но не на волокнах, расположенных в объеме матрицы (рисунок 8 В).

Установлено, что ватеритные покрытия в виде оболочек на волокнах могут быть получены путем УЗ-обработки рабочего раствора при инкубации в нем ПКЛ-матрицы (рисунок 8 Г). При этом можно заметить, что большая часть CaCO_3 -покрытия, формируемого в течение 30 секунд при такой обработке, находится в виде агрегатов сферических частиц, расположенных вдоль волокон. Пористая морфология и сферическая форма частиц (вставка на рисунок 8 Г) свидетельствуют о том, что данные частицы находятся в полиморфной модификации ватерита [163].

Формирование таких структур можно объяснить воздействием УЗ и кавитационными эффектами на процесс кристаллизации и зародышеобразования частиц CaCO_3 . Для исследования и понимания процесса формирования CaCO_3 структур в виде покрытий на волокнах в данной системе, необходимо иметь представление о так называемом «классическом» процессе кристаллизации CaCO_3 частиц. Согласно работе П. Ботса и соавторов [98], при смешивании растворов, содержащих ионы Ca^{2+} и CO_3^{2-} , на первоначальном этапе образуются наночастицы аморфного карбоната кальция (АКК) размером 1-10 нм. Скопления данных наночастиц служат центрами роста, т.е. центрами, в которых инициируется процесс формирования поликристаллических частиц ватерита. При этом за счет растворения АКК вокруг центров роста поддерживается приток ионов Ca^{2+} и CO_3^{2-} к растущим частицам ватерита. В основе трансформации АКК в ватерит лежит механизм формирования сферолитов за счет непрерывного роста поликристаллических слоев. Частица ватерита фактически представляет собой сферолитический поликристаллический агрегат, состоящий из кристаллитов, организованных в упорядоченную структуру. В представленной модели рост и укрупнение сферолитов ватерита происходит за счет непрерывного формирования на их поверхности новых мелких кристаллитов CaCO_3 [174]. В результате этого процесса образуются сферические поликристаллические частицы, состоящие из кристаллитов примерно одинакового размера. Дальнейшее развитие структуры

сферических ватеритных частиц CaCO_3 описывается с помощью классического процесса созревания Оствальда, в котором рост более крупных частиц происходит за счет растворения более мелких частиц [98,99]. В этом случае, вместо роста новых кристаллитов на поверхности ватеритной частицы, происходит увеличение размера уже существующих кристаллитов по механизму взаимосвязанных процессов растворения и осаждения. Данный процесс в конечном итоге приводит к формированию стабильной фазы CaCO_3 – кубических кристаллов кальцита. В целях замедления или, по возможности, предотвращения перекристаллизации ватерита в кальцит, ватеритные частицы на этапе начала созревания Оствальда отделяют от рабочей среды, высушивают и хранят в среде с низкой влажностью. В некоторых исследованиях [175], образование ватерита рассматривалось как агрегация первичных наночастиц АКК в сферические частицы. Однако неоднородность размеров образующихся частиц трудно объяснить наноагрегацией, но при этом она достаточно хорошо описывается моделью роста сферолитного поликристаллического агрегата [176].

В многих исследованиях изучалось влияние различных условий синтеза на морфологию и полиморфную форму образующегося CaCO_3 . Использование пересыщенных солевых растворов способствует увеличению количества центров зародышеобразования. Поскольку количество ионов Ca^{2+} и CO_3^{2-} в рабочем растворе является конечным, то при увеличении количества этих центров конечный размер частиц в результате уменьшается [98,176]. В исследовании Л. Дюпонта и соавторов [177] было показано, что интенсивное перемешивание рабочего раствора при образовании частиц CaCO_3 способствует быстрому гомогенному распределению реагентов в объеме рабочего раствора, что также стимулирует появление большего количества центров роста. Кавитационные эффекты в рабочем растворе, возникающие при УЗ-воздействии также способны ускорять перемешивание раствора [178]. УЗ-обработка предотвращает образование крупных частиц и их агрегатов в объеме раствора, поскольку стимулирует их растворение и поддерживает свободную циркуляцию ионов Ca^{2+} и CO_3^{2-} в растворе. Кроме того, УЗ стимулирует проникновение растворов во

внутренний объем волокнистого материала, что способствует гомогенной минерализации матрицы.

В нашем случае ПКЛ-волокна служат дополнительными центрами роста для гетерогенного зародышеобразования CaCO_3 . АКК и вновь образующиеся зародыши формируются на поверхности волокон и организуют центры роста для образования сферолитов ватерита. Частицы ватерита, которые образуются на поверхности волокон или осаждаются на нее впоследствии из объема раствора, служат центрами агрегации при формировании CaCO_3 покрытия.

3.1.2. Влияние концентрации солей на процесс формирования ватеритного покрытия

На рисунке 9 показаны сравнительные СЭМ-изображения ПКЛ-матриц с ватеритными покрытиями, сформированными при УЗ-воздействии в водных растворах солей CaCl_2 и Na_2CO_3 различных молярностей. На рисунке 9А и рисунке 9Б представлены ПКЛ-матрицы, полученные при проведении одного цикла «минерализации» из 0.33 М и 1 М растворов, соответственно. На рисунке 9В приведены изображения матриц после двухкратного повторения процедуры формирования покрытия в 1 М растворах солей. Данные изображения наглядно демонстрируют процесс заращивания волокон ПКЛ-матриц ватеритными оболочками.

Волокна, обработанные 0.33 М растворами солей (рисунок 9 А), имеют покрытие из сферических частиц CaCO_3 размером 0.4 ± 0.1 мкм, расположенных на волокнах и стремящихся к агрегации на их поверхности. Увеличение концентрации солей до 1 М приводит к увеличению продукта реакции и, следовательно, к увеличению количества образующихся частиц ватерита (рисунок 9 Б). Кроме того, происходит увеличение размера некоторых частиц. Частицы организуются в агрегаты на поверхности ПКЛ-волокна. Данные агрегаты срастаются с соседними и, таким образом, образуют CaCO_3 -оболочку, которая покрывает волокна ПКЛ-матрицы.

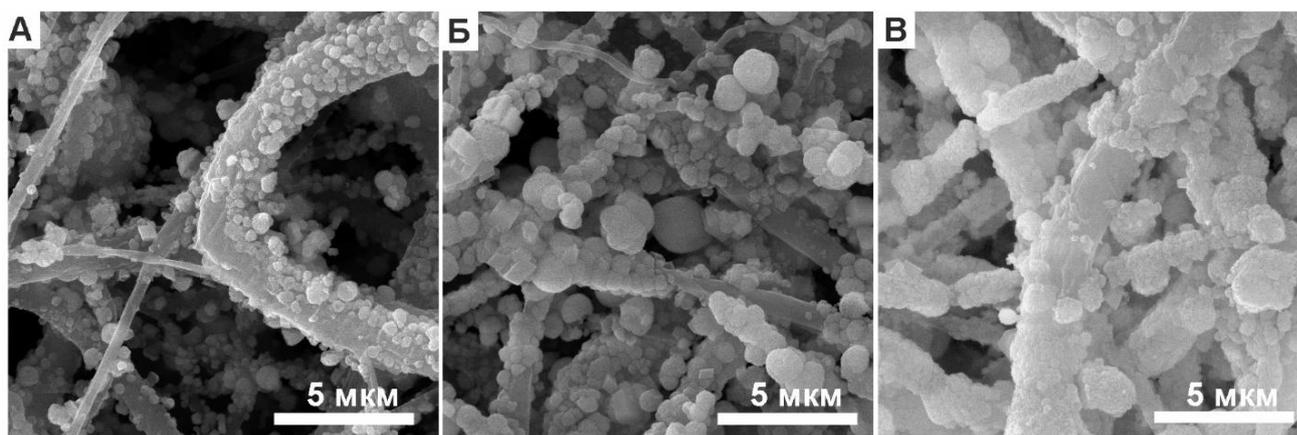


Рисунок 9. СЭМ-изображения матрицы с ватеритным покрытием, сформированным из растворов солей CaCl_2 и Na_2CO_3 с различной концентрацией: 0.33 М (А); 1 М (Б), и матрицы после двух повторений процедуры формирования покрытия в 1 М растворах солей (В).

После двух этапов обработки в 1 М растворах (рисунок 9 В) образуется CaCO_3 -покрытие с несколько отличающейся морфологией. В этом случае трудно различить отдельные сферические частицы, поскольку агрегаты кристаллитов образуют оболочкоподобное покрытие, соединяющее цельные ватеритные частицы или фрагменты сферолитов в единую структуру. В результате такой самоорганизации и ассоциации кристаллитов на волокнах были сформированы сплошные покрытия из карбоната кальция на волокнах ПКЛ-матрицы. Данные образования состоят из агрегатов не полностью сформированных сферолитов и полностью сформировавшихся ватеритных частиц.

На основании полученных данных был сделан вывод о целесообразности дальнейшего использования 1 М растворов солей для формирования сплошных покрытий.

3.1.3. Влияние повторений процедуры формирования ватеритного покрытия на ПКЛ-матрице

Далее было проведено исследование влияния числа повторений (циклов) процедуры формирования CaCO_3 покрытия на ПКЛ-матрице на степень ее заполнения формируемым ватеритным покрытием. На рисунке 10 представлена схема формирования ватеритного покрытия на нетканой ПКЛ-матрице в

присутствии УЗ-обработки. О степени заполнения поверхности нетканых матриц формируемым ватеритным покрытием наиболее наглядно свидетельствуют СЭМ-изображения ПКЛ-матриц, полученные при меньшем увеличении (рисунок 10). Так, изображения демонстрируют, что за один цикл обработки удается достичь лишь частичного заполнения поверхности волокон матрицы. Полное заполнение матрицы сплошным ватеритным покрытием (рисунок 10 Б) может быть достигнуто после 2х циклов обработки (рисунок 10 В). На поперечном сечении ПКЛ-матрицы (рисунок 10 В, вставка) показано, что данное покрытие формируется не только на волокнах, но и внутри матрицы.

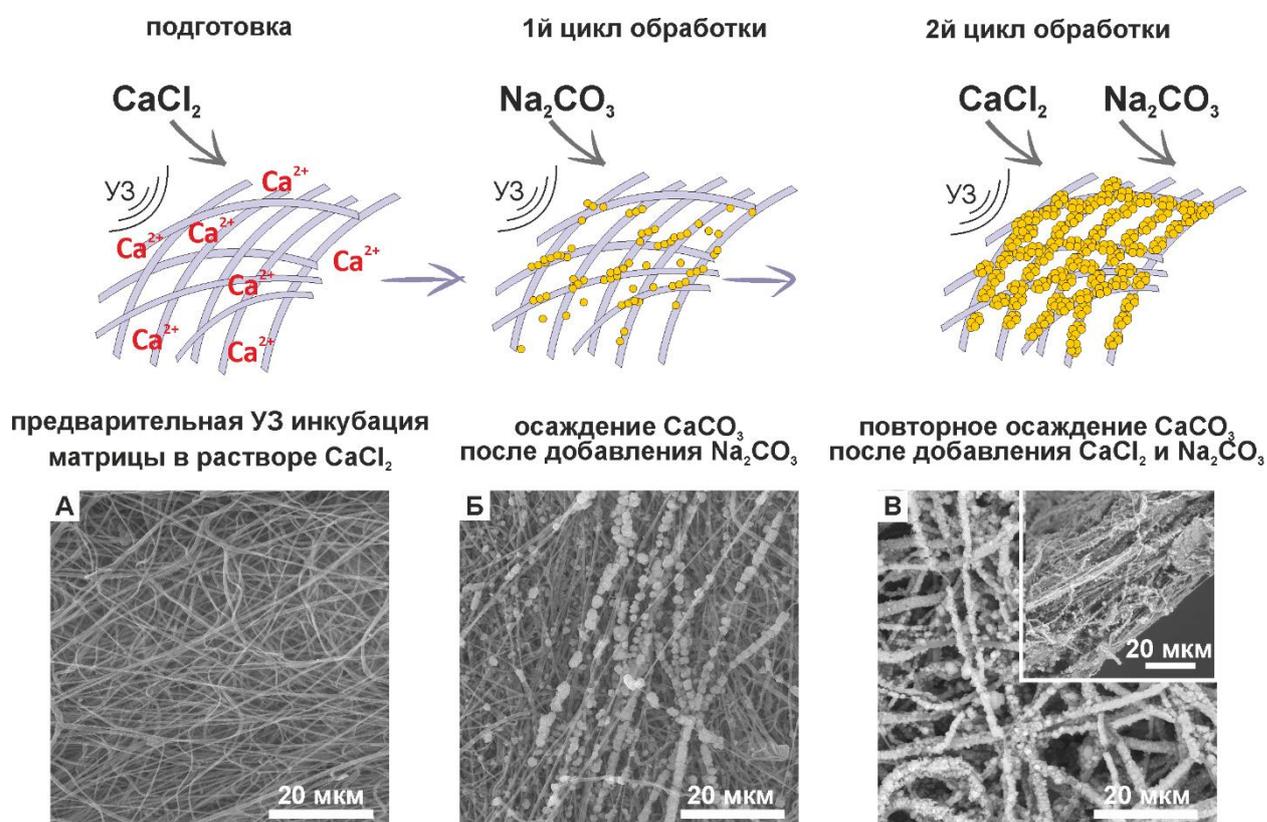


Рисунок 10. Схема формирования ватеритного покрытия на нетканой ПКЛ-матрице в присутствии УЗ-обработки и соответствующие СЭМ-изображения исходной ПКЛ-матрицы (А); матрицы ПКЛ с ватеритным покрытием, сформированным за 1 цикл (Б) и 2 цикла (В), поперечный разрез матрицы после 2х циклов (В, вставка).

Было определено необходимое количество циклов для получения сплошного ватеритного покрытия на волокнах нетканой ПКЛ-матрицы. Всего было проведено до семи циклов обработки. В ходе проведения многократных

циклов проводилось наблюдение морфологии формирующихся покрытий. СЭМ-изображения матриц на каждой стадии показаны на рисунке 11.

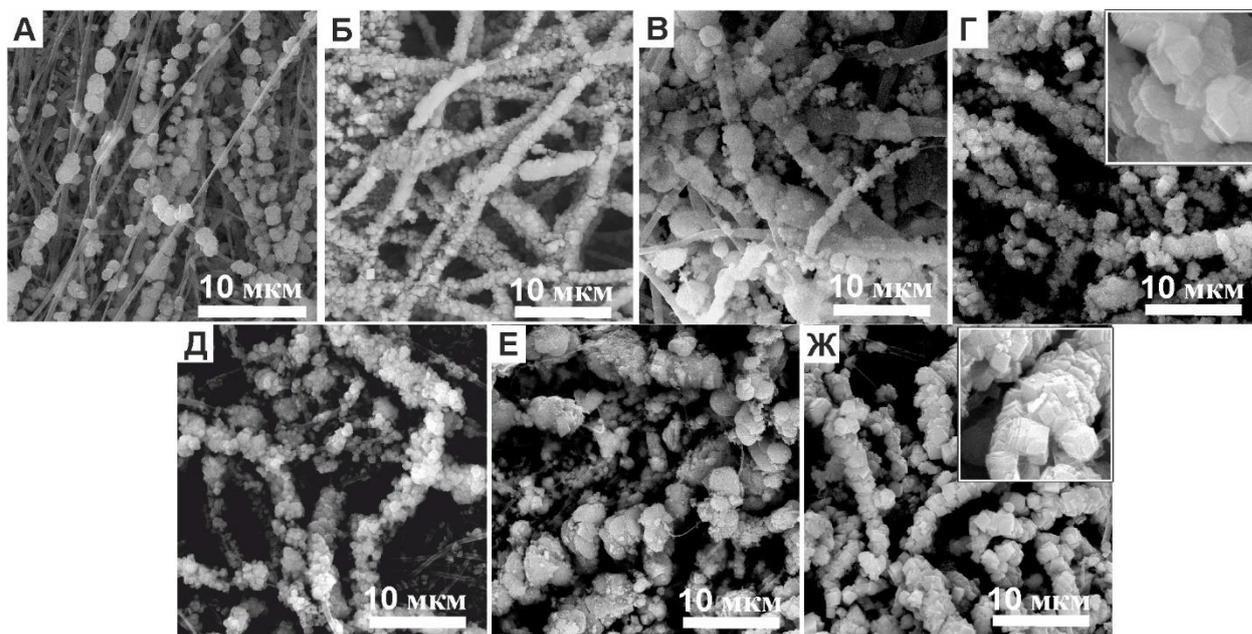


Рисунок 11. СЭМ-изображения ПКЛ-матриц после 1 (А), 2 (Б), 3 (В), 4 (Г), 5 (Д), 6 (Е) и 7 (Ж) циклов формирования ватеритного покрытия.

При сравнении результатов формирования покрытия для одного и двух циклов (рисунок 11 А,Б), можно сделать вывод, что второй цикл приводит к увеличению количества волокон с ватеритным покрытием. Следовательно, участки матрицы, которые не были покрыты после первого цикла, были минерализованы после второго. Таким образом, такая последовательность циклов формирования позволяет достичь равномерного покрытия всех волокон полимерной матрицы.

После трех циклов наблюдалось дальнейшее заращивание волокон ПКЛ-матрицы ватеритным покрытием (рисунок 11 В). Увеличение числа циклов обработки до четырех-пяти приводило к инициации процесса перекристаллизации ватерита в кальцит (рисунок 11 Г,Д). После семи циклов покрытие уже практически полностью состояло из кальцита (рисунок 11 Ж). Дальнейшая обработка этой матрицы была признана нецелесообразной, поскольку после седьмого цикла можно было визуальнo наблюдать механическую деформацию матрицы.

При повторении циклов формирования ватеритного покрытия на ПКЛ-матрице контролировался прирост массы карбоната кальция. Увеличение массы минерализованной матрицы (рисунок 12 А) подтверждает прирост CaCO_3 в ходе проведения циклов. После трех циклов происходит увеличение и уплотнение покрытия, сформированного на предыдущих стадиях, что можно объяснить осаждением CaCO_3 на уже существующие структуры, что также подтверждается соответствующим увеличением массы. Стоит отметить, что зависимость прироста массы CaCO_3 от количества циклов обработки носит линейный характер.

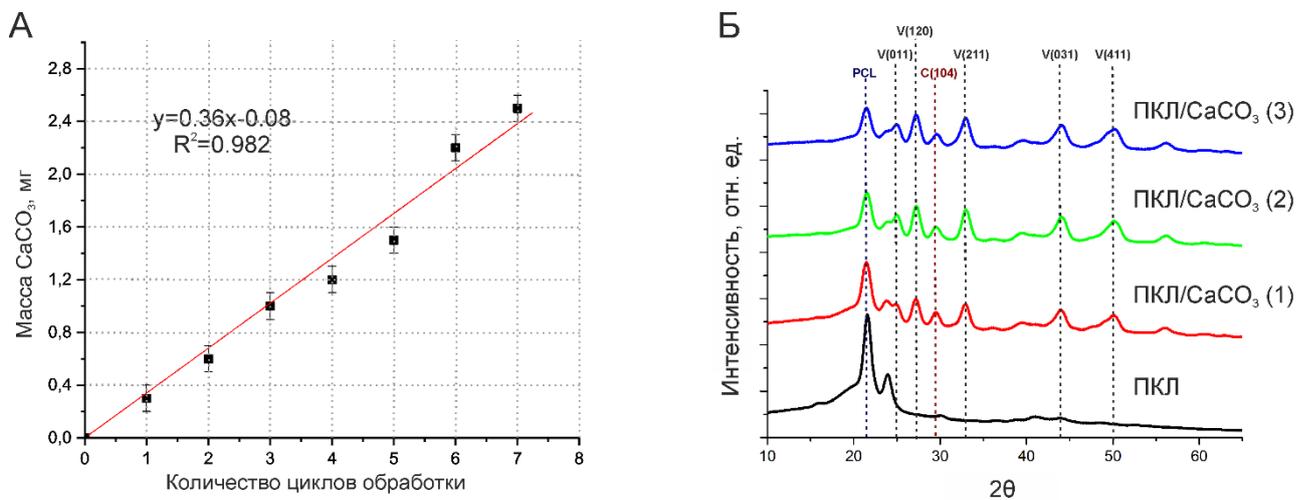


Рисунок 12. Зависимость прироста массы CaCO_3 на ПКЛ-матрице ($1 \text{ см} \times 1 \text{ см}$) от количества циклов формирования ватеритного покрытия (А), планки погрешностей показывают стандартное отклонение, рассчитанное по 5 измерениям для каждого образца на каждой стадии. Дифрактограммы ПКЛ матриц: исходной и после трех циклов формирования покрытия (Б); показаны пики, соответствующие фазам ватерита (V), кальцита (C) и ПКЛ (PCL).

Начало перекристаллизации ватерита в кальцит после четвертого цикла можно объяснить продолжающимся процессом созревания Оствальда, который происходит в результате каждого последующего цикла параллельно с осаждением CaCO_3 . В данном процессе, когда размер кристаллитов ватерита становится критическим, начинается образование фазы кальцита [98].

На рисунке 12 Б показаны дифрактограммы, полученные для исходной ПКЛ-матрицы и ПКЛ-матриц после трех циклов формирования ватеритного покрытия. Рентгеноструктурный анализ подтверждает, что в процессе поэтапной обработки на ПКЛ-матрицах образуются покрытия со структурой ватерита,

однако наличие пика небольшой интенсивности на $\sim 30^\circ$, характерного для структуры кальцита, говорит о незначительном присутствии второй фазы.

Полученные результаты продемонстрировали возможность формирования сплошных ватеритных покрытий разной массы и морфологии в зависимости от числа циклов обработки ПКЛ-матрицы. Оптимальное количество циклов обработки может варьироваться в зависимости от задач эксперимента. Для обеспечения возможности иммобилизации БАВ в ПКЛ-матрицу, формируемое покрытие должно обладать пористой структурой на ее максимальной площади поверхности, т.е. состоять из ватерита. Данное свойство оптимальным образом реализуется при двух/трех-этапной минерализации матриц. Поскольку на основе оценки морфологии полученных образцов (рисунок 11), был сделан вывод, что для формирования сплошного ватеритного покрытия на нетканых ПКЛ-матрицах достаточно двух циклов обработки, то именно эта схема была принята оптимальной для дальнейших исследований.

3.1.4. Исследование влияния полимерных матриц с ватеритными покрытиями на жизнедеятельность фибробластов

Клеточная линия нормальных дермальных фибробластов человека (НДФЧ) была использована для изучения влияния ватеритных покрытий на нетканых ПКЛ-матрицах на метаболическую активность, адгезию и пролиферацию клеток *in vitro*.

Исследование жизнеспособности клеток НДФЧ

ПКЛ-матрицы без (ПКЛ) и с ватеритным покрытием (ПКЛ/ CaCO_3) инкубировались с НДФЧ, жизнеспособность данных клеток измерялась в различные интервалы времени (24, 48 и 72 ч). В качестве контроля выступали клетки НДФЧ в культуральной среде. Количественная оценка жизнеспособности клеток проводилась с помощью флуоресцентного красителя AlamarBlue, результаты представлены на рисунке 13.

На основе анализа ANOVA (рисунок 13) было показано, что жизнеспособность клеток на ПКЛ-матрице с ватеритным покрытием (ПКЛ/ CaCO_3) сравнима с жизнеспособностью контрольной группы клеток во все

моменты времени (24, 48 и 72 ч), из чего был сделан вывод об отсутствии выраженного цитотоксического эффекта от применения матрицы ПКЛ/ CaCO_3 . Для ПКЛ-матрицы без ватеритного покрытия наблюдался более низкий уровень жизнеспособности клеток по сравнению с матрицей ПКЛ/ CaCO_3 и контролем, причем разница уровней выживаемости клеток между данной группой и контролем была статистически значимой при инкубации в течение 48 и 72 часов (в ~ 1.3 раза).

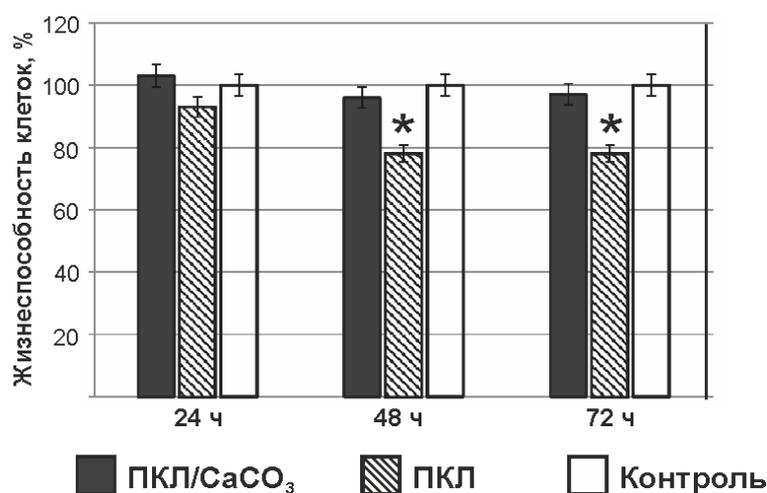


Рисунок 13. Зависимость жизнеспособности клеток НДФЧ от длительности инкубации ПКЛ-матриц без (ПКЛ) и с ватеритным покрытием (ПКЛ/ CaCO_3). Планки погрешностей отображают стандартное отклонение. Значения, отмеченные звездочкой (*), имеют статистически значимое отличие от контроля (клетки НДФЧ без ПКЛ-матриц) при $p < 0.05$, согласно оценке с помощью однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

Адгезия и пролиферация клеток НДФЧ на нетканых ПКЛ-матрицах

ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием (ПКЛ/ CaCO_3) инкубировались с НДФЧ в течение 24 и 48 ч. Затем морфология их поверхности была изучена с помощью СЭМ. Результаты данного исследования представлены на рисунке 14. В качестве контроля выступали ПКЛ-матрицы без ватеритного покрытия (ПКЛ).

В обоих случаях клетки демонстрируют морфологию, типичную для прикрепленных на субстрате клеток, как через 24 ч, так и через 48 ч культивирования. Видно, что клетки имеют морфологию, типичную для расплостёртых фибробластов, своими псевдоподиями прикрепленных к волокнам

матрицы и демонстрирующей способность к адгезии и пролиферации на матрице. Кроме того, на изображениях заметно (рисунок 14 Д-Е), что нетканая матрица с ватеритным покрытием (ПКЛ/ CaCO_3) после 48 ч инкубации с клетками содержит клеточные скопления и продукты клеточного метаболизма, что свидетельствует об активности прикрепленных к матрице ПКЛ/ CaCO_3 фибробластов. В то же время, наличия подобных продуктов метаболизма на ПКЛ-матрице без ватеритного покрытия не наблюдалось (рисунок 14 Ж,З).

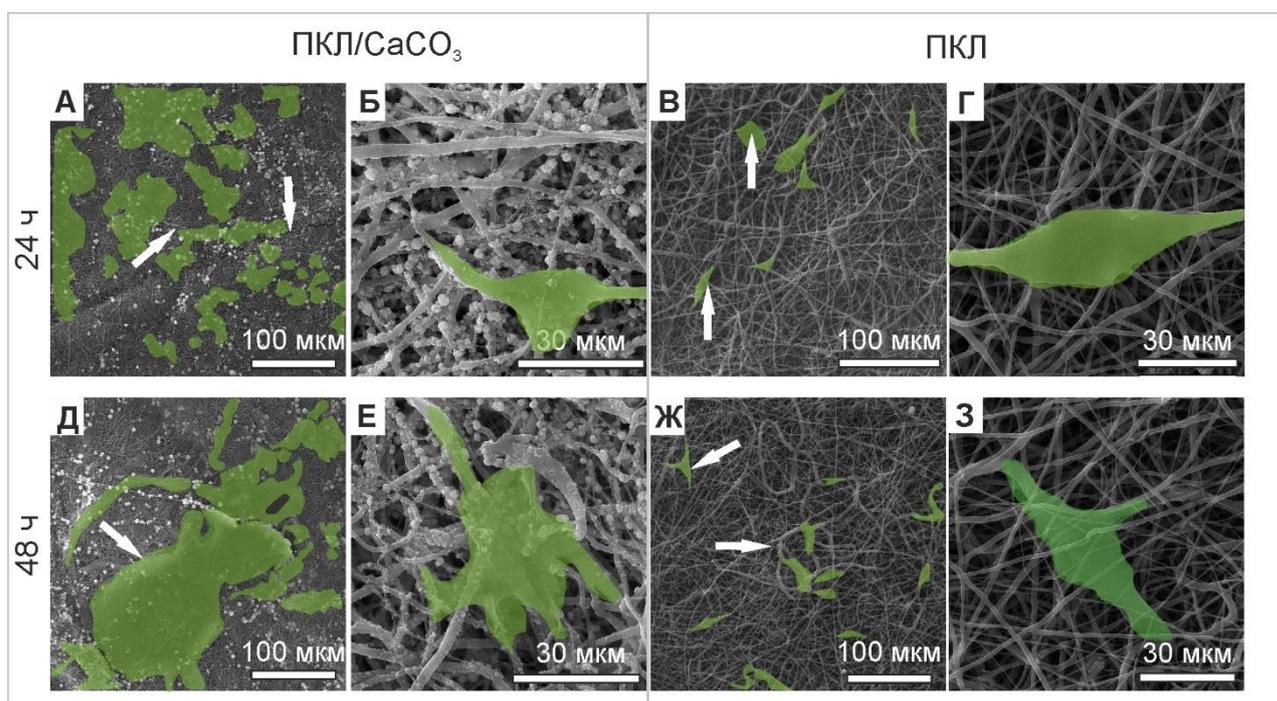


Рисунок 14. СЭМ-изображения ПКЛ-матриц с ватеритным покрытием (ПКЛ/ CaCO_3) после инкубации с клетками НДФЧ в течение 24 ч (А, Б) и 48 ч (Д, Е); а также контрольной матрицы (ПКЛ) без ватеритного покрытия после инкубации с клетками НДФЧ в течение 24 ч (В, Г) и 48 ч (Ж, З). Стрелки указывают на клетки (выделены зеленым цветом) и их скопления на матрицах.

Таким образом, показано, что клетки обладают лучшей адгезией к ПКЛ-матрицам с ватеритным покрытием, по сравнению с матрицей без ватеритного покрытия. Следовательно, ватеритные покрытия на ПКЛ-матрицах способны стимулировать биологическую реакцию со стороны клеток линии НДФЧ, выражающуюся в повышении жизнеспособности, адгезии и клеточной активности.

3.2. Использование нетканых полимерных матриц с ватеритным покрытием в качестве ГКР платформ для детектирования биомолекул

Детектирование молекул БАВ, определение их концентраций дает возможности для детального исследования биохимических процессов, происходящих в живых системах. Это имеет большое значение в биофизике сложных систем. Анализ молекул БАВ *in vivo* и *in vitro* может быть осуществлён с помощью неинвазивных методов колебательной спектроскопии, включая спектроскопию комбинационного рассеяния (КР). Чувствительность спектроскопии КР к обнаружению единичных молекул вещества может быть достигнута благодаря эффекту гигантского комбинационного рассеяния света (ГКР). Данный эффект имеет место в случае, когда рассеяние излучения детектируется с области в непосредственной близости от металлической наноструктуры. Это открывает возможности для мониторинга биохимических процессов *in vivo*. Визуализация и количественная оценка биохимических процессов, в частности взаимодействия клеток и тканей с матрицей является одной из наиболее важных задач в области тканевой инженерии, которая может быть решена путем создания нетканых матриц, позволяющих проводить мониторинг средствами спектроскопии ГКР.

3.2.1. Повышение коэффициента усиления ГКР сигнала при модификации матриц ватеритными покрытиями

В качестве основы для ГКР-платформ были использованы однослойные нетканые полимерные матрицы без ватеритного покрытия (ПКЛ) и с равномерным ватеритным покрытием (ПКЛ/ CaCO_3). Формирование слоя из частиц серебра на однослойных матрицах ПКЛ и ПКЛ/ CaCO_3 осуществлялось с помощью реакции «серебряного зеркала». СЭМ-изображения полученных матриц представлены на рисунке 15.

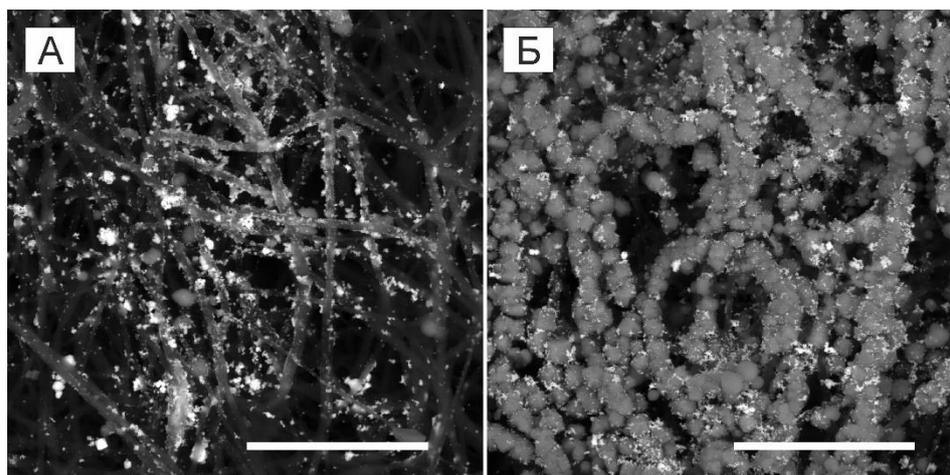


Рисунок 15. СЭМ-изображения нетканых ПКЛ-матриц с частицами серебра без ватеритного покрытия ПКЛ/Ag (А) и с ватеритным покрытием ПКЛ/CaCO₃/Ag (Б). Масштабный отрезок на изображениях составляет 20 мкм.

В случае неминерализованной ПКЛ/Ag матрицы видно, что частицы серебра распределены как вдоль волокон матрицы, так и в хаотичной порядке; также можно наблюдать крупные агрегаты частиц Ag (Рисунок 15А). В случае матрицы с ватеритным покрытием ПКЛ/CaCO₃/Ag (Рисунок 15Б) можно наблюдать меньшее количество крупных агрегатов частиц Ag; частицы распределены вдоль волокон матрицы.

По результатам СЭМ был рассчитан размер частиц серебра, сформированных на нетканых матрицах (Таблица 6), и установлено, что средний размер частиц Ag в ПКЛ/Ag матрицах, был выше, чем в ПКЛ/CaCO₃/Ag. Таким образом, наличие ватеритного покрытия способствовало формированию частиц Ag меньшего размера, что, по всей видимости, объясняется возможностью зародышеобразования и роста частиц Ag в порах ватеритного покрытия.

Таблица 6. Размеры частиц серебра на матрицах

Тип матрицы	Размер частиц Ag, нм (данные представлены как «среднее ± стандартное отклонение»)
ПКЛ/Ag	160 ± 90
ПКЛ/CaCO ₃ /Ag	70 ± 30

Для исследования возможности усиления сигнала КР за счет применения модифицированных серебряными частицами ПКЛ-матриц была использована 4-меркаптобензойная кислота (4-МБК) в качестве аналита. На рисунке 16 представлены интенсивность сигнала на полосе 1580 см^{-1} и коэффициент усиления КР сигнала для данной интенсивности, рассчитанный по формуле, представленной в *пункте 2.5.10*.

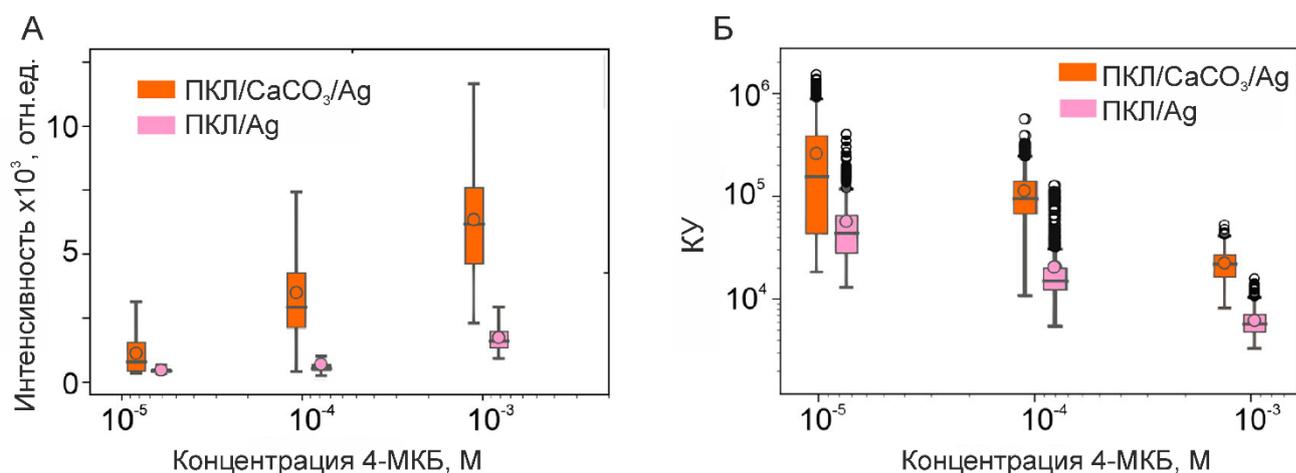


Рисунок 16. Интенсивность сигнала ГКР на полосе спектра 1580 см^{-1} нетканых ПКЛ-матриц с частицами серебра без (ПКЛ/Ag) и с ватеритным покрытием (ПКЛ/CaCO₃/Ag) для 4-МБК (А). Коэффициенты усиления ГКР сигнала, рассчитанные на основе значений данных интенсивностей (Б). Данные для КУ приведены в логарифмической шкале.

Установлено, что значения интенсивности сигнала КР и значения КУ при применении нетканых ПКЛ-матриц с ватеритным покрытием (ПКЛ/CaCO₃/Ag) превышают эти значения, полученные при использовании матриц без ватеритного покрытия (ПКЛ/Ag). Это можно объяснить меньшим размером частиц Ag, сформированных на ПКЛ/CaCO₃/Ag-матрицах, обеспечивающим усиление эффекта поверхностного плазмонного резонанса, и, соответственно, усиление сигнала КР. Кроме того, наличие пористого ватеритного покрытия на ПКЛ-матрице увеличивает концентрацию адсорбируемого аналита, что также приводит к росту интенсивности сигнала.

3.2.2. Детектирование органических молекул с помощью нетканой ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием и частицами серебра

Для исследования возможности детектирования органических молекул с помощью нетканой ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием и частицами серебра были выбраны ТРИТЦ-БСА ($M_w = 70$ кДа) – в качестве модельного высокомолекулярного вещества, и Родамин 6G ($M_w = 479$ Da) – в качестве модельной молекулы с малой молекулярной массой. Для данных веществ характерен одинаковый механизм иммобилизации в матрицу – физическая сорбция на поверхности материала.

На рисунке 17 представлены спектры КР для различных типов ПКЛ-матриц, в зависимости от типа их модификации (наличия/отсутствия ватеритного покрытия или частиц Ag) при детектировании молекул ТРИТЦ-БСА (Рисунок 17А) и Родамина 6G (Рисунок 17Б). Также представлено сравнение значений КУ для ТРИТЦ-БСА, Родамина 6G и 4-МБК в случае применения матриц различной структуры (Рисунок 17В). Обнаружено, что для всех типов матриц эффективность иммобилизации Родамина 6G была выше, чем ТРИТЦ-БСА (Рисунок 17Г). Сравнение значений КУ показало, что матрицы без частиц Ag демонстрируют очень низкую интенсивность сигнала КР (<50 отн.ед.) даже при высокой мощности лазера (50 мВт). ПКЛ-матрицы, содержащие частицы серебра (ПКЛ/Ag и ПКЛ/ $CaCO_3$ /Ag) продемонстрировали наличие ГКР-эффекта с интенсивностью сигнала до 7×10^3 отн.ед. для Родамина 6G и до 500 отн.ед. для ТРИТЦ-БСА (Рисунок 17А,Б). При этом, значения эффективности иммобилизации не различались статистически достоверно для матриц с Ag и без (Рисунок 17Г). Это свидетельствовало о необходимости покрытия ПКЛ-матриц частицами серебра для обеспечения возможности детектирования БАВ с их помощью. Важно отметить, что статистически значимая разница между значениями КУ для Родамина 6G и ТРИТЦ-БСА при применении нетканых ПКЛ-матриц без и с ватеритным покрытием отсутствовала (Рисунок 17В). Данное обстоятельство можно объяснить тем, что присутствие частиц серебра на поверхности ватеритных покрытий ограничивало процесс иммобилизации молекул аналита в

поры ватерита, вследствие чего их концентрация на матрицах была снижена. Соответственно, снизилась интенсивность сигнала КР и величина КУ.

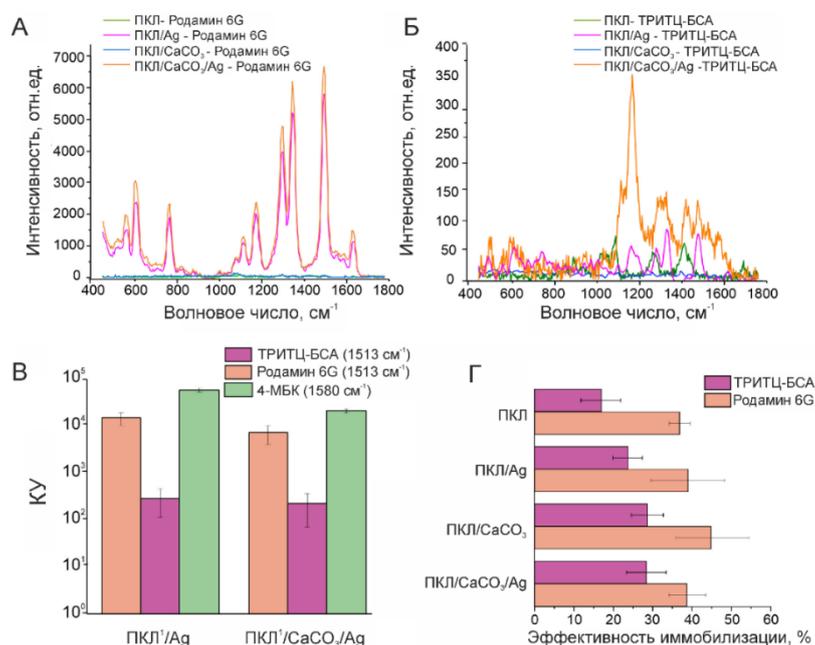


Рисунок 17. Спектры КР для Родамина 6G (А) и ТРИТЦ-БСА (Б) на нетканых ПКЛ-матрицах различной структуры. КУ на полосе 1513 см⁻¹ для ТРИТЦ-БСА и Родамина 6G и на полосе 1580 см⁻¹ для 4-МБК (данные представлены в логарифмической шкале) (В). Эффективность иммобилизации ТРИТЦ-БСА и Родамина 6G в ПКЛ-матрицы (Г).

3.3. Разработка подходов к модификации гидрогелевых матриц частицами ватерита

Гидрогели представляют собой трехмерные связанные полимерные структуры, содержащие большое количество воды. Гидрогелевые материалы на основе природных и/или синтетических биосовместимых полимеров способны имитировать структуру и свойства внеклеточного матрикса живых тканей. Поэтому материалы на основе гидрогелей широко используются в различных областях биологии и медицины, в том числе при создании биоматериалов для тканевой инженерии. Однако гидрогели обладают рядом недостатков, таких как низкая степень биоминерализации, недостаточные механические свойства, и низкая степень остеоинтеграции, что делает гидрогели непригодными для инженерии твердых тканей, в частности, для регенерации кости. В настоящее

время широко разрабатываются подходы к преодолению этих ограничений, в частности к повышению биологической активности и биоминерализации гидрогелей.

Гидрогелевые матрицы на основе анионного полисахарида геллановой камеди (ГК) были получены методом ионотропной гелефикации с помощью двухвалентных ионов кальция Ca^{2+} в качестве сшивающего агента, способствующего связыванию карбоксилатных групп спиральных цепей молекул геллановой камеди [179]. Кроме того, добавление ионов кальция снижает отрицательный заряд спиральных цепей ГК и, таким образом, стимулирует их внутреннее электростатическое взаимодействие, также способствующее их гелефикации [179,180]. Полученный ГК гидрогель предварительно обрабатывали в растворе CaCl_2 при ультразвуковом воздействии, которое стимулирует диффузию ионов Ca^{2+} из раствора в матрицу гидрогеля. Последующее добавление карбонатных ионов CO_3^{2-} инициирует рост CaCO_3 частиц в матрице гидрогеля ГК. Схема процесса модификации гидрогеля ГК с помощью УЗ представлена на рисунке 18. На СЭМ изображениях полученных минерализованных гидрогелей ГК/ CaCO_3 (Рисунок 19, панель А, «1-й цикл обработки») можно наблюдать сферические частицы с пористой морфологией поверхности, характерной для полиморфной модификации ватерита, а также равномерное распределение частиц в гидрогеле.

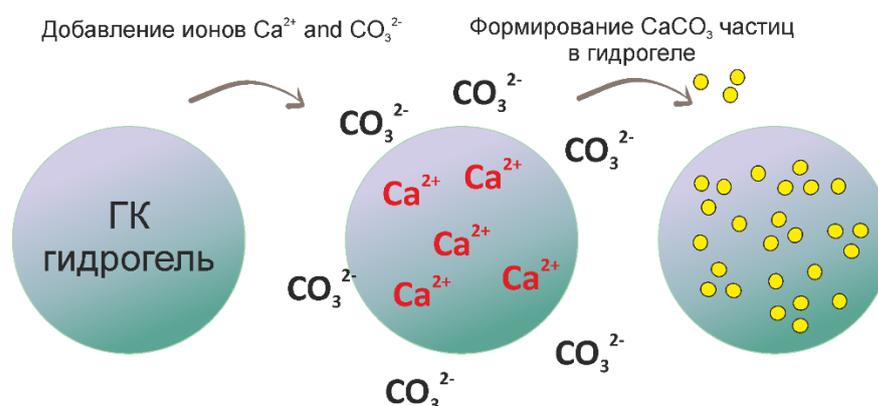


Рисунок 18. Схема процесса ультразвуковой минерализации гидрогелевой матрицы гелланной камеди частицами ватерита CaCO_3

УЗ-минерализация обеспечивает наиболее оптимальную структуру композиционного материала на основе гидрогеля с точки зрения полиморфной модификации микрочастиц CaCO_3 и их распределения в материале. По функциональности CaCO_3 в полиморфной модификации ватерита предпочтительнее кальцита, поскольку обладает более высокой биологической активностью, остеогенным потенциалом [181] и большей способностью к иммобилизации биологически активных фрагментов [178].

Далее для изучения влияния УЗ-воздействия на структуру композиционного материала были проведены три процедуры такой УЗ-обработки гидрогелей ГК. На СЭМ-изображениях образцов гидрогеля после 1-й, 2-й и 3-й процедур УЗ-обработки (рисунок 19) можно наблюдать, что в результате увеличения количества процедур обработки размер и количество частиц CaCO_3 в материале также увеличиваются (рисунок 20 А, Б). Статистически значимое увеличение среднего диаметра частиц CaCO_3 происходит после 3-й процедуры обработки, а коэффициент заполнения резко возрастает уже после 2-й процедуры. После третьей процедуры в гидрогеле наблюдаются частицы кальцита кубической формы. В результате измерения массы образцов (как влажных, так и высушенных) в процессе УЗ обработки, было выявлено, что содержание воды в гидрогелях увеличивалось (рисунок 20 В) при статистически значимом уменьшении сухой массы ГК (рисунок 20 Г) после 1-й процедуры УЗ-обработки. Стоит отметить, что статистически значимой разницы в изменении количества сухой массы образцов после 1-й, 2-й и 3-й процедур обработки нет. Также последующие (2-я и 3-я) процедуры обработки не вызвали статистически значимого изменения содержания воды в гидрогелях. На дифрактограммах этих образцов (рисунок 19, панель Б) наблюдаются пики, характерные для ватерита, что подтверждает наличие CaCO_3 в полиморфной модификации ватерита в композитном гидрогеле. На дифрактограммах образцов после второй и третьей процедур также отмечается наличие пиков кальцита.

Таким образом, можно заключить, что последовательное увеличение количества процедур УЗ-обработки гидрогеля ГК инициирует процесс

перекристаллизации частиц ватерита в кальцит. Таким образом, две процедуры УЗ-обработки были признаны оптимальными для формирования стабильной фазы CaCO_3 в композитном гидрогеле с точки зрения ватеритной полиморфной модификации CaCO_3 и распределения частиц в матрице гидрогеля.

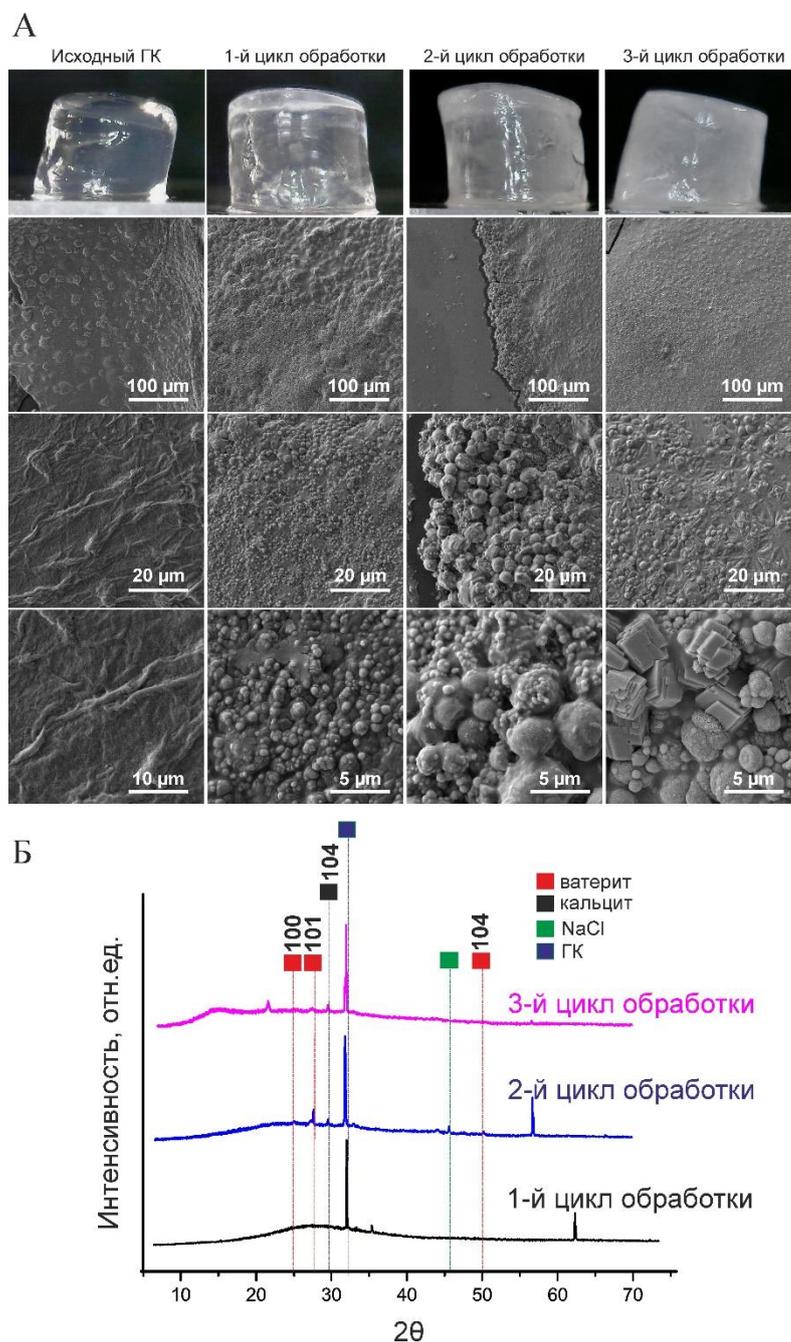


Рисунок 19. А - фотография и соответствующие СЭМ-изображения исходных гидрогелей ГК и композитных гидрогелей ГК после одной, двух и трех процедур минерализации CaCO_3 с помощью УЗ. Б - дифрактограммы композитных гидрогелей ГГ после одной, двух и трех процедур УЗ-минерализации CaCO_3 .

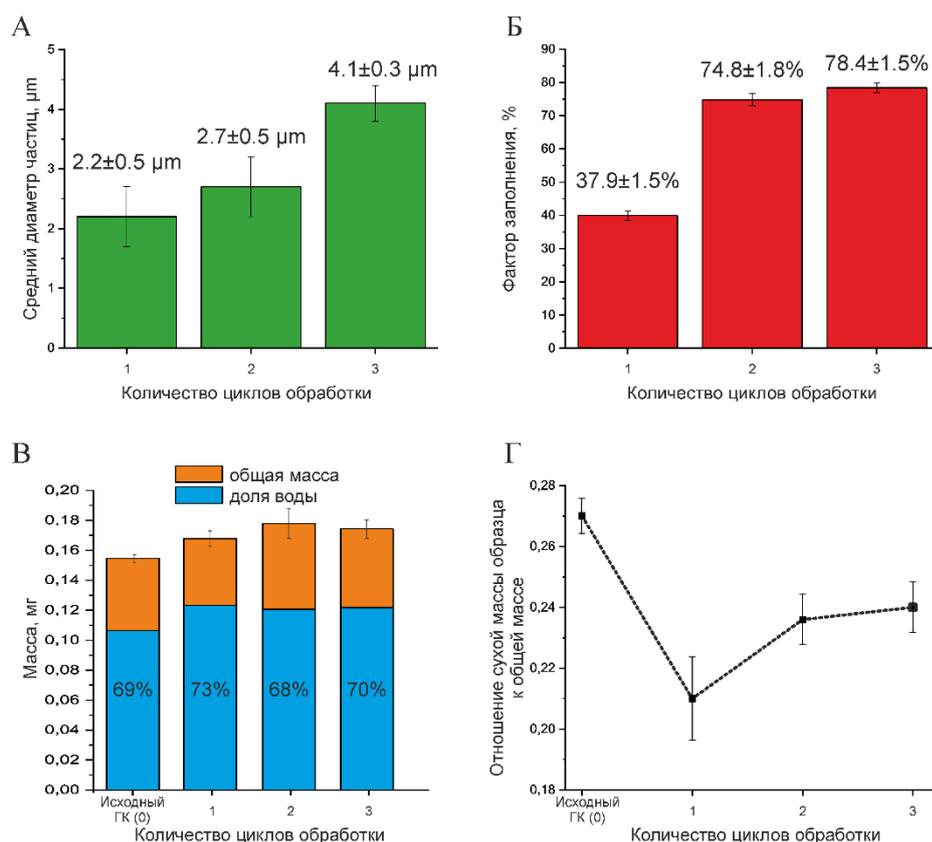


Рисунок 20. А – средние диаметры частиц CaCO_3 и Б – коэффициент заполнения частиц CaCO_3 в образцах композитного гидрогеля ГК после одной, двух и трех процедур УЗ минерализации CaCO_3 . В - измерения массы влажных образцов гидрогелей (начальные и после различного количества процедур минерализации CaCO_3 с помощью УЗ) и соответствующего содержания воды в гидрогелях. Г – отношение сухой массы к общей массе исходного гидрогеля ГК и композитных гидрогелей ГК после одной, двух и трех процедур УЗ-минерализации CaCO_3 .

3.4. Выводы к главе 3

УЗ-воздействие обеспечивает формирование покрытия из агрегатов ватерита на волокнах однослойной нетканой ПКЛ-матрицы.

Многочисленная процедура формирования ватеритного покрытия на ПКЛ-матрице позволяет достичь равномерности покрытия. Для формирования ватеритных покрытий внутренних и внешних волокон ПКЛ-матрицы достаточно двух циклов.

Варьирование условий процедуры формирования ватеритного покрытия на ПКЛ-матрице (концентрация растворов солей, время синтеза) и количества циклов позволяют контролировать массу сформированного CaCO_3 , его полиморфную модификацию (ватерит, кальцит) и равномерность покрытия.

Жизнеспособность клеток НДФЧ на нетканых ПКЛ-матрицах с ватеритным покрытием ($\text{ПКЛ}/\text{CaCO}_3$) не отличается от жизнеспособности контрольных клеток, что свидетельствует об отсутствии выраженных цитотоксических эффектов и высокой цитосовместимости полученных матриц. Важно отметить, что жизнеспособность НДФЧ на матрицах $\text{ПКЛ}/\text{CaCO}_3$ выше жизнеспособности НДФЧ на ПКЛ-матрицах без ватеритного покрытия в 1.2 раза. Кроме того, показано, что клетки обладают хорошей способностью к адгезии и пролиферации на матрицах $\text{ПКЛ}/\text{CaCO}_3$ при инкубации в течение 48 ч.

Таким образом, доказано, что ватеритное покрытие на нетканой ПКЛ-матрице выступает в роли эффективно стимулирует биологическую реакцию клеток линии НДФЧ.

Была продемонстрирована возможность модификации нетканых ПКЛ-матриц частицами серебра. Причем, установлено, что при наличии ватеритного покрытия на таких матрицах удастся сформировать частицы Ag меньшего диаметра, чем без него, поскольку в данном случае поры ватеритного покрытия могут выступать в роли центров зародышеобразования и роста частиц Ag . Как следствие, продемонстрировано, что применение $\text{ПКЛ}/\text{CaCO}_3/\text{Ag}$ -матриц позволяет повысить КУ сигнала ГКР, по сравнению с $\text{ПКЛ}/\text{Ag}$ -матрицами (при использовании модельного анализита 4-меркаптобензойной кислоты).

Была показана возможность эффективного обнаружения органических молекул с помощью матриц $\text{ПКЛ}/\text{CaCO}_3/\text{Ag}$ на примере модельных веществ Родамина 6G и ТРИТЦ-БСА как молекул низкой и высокой молекулярной массы, соответственно.

Гидрогели желлановой камеди функционализировали микрочастицами CaCO_3 в пористой полиморфной форме ватерита. Проведено сравнительное исследование трех подходов к формированию композиционного материала на

основе гидрогеля геллановой камеди и микрочастиц CaCO_3 . Структура, полиморфная модификация частиц CaCO_3 , а также их распределение в матрице гидрогеля зависели от условий их синтеза. Показано, что наиболее эффективным способом минерализации гидрогелей является ультразвуковая (УЗ) обработка гидрогеля ГК в растворах, содержащих Ca^{2+} и CO_3^{2-} . Обработка УЗ стимулирует проникновение этих ионов в сетку полимерного гидрогеля и способствует образованию пористых микрочастиц ватерита внутри гидрогеля. Установлено, что наличие ультразвуковой обработки при синтезе частиц CaCO_3 позволяет получить частицы с необходимой полиморфной модификацией (ватерит) и равномерным распределением в гидрогеле ГК. Также было изучено влияние количества процедур УЗ-обработки на структуру композитного гидрогеля ГК и показано, что обе процедуры оптимальны с точки зрения структуры и распределения частиц CaCO_3 в матрице гидрогеля. Композитные гидрогели ГК, функционализированные ватеритом, могут быть перспективны для применения в качестве имплантируемых материалов для регенерации костной ткани.

Результаты главы представлены в работах [182].

ГЛАВА 4. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ МЯГКИХ ТКАНЕЙ ПРИ ПОДКОЖНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ ОДНОСЛОЙНЫХ НЕТКАННЫХ ПОЛИМЕРНЫХ МАТРИЦ С ВАТЕРИТНЫМ ПОКРЫТИЕМ

Как было показано в *главе 3*, нетканые однослойные ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием (ПКЛ/CaCO₃) не оказывают токсического воздействия на живые клетки линии НДФЧ. Было выявлено, что ватеритное покрытие создает физический стимул, способствующий адгезии и пролиферации клеток. Следующим закономерным шагом по апробации матричного материала для его применения в живых системах является *in vivo* исследование их биосовместимости и биологической реакции тканей на их имплантацию, а также процесса регенерации в зоне имплантации, в частности, васкуляризации.

Расшифровка некоторых терминов:

Васкуляризация – плотность снабжения органов и тканей сосудами.

Ангиогенез - процесс формирования новых сосудов из уже существующих, обеспечивающий расширение и ремоделирование сосудистой сети.

Диapedез - прохождение клеточных элементов крови (лейкоцитов, эритроцитов) через неповрежденные стенки кровеносных сосудов. Наблюдается при воспалительной реакции тканей, окружающих сосуды.

Перифокальная область матрицы – область ткани в непосредственной близости матрицы.

4.1. Изучение биологической реакции тканей в ответ на подкожную имплантацию ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием *in vivo*.

Нетканые однослойные ПКЛ-матрицы без и с ватеритным покрытием были имплантированы подкожно в область холки белым крысам. Спустя 21 день после имплантации был проведен морфологический анализ срезов тканей из области

имплантации, а также осуществлено исследование структуры, состава и степени колонизации клетками матрицы, извлеченной из области имплантации, с помощью рентгеновской дифракции и СЭМ. Было исследовано три типа матриц: нетканая ПКЛ-матрица без ватеритного покрытия (ПКЛ, контрольная группа), нетканая ПКЛ-матрица с ватеритным покрытием (ПКЛ/ CaCO_3 , экспериментальная группа) и нетканая ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием с иммобилизованным чужеродным белком (ПКЛ/ CaCO_3 /ОВА, группа негативного контроля).

Контрольная группа

На рисунке 21 представлены изображения гистологических срезов образцов контрольной группы с имплантированными ПКЛ-матрицами без ватеритного покрытия ПКЛ спустя 7, 14 и 21 день после имплантации. При морфологическом анализе срезов не наблюдалось выраженных признаков воспаления в окружающих тканях в ответ на имплантацию ПКЛ-матрицы. Реактивные изменения в перифокальной зоне полностью купировались к 21-м суткам после имплантации. Наблюдались признаки активной колонизации матрицы клетками соединительной ткани в период с 7^{го} по 21^й день эксперимента. Данные результаты свидетельствуют о высокой степени биосовместимости нетканых ПКЛ-матриц без ватеритного покрытия.

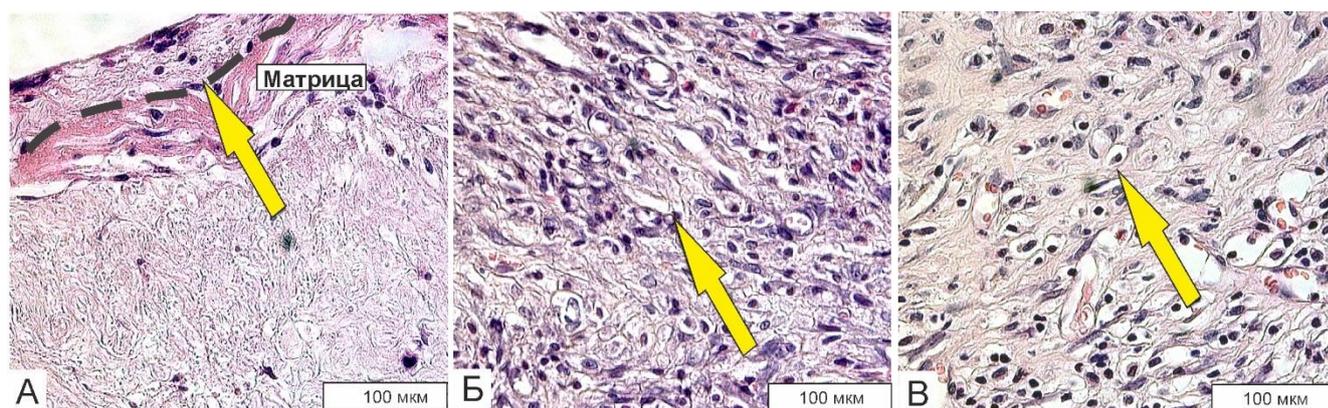


Рисунок 21. Оптические изображения гистологических срезов тканей с однослойной нетканой ПКЛ-матрицей без ватеритного покрытия (контрольная группа) на 7^й (А), 14^й (Б) и 21^й день (В) после подкожной имплантации. Черной пунктирной линией выделена граница матрица-ткань, стрелки указывают на фибробласты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

Группа негативного контроля

Группа негативного контроля – животные, которым имплантировали матрицы с чужеродным иммуногенным белком (овальбумином, ОВА), была использована для изучения особенностей заведомо острой воспалительной реакции в ответ на имплантацию, а также последующего сопоставления результатов с контрольной и экспериментальной группами в целях полноценного и всестороннего исследования. Гистологическое исследование зон имплантации у животных группы отрицательного контроля на 21-е сутки эксперимента выявило усиление кровенаполнения артериальных сосудов, а также венозных сосудов и отек мягких тканей, окружающих имплантированную ПКЛ/СаСО₃/ОВА матрицу с иммобилизованным овальбумином. Формирование ограничительного барьера, состоящего из соединительной ткани и окружающего имплантированную матрицу, произошло на 21^й день эксперимента (рисунок 22 А). Было обнаружено большое количество сидерофагов (гемосидерин-содержащих макрофагов) и зерен гемосидерина, свободно лежащих в перифокальной области матрицы (рисунок 22 Б). Соединительнотканый барьер был инфильтрирован лейкоцитами, включающими в себя лимфоциты, плазматические клетки и макрофаги (рисунок 22 В). На 21^й день эксперимента матрица была инфильтрирована белыми кровяными тельцами и нейтрофилами (рисунок 22 Г). Степень васкуляризации данной матрицы и ее колонизации фибробластами и фибробластическими элементами была очень низкой. Таким образом, у животных группы негативного контроля был выявлен ярко выраженный воспалительный ответ в области имплантации матрицы ПКЛ/СаСО₃/ОВА с иммобилизованным овальбумином.

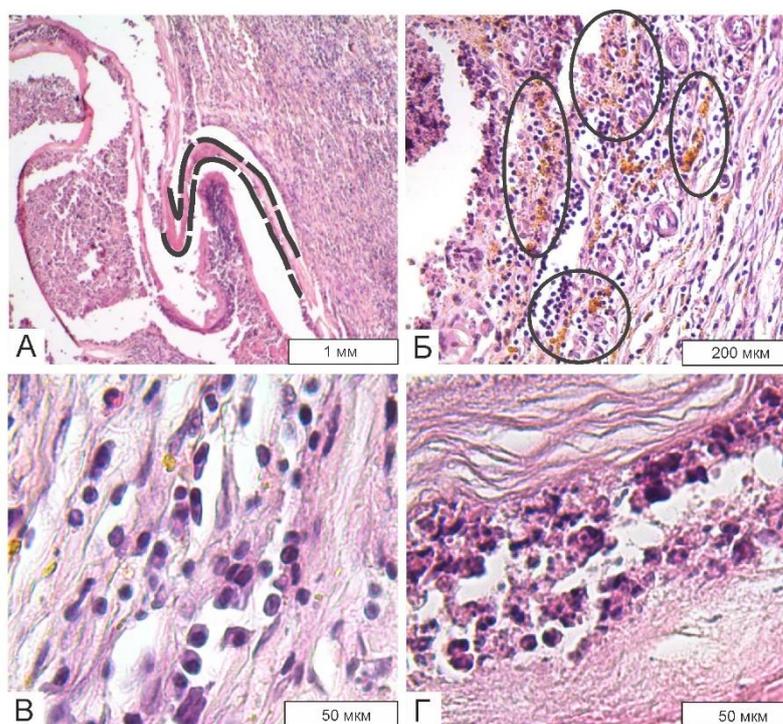


Рисунок 22. Оптические изображения гистологических срезов однослойной нетканой ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием и иммобилизованным овальбумином ПКЛ/ CaCO_3 /ОВА (группа негативного контроля) на 21^й день после подкожной имплантации. Черной пунктирной линией выделена граница матрица-ткань (А); черными кругами обозначены зерна гемосидерина (Б). Участки с ярко выраженной воспалительной реакцией представлены на изображениях (В, Г). Окраска срезов: гематоксилин-эозин.

Экспериментальная группа

У животных экспериментальной группы с имплантированной нетканой однослойной ПКЛ-матрицей с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 на 21 день эксперимента не было обнаружено каких-либо признаков воспаления в тканях, окружающих матрицу. Не наблюдалось повышенной инфильтрации лейкоцитами в прилежащих тканях (рисунок 23 В). Сама матрица была интенсивно колонизована фибробластами и фиброцитами (рисунок 23 Г). На фоне преобладания фибробластических элементов в клеточных популяциях в зоне матрицы были выявлены только единичные лимфоциты и макрофаги, что также подтверждает отсутствие воспалительного ответа на имплантацию со стороны прилежащих тканей и организма.

Таким образом, результаты гистологического исследования тканей экспериментальной группы показали, что имплантация матрицы с ватеритным

покрытием ПКЛ/ CaCO_3 не вызывает воспалительного ответа со стороны прилежащих тканей и организма. Также наблюдалась положительная реакция, выражающаяся в достаточно интенсивной колонизации матрицы фибробластами и фибробластическими элементами, а также хорошей васкуляризации. Таким образом, была доказана биосовместимость минерализованных ватеритом матриц ПКЛ/ CaCO_3 .

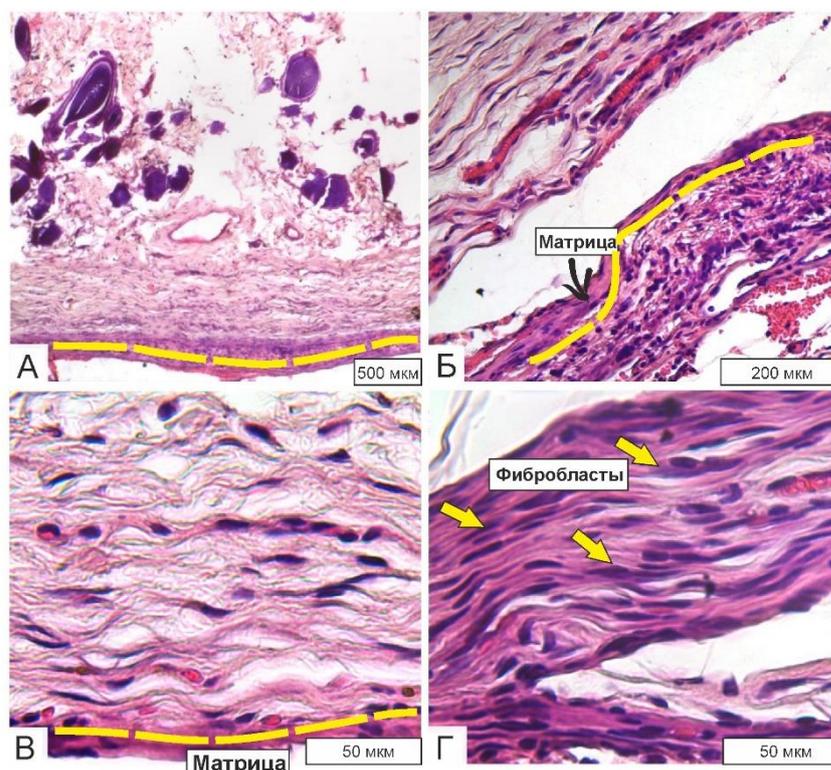


Рисунок 23. Оптические изображения гистологических срезов однослойной нетканой ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 (экспериментальная группа) на 21^й день после подкожной имплантации. Желтой пунктирной линией выделена граница матрица-ткань (А-В); желтые стрелки указывают на фибробласты в области границы матрица-ткань (Г). Окраска срезов: гематоксилин-эозин.

Данные результаты, касающиеся имплантации нетканых однослойных ПКЛ-матриц без и с ватеритным покрытием (ПКЛ и ПКЛ/ CaCO_3), согласуются с результатами, полученными ранее другими авторами, которые исследовали биосовместимость материалов на основе ПКЛ [17,183–186]. В частности, сообщалось, что поликапролактоновый материал при подкожной имплантации мышам был колонизован фибробластами и элементами соединительной ткани, и демонстрировал умеренную инфильтрацию лимфоцитами и макрофагами [187].

Полученные результаты также согласуются с предыдущими исследованиями биосовместимости нетканых ПКЛ-матриц, содержащих гидроксиапатит [188]. Скорость колонизации фибробластами нетканых однослойных ПКЛ-матриц с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 была аналогична скорости колонизации матриц ПКЛ с гидроксиапатитом после подкожной имплантации белым крысам [188].

Очень важным явлением, которое наблюдалось в экспериментальной группе и, в то же время, не было обнаружено в контрольной группе, является наличие большого количества микрососудов с хорошим кровенаполнением в области матрицы с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 , а также выраженное изменение микроциркуляторного сосудистого русла. Матрица ПКЛ/ CaCO_3 была обильно васкуляризована спустя 21 день после имплантации, в то время как в отрицательном контроле данного не наблюдалось вовсе, а в контрольной группе с матрицами без ватеритного покрытия (ПКЛ) наблюдалось в гораздо меньшей степени. Следовательно, присутствие ватеритных покрытий в составе полимерной матрицы стимулировало активацию ангиогенеза в области имплантации матрицы.

Сосуды в перифокальной зоне матрицы с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 имели умеренный кровоток (рисунок 23 А), за исключением микрососудов, расположенных непосредственно на границе с матрицей, – данные сосуды имели повышенное кровенаполнение (рисунок 23 Б). Также следует отметить, что в соединительных тканях на границе с матрицей наблюдались множественные кровоизлияния и диапедез эритроцитов (рисунок 23 Г). Важный момент заключается в том, что микрососуды имели повышенное кровенаполнение исключительно только на граничной области матрицы с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 с окружающими тканями, в отличие от группы отрицательного контроля, где гиперемия имела более обширный характер и наблюдалась в дермальных и гиподермальных сосудах перифокальной зоны. Образование множественных сосудов в матрице с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 вызывало активацию ангиогенеза, что приводило к интенсивной васкуляризации матрицы. Это согласуется с представленными в литературе данными,

свидетельствующими о том, что умеренная воспалительная реакция тканей на начальных этапах взаимодействия материал-ткань может оказывать такой положительный эффект, как стимуляция процессов ангиогенеза и васкуляризации области имплантации и имплантированного материала [189]. При этом, в случае острой воспалительной реакции в тканях, вызванной имплантацией матрицы с ОВА, было показано, что образования новых кровеносных сосудов не происходит [189]. Аналогично, при имплантации матриц ПКЛ/СаСО₃/ОВА, также вызвавших острую воспалительную реакцию в прилегающих тканях, их васкуляризации не наблюдалось.

Также стоит отметить различия в стабильности новой сформированной сосудистой сетки в зоне имплантации матрицы с ватеритным покрытием ПКЛ/СаСО₃. Свежие кровоизлияния были обнаружены в гистологических препаратах, содержащих матрицу ПКЛ/СаСО₃ и прилежащие ткани. В группе негативного контроля в перифокальной зоне были отмечены свободно лежащие сидерофаги и зерна гемосидерина, что является признаком старых кровоизлияний. Присутствие же свежих кровоизлияний может быть связано с повреждением сосудов, которое произошло непосредственно в процессе извлечения матрицы ПКЛ/СаСО₃ вместе с прилежащими тканями из зоны имплантации. Предположительно, существует множество факторов, которые могут быть причиной возникновения кровоизлияний, и наиболее вероятным из них является хрупкость стенок вновь образованных сосудов. Укрепление новообразованных сосудов и стабилизация сосудистой системы происходят на более поздних стадиях ангиогенного процесса [190]. Хрупкость капилляров и образование кровоизлияний после извлечения матрицы с ватеритным покрытием ПКЛ/СаСО₃, вероятно, свидетельствуют о незавершенности процесса ангиогенеза. Полученные результаты в ходе данного исследования предполагают необходимость регуляции как интенсивности васкуляризации имплантированных матричных материалов, так и стабилизации новообразованной сосудистой системы в области материала и прилежащих тканей в зоне имплантации.

4.2. Исследование образцов тканей, извлеченных вместе с ПКЛ-матрицами, после подкожной имплантации

Исследование морфологии и структуры эксплантированных матриц было осуществлено физическими методами, включающими анализ с помощью СЭМ и рентгеновской дифракции.

На рисунке 24 А,Д приведено СЭМ-изображение исходной однослойной ПКЛ/ CaCO_3 матрицы до имплантации крысам. Оценка изменений морфологии матричного материала в ходе взаимодействия с прилежащими тканями в зоне подкожной имплантации проводилась в сравнении с данным изображением. Эксплантированная через 21 день матрица с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 (рисунок 24 Б,Е) демонстрирует на своей поверхности плотную субстанцию, по-видимому, состоящую из скопления клеток и продуктов их жизнедеятельности. На рисунке 24 Е показано поперечное сечение эксплантированной матрицы, на котором можно увидеть фибробласты, прикрепленные к волокнам матрицы (выделенная область). На данном изображении также можно отметить отдельные частицы CaCO_3 на волокнах (указано красными стрелками). Спустя 33 дня после имплантации наблюдалось дальнейшее заращивание матрицы тканями, о чем более гладкая морфология эксплантированного образца (рисунок 21 В,Ж).

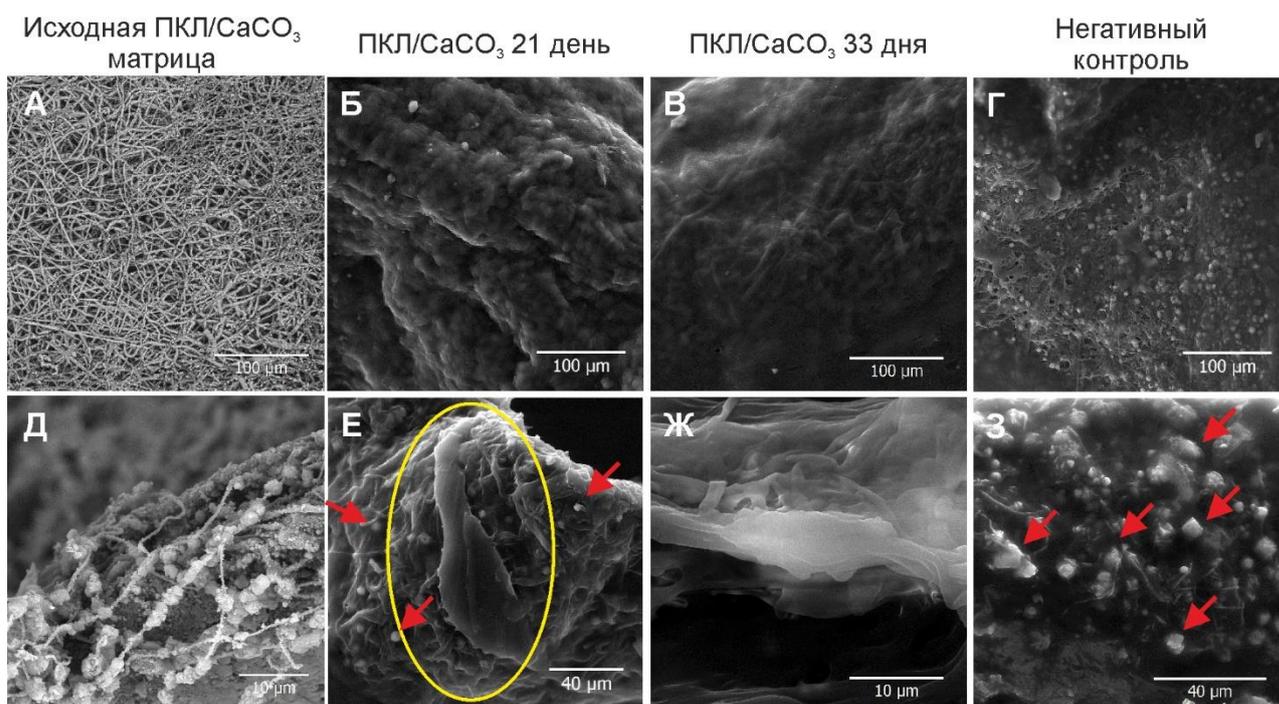


Рисунок 24. СЭМ-изображения исходной однослойной ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 (А, Д), матриц экспериментальной группы ПКЛ/ CaCO_3 , извлеченных на 21 день (Б, Е) и 33 день (В, Ж) после подкожной имплантации, и матриц ПКЛ/ CaCO_3 /ОВА с иммобилизованным чужеродным белком (группа негативного контроля) (Г, З). Желтым овалом выделена клетка фибробластического ряда; красными стрелками выделены частицы CaCO_3 в эксплантированных матрицах.

Срез тканей группы негативного контроля, содержащих ПКЛ-матрицу с ватеритным покрытием и чужеродным белком овальбумином ПКЛ/ CaCO_3 /ОВА, после 21-го дня после имплантации показан на рисунке 24 Г,З. Данный образец демонстрирует явное отличие в своей морфологии от тканей экспериментальной группы: скопление клеток и продуктов их жизнедеятельности на матрице является менее плотным. Кроме того, отчетливо видны полимерные волокна матрицы и кубические частицы CaCO_3 на волокнах, свидетельствующие о перекристаллизации ватерита в кальцит (указано красными стрелками).

Присутствие CaCO_3 на волокнах эксплантированных матриц было подтверждено данными энергодисперсионного анализа, демонстрирующими присутствие атомов Са на них. СЭМ-изображение поперечного сечения ПКЛ/ CaCO_3 матрицы, извлеченной через 21 день после подкожной имплантации крысам экспериментальной группы, представлено на рисунке 25 А. Исследование фазового состава ватеритного покрытия данных матриц далее проводили с помощью рентгеновской дифрактометрии, результаты представлены на рисунке 25 Б.

А Массовая доля Са (ат. %):

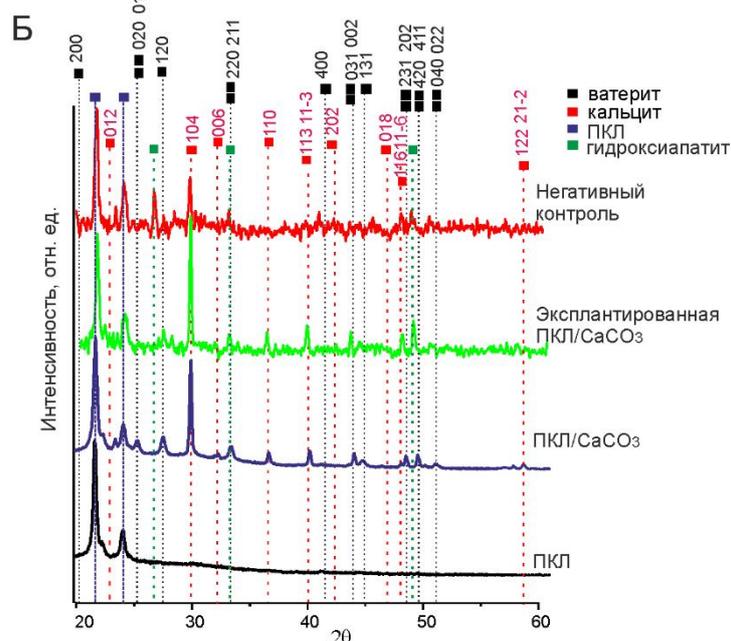
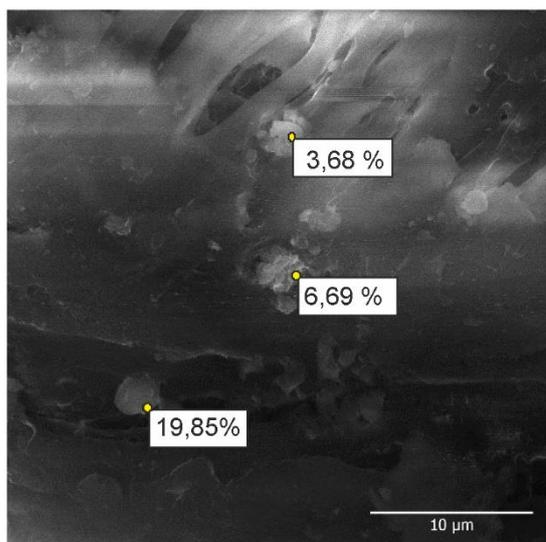


Рисунок 25. СЭМ-изображение поперечного среза однослойной нетканой ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 в экспериментальной группе, извлеченного на 21 день подкожной имплантации, с указанием массовых долей атомов Са в обозначенных точках среза (А). Дифрактограммы исходных ПКЛ-матрицы без (ПКЛ) и с ватеритным покрытием (ПКЛ/ CaCO_3), а также эксплантированных ПКЛ/ CaCO_3 и ПКЛ/ CaCO_3 /ОВА матриц, извлеченных после 21-дневной подкожной имплантации, с указанием пиков, соответствующих фазам ватерита, кальцита, гидроксиапатита и ПКЛ (Б).

Анализ дифрактограмм извлеченных после имплантации ПКЛ-матриц с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 был проведен в сравнении с дифрактограммами исходных ПКЛ-матриц без ватеритного покрытия и ПКЛ-матриц с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 (рисунок 25 Б). На дифрактограмме исходной матрицы ПКЛ/ CaCO_3 наблюдаются пики, соответствующие фазам как ватерита (220, 20, 11), так и кальцита (104, 113). На дифрактограмме эксплантированной матрицы ПКЛ/ CaCO_3 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, помимо указанных пиков, присутствуют также пики, характерные для гидроксиапатита (005, 203, 232).

4.3. Иммуобилизация капилляростабилизирующего БАВ в ватеритные покрытия однослойных нетканых ПКЛ-матриц и оценка его воздействия на васкуляризацию *in vivo*

Принимая во внимание чрезмерную активацию ангиогенеза и обильную васкуляризацию матриксного материала, а также хрупкость стенок новых образованных сосудов и капилляров, приводящие к возникновению кровоизлияний, иммуобилизация в ватеритные покрытия однослойной матрицы ПКЛ/ CaCO_3 антиоксидантного препарата, обладающего капилляростабилизирующим действием, является перспективной задачей. Такой подход позволит добиться регуляции ангиогенеза и стабилизации сосудистой системы при имплантации тканеинженерных матриц. С этой точки зрения, таниновая кислота (ТК) является подходящим кандидатом.

Иммуобилизация ТК

Иммуобилизация ТК проходила с помощью метода адсорбции из водного раствора ТК с концентрацией 1 мг/мл на однослойных нетканых ПКЛ-матрицах с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 и без ватеритного покрытия ПКЛ. Размер матриц составлял 1 см \times 1 см. В результате были получены образцы матриц ПКЛ/ CaCO_3 /ТК и ПКЛ/ТК.

Эффективность загрузки $X_{эф}$ ТК в ПКЛ-матрицы без ватеритного покрытия, рассчитанная по оптической плотности супернатантов после адсорбции ТК, составила $4 \pm 2\%$ (рисунок 26). Эффективность загрузки $X_{эф}$ ТК в ПКЛ/ CaCO_3 матрицы оказалась существенно выше и составила $40 \pm 10\%$ (рисунок 26). Данное значение эквивалентно содержанию 0.4 мг ТК в матрице размером 1 см \times 1 см, которая была адсорбирована из 1 мл водного раствора ТК с концентрацией 1 мг/мл.

Ёмкость загрузки $X_{ем}$ матриц, рассчитанная на основе измерений оптической плотности растворов после растворения CaCO_3 покрытий матрицы как отношение иммуобилизованной ТК к общей массе матрицы ПКЛ/ CaCO_3 /ТК, составила $25 \pm 6\%$. Это эквивалентно содержанию 0.4 мг ТК в матрице размером 1 см \times 1 см и массой 1.6 мг. Таким образом, результаты расчета массы ТК в

ПКЛ/ CaCO_3 /ТК матрицах, полученные с использованием двух разных методик, полностью совпадают друг с другом.

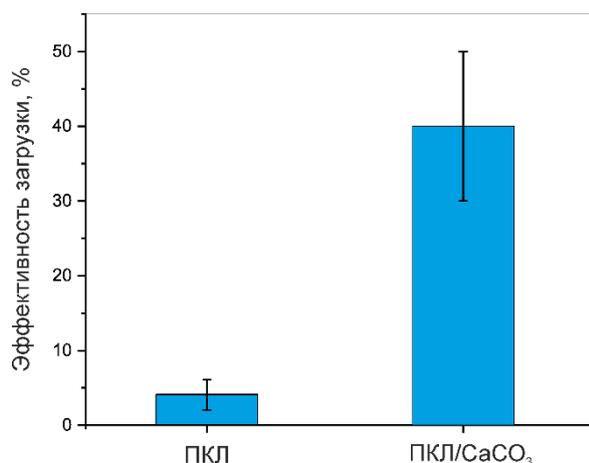


Рисунок 26. Эффективность загрузки таниновой кислоты в однослойные нетканые ПКЛ-матрицы без (ПКЛ) и с ватеритным покрытием (ПКЛ/ CaCO_3). Данные представлены как «среднее ± стандартное отклонение».

Сравнение эффективности иммобилизации ТК для матрицы ПКЛ/ CaCO_3 /ТК (40 ± 10 %) и матрицы ПКЛ/ТК (4 ± 2 %) (рисунок 26) наглядно демонстрирует преимущество ватеритного покрытия для иммобилизации и доставки БАВ на базе тканеинженерных матриц. Высокая степень пористости ватерита позволяют иммобилизовать гораздо большее количество вещества, по сравнению с гидрофобной поверхностью ПКЛ волокон без ватеритного покрытия.

Из литературы известно, что частицы ватерита отличаются высокой емкостью загрузки и демонстрируют возможность загрузки широкого спектра соединений (например, фталоцианинов [163], флуоресцентных красителей [191,192], белков [167,168]). Однако, эффективность загрузки БАВ путем адсорбции на поверхности ватеритных частиц, как правило, не превосходит 5%. В связи с этим, можно сделать предположение, что высокая эффективность иммобилизации ТК в однослойные нетканые ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием (40 ± 10 %) обусловлена не только наличием определенной сорбционной емкости частиц ватерита, но также способностью молекул ТК формировать координационные комплексы с ионами кальция Ca^{2+} . Сообщалось, что тенденция к образованию координационных комплексов с ионами Ca^{2+}

характерна для широкого ряда различных полифенольных соединений [193]. Таким образом, предлагаемые ПКЛ/ CaCO_3 матрицы обладают высоким потенциалом для иммобилизации полифенольных соединений.

Подкожная имплантация нетканых полимерных матриц с иммобилизованной ТК

Полученные ПКЛ/ CaCO_3 /ТК матрицы подкожно имплантировали белым крысам, затем на 21 день проводили забор тканей в области имплантации для проведения гистологического исследования. СЭМ-изображение ПКЛ/ CaCO_3 /ТК матрицы до и через 21 день после имплантации представлено на рисунке 27 А и Г, соответственно.

Гистологическое исследование выявило отек мягких тканей, окружающих ПКЛ/ CaCO_3 /ТК матрицу, на 21 день эксперимента (рисунок 27 В). Однако, в отличие от группы негативного контроля (нетканые ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием и чужеродным белком ОВА, см. рисунок 22), здесь не наблюдалось признаков повышенного кровенаполнения артериальных и венозных сосудов в перифокальной зоне матрицы. Было отмечено отсутствие соединительнотканного ограничительного барьера вокруг матрицы, а также не наблюдалось инфильтрации лейкоцитами перифокальной зоны (рисунок 27 Е). Кроме того, было обнаружено только несколько отдельно лежащих макрофагов и лимфоцитов. В отличие от первой экспериментальной группы с ПКЛ/ CaCO_3 матрицей (см. рисунок 23), в данном случае не наблюдалось кровоизлияний и диапедеза эритроцитов (рисунок 27 Д). Но стоит отметить, что были обнаружены сидерофаги (гемосидерин-содержащие макрофаги) и свободно лежащие зерна гемосидерина в некоторых областях тканей, прилежащих к имплантированной матрице.

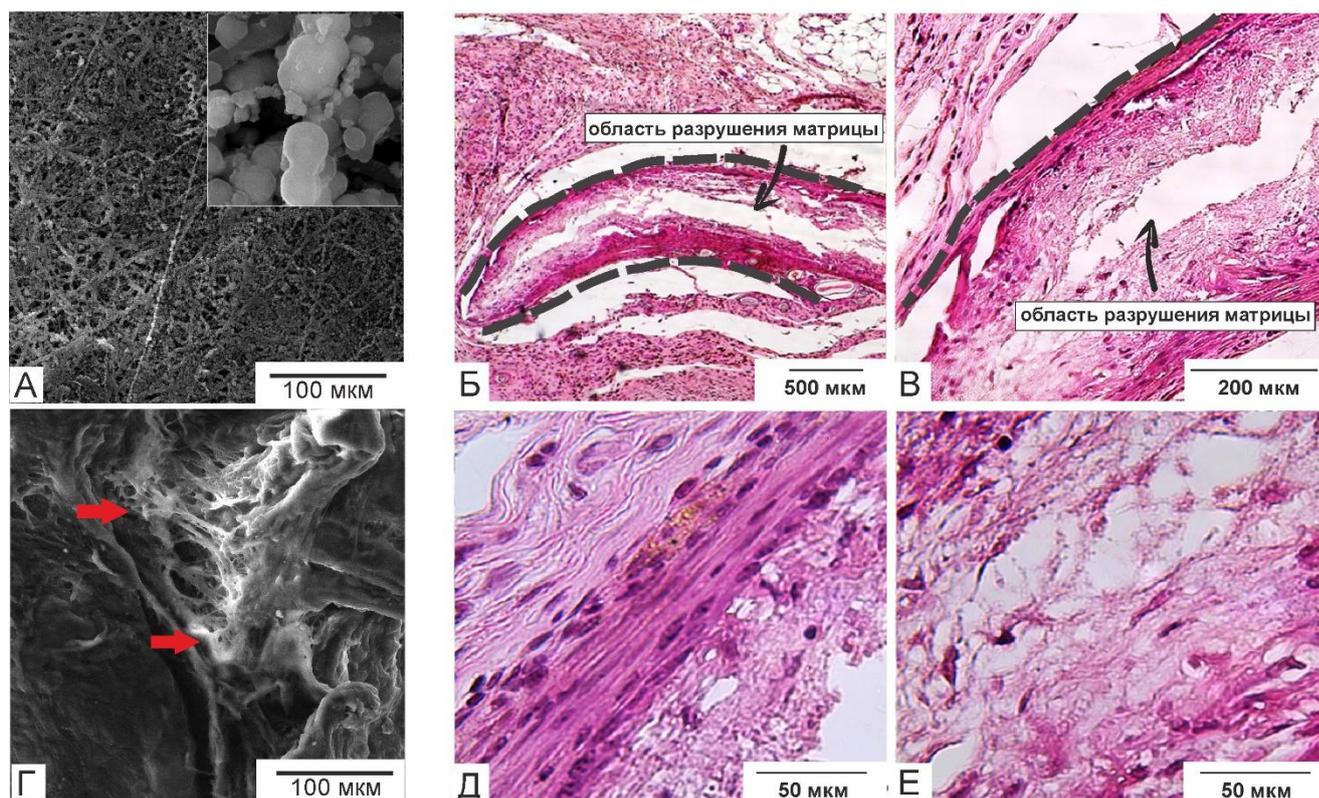


Рисунок 27. СЭМ-изображения однослойной нетканой ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием и иммобилизованной ТК (ПКЛ/CaCO₃/ТК) до подкожной имплантации (А) и извлеченной на 21 день после подкожной имплантации (Г). Красные стрелки указывают на область разрушения матрицы. Оптические изображения гистологических 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.

Колонизация фибробластами и соединительнотканными элементами наблюдалась только на периферических областях однослойной нетканой ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием и иммобилизованной ТК ПКЛ/CaCO₃/ТК (рисунок 27 Д,Е). Центральная область матрицы не содержала кровеносных сосудов (рисунок 27 Д,Е), но при этом не было отмечено инфильтрации матрицы лейкоцитами, что свидетельствует об отсутствии воспалительной реакции тканей. Центральная часть матрицы была разрушена и не содержала клеток (рисунок 27 Б,В,Г).

Анализируя морфологию ПКЛ/CaCO₃/ТК матрицы, извлеченной на 21 день после имплантации (рисунок 27 Г), можно наблюдать плотную субстанцию, представляющую собой скопление фибробластов и элементов соединительной

ткани на поверхности матрицы, как и в случае ПКЛ/ CaCO_3 матрицы. Также выделяется область, в которой нарушена целостность матрицы (отмечено красными стрелками на рисунке 27 Г).

Таким образом, показано, что включение ТК в состав ватеритного покрытия нетканых однослойных ПКЛ-матриц способствовало ингибированию процесса ангиогенеза и снижению интенсивности васкуляризации матрицы. Также было показано значительное уменьшение количества кровоизлияний и степени диапедеза эритроцитов. Эти результаты могут быть обусловлены антиоксидантными свойствами ТК и соответствуют данным, полученным другими авторами, в частности согласуются с результатами исследования эффекта, оказываемого танинами на эндотелиальные клетки *in vitro* [194–196]. Кроме того, результаты, касающиеся ингибирующего влияния ТК на васкуляризацию, согласуются с результатами исследований, выявивших антиангиогенную активность ТК [197].

Полученные результаты исследования демонстрируют перспективы применения ватеритных покрытий в качестве системы для локальной доставки лекарств на базе тканеинженерных конструкций, с одной стороны, а также преимущества использования ТК в тканевой инженерии для регулирования процесса ангиогенеза и васкуляризации, с другой стороны. Особого внимания заслуживает влияние ТК на деградацию матрицы, так как обнаруженные области разрушения матрицы, не характерные для ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 , свидетельствуют об ускорении скорости ее резорбции *in vivo*. Эффект ТК на биodeградацию матрицы нуждается в более подробных исследованиях.

Стоит отметить, что методы иммобилизации, доставки и управляемого высвобождения БАВ, используемых для носителей на основе ватерита, могут быть адаптированы для ПКЛ/ CaCO_3 матриц. В связи с этим такие матрицы могут быть функционализированы лекарственными препаратами, факторами роста и другими биологически активными компонентами, действие которых направлено как на стимуляцию регенерации ткани в области имплантации, так и на оказание

терапевтического эффекта – например, предотвращение воспалительной реакции тканей и отторжения имплантата. Кроме того, процесс трансформации ватерита в кальцит и гидроксиапатит может быть использован как для пролонгированного высвобождения лекарственных средств [191], так и для высвобождения ионов кальция [163], что будет стимулировать метаболическую активность клеток костной ткани остеобластов и формирование костной ткани.

В заключении данной главы можно сделать вывод, что формирование ватеритного покрытия на волокнах однослойной нетканой ПКЛ-матрицы позволяет осуществлять иммобилизацию функциональных БАВ (на примере таниновой кислоты) и их доставку в целевые области с помощью тканеинженерных матриц. 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.

4.4. Выводы к главе 5

Однослойные нетканые ПКЛ-матрицы без и с ватеритным покрытием при подкожной имплантации белым крысам не вызывают воспалительного ответа со стороны прилежащих тканей, колонизируются фибробластами и зарастаются соединительноткаными элементами, что указывает на биосовместимость обоих типов матриц.

Однако, при подкожной имплантации однослойные нетканые ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием наблюдается избыточная васкуляризация и кровоизлияния на границе матрица-ткань. Иммобилизация ТК в такие матрицы купирует кровоизлияния и диапедез эритроцитов при подкожной имплантации белым крысам, тем самым стабилизируя сосудистую систему в области имплантации.

Результаты главы представлены в работах [34,198].

ГЛАВА 5. ИССЛЕДОВАНИЕ БИОЛОГИЧЕСКОЙ РЕАКЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ ПРИ ИМПЛАНТАЦИИ НЕТКАНЫХ ДВУХСЛОЙНЫХ МАТРИЦ С ВАТЕРИТНЫМ ПОКРЫТИЕМ В ДЕФЕКТ БЕДРЕННОЙ КОСТИ

Как было показано в *главе 4*, нетканые однослойные ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием (ПКЛ/ CaCO_3) при подкожной имплантации в область холки белым крысам проявляют свойство биосовместимости, не вызывают воспалительной реакции, колонизируются клетками и элементами соединительной ткани, васкуляризируются. Следующим шагом по исследованию матриксного материала является исследование его влияния на регенерацию костной ткани при имплантации в дефект бедренной кости белых крыс *in vivo*. Для этого были сформированы двухслойные ПКЛ-матрицы на основе нетканой матрицы-субстрата и нетканой тонковолоконной ПКЛ-матрицы. Сочетание в одном матриксном материале двух нетканых ПКЛ-слоев с разным диаметром волокна позволило улучшить их механические свойства по сравнению с тонковолоконной ПКЛ-матрицей. На поверхности волокон двухслойной ПКЛ-матрицы были сформированы ватеритные покрытия. Ранее было показано, что ватерит имеет такие же остеокондуктивные свойства, как гидроксиапатит, который широко используется при создании материалов для восстановления дефектов костной ткани [106,199–201]. Ватерит обладает более высокой реакционной способностью, в силу своей метастабильной структуры, по сравнению с гидроксиапатитом, и, следовательно, способен к более быстрой резорбции в физиологических условиях, в результате чего является более эффективным источником ионов Ca^{2+} . Концентрация катионов Ca^{2+} во внеклеточной жидкости является ключевым биохимическим фактором для метаболической активности остеобластов, поскольку Ca^{2+} принимает непосредственное участие в регуляции процессов связывания лигандов интегринов и, следовательно, влияет на адгезию, пролиферацию и дифференциацию клеток на матрице [165]. Было показано, что повышение локальной концентрации Ca^{2+} приводит к стимуляции указанных процессов для остеобластов, что в свою очередь способствует повышению их

остеогенной активности [164,166]. Более того, ватерит, благодаря высокой степени пористости, может быть использован для иммобилизации и доставки биологически активных веществ. Это обуславливает важность изучения влияния ватерита на процессы остеогенеза и восстановления структурной целостности ткани при имплантации матриц ПКЛ/ CaCO_3 в бедренную кость крысы *in vivo*.

Расшифровка некоторых терминов:

Остеокондукция - способность остеопластического материала играть роль пассивного каркаса (матрикса) для наращивания новой ткани с последующей резорбцией имплантированного графта.

Остеоиндукция - стимуляция недифференцированных клеток к трансформации в остеобласты. Простыми словами, ряд остеопластических материалов способствуют преобразованию клеток организма в зоне регенерации именно в костную ткань, а не в фиброзную или хрящевую.

Остеоинтеграция - анатомическая и функциональная связь между изменяемой живой костной тканью и поверхностью имплантата.

Остеогенез – процесс формирования костной ткани.

Периостальная реакция - ответная реакция надкостницы на внешний раздражающий стимул, в результате которой в ответ на поражение самой костной ткани или окружающих её мягких тканей формируется слой новообразованной костной ткани, прилежащей к надкостнице

Эндостальная реакция - ответная реакция эндоста (слой соединительной ткани, формирующий костномозговой канал в трубчатых костях) на внешний раздражающий стимул, в результате которой в ответ на поражение самой костной ткани или окружающих её мягких тканей формируется слой новообразованной костной ткани во внутренней части кости.

Трабекула - пластинки, перегородки и тонкие элементы из костной ткани, составляющие внутреннее пространство кости.

5.1. Формирование ватеритного покрытия на двухслойных нетканых полимерных матрицах и их характеристика

Получение ватеритного покрытия на двухслойных нетканых полимерных матрицах

Формирование двухслойных матриц проходило послойным электроформованием субмикронной волоконной ПКЛ-матрицы на матрице-субстрате. Схема данного процесса представлена на рисунке 28 А. Полученная двухслойная нетканая полимерная матрица (ПКЛ) представляет собой гибридный материал (рисунок 28 Г), состоящий из двух нетканых ПКЛ-слоев различной толщины (рисунок 28 Б,В) и различающихся диаметром волокна (рисунок 28 Д). Матрица-субстрат имела толщину 1 мм и диаметр волокон 9.7 ± 2.5 мкм, в то время как верхняя тонковолоконная ПКЛ-матрица была толщиной 100 мкм и имела волокна диаметром 0.7 ± 0.3 мкм.

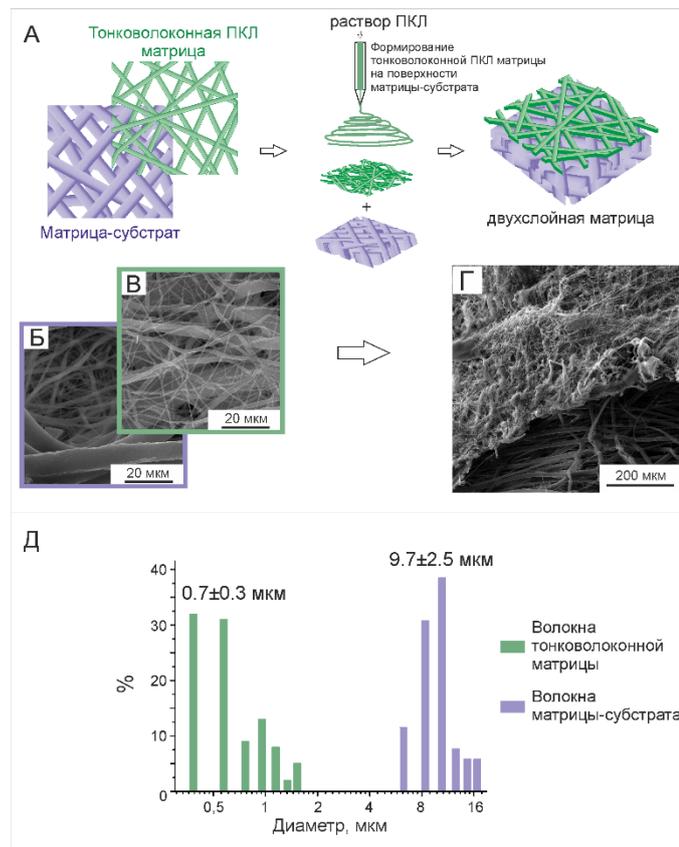


Рисунок 28. Схематическое изображение процесса формирования нетканой двухслойной ПКЛ-матрицы (А). СЭМ-изображения матрицы-субстрата (Б), верхней однослойной ПКЛ-матрицы (В), двухслойная нетканая ПКЛ-матрица (Г). Распределения по размерам волокон матрицы-субстрата и верхней ПКЛ-матрицы (Д).

Далее на полученных двухслойных матрицах методом соосаждения из смеси водных растворов солей CaCl_2 и Na_2CO_3 формировали ватеритное покрытие (рисунок 29 А), как описано в *главе 3*. Было проведено два цикла формирования ватеритного покрытия на матрице. СЭМ-изображение полученной ПКЛ/ CaCO_3 матрицы, представлено на рисунке 29 Б. На данном изображении можно увидеть, что ватеритное покрытие сформировано как единичными сферическими частицами ватерита, так и их агрегатами. Массовая доля полученного ватеритного покрытия составила $18 \pm 1 \%$ (мас.%).

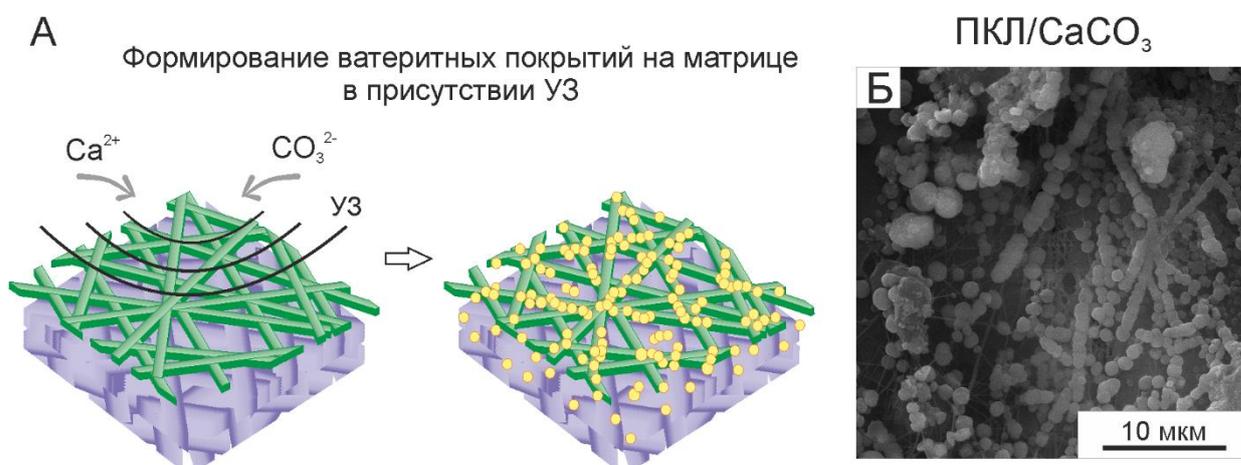


Рисунок 29. Схематическое изображение процесса формирования ватеритного покрытия на двухслойной ПКЛ-матрице (А). СЭМ-изображение поверхности полученной двухслойной матрицы ПКЛ/ CaCO_3 с ватеритным покрытием (Б).

Исследование механических свойств полученных матриц

Был исследован модуль упругости матрицы-субстрата, верхней однослойной ПКЛ-матрицы, двухслойной нетканой ПКЛ-матрицы без и с ватеритным покрытием. Кривые деформации-напряжения показали, что модуль упругости зависит от диаметра волокон, из которых состоит матрица (рисунок 30). При растяжении матрица-субстрат проявила себя как наиболее прочный материал с большой областью пластической деформации, что типично для полимерных материалов. В то время, как тонковолокнистая ПКЛ-матрица выступила как наименее прочный материал. Кривая деформации-напряжения для двухслойной ПКЛ-матрицы продемонстрировала хрупкость данного типа материала, поскольку при достижении предела текучести материал разрушается, и

растяжение прекращается. Однако, стоит отметить, что прочность двухслойной ПКЛ-матрицы оказалась выше, чем у тонковолоконной. Формирование ватеритного покрытия на двухслойной ПКЛ-матрице приводило к ухудшению механических свойств. Это можно объяснить частичным нарушением целостности волокон в местах локализации и/или разрушения CaCO_3 при деформации, где происходит локализация напряжений в полимерном материале [202].

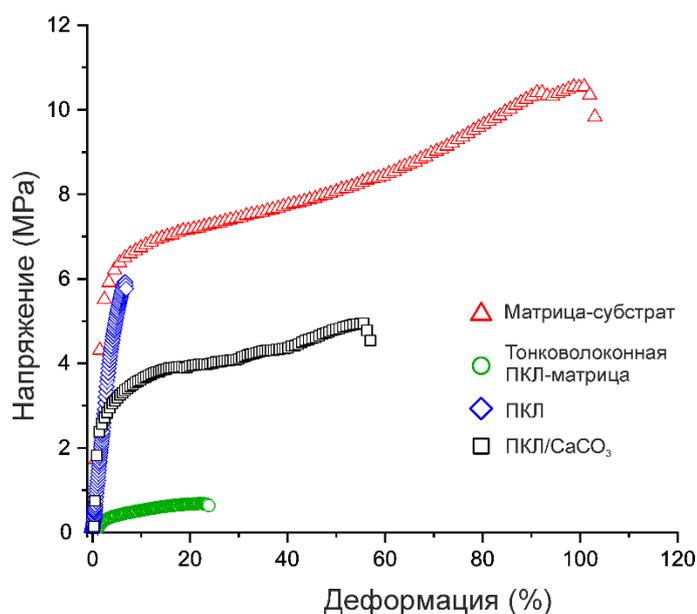


Рисунок 30. Кривые деформации-напряжения матрицы-субстрата, тонковолоконной ПКЛ-матрицы, двухслойной матрицы ПКЛ без ватеритного покрытия и двухслойной матрицы ПКЛ/ CaCO_3 с ватеритным покрытием.

Введение толстоволоконной матрицы-субстрата в структуру матричного материала позволяет добиться повышения значения модуля Юнга по сравнению с однослойными тонковолоконными ПКЛ-матрицами (4.0 ± 1.0 МПа против 0.5 ± 0.1 МПа) (Таблица 7). Формирование ватеритного покрытия на двухслойной матрице ПКЛ/ CaCO_3 приводит к снижению значения модуля Юнга (3.0 ± 0.5 МПа), однако, изменение значения модуля Юнга в данном случае не является значительным.

Таблица 7. Модуль Юнга полученных матриц

Тип матрицы	Матрица-субстрат	Тонковолоконная ПКЛ-матрица	Двухслойная матрица ПКЛ без ватеритного покрытия	Двухслойная матрица ПКЛ/ CaCO_3 с ватеритным покрытием

Модуль Юнга, МПа	6.5±1.5	0.5±0.1	4.0±1.0	3.0±0.5
------------------	---------	---------	---------	---------

Иммобилизация активного фермента в ватеритные покрытия двухслойных

ПКЛ-матриц

Щелочная фосфатаза является одной из основных функциональных биомолекул, экспрессируемых в процессе кальцификации натурального костного матрикса. Это обуславливает решающую роль данного фермента на ранних стадиях минерализации. Следовательно, использование ЩФ в качестве стимулирующего биохимического фактора в составе матриксного материала представляет многообещающую перспективу для стимуляции регенерации костной ткани с помощью тканеинженерных матриц [203,204]. Направленная доставка ЩФ в костную ткань *in vivo* и ее влияние на процесс остеогенеза пока еще не были достаточно изучены. Таким образом, данное исследование представляет собой первую попытку адресной доставки ЩФ с использованием нетканых композитных матриц ПКЛ/CaCO₃ в дефект кости и, более того, первое подробное исследование стимуляции остеогенеза в бедренной кости *in vivo* на основе морфологического анализа тканей области имплантации.

Иммобилизация активного фермента ЩФ в матрицу осуществлялась путем адсорбции молекул ЩФ на пористой поверхности ватеритных покрытий, сформированных на двухслойных нетканых ПКЛ-матрицах и представленных на рисунке 29 Б. Схема процесса иммобилизации приведена на рисунке 31 А. Введение ЩФ не оказало существенного влияния на морфологию поверхности матрицы (рисунок 31 Б). Ёмкость иммобилизации активного фермента ЩФ в матрицу ПКЛ/CaCO₃/ЩФ составила 6.0 ± 0.1 (мас.%). Таким образом, в двухслойной матрице ПКЛ/CaCO₃/ЩФ размером 1 см × 1 см и массой 10 мг содержится 0.6 мг активного фермента ЩФ.

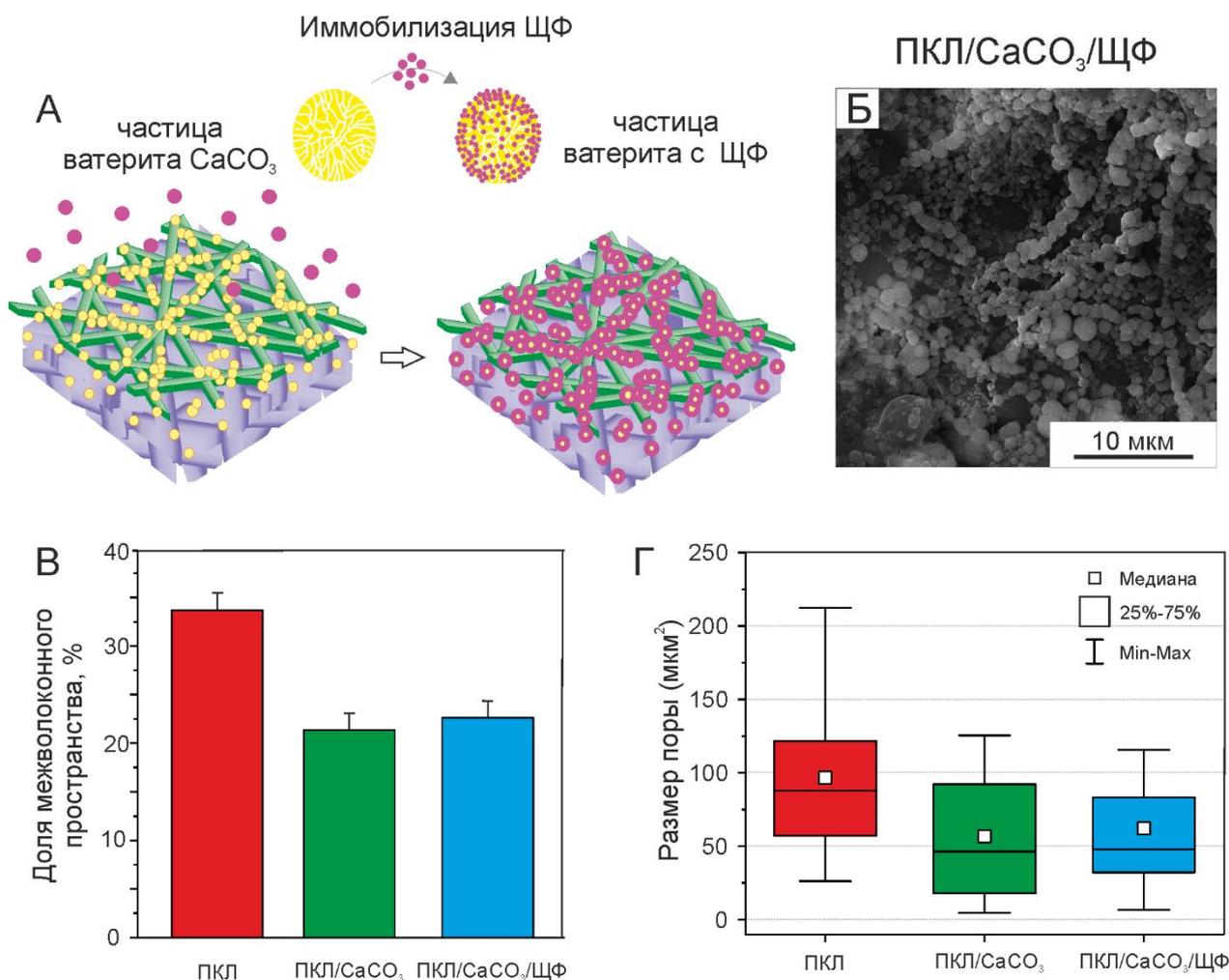


Рисунок 31. Схематическое изображение процесса иммобилизации ЩФ в двухслойную ПКЛ-матрицу с ватеритным покрытием (А). СЭМ-изображение поверхности двухслойной матрицы с ватеритным покрытием и иммобилизованной ЩФ (ПКЛ/ CaCO_3 /ЩФ) (Б). Доля, приходящаяся на межволоконное пространство, (В) и размер пор на поверхности (Г) двухслойной матрицы ПКЛ, двухслойной матрицы с ватеритным покрытием ПКЛ/ CaCO_3 и двухслойной матрицы с ватеритным покрытием и иммобилизованной ЩФ ПКЛ/ CaCO_3 /ЩФ.

Формирование ватеритного покрытия на волокнах двухслойной матрицы привело к уменьшению доли межволоконного пространства внешнего слоя матрицы (тонковолокнистой ПКЛ-матрицы) более, чем на 10% (рисунок 31 В). Так, межволоконное пространство внешнего слоя для ПКЛ-матрицы составляет 33.7 %, для ПКЛ/ CaCO_3 матрицы – 21.36 %, для ПКЛ/ CaCO_3 /ЩФ матрицы – 22.64 %. Средний размер пор внешнего слоя двухслойной матрицы (тонковолокнистая ПКЛ-матрица) также уменьшился после формирования

ватеритного покрытия (96.5 мкм^2 для ПКЛ, 57 мкм^2 для ПКЛ/ CaCO_3 , 63 мкм^2 для ПКЛ/ CaCO_3 /ЩФ) (рисунок 31 Г).

Процесс высвобождения БАВ из тканеинженерных матриксных материалов является важной характеристикой, определяющей их терапевтическую эффективность и влияние на биологическую реакцию со стороны тканей организма. В связи с этим, было проведено исследование кинетики высвобождения активной ЩФ из полученных ПКЛ/ CaCO_3 /ЩФ матриц в деионизованной воде, результаты которой представлены на рисунке 32. Масса высвобожденной активной ЩФ во времени определялась с помощью ферментативной реакции с П-нитрофенилфосфатом. Кинетическая кривая высвобождения достигала насыщения через 96 ч инкубации (рисунок 32 А), при этом количество высвобожденной активной ЩФ не превышало 22%. Такой невысокий процент может быть объяснен частичной потерей активности фермента ЩФ за время инкубации.

Процесс перекристаллизации ватеритного покрытия двухслойной матрицы ПКЛ/ CaCO_3 /ЩФ начинается сразу с момента ее инкубации в деионизованной воде, о чем свидетельствует появление первых кристаллов кальцита уже через 3 ч после начала эксперимента (рисунок 32 Б, «3 ч»). Фаза кальцита начинает преобладать через 24 ч (рисунок 32 Б, «24 ч»); спустя 48 ч кальцит полностью заменил ватерит в покрытии волокон двухслойной матрицы (рисунок 32 Б, «48 ч»). Это согласуется с данными исследования кинетики высвобождения ЩФ из матриц, поскольку кривая зависимости массы высвободившегося активного фермента от времени начинает достигать насыщения через 48 ч (рисунок 32 А), что свидетельствует о высвобождении остатка активной ЩФ из CaCO_3 . Известно, что высвобождение иммобилизованного вещества из пористого ватерита происходит в процессе полиморфного перехода, сопровождаемого высвобождением молекул этого вещества из пор ватерита во время процесса перекристаллизации CaCO_3 [100,163].

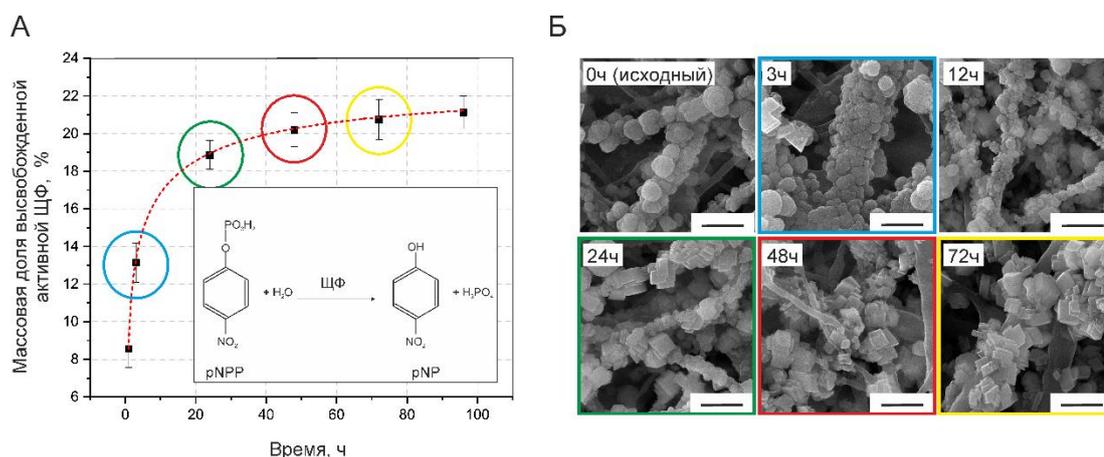


Рисунок 32. Кинетика высвобождения ЩФ из матрицы ПКЛ/CaCO₃/ЩФ в деионизованной воде; схема ферментативной реакции (на вставке) (А). СЭМ-изображения матриц ПКЛ/CaCO₃/ЩФ в процессе инкубации в деионизованной воде в течение 0, 3, 12, 24, 48 и 72 ч. Масштабный отрезок составляет 2 мкм (Б).

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

$$C = A(1 - e^{-k(t-t_c)^d}), \quad (20)$$

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 8 приведены параметры, полученные при аппроксимации. Значение параметра $d = 0.33$ указывает на то, что механизм высвобождения ЩФ из матрицы ПКЛ/CaCO₃/ЩФ в деионизированной воде подчиняется закону диффузии Фика.

Таблица 8. Параметры уравнения Вейбулла, полученные при аппроксимации экспериментальных данных высвобождения ЩФ

A	k	d	t_c
22.24	0.29	0.33	0.63

5.2. Изучение биосовместимости двухслойных ПКЛ-матриц

Добавление толстоволоконного слоя к тонковолоконной ПКЛ-матрице позволило улучшить ее механические свойства и, таким образом, выполнить необходимое условие для формирования нетканого матриксного материала, предназначенного для имплантации в костную ткань. Перед исследованием влияния ватеритного покрытия, сформированного на волокнах такой двухслойной матрицы, на биологическую реакцию костной ткани, возникающую в ответ на ее имплантацию, необходимо было оценить биосовместимость данного гибридного материала *in vivo*.

Оценка биосовместимости проводилась для всех составляющих элементов двухслойной ПКЛ-матрицы без ватеритного покрытия при подкожной имплантации белым крысам. С этой целью животным в область холки имплантировали тонковолоконную ПКЛ-матрицу (диаметр волокон 0.7 ± 0.3 мкм), толстоволоконную матрицу-субстрат и двухслойный ПКЛ-материал, содержащий в себе обе данных матрицы. Через 21 день ткани, содержащие матрицы, были извлечены из области имплантации. Было проведено гистологическое исследование срезов данных тканей, результаты представлены на рисунке 33.

Тонковолоконная ПКЛ-матрица имела высокую степень биосовместимости, однако легко сминалась, как это видно на рисунке 33 А. Это указывает на низкую устойчивость к деформации и подтверждает ранее сделанный вывод (*пункт 5.1*) о необходимости улучшения механических свойств таких нетканых ПКЛ-матриц для дальнейшей имплантации в костную ткань.

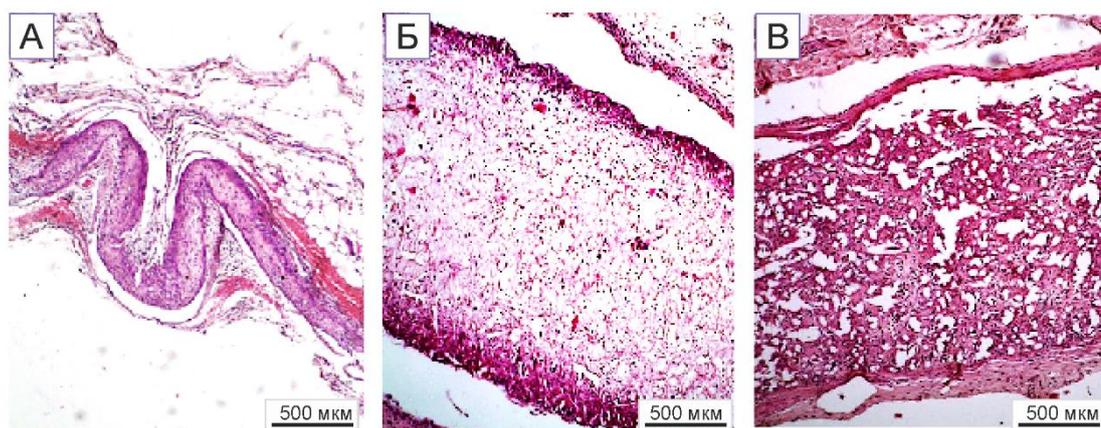


Рисунок 33. Оптические изображения гистологических срезов мягких тканей с имплантированной тонковолоконной ПКЛ-матрицей (А), толстоволоконной матрицей-субстратом (Б) и двухслойной ПКЛ-матрицей (В) без ватеритного покрытия после 21-дневного периода подкожной имплантации в область холки белых крыс. Окраска срезов: гематоксилин-эозин.

Использование толстоволоконной матрицы-субстрата представлялось в данном случае логичным решением, поскольку она обладает большим значением модуля Юнга, по сравнению с тонковолоконной ПКЛ-матрицей, благодаря чему, при подкожной имплантации она сохранила свою форму (рисунок 30). Однако оценка биосовместимости матрицы-субстрата при подкожной имплантации выявила большое количество крупных гигантских многоядерных клеток в матрице и периферийной области (рисунок 33 Б), чего не наблюдалось в случае имплантации тонковолоконной ПКЛ-матрицы. Можно предположить, что структура матрицы-субстрата с волокнами микронного размера и крупными порами стимулирует выраженную воспалительную реакцию в ответ на имплантацию, что приводит к образованию выраженной гигантоклеточной гранулёмы. В литературе имеются данные, что характерные структурные параметры матрицы, включая форму и размер пор, а также степень пористости, входят в число ключевых биофизических факторов, определяющих биологическую реакцию тканей в ответ на имплантацию данной матрицы и эволюции тканей в области имплантации [205,206].

Формирование тонковолоконного слоя на матрице-субстрате позволило избежать появления гигантских многоядерных клеток (рисунок 33 В) и, тем

самым, повысить ее биосовместимость. Несмотря на то, что модуль Юнга двухслойной ПКЛ-матрицы был ниже, чем у матрицы-субстрата (в 1.6 раз), он, однако, значительно превосходил значение, полученное для тонковолоконной матрицы (в 8 раз). В связи с этим, двухслойная ПКЛ-матрица не деформировалась при подкожной имплантации.

Таким образом, продемонстрировано, что комбинация двух нетканых слоев с двумя различными размерами волокон позволяет достичь сочетания достаточной механической прочности и биосовместимости, что обеспечивает положительную реакцию со стороны тканей организма при имплантации. В связи с этим, двухслойные ПКЛ-матрицы были использованы далее при имплантации в дефект бедренной кости для оценки остеогенного потенциала ватеритного покрытия.

5.3. Изучение биологической реакции тканей в ответ на имплантацию двухслойных ПКЛ-матриц в дефект бедренной кости

Следующим этапом работы являлось изучение влияния ватеритного покрытия, сформированного на волокнах нетканной двухслойной ПКЛ-матрицы, на биологическую реакцию костной ткани *in vivo*. С этой целью было проведено сравнительное исследование, включающее имплантацию нескольких типов матриц в бедренную кость белых крыс, а именно: двухслойной ПКЛ-матрицы ПКЛ без ватеритного покрытия (ПКЛ), двухслойной матрицы с ватеритным покрытием (ПКЛ/CaCO₃), а также двухслойной матрицы с ватеритным покрытием и иммобилизованной ЩФ (ПКЛ/CaCO₃/ЩФ). Также, для полной всесторонней оценки влияния матриц на процесс регенерации костной ткани, были выполнены ложная имплантация (формирование дефекта без имплантации) и негативный контроль (имплантация двухслойной ПКЛ-матрицы с бактериальными липополисахаридами, ПКЛ/ЛПС). На 28-й день после имплантации были исследованы поперечные срезы бедренной кости, содержащие матриксный материал. Дефект в виде пропиленного узкого отверстия в кортикальной пластине

отчетливо виден на оптических изображениях и СЭМ-изображениях гистологических препаратов поперечных срезов бедренной кости (рисунки 34-38).

5.3.1. *Группа сравнения: ложная имплантация*

Ложная имплантация, представляющая собой формирование дефекта бедренной кости без последующей имплантации матриксного материала, осуществлялась как контроль процесса остеогенеза, который затем использовался для сравнения с остеогенезом в экспериментальных группах, где выполнялась имплантация материала. Было отмечено, что образование дефекта в бедренной кости у крыс индуцирует регенеративные процессы, которые проявляются к 28-му дню с образованием мягкой костной мозоли (рисунок 34 А-В). У всех животных в группе с ложной имплантацией был сформирован регенерат в области дефекта в кости (рисунок 34), состоящий из соединительной и хрящевой тканей. Местная периостальная реакция наблюдалась у всех животных данной группы. Также в 40% случаев была обнаружена эндостальная реакция.

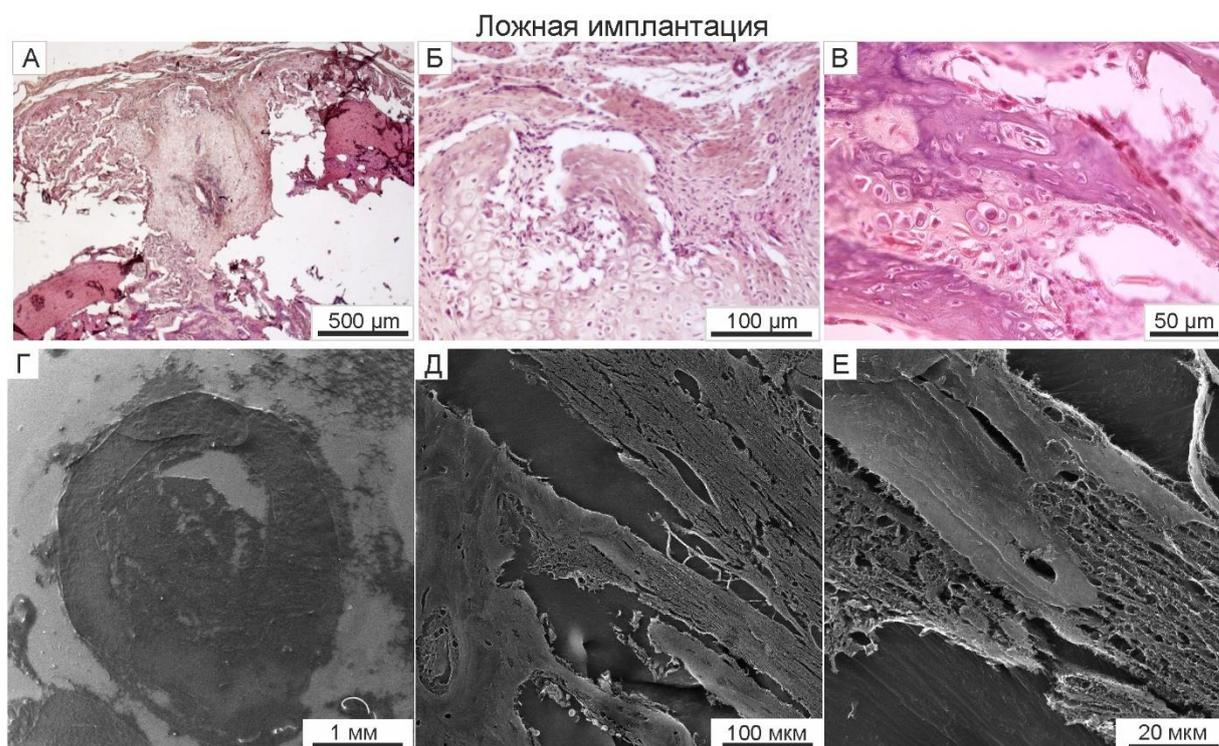


Рисунок 34. Оптические (А-В) и СЭМ-изображения (Г-Д) поперечных срезов бедренной кости с ложной имплантацией на 28-е сутки после имплантации, полученные при различно умвеличении. Окраска срезов: гематоксилин-эозин.

Согласно литературным данным, активация ангиогенеза предшествует остеогенезу [207,208]. Ангиогенез играет решающую роль в восстановлении структурно-функциональной целостности костной ткани и восстановлении гомеостаза. Все этапы восстановления, включая формирование новой костной ткани, ремоделирование и восстановление дефектов, включает взаимную активацию и сложное взаимодействие между ангиогенными и остеогенными процессами. Следовательно, стимуляция и поддержка достаточной степени васкуляризации матриксного материала является первостепенной задачей в инженерии костной ткани; в противном случае нарушение васкуляризации приводит к нарушению и подавлению остеогенеза и отторжению имплантата [208].

Остеобласты – клетки, продуцирующие композитный костный матрикс и отвечающие за общий процесс формирования костной ткани. Следовательно, повышение их активности свидетельствует об интенсивном протекании процесса образования новой костной ткани и минерализации. В случае ложной имплантации процесс минерализации демонстрирует умеренный характер, что морфологически выражается в присутствии костной ткани в пери- и эндостальных областях в то время, как соединительная и хрящевая ткань преобладает в новообразованных тканях (рисунок 34 А-В). Наличие хрящевой ткани в новообразованном регенерате при поврежденном диафизе свидетельствует о дефиците кровоснабжения в этой области [209]. Таким образом, подтверждается концепция критического значения ангиогенеза и ремоделирования сосудистой системы для нормального протекания регенерационных процессов в костной ткани [210].

5.3.2. Имплантация двухслойной ПКЛ-матрицы, содержащей бактериальные липополисахариды, в дефект бедренной кости

Группа негативного контроля демонстрирует заранее известную ярко выраженную воспалительную реакцию в ответ на имплантацию матриксного материала, содержащего бактериальные липополисахариды, наряду с высокой степенью лейкоцитарной инфильтрации самого материала и перифокальных

тканей (рисунок 35 А-В). Полученные данные коррелируют с результатами наших предыдущих исследований, связанных с имплантацией небиосовместимых матриц с адсорбированным иммуногенным белком (овальбумином) (см. глава 4).

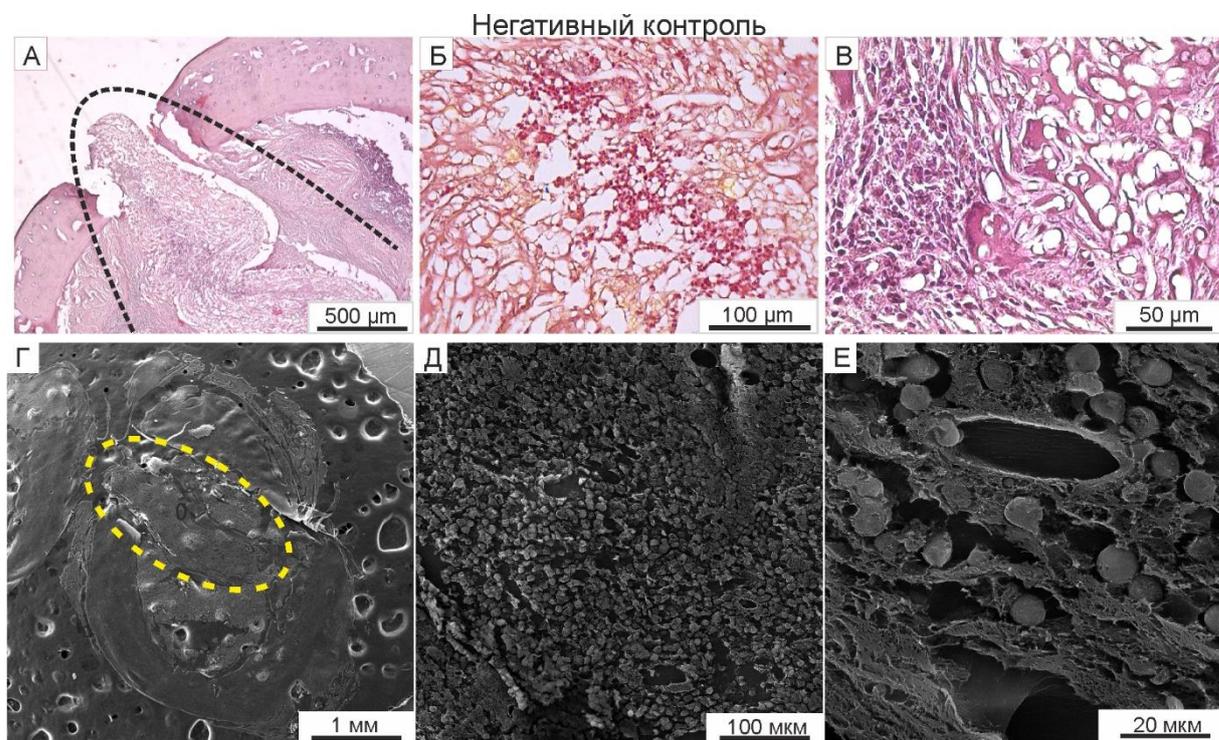


Рисунок 35. Оптические (А-В) и СЭМ-изображения (Г-Е) поперечных срезов бедренной кости с имплантированной ПКЛ/ЛПС матрицей на 28-е сутки после имплантации в бедренную кость белой крысы, полученные при различном увеличении. Черные пунктирные линии на А обозначают имплантированную матрицу. Окраска срезов: гематоксилин-эозин.

У всех животных группы отрицательного контроля наблюдалась выраженная периостальная реакция (25% – локально в области дефекта, 75% – в области диафиза), которая сопровождалась эндостальной реакцией, приводящей к образованию костных трабекул вокруг двухслойной ПКЛ/ЛПС матрицы в 50% случаев (рисунок 35 А-В). У 75% животных из этой группы наблюдалось разрастание соединительной ткани вокруг матрицы, которая имела высокую степень васкуляризации и инфильтрации лейкоцитами и лимфоцитами. Состав клеточных популяций, колонизировавших двухслойную ПКЛ/ЛПС матрицу, представлен нейтрофилами, многочисленными гигантскими многоядерными клетками, лежащими отдельно и небольшими группами (таблица 8), а также фибробластами. На некоторых участках матрицы не было обнаружено клеточных

элементов, отмечалось их покрытие оксифильной однородной массой. В некоторых периферических частях ПКЛ/ЛПС матрицы были обнаружены элементы красного костного мозга. Признаков васкуляризации и остеогенеза в матрице не наблюдалось.

Инфильтрация нейтрофилами данных двухслойных нетканых матриц, содержащих бактериальные липополисахариды, (ПКЛ/ЛПС) указывает на острую воспалительную реакцию. Воспалительная реакция приводила к подавлению процесса васкуляризации, в то время как грануляционная ткань разрасталась, что привело к образованию ограничивающего барьера (рисунок 35 А). Очевидно, что эти процессы указывают на плохую биосовместимость имплантационных матричных материалов. Такие небюсовместимые матрицы не оказывают стимулирующего действия на остеогенез, что морфологически проявляется в отсутствии трабекул внутри ПКЛ/ЛПС матрицы и полном отсутствии ее остеоинтеграции с краями кортикального дефекта.

5.3.3. Имплантация двухслойной ПКЛ-матрицы без ватеритного покрытия в дефект бедренной кости

Гистологические срезы костной ткани с двухслойной матрицей без ватеритного покрытия (ПКЛ) представлены на рисунок 36 А-В. Данная матрица показала низкую степень остеоинтеграции с краями дефекта кортикальной пластины; в одном из случаев (вероятность события оставила 12%) матрица была смещена в полость костного мозга (рисунок 36 А). Структурная целостность ПКЛ-матрицы не была нарушена. Наблюдались единичные, в основном изолированные, костные трабекулы, расположенные по периферии и внутри самой матрицы (рисунок 36 Б,В). Некоторые трабекулы анастомозировали друг с другом, что выражалось в уменьшении минимального расстояния между матрицей и прилежащими трабекулами. Костные трабекулы имели разную степень зрелости. Степень заполнения двухслойной ПКЛ-матрицы новой образованной костной тканью составляла 17.5% (таблица 9). В промежутках между трабекулами наблюдались участки с клетками соединительной ткани. Следовательно, наличие новообразованных трабекул в самой матрице

подтверждает способность матрицы поддерживать пролиферацию остеобластов *in vivo* (рисунок 36 А-В), что согласуется с данными предыдущих исследований [211]. Кроме того, в двухслойной ПКЛ-матрице и прилежащих тканях не наблюдалось инфильтрации лейкоцитов, также не было обнаружено признаков воспалительных процессов (таблица 9).

Таким образом, двухслойные ПКЛ-матрицы без ватеритного покрытия продемонстрировали высокую степень биосовместимости при имплантации в костную ткань, что выражалось отсутствием явных признаков воспаления и инкапсуляции матриц соединительной тканью. Значительных различий в ангиогенной активности после имплантации таких матриц, по сравнению с ложной имплантацией, не отмечалось. Отсутствие кровенаполненных сосудов через 28 дней после имплантации также указывает на хорошую биосовместимость двухслойных ПКЛ-матриц.

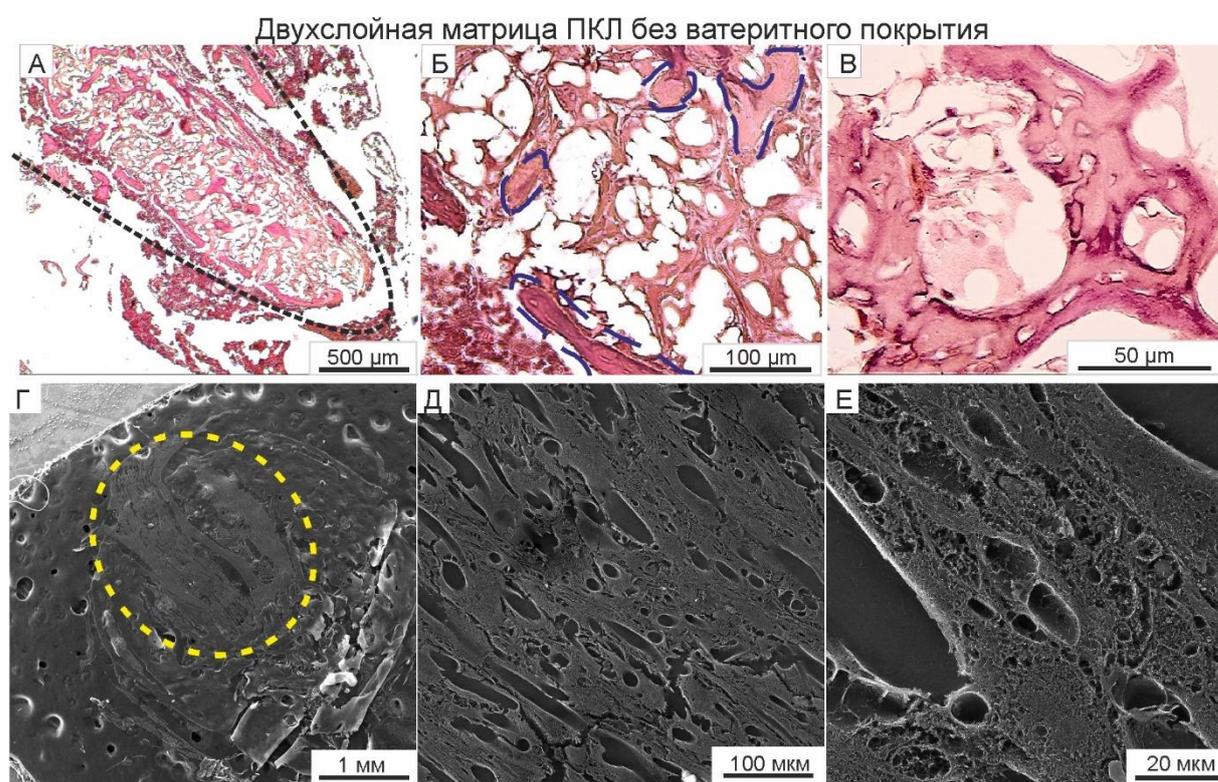


Рисунок 36. Оптические (А-В) и СЭМ-изображения (Г-Е) изображения поперечных срезов бедренной кости с двухслойной ПКЛ-матрицей без ватеритного покрытия на 28-е сутки после имплантации в бедренную кость белой крысы, полученные при различном увеличении. Черные пунктирные линии на А обозначают имплантированную матрицу. Синие пунктирные линии на Б

указывают на области новой костной ткани (костных трабекул). Окраска срезов: гематоксилин-эозин.

На СЭМ-изображениях срезов бедренной кости с имплантированными двухслойными матрицами ПКЛ без ватеритного покрытия можно также видеть новую образованную костную ткань с морфологией, демонстрирующей структуру с высокой степенью пористости, прорастающей через поры матрицы и окружающей ее волокна (рисунок 36 Д,Е). Округлые полости диаметром около 10 мкм, наблюдаемые в области матрицы, очевидно, остались после растворения полимерных волокон матрицы, произошедшего во время проводки гистологического материала.

Однако, морфологический анализ выявил низкую степень остеоинтеграции матрицы с краями дефекта в кортикальной пластине (рисунок 36 А-В). Кроме того, количество новообразованных трабекул в матрице оказалось небольшим. Иными словами, двухслойная ПКЛ-матрица без ватеритного покрытия не оказала стимулирующего действия на остеогенез. Таким образом, остеоиндуктивные свойства таких матриц требовали дальнейшего улучшения.

5.3.4. Имплантация двухслойной ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием в дефект бедренной кости

Гистологические срезы тканей, содержащих имплантированную двухслойную ПКЛ-матрицу с ватеритным покрытием (ПКЛ/ CaCO_3), представлены на рисунке 37 А-В. Местная периостальная реакция наблюдалась только у 12% животных этой группы. Матрица ПКЛ/ CaCO_3 была соединена костными трабекулами с краями дефекта кортикальной пластины (рисунок 37 А). Остеоинтеграция с одним из краев дефекта была обнаружена в 50% случаев, остеоинтеграция с обоими краями – в остальных 50% случаев. Наблюдались множественные костные трабекулы разной степени зрелости (с оксифильной и базофильной окраской). Костные трабекулы были расположены по периферии ПКЛ/ CaCO_3 матрицы и анастомозировали с трабекулами, расположенными внутри матрицы (рисунок 37 Б,В). Минимальное расстояние между матрицей и

прилежащими трабекулами было значительно меньше, чем это наблюдалось при имплантации двухслойной ПКЛ-матрицы без ватеритного покрытия, что свидетельствует о более высокой степени остеоинтеграции (таблица 9). Следует отметить, что ПКЛ/ CaCO_3 матрица содержала большее количество зон с новой образованной костной тканью, по сравнению с матрицей без покрытия. Степень заполнения новой образованной костной тканью ПКЛ/ CaCO_3 матрицы с ватеритным покрытием составила 37% (таблица 9). Пространства между трабекулами в некоторых видимых областях ПКЛ/ CaCO_3 матрицы были колонизированы небольшим количеством фибробластов и фибробластических элементов. Среди соединительнотканых элементов матрицы с ватеритным покрытием были обнаружены единичные гигантские многоядерные клетки (таблица 9). СЭМ-изображения срезов бедренной кости с имплантированной двухслойной матрицей с ватеритным покрытием (рисунок 37 Г-Е) демонстрируют ту же высокопористую морфологию новой образованной костной ткани, что наблюдалась при имплантации матрицы без ватеритного покрытия.

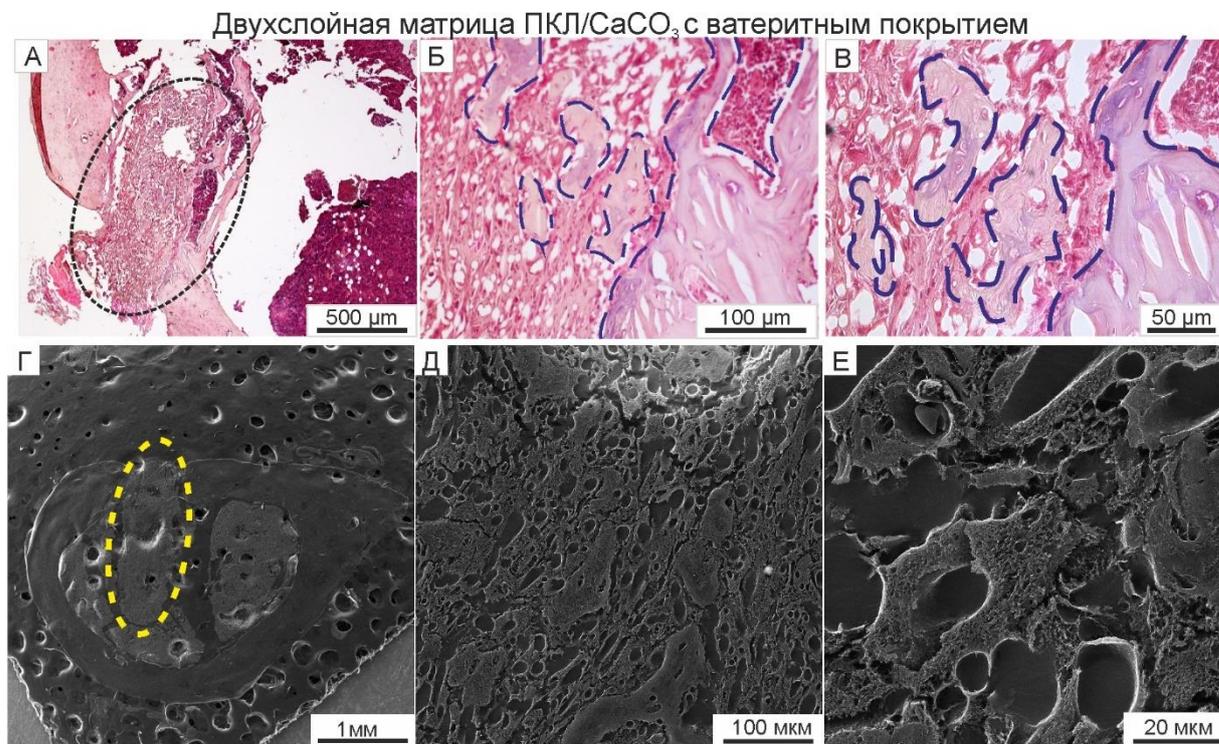


Рисунок 37. Оптические (А-В) и СЭМ-изображения (Г-Е) изображения поперечных срезов бедренной кости с двухслойной ПКЛ-матрицей с ватеритным покрытием (ПКЛ/ CaCO_3) на 28-е сутки после имплантации в бедренную кость белой крысы, полученные при различном увеличении. Черные пунктирные линии

на **A** обозначают имплантированную матрицу. Синие пунктирные линии на **B** и **B** указывают на области новой костной ткани (костных трабекул). Области пурпурного цвета (обозначенные синими пунктирными линиями) обозначают зрелые костные трабекулы. Окраска срезов: гематоксилин-эозин.

Присутствие минеральной фазы (в нашем случае – ватеритного покрытия) в матрицах имеет большое значение при разработке матричных материалов для регенерации костей, поскольку межклеточное вещество в костной ткани содержит большой процент неорганической фазы. Доступность ионов Ca^{2+} очень важна для метаболизма остеобластов и способствует образованию новой костной ткани [198,212,213]. В то же время модификация поверхности матриц биоактивными неорганическими покрытиями, особенно пористым ватеритом, увеличивает шероховатость и площадь поверхности, что, таким образом создает биофизическую стимуляцию для адсорбции сигнальных протеинов, и, следовательно, адгезии и пролиферации клеток [214]. Полученные результаты показали, что формирование ватеритного покрытия на волокнах двухслойной ПКЛ-матрицы не оказывает отрицательного влияния на биосовместимость, но при этом значительно повышает остеоиндуктивность матрицы. Интенсивное образование трабекул в ПКЛ/ CaCO_3 матрице, а также эффективная остеointеграция матрицы с краями дефекта в кортикальной пластине свидетельствуют о высокой остеоиндуктивности такой матрицы и успешности протекания процесса остеогенеза, что обусловлено присутствием ватерита как эффективного биофизического и биохимического фактора (рисунок 37). Улучшение остеоиндуктивных свойств двухслойных ПКЛ-матриц при формировании ватеритного покрытия можно объяснить ранее описанной способностью ватерита повышать степень адгезии, пролиферации и дифференциации остеобластов [215,216].

5.3.5. Имплантация двухслойной ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием и иммобилизованной ЩФ в дефект бедренной кости

Гистологические срезы тканей, содержащих имплантированную двухслойную матрицу с ватеритным покрытием и иммобилизованной ЩФ

(ПКЛ/СаСО₃/ЩФ) представлены на рисунке 38 А-В. Видно, что имплантированная ПКЛ/СаСО₃/ЩФ матрица была расположена в зоне дефекта кортикальной пластины, плотно прилегала к краям дефекта за счет образования новой костной ткани у всех животных этой группы (рисунок 38 А,Б). Большое количество костных трабекул разной степени зрелости наблюдалось как в самой матрице, так и на её периферии. Костные трабекулы анастомозировали между собой. Расстояние между матрицей и прилежащими трабекулами в данном случае было минимальным, по сравнению с другими экспериментальными группами (таблица 9). Некоторые трабекулы не имели четких границ, что свидетельствовало об их незрелости. Между костными трабекулами наблюдались тонкие прослойки соединительной ткани. Одиночные гигантские многоядерные клетки были видны в слоях соединительной ткани (таблица 9).

Двухслойная матрица ПКЛ/СаСО₃/ЩФ с ватеритным покрытием и иммобилизованной ЩФ

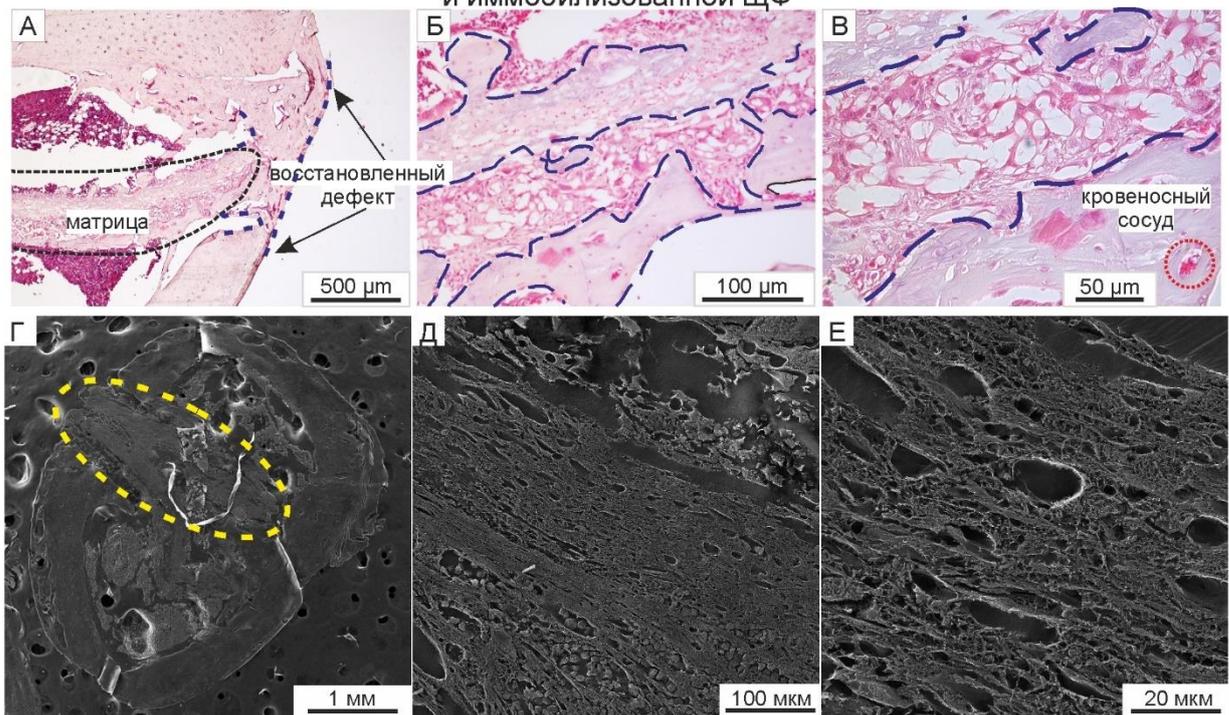


Рисунок 38. Оптические (А-В) и СЭМ-изображения (Г-Е) изображения поперечных срезов бедренной кости с двухслойной матрицей с ватеритным покрытием и иммобилизованной ЩФ (ПКЛ/СаСО₃/ЩФ) на 28-е сутки после имплантации в бедренную кость белой крысы, полученные при различном увеличении. Черные пунктирные линии на А обозначают имплантированную матрицу. Синие пунктирные линии на Б и В указывают на области новой костной ткани (костных трабекул). Области пурпурного цвета (обозначенные синими пунктирными линиями) обозначают зрелые костные трабекулы. Красная

пунктирная линия на изображении **В** указывает на кровеносный сосуд в полости костных трабекул. Окраска срезов: гематоксилин-эозин.

В случае двухслойной матрицы с ватеритным покрытием и иммобилизованной ЩФ отмечалась наибольшая степень минерализации матрицы и образования новой костной ткани. Степень заполнения матрицы новой образованной костной тканью составила 63% (таблица 9). Отверстие в кортикальной пластине, представляющее собой дефект, в который была имплантирована ПКЛ/СаСО₃/ЩФ матрица, было восстановлено и полностью закрыто новой костной тканью в 75% случаев (рисунок 38 А-В). Новосформированные кровеносные сосуды можно было наблюдать в полостях (рисунок 38 В) костных трабекул, что свидетельствует о продолжающемся процессе ангиогенеза.

СЭМ-изображения срезов бедренной кости с имплантированной ПКЛ/СаСО₃/ЩФ матрицей (рисунок 38 Г-Е) продемонстрировали такую же высокопористую морфологию новой образованной костной ткани, как наблюдалось при имплантации ПКЛ/СаСО₃ матрицы, однако количество полостей, оставшихся после растворения волокон матрицы, заметно уменьшилось.

Высокая степень биосовместимости матриц с ватеритным покрытием и иммобилизованной ЩФ и отсутствие патогенного воздействия на ферментативный гомеостаз также были продемонстрированы в ходе тестов на подкожную имплантацию и костную имплантацию, проведенных ранее в исследованиях [217,218]. Отсутствие негативных системных эффектов от присутствия ЩФ позволяет предположить, что ПКЛ/СаСО₃/ЩФ матрицы безопасны для применения при стимуляции регенерации скелетной ткани. Наиболее благоприятным действием ЩФ в составе двухслойной матрицы с ватеритным покрытием (ПКЛ/СаСО₃/ЩФ) является значительное повышение интенсивности остеогенеза в дефекте, проявляющееся в заполнении 63% площади матрицы новой костной тканью (таблица 9), а также значительное повышение

степени ее остеоинтеграции. Стоит отметить, что остеоинтеграция ПКЛ/ CaCO_3 /ЩФ матрицы с краями дефекта в кортикальной пластине оказалась максимальной (рисунок 38 А,Б), по сравнению со всеми другими типами матриц, имплантированных в ходе данного диссертационного исследования. В некоторых случаях остеоинтеграция была настолько эффективной, что дефект в кортикальной пластине оказывался полностью закрытым на 28-й день после имплантации, что доказывает высокий регенеративный потенциал этого типа матриц и подтверждает перспективность их применения в качестве матричных материалов для тканевой инженерии, способных инициировать необходимую биологическую реакцию тканей, направленных на регенерацию костного аппарата.

Таблица 9. Количественная оценка морфологических характеристик биосовместимости, остеоиндуктивности и остеоинтеграции имплантированных двухслойных ПКЛ-матриц в дефект бедренной кости.

Тип матрицы	Группа отрицательного контроля (n =8)	ПКЛ (n=8)	ПКЛ/ CaCO_3 (n=8)	ПКЛ/ CaCO_3 /ЩФ (n=8)
Количество полиморфноядерных лейкоцитов, шт.	48 (15; 63)	0* (0; 2)	0* (0; 1)	0* (0; 2)
Количество гигантских многоядерных клеток, шт.	4 (2; 7)	0* (0; 1)	1* (0; 2)	1 * (0; 1)
Минимальное расстояние между границей матрицы и прилегающими костными трабекулами, мкм	38 (32; 61)	22* (14; 26)	13 * (2; 18)	10* (0; 14)
Доля новой сформированной костной ткани в матрице, %	0	17.5	37.0	63.0

Примечания: звездочка * указывает на значения, имеющие статистически значимое различие ($p < 0.05$), по сравнению со значениями группы отрицательного контроля (ПКЛ/ЛПС). Данные по количеству клеток (полиморфноядерные лейкоциты и гигантские многоядерные клетки) и минимальное значение расстояния между границей матрицы и прилежащими костными трабекулами представлены в виде медианы и межквартильного размаха.

5.4. Выводы к главе 5

Сформированы гибридные двухслойные нетканые матрицы, состоящие из матрицы-субстрата и тонковолоконной ПКЛ-матрицы, сочетающие в себе хорошую устойчивость к деформации и высокую биосовместимость. Модуль Юнга полученного матричного материала был ниже, чем у матрицы-субстрата (6.5 ± 1.5 МПа), однако значительно превышал значение, полученное для однослойной тонковолоконной ПКЛ-матрицы (0.5 ± 0.1 МПа), и составил 4.0 ± 1.0 МПа. При этом двухслойная матрица была полностью биосовместима в отличие от матрицы-субстрата, имплантация которой приводила к развитию выраженной воспалительной реакции.

Продемонстрировано, что комбинация двух нетканых слоев с двумя различными размерами волокон позволяет достичь сочетания достаточной механической прочности и биосовместимости, обеспечивая положительную реакцию со стороны тканей организма при имплантации.

Установлено, что формирование ватеритного покрытия на двухслойной ПКЛ-матрице приводило к снижению ее устойчивости к растяжению/сжатию (модуль Юнга составил 3.0 ± 0.5 МПа), вследствие частичного нарушения целостности волокон в местах локализации частиц CaCO_3 при деформации. Однако, изменение значения модуля Юнга не являлось значительным. Им можно пренебречь в данном случае, учитывая преимущества остеогенного потенциала ватеритного покрытия при костной имплантации.

Так, имплантация двухслойной ПКЛ-матрицы без ватеритного покрытия в дефект бедренной кости белой крысы показала низкую степень остеоинтеграции матрицы с краями дефекта в кортикальной пластине. Количество новообразованных трабекул в матрице в этом случае было низким и оставило 17.5% от площади поперечного сечения матрицы. Имплантация матрицы с ватеритным покрытием привела к повышению интенсивности образования трабекул в матрице в более, чем 2 раза: площадь образования трабекул составила

37.0%. Кроме того, наблюдалась эффективная остеоинтеграция такой двухслойной матрицы с краями дефекта.

Помимо повышения степени остеоиндуктивности и эффективности остеоинтеграции, ватеритное покрытие позволяет осуществлять локальную доставку БАВ при имплантации ПКЛ-матриц за счет возможности введения активных молекул в пористый ватерит. ЩФ была успешно иммобилизована в двухслойные ПКЛ-матрицы с ватеритным покрытием, эффективность иммобилизации активной ЩФ при этом составила 6.0 ± 0.1 % (мас.%). Кривая кинетики высвобождения ЩФ из матриц в деионизованной воде выходила на насыщение через 48 ч, что коррелировало с результатами исследования процесса перекристаллизации фазы ватерита в кальцит.

В результате имплантации двухслойной матрицы с ватеритным покрытием и иммобилизованной ЩФ в дефект бедренной кости белой крысе была показана высокая интенсивность образования трабекул, которая привела к заполнению 63.0% от площади матрицы новой образованной костной тканью (что практически в 4 раза превосходит площадь зарастивания двухслойной ПКЛ-матрицы без ватеритного покрытия и активного агента). Кроме того, дефект в кортикальной пластине оказался полностью закрытым на 28 день после имплантации такого гибридного матричного материала.

Результаты главы представлены в работе [219].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Ультразвуковая обработка нетканой ПКЛ-матрицы (30 с, частота 35 кГц и плотность мощности 0.64 Вт/см^3) в растворе, содержащем ионы Ca^{2+} и CO_3^{2-} 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/см^3) в растворе, содержащем ионы Ca^{2+} и CO_3^{2-} 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 васкуляризуются, 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 тонковолоконной 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 масс.%. 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 РАБОТ АВТОРА, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ
ДИССЕРТАЦИИ**

Издания из списка ВАК:

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. Martyukova, 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-in-organics in it, their composition and applications //Frontiers in chemistry. – 2019. – Т. 7. – С. 179.

13. **M. S. Saveleva**, E. S. Prikhozhdenko, 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. - Т. 21. – №. 12. – С. 2100266.

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.

Все остальные опубликованные работы автора:

1. **M. Saveleva**, A. Ivanov, T. E.L. Douglas, D. Gorin, A. Skirtach, B. Parakhonskiy. Vaterite CaCO₃-coated polymeric fibrous scaffolds for biomedical applications // Engineering of Biomaterials. – 2017. – Т. 20. - №143.

2. B. Parakhonskiy, **M. Saveleva**, Yu. Svenskaya, A. Ivanova, E. Lengert, A. Alebastrova, A. Yashchenok, D. Gorin, T. Bukreeva, I. Marchenko, T. Douglas, A. Skirtach. Bioceramic micro and nanoparticles as functional biological materials // Engineering of Biomaterials. – 2017. – Т. 20. - №143.

Тезисы докладов на научных конференциях:

1) **M. S. Saveleva**, A. N. Ivanov, B. V. Parakhonskiy, A. G. Skirtach. Sonochemical mineralization treatment of biomaterials: surface bioactivation, osseointegration and in vivo drug release. UK-Russia Workshop “Patient-tailored biomaterials for tissue

regeneration, combating microbial contamination and drug delivery” 2nd-4th October 2019, Lancaster, UK

2) **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. IV International Conference on Metamaterials and Nanophotonics METANANO 2019" г. Санкт-Петербург, Россия; 14.07.2019 – 20.04.2019.

3) **M. S. Saveleva**, A. N. Ivanov, B. V. Parakhonskiy, A. G. Skirtach. Functional hybrid materials based on mineralized polymeric scaffolds for bone tissue regeneration. British Council Researcher Links Workshop “Prevention of microbial contamination of biomaterials for tissue regeneration and wound healing” Lancaster, UK, 1-3/10/2018

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БАВ	биологически активное вещество
ПКЛ	поликапролактон
ЩФ	щелочная фосфатаза
НДФЧ	нормальные дермальные фибробласты человека
ЭФ	электроформование
УЗ	ультразвук
ДХМ	дихлорметан
ДМФА	диметилформаид
ТК	таниновая кислота
ОВА	овальбумин
СЭМ	сканирующая электронная микроскопия
АКК	аморфный карбонат кальция
PBS	фосфатно-солевой буферный раствор (phosphate buffered saline)
ГКР	гигантское комбинационное рассеяние
ТРИТС-БСА	тетраметилродамин-бычий сывороточный альбумин
4-МБК	4-меркаптобензойная кислота

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

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. Klopfleisch 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. Bhatt R.A., Rozental T.D. Bone graft substitutes // *Hand Clin. Elsevier*, 2012. Vol. 28, № 4. P. 457–468.
4. Greenwald A.S. et al. Bone-graft substitutes: facts, fictions, and applications // *JBJS. LWW*, 2001. Vol. 83. P. 98–103.
5. Orthoworld Inc. Orthopaedic Industry Annual Report. 2021.
6. Rawlinson J.N. Morbidity after anterior cervical decompression and fusion. The influence of the donor site on recovery, and the results of a trial of surgibone compared to autologous bone // *Acta Neurochir. (Wien). Springer*, 1994. Vol. 131, № 1–2. P. 106–118.
7. Baumhauer J. et al. Site selection and pain outcome after autologous bone graft harvest // *Foot ankle Int. SAGE Publications Sage CA: Los Angeles, CA*, 2014. Vol. 35, № 2. P. 104–107.
8. Goldberg V.M. Natural history of autografts and allografts // *Bone Implant grafting. Springer*, 1992. P. 9–12.
9. Ratner B.D. New ideas in biomaterials science—a path to engineered biomaterials // *J. Biomed. Mater. Res. John Wiley & Sons, Ltd*, 1993. Vol. 27, № 7. P. 837–850.
10. Ratner B.D. et al. Introduction—biomaterials science: an evolving, multidisciplinary endeavor // *Biomater. Sci. An Introd. to Mater. Med. Wagner, W., Sakiyama-Elbert, S., Zhang, G., Yaszemski, M., Eds.* 2013. P. 3–19.
11. Curtis A., Riehle M. Tissue engineering: the biophysical background // *Phys. Med. Biol.* 2001. Vol. 46, № 4. P. R47–R65.
12. Brokesh A.M., Gaharwar A.K. *Inorganic Biomaterials for Regenerative Medicine*

- // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2020. Vol. 12, № 5. P. 5319–5344.
13. Ke P.C. et al. A Decade of the Protein Corona // ACS Nano. 2017. Vol. 11, № 12. P. 11773–11776.
 14. Almouemen N., Kelly H.M., O’Leary C. Tissue Engineering: Understanding the Role of Biomaterials and Biophysical Forces on Cell Functionality Through Computational and Structural Biotechnology Analytical Methods // Comput. Struct. Biotechnol. J. 2019. Vol. 17. P. 591–598.
 15. Biomaterials and biomedical materials // Definitions of Biomaterials for the Twenty-First Century. Elsevier, 2019. P. 15–23.
 16. Dhand C. et al. Bio-inspired in situ crosslinking and mineralization of electrospun collagen scaffolds for bone tissue engineering // Biomaterials. Elsevier, 2016. Vol. 104. P. 323–338.
 17. Lam C.X.F. et al. Evaluation of polycaprolactone scaffold degradation for 6 months in vitro and in vivo. // J. Biomed. Mater. Res. A. 2009. Vol. 90, № 3. P. 906–919.
 18. Jensen J. et al. Surface-modified functionalized polycaprolactone scaffolds for bone repair: In vitro and in vivo experiments // J. Biomed. Mater. Res. - Part A. 2014. Vol. 102, № 9.
 19. Ivanov A.N. et al. In vivo Evaluation of Polycaprolactone-Hydroxyapatite Scaffold Biocompatibility // Tsitologiya. 2015. Vol. 57, № 4. P. 286–293.
 20. Fujihara K., Kotaki M., Ramakrishna S. Guided bone regeneration membrane made of polycaprolactone/calcium carbonate composite nano-fibers. // Biomaterials. 2005. Vol. 26, № 19. P. 4139–4147.
 21. Sheikh Z. et al. Biodegradable Materials for Bone Repair and Tissue Engineering Applications // Materials (Basel). 2015. Vol. 8, № 9. P. 5744–5794.
 22. Porter J.R. et al. Biocompatibility and Mesenchymal Stem Cell Response to Poly (ϵ -Caprolactone) Nanowire Surfaces for Orthopedic Tissue Engineering // Tissue Eng. Part A. Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 2009. Vol. 15, № 9. P. 2547–2559.
 23. Pitt G.G. et al. Aliphatic polyesters II. The degradation of poly (DL-lactide), poly

- (ϵ -caprolactone), and their copolymers in vivo // *Biomaterials*. Elsevier, 1981. Vol. 2, № 4. P. 215–220.
24. Hajiali F., Tajbakhsh S., Shojaei A. Fabrication and Properties of Polycaprolactone Composites Containing Calcium Phosphate-Based Ceramics and Bioactive Glasses in Bone Tissue Engineering: A Review // *Polym. Rev.* Taylor & Francis, 2018. Vol. 58, № 1. P. 164–207.
 25. Faustini M. et al. History of Organic–Inorganic Hybrid Materials: Prehistory, Art, Science, and Advanced Applications // *Adv. Funct. Mater.* John Wiley & Sons, Ltd, 2018. Vol. 28, № 27. P. 1704158.
 26. Saveleva M.S. et al. Hierarchy of Hybrid Materials—The Place of Inorganics-in-Organics in it, Their Composition and Applications // *Front. Chem.* 2019. Vol. 7.
 27. de Jonge L.T. et al. Organic–Inorganic Surface Modifications for Titanium Implant Surfaces // *Pharm. Res.* 2008. Vol. 25, № 10. P. 2357–2369.
 28. Sikirić M.D. et al. Biomimetic organic–inorganic nanocomposite coatings for titanium implants // *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. John Wiley & Sons, Ltd, 2009. Vol. 89A, № 3. P. 759–771.
 29. Basu B. Natural bone and tooth: structure and properties // *Biomaterials for musculoskeletal regeneration*. Springer, 2017. P. 45–85.
 30. Baxter F.R. et al. Electrically active bioceramics: a review of interfacial responses // *Ann. Biomed. Eng.* Springer, 2010. Vol. 38, № 6. P. 2079–2092.
 31. Jensen D.B. et al. Bone tissue: a relationship between micro and nano structural composition and its corresponding electrostatic properties with applications in tissue engineering // 2007 IEEE Industry Applications Annual Meeting. IEEE, 2007. P. 55–59.
 32. Meyers M.A. et al. Biological materials: structure and mechanical properties // *Prog. Mater. Sci.* Elsevier, 2008. Vol. 53, № 1. P. 1–206.
 33. Wegst U.G.K. et al. Bioinspired structural materials // *Nat. Mater.* 2015. Vol. 14, № 1. P. 23–36.
 34. Saveleva M.S. et al. Hybrid PCL/CaCO₃ scaffolds with capabilities of carrying biologically active molecules: Synthesis, loading and in vivo applications // *Mater.*

- Sci. Eng. C. 2017. Vol. 85. P. 57–67.
35. Puppi D., Chiellini F. Drug release kinetics of electrospun fibrous systems // Core-Shell Nanostructures Drug Deliv. Theranostics. Woodhead Publishing, 2018. P. 349–374.
 36. Serio F. et al. Electrospun Filaments Embedding Bioactive Glass Particles with Ion Release and Enhanced Mineralization // Nanomaterials. Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. Vol. 9, № 2. P. 182.
 37. Ramírez-Cedillo E. et al. Electrospun Polycaprolactone Fibrous Membranes Containing Ag, TiO₂ and Na₂Ti₆O₁₃ Particles for Potential Use in Bone Regeneration // Membranes (Basel). Multidisciplinary Digital Publishing Institute, 2019. Vol. 9, № 1. P. 12.
 38. Severyukhina A.N. et al. Nanoplasmonic Chitosan Nanofibers as Effective SERS Substrate for Detection of Small Molecules // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2015. Vol. 7, № 28. P. 15466–15473.
 39. Yang F., Wolke J.G.C., Jansen J. a. Biomimetic calcium phosphate coating on electrospun poly(ϵ -caprolactone) scaffolds for bone tissue engineering // Chem. Eng. J. 2008. Vol. 137, № 1. P. 154–161.
 40. Mavis B. et al. Synthesis, characterization and osteoblastic activity of polycaprolactone nanofibers coated with biomimetic calcium phosphate. // Acta Biomater. 2009. Vol. 5, № 8. P. 3098–3111.
 41. Dan H. et al. The influence of cellular source on periodontal regeneration using calcium phosphate coated polycaprolactone scaffold supported cell sheets // Biomaterials. Elsevier Ltd, 2014. Vol. 35, № 1. P. 113–122.
 42. Engel J. Biominerals and Their Function in Different Organisms // A Critical Survey of Biomineralization: Control, Mechanisms, Functions and Material Properties. Cham: Springer International Publishing, 2017. P. 7–11.
 43. Lakshminarayanan R. et al. Formation of Transient Amorphous Calcium Carbonate Precursor in Quail Eggshell Mineralization: An In Vitro Study // Biomacromolecules. 2006. Vol. 7, № 11. P. 3202–3209.
 44. LeGeros R.Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials. // Chem. Rev.

2008. Vol. 108, № 11. P. 4742–4753.
45. Maeda H. et al. Vaterite deposition on biodegradable polymer foam scaffolds for inducing bone-like hydroxycarbonate apatite coatings // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2007. Vol. 18, № 12. P. 2269–2273.
 46. Tozzi G. et al. Composite hydrogels for bone regeneration // *Materials (Basel). Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, 2016. Vol. 9, № 4. P. 267.
 47. Douglas T.E.L. et al. Enzymatic, urease-mediated mineralization of gellan gum hydrogel with calcium carbonate, magnesium-enriched calcium carbonate and magnesium carbonate for bone regeneration applications // *J. Tissue Eng. Regen. Med. Wiley Online Library*, 2017. Vol. 11, № 12. P. 3556–3566.
 48. Douglas T.E.L. et al. Novel self-gelling injectable hydrogel/alpha-tricalcium phosphate composites for bone regeneration: Physiochemical and microcomputer tomographical characterization // *J. Biomed. Mater. Res. Part A. Wiley Online Library*, 2018. Vol. 106, № 3. P. 822–828.
 49. Abalymov A. et al. Identification and analysis of key parameters for the ossification on particle functionalized composites hydrogel materials // *ACS Appl. Mater. Interfaces. ACS Publications*, 2020. Vol. 12, № 35. P. 38862–38872.
 50. Lopez-Heredia M.A. et al. Mineralization of gellan gum hydrogels with calcium and magnesium carbonates by alternate soaking in solutions of calcium/magnesium and carbonate ion solutions // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2018. Vol. 12, № 8. P. 1825–1834.
 51. Douglas T.E.L. et al. Enzymatic Mineralization of Hydrogels for Bone Tissue Engineering by Incorporation of Alkaline Phosphatase // *Macromol. Biosci.* 2012. Vol. 12, № 8. P. 1077–1089.
 52. Roy M., Bandyopadhyay A., Bose S. *Ceramics in Bone Grafts and Coated Implants // Materials for Bone Disorders. Elsevier*, 2017. P. 265–314.
 53. Cunniffe G.M. et al. Development and characterisation of a collagen nano-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2010. Vol. 21, № 8. P. 2293–2298.
 54. Rodrigues C.V.M. et al. Characterization of a bovine collagen–hydroxyapatite

- composite scaffold for bone tissue engineering // *Biomaterials*. 2003. Vol. 24, № 27. P. 4987–4997.
55. Al-Munajjed A.A. et al. Development of a biomimetic collagen-hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering using a SBF immersion technique // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2009. Vol. 90B, № 2. P. 584–591.
 56. Inzana J.A. et al. 3D printing of composite calcium phosphate and collagen scaffolds for bone regeneration // *Biomaterials*. 2014. Vol. 35, № 13. P. 4026–4034.
 57. Wutticharoenmongkol P. et al. Preparation and characterization of novel bone scaffolds based on electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles. // *Macromol. Biosci.* 2006. Vol. 6, № 1. P. 70–77.
 58. Metwally H.A. et al. The Influence of Hydroxyapatite and Calcium Carbonate Microparticles on the Mechanical Properties of Nonwoven Composite Materials Based on Polycaprolactone // *Bionanoscience*. 2014. Vol. 5, № 1. P. 22–30.
 59. Poh P.S.P. et al. In vitro and in vivo bone formation potential of surface calcium phosphate-coated polycaprolactone and polycaprolactone/bioactive glass composite scaffolds // *Acta Biomater.* 2016. Vol. 30. P. 319–333.
 60. Azevedo M.C. et al. Development and properties of polycaprolactone/hydroxyapatite composite biomaterials // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2003. Vol. 14, № 2. P. 103–107.
 61. Park J. et al. Surface modification of a three-dimensional polycaprolactone scaffold by polydopamine, biomineralization, and BMP-2 immobilization for potential bone tissue applications // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2021. Vol. 199. P. 111528.
 62. Kim B.-S., Yang S.-S., Kim C.S. Incorporation of BMP-2 nanoparticles on the surface of a 3D-printed hydroxyapatite scaffold using an ϵ -polycaprolactone polymer emulsion coating method for bone tissue engineering // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2018. Vol. 170. P. 421–429.
 63. Ramírez-Cedillo E. et al. Electrospun Polycaprolactone Fibrous Membranes Containing Ag, TiO₂ and Na₂Ti₆O₁₃ Particles for Potential Use in Bone

- Regeneration // *Membranes (Basel)*. 2019. Vol. 9, № 1. P. 12.
64. Solanki A.K. et al. Bioactive glasses and electrospun composites that release cobalt to stimulate the HIF pathway for wound healing applications // *Biomater. Res.* 2021. Vol. 25, № 1. P. 1.
65. Paxton N.C. et al. Rheological Characterization of Biomaterials Directs Additive Manufacturing of Strontium-Substituted Bioactive Glass/Polycaprolactone Microfibers // *Macromol. Rapid Commun.* 2019. Vol. 40, № 11. P. 1900019.
66. Cannillo V. et al. Production of Bioglass® 45S5 – Polycaprolactone composite scaffolds via salt-leaching // *Compos. Struct.* 2010. Vol. 92, № 8. P. 1823–1832.
67. Serio F. et al. Electrospun Filaments Embedding Bioactive Glass Particles with Ion Release and Enhanced Mineralization // *Nanomaterials*. 2019. Vol. 9, № 2. P. 182.
68. Hong Z., Reis R.L., Mano J.F. Preparation and in vitro characterization of scaffolds of poly(L-lactic acid) containing bioactive glass ceramic nanoparticles // *Acta Biomater.* 2008. Vol. 4, № 5. P. 1297–1306.
69. Maeda H. et al. Vaterite deposition on biodegradable polymer foam scaffolds for inducing bone-like hydroxycarbonate apatite coatings // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2007. Vol. 18, № 12. P. 2269–2273.
70. Huang Q. et al. Comparing the regeneration potential between PLLA/Aragonite and PLLA/Vaterite pearl composite scaffolds in rabbit radius segmental bone defects // *Bioact. Mater.* 2020. Vol. 5, № 4. P. 980–989.
71. Oliveira J.M. et al. Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells // *Biomaterials*. 2006. Vol. 27, № 36. P. 6123–6137.
72. Malafaya P.B., Reis R.L. Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: Influence of hydroxyapatite on in vitro cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor // *Acta Biomater.* 2009. Vol. 5, № 2. P. 644–660.
73. Douglas T.E.L. et al. Enzymatic, urease-mediated mineralization of gellan gum

- hydrogel with calcium carbonate, magnesium-enriched calcium carbonate and magnesium carbonate for bone regeneration applications // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2017. Vol. 11, № 12. P. 3556–3566.
74. Douglas T.E.L. et al. Novel injectable, self-gelling hydrogel–microparticle composites for bone regeneration consisting of gellan gum and calcium and magnesium carbonate microparticles // *Biomed. Mater.* 2016. Vol. 11, № 6. P. 065011.
75. Abalymov A. et al. The influence of Ca/Mg ratio on autogelation of hydrogel biomaterials with bioceramic compounds // *Mater. Sci. Eng. C.* 2022. P. 112632.
76. Douglas T.E.L. et al. Novel self-gelling injectable hydrogel/alpha-tricalcium phosphate composites for bone regeneration: Physiochemical and microcomputer tomographical characterization // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* Wiley-Blackwell, 2017. Vol. 106, № 3. P. 822–828.
77. Douglas T.E.L. et al. Novel injectable gellan gum hydrogel composites incorporating Zn- and Sr-enriched bioactive glass microparticles: High-resolution X-ray microcomputed tomography, antibacterial and in vitro testing // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2018. Vol. 12, № 6. P. 1313–1326.
78. Abalymov A. et al. Carbon Nanotubes Transform Soft Gellan Gum Hydrogels into Hybrid Organic–Inorganic Coatings with Excellent Cell Growth Capability // *C.* 2021. Vol. 7, № 1. P. 18.
79. Muderrisoglu C. et al. Nanostructured Biointerfaces Based on Bioceramic Calcium Carbonate/Hydrogel Coatings on Titanium with an Active Enzyme for Stimulating Osteoblasts Growth // *Adv. Mater. Interfaces.* 2018. Vol. 5, № 19. P. 1800452.
80. Abalymov A. et al. Cells-Grab-on Particles: A Novel Approach to Control Cell Focal Adhesion on Hybrid Thermally Annealed Hydrogels // *ACS Biomater. Sci. Eng.* ACS Publications, 2020. Vol. 6, № 7. P. 3933–3944.
81. Dziadek M. et al. Modification of heat-induced whey protein isolate hydrogel with highly bioactive glass particles results in promising biomaterial for bone tissue engineering // *Mater. Des.* 2021. Vol. 205. P. 109749.

82. Riveiro A. et al. Hyaluronic acid hydrogels reinforced with laser spun bioactive glass micro- and nanofibres doped with lithium // *Mater. Sci. Eng. C*. 2021. Vol. 126. P. 112124.
83. Vivanco J. et al. Mechanical characterization of injection-molded macro porous bioceramic bone scaffolds // *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2012. Vol. 9. P. 137–152.
84. Mastrogiacomo M. et al. Engineering of bone using bone marrow stromal cells and a silicon-stabilized tricalcium phosphate bioceramic: Evidence for a coupling between bone formation and scaffold resorption // *Biomaterials*. 2007. Vol. 28, № 7. P. 1376–1384.
85. Sari M. et al. Bioceramic hydroxyapatite-based scaffold with a porous structure using honeycomb as a natural polymeric Porogen for bone tissue engineering // *Biomater. Res.* 2021. Vol. 25, № 1. P. 2.
86. Wang H. et al. Comparative studies on ectopic bone formation in porous hydroxyapatite scaffolds with complementary pore structures // *Acta Biomater.* 2013. Vol. 9, № 9. P. 8413–8421.
87. Wang H. et al. Osteogenic effect of controlled released rhBMP-2 in 3D printed porous hydroxyapatite scaffold // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2016. Vol. 141. P. 491–498.
88. Jun S.-H. et al. Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) loaded hybrid coating on porous hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2013. Vol. 24, № 3. P. 773–782.
89. Liu F.-H. Synthesis of bioceramic scaffolds for bone tissue engineering by rapid prototyping technique // *J. Sol-Gel Sci. Technol.* 2012. Vol. 64, № 3. P. 704–710.
90. Seidenstuecker M. et al. 3D Powder Printed Bioglass and β -Tricalcium Phosphate Bone Scaffolds // *Materials (Basel)*. 2017. Vol. 11, № 1. P. 13.
91. Yang J. Progress of Bioceramic and Bioglass Bone Scaffolds for Load-Bearing Applications // *Orthopedic Biomaterials*. Cham: Springer International Publishing, 2018. P. 453–486.
92. Hua S.-B. et al. Microstructures and properties of 45S5 bioglass® & BCP

- bioceramic scaffolds fabricated by digital light processing // *Addit. Manuf.* 2021. Vol. 45. P. 102074.
93. de Leeuw N.H., Parker S.C. Surface structure and morphology of calcium carbonate polymorphs calcite, aragonite, and vaterite: an atomistic approach // *J. Phys. Chem. B.* ACS Publications, 1998. Vol. 102, № 16. P. 2914–2922.
 94. Morse J.W., Mucci A., Millero F.J. The solubility of calcite and aragonite in seawater of 35‰ salinity at 25°C and atmospheric pressure // *Geochim. Cosmochim. Acta.* Pergamon, 1980. Vol. 44, № 1. P. 85–94.
 95. Falini G. et al. Control of aragonite or calcite polymorphism by mollusk shell macromolecules // *Science* (80-.). American Association for the Advancement of Science, 1996. Vol. 271, № 5245. P. 67–69.
 96. Chakoumakos B.C. et al. Empirically testing vaterite structural models using neutron diffraction and thermal analysis // *Sci. Rep. The Author(s)*, 2016. Vol. 6. P. 36799.
 97. Al Omari M.M.H. et al. Calcium Carbonate // *Profiles Drug Subst. Excipients Relat. Methodol.* Academic Press, 2016. Vol. 41. P. 31–132.
 98. Bots P. et al. Mechanistic Insights into the Crystallization of Amorphous Calcium Carbonate (ACC) // *Cryst. Growth Des.* 2012. Vol. 12, № 7. P. 3806–3814.
 99. Zhou G.-T. et al. Controlled crystallization of unstable vaterite with distinct morphologies and their polymorphic transition to stable calcite // *Eur. J. Mineral.* 2010. Vol. 22, № February. P. 259–269.
 100. Parakhonskiy B. V, Haase A., Antolini R. Sub-micrometer vaterite containers: Synthesis, substance loading, and release // *Angew. Chemie - Int. Ed.* 2012. Vol. 51, № 5. P. 1195–1197.
 101. Sukhorukov G.B. et al. Porous calcium carbonate microparticles as templates for encapsulation of bioactive compounds // *J. Mater. Chem.* 2004. Vol. 14, № 14. P. 2073.
 102. Parakhonskiy B. V. et al. Macromolecule Loading into Spherical, Elliptical, Star-Like and Cubic Calcium Carbonate Carriers // *ChemPhysChem.* 2014. Vol. 15, № 13. P. 2817–2822.

103. Parakhonskiy B. V et al. Size controlled hydroxyapatite and calcium carbonate particles: Synthesis and their application as templates for SERS platform // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. Elsevier B.V., 2014. Vol. 118. P. 243–248.
104. Trushina D.B. et al. CaCO₃ vaterite microparticles for biomedical and personal care applications // *Mater. Sci. Eng. C*. 2014. Vol. 45. P. 644–658.
105. Obata A., Kasuga T., Jones J.R. Hydroxyapatite Coatings Incorporating Silicon Ion Releasing System on Titanium Prepared Using Water Glass and Vaterite // *J. Am. Ceram. Soc.* John Wiley & Sons, Ltd (10.1111), 2011. Vol. 94, № 7. P. 2074–2079.
106. Ohgushi H. et al. Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite. // *J. Biomed. Mater. Res.* 1992. Vol. 26, № 7. P. 885–895.
107. Obata A. et al. Electrospun microfiber meshes of silicon-doped vaterite/poly(lactic acid) hybrid for guided bone regeneration. // *Acta Biomater.* Acta Materialia Inc., 2010. Vol. 6, № 4. P. 1248–1257.
108. Douglas T.E.L. et al. Novel injectable, self-gelling hydrogel–microparticle composites for bone regeneration consisting of gellan gum and calcium and magnesium carbonate microparticles // *Biomed. Mater.* IOP Publishing, 2016. Vol. 11, № 6. P. 065011.
109. Zhong Q. et al. Degradation pattern of porous CaCO₃ and hydroxyapatite microspheres in vitro and in vivo for potential application in bone tissue engineering // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. Elsevier, 2016. Vol. 143. P. 56–63.
110. Trucillo P. Drug Carriers: A Review on the Most Used Mathematical Models for Drug Release // *Processes*. 2022. Vol. 10, № 6. P. 1094.
111. *The ADME Encyclopedia* / ed. Talevi A. Cham: Springer International Publishing, 2022.
112. Siepmann J., Peppas N.A. Higuchi equation: Derivation, applications, use and misuse // *Int. J. Pharm.* 2011. Vol. 418, № 1. P. 6–12.
113. Corsaro C. et al. Weibull Modeling of Controlled Drug Release from Ag-PMA Nanosystems // *Polymers (Basel)*. 2021. Vol. 13, № 17. P. 2897.

114. Ritger P.L., Peppas N.A. A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swellable devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs // *J. Control. Release*. 1987. Vol. 5, № 1. P. 23–36.
115. Ritger P.L., Peppas N.A. A simple equation for description of solute release II. Fickian and anomalous release from swellable devices // *J. Control. Release*. 1987. Vol. 5, № 1. P. 37–42.
116. Thomas N., Windle A.. A theory of case II diffusion // *Polymer (Guildf)*. 1982. Vol. 23, № 4. P. 529–542.
117. Medina H. et al. Head and neck reconstructions with prolene mesh // *Rev. Bras. Cir. Plástica. Revista Brasileira de Cirurgia Plástica*, 2001. Vol. 12, № 1. P. 7–16.
118. Mélega J.M., Zanini S.A., Psillakis J.M. Cirurgia plástica reparadora e estética // *Cirurgia plástica reparadora e estética*. 1992. P. 1078.
119. Hankenson K.D. et al. Angiogenesis in bone regeneration // *Injury*. Elsevier, 2011. Vol. 42, № 6. P. 556–561.
120. Schmidt-Bleek K. et al. Boon and Bane of Inflammation in Bone Tissue Regeneration and Its Link with Angiogenesis // *Tissue Eng. Part B Rev.* Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2015. Vol. 21, № 4. P. 354–364.
121. Williams D.F. On the mechanisms of biocompatibility // *Biomaterials*. Elsevier, 2008. Vol. 29, № 20. P. 2941–2953.
122. Kumar M. et al. Biomechanical properties of orthopedic and dental implants: a comprehensive review // *Handb. Res. Green Eng. Tech. Mod. Manuf.* IGI Global, 2019. P. 1–13.
123. Gasik M. 24 - Biomechanical characterization of engineered tissues and implants for tissue/organ replacement applications // *Biomaterials for Organ and Tissue Regeneration* / ed. Vrana N.E., Knopf-Marques H., Barthes J. Woodhead Publishing, 2020. P. 599–627.
124. Athanasiou K.A. et al. Fundamentals of Biomechanics in Tissue Engineering of Bone // *Tissue Eng.* Mary Ann Liebert, Inc., publishers, 2000. Vol. 6, № 4. P. 361–381.
125. Штейнле А.В. Посттравматическая Регенерация Костной Ткани (Часть 1) //

- Сибирский Медицинский Журнал. 2009. Vol. 4, № выпуск 1. P. 101–108.
126. Швырков М. Б. Стадийность Регенерации Кости И Основы Фармакологической Коррекции Репаративного Остеогенеза Нижней Челюсти // Стоматология. 2012. Vol. 91, № 1. P. 9–12.
127. Барабаш А.П., Петровская Н.В., Бахлыков Ю.Н. Утолщение диафиза большеберцовой кости по Илизарову в условиях сохранения внутрикостной сосудистой сети // Теоретические и клинические аспекты дистракционного остеогистогенеза. 1982. P. 24–28.
128. Ларионов А.А. Васкуляризация большеберцовой кости при возмещении диафизарного дефекта удлинением одного из отломков по методике ГА Илизарова // Морфология. 1989. № 11. P. 21.
129. Михайлова Л.Н., Штин В.П. Электронно-микроскопическое исследование особенностей дифференцировки скелетогенной ткани при дистракционном остеосинтезе // Арх. патологии. 1979. Vol. 42, № 5. P. 55–63.
130. Бачу И.С., Лаврищева Г.И., Оноприенко Г.А. Функциональная внутрикостная микроциркуляция // Кишинев: Штиинца. 1984.
131. Федяев И.М., Левченко А.Р., Слесарев О.В. Динамика заживления переломов костей скуловой области // Стоматология. 1992. Vol. 71, № 1. P. 50–53.
132. Grosso A. et al. It Takes Two to Tango: Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration // Front. Bioeng. Biotechnol. 2017. Vol. 5. P. 68.
133. Русаков А.В. Введение в физиологию и патологию костной ткани // М. Медгиз. 1959.
134. Hanks C.T., Wataha J.C., Sun Z. In vitro models of biocompatibility: a review // Dent. Mater. Elsevier, 1996. Vol. 12, № 3. P. 186–193.
135. Martini L. et al. Sheep model in orthopedic research: a literature review // Comp. Med. American Association for Laboratory Animal Science, 2001. Vol. 51, № 4. P. 292–299.
136. Pizzoferrato A. et al. Cell culture methods for testing biocompatibility // Clin.

- Mater. Elsevier, 1994. Vol. 15, № 3. P. 173–190.
137. Davies C.M. et al. Mechanically loaded ex vivo bone culture system ‘Zetos’: systems and culture preparation // *Eur Cell Mater.* 2006. Vol. 11. P. 57–75.
 138. Dolzhikov A.A., Dolzhikova I.N. The Problem of Experimental Model Choice in Biomedical Researches of Implants (Review) // *Res. Result Med. Pharm.* 2018. Vol. 4, № 3. P. 49–62.
 139. Pearce A. et al. Animal models for implant biomaterial research in bone: A review // *Eur. Cells Mater.* 2007. Vol. 13. P. 1–10.
 140. Wancket L.M. Animal Models for Evaluation of Bone Implants and Devices // *Vet. Pathol.* 2015. Vol. 52, № 5. P. 842–850.
 141. Renaud M. et al. A new rat model for translational research in bone regeneration // *Tissue Eng. Part C Methods.* Mary Ann Liebert, Inc. 140 Huguenot Street, 3rd Floor New Rochelle, NY 10801 USA, 2016. Vol. 22, № 2. P. 125–131.
 142. Spicer P.P. et al. Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect // *Nat. Protoc.* Nature Publishing Group, 2012. Vol. 7, № 10. P. 1918–1929.
 143. Von Rechenberg B. Animal models in bone repair // *Drug Discovery Today: Disease Models.* Elsevier Ltd, 2014. Vol. 13. P. 23–27.
 144. Fang T.D. et al. Guided Tissue Regeneration Enhances Bone Formation in a Rat Model of Failed Osteogenesis // *Plast. Reconstr. Surg.* 2006. Vol. 117, № 4.
 145. Gomes P.S., Fernandes M.H. Rodent models in bone-related research: The relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies // *Lab. Anim.* 2011. Vol. 45, № 1. P. 14–24.
 146. Gothard D. et al. Tissue engineered bone using select growth factors: A comprehensive review of animal studies and clinical translation studies in man. // *Eur. Cell. Mater.* 2014.
 147. Bhardwaj A., Bhardwaj S. V. Contribution of animal models in periodontal research // *IJAVMS.* 2012. Vol. 6. P. 150–157.
 148. Li Y. et al. Bone defect animal models for testing efficacy of bone substitute biomaterials // *J. Orthop. Transl.* Elsevier, 2015. Vol. 3, № 3. P. 95–104.

149. Hulsart-Billström G. et al. A uni-cortical femoral defect model in the rat: evaluation using injectable hyaluronan hydrogel as a carrier for bone morphogenetic protein-2 // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* Wiley Online Library, 2015. Vol. 9, № 7. P. 799–807.
150. Ebina H. et al. Micro-CT analysis of alveolar bone healing using a rat experimental model of critical-size defects // *Oral Dis.* Wiley Online Library, 2009. Vol. 15, № 4. P. 273–280.
151. Kummari S.R. et al. Trabecular microfracture precedes cortical shell failure in the rat caudal vertebra under cyclic overloading // *Calcif. Tissue Int.* Springer, 2009. Vol. 85, № 2. P. 127–133.
152. Morad G., Kheiri L., Khojasteh A. Dental pulp stem cells for in vivo bone regeneration: a systematic review of literature // *Arch. Oral Biol.* Elsevier, 2013. Vol. 58, № 12. P. 1818–1827.
153. Taguchi T., Lopez M.J. An overview of de novo bone generation in animal models // *J. Orthop. Res.* John Wiley & Sons, Ltd, 2021. Vol. 39, № 1. P. 7–21.
154. ISO 10993-6:2016(en) Biological evaluation of medical devices — Part 6: Tests for local effects after implantation.
155. Reneker D.H., Chun I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning // *Nanotechnology.* 1996. Vol. 7, № 3. P. 216–223.
156. Volodkin D. V, Larionova N.I., Sukhorukov G.B. Protein encapsulation via porous CaCO₃ microparticles templating // *Biomacromolecules.* 2004. Vol. 5. P. 1962–1972.
157. Hughes J.M., Cameron M., Crowley K.D. Structural variations in natural F, OH, and Cl apatites // *Am. Mineral.* 1989. Vol. 74, № 7–8. P. 870.
158. Le Bail A., Ouhenia S., Chateigner D. Microtwinning hypothesis for a more ordered vaterite model // *Powder Diffr.* 2012. Vol. 26, № 01. P. 16–21.
159. Sitepu H. Texture and structural refinement using neutron diffraction data from molybdate (MoO₃) and calcite (CaCO₃) powders and a Ni-rich Ni_{50.7}Ti_{49.30} alloy // *Powder Diffr.* 2009. Vol. 24, № 04. P. 315–326.
160. Elsdale T., Bard J. Collagen Substrata For Cell Behavior // *J. Cell Biol.* 1972. Vol.

54. P. 626–637.
161. Bertoldi S. et al. Functionalization of PU Foams via Inorganic and Organic Coatings to Improve Cell and Tissue Interactions // Proceedings of 1st Coatings and Interfaces Web Conference. Basel, Switzerland: MDPI, 2019. P. 6149.
162. Idaszek J. et al. How important are scaffolds and their surface properties in regenerative medicine // Appl. Surf. Sci. 2016. Vol. 388. P. 762–774.
163. Svenskaya Y. et al. Anticancer drug delivery system based on calcium carbonate particles loaded with a photosensitizer // Biophys. Chem. Elsevier B.V., 2013. Vol. 182. P. 11–15.
164. Lim S.S., Chai C.Y., Loh H.-S. In vitro evaluation of osteoblast adhesion, proliferation and differentiation on chitosan-TiO₂ nanotubes scaffolds with Ca²⁺ ions // Mater. Sci. Eng. C. 2017. Vol. 76. P. 144–152.
165. Obata A., Ogasawara T., Kasuga T. Combinatorial effects of inorganic ions on adhesion and proliferation of osteoblast-like cells // J. Biomed. Mater. Res. Part A. Wiley Online Library, 2019. Vol. 107, № 5. P. 1042–1051.
166. Jung G.-Y., Park Y.-J., Han J.-S. Effects of HA released calcium ion on osteoblast differentiation // J. Mater. Sci. Mater. Med. 2010. Vol. 21, № 5. P. 1649–1654.
167. Volodkin D. V, Von Klitzing R., Möhwald H. Pure protein microspheres by calcium carbonate templating // Angew. Chemie - Int. Ed. 2010. Vol. 49, № 48. P. 9258–9261.
168. Donatan S. et al. The loading capacity versus the enzyme activity in new anisotropic and spherical vaterite microparticles // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2016. Vol. 8, № 22. P. 14284–14292.
169. Peng C., Zhao Q., Gao C. Sustained delivery of doxorubicin by porous CaCO₃ and chitosan/alginate multilayers-coated CaCO₃ microparticles // Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 2010. Vol. 353, № 2–3. P. 132–139.
170. Svenskaya Y. et al. Point-wise laser effect on NIH/3T3 cells impregnated with photosensitizer-loaded porous calcium carbonate microparticles // 2015 IEEE 15th International Conference on Nanotechnology (IEEE-NANO). IEEE, 2015. P. 1513–1516.

171. Svenskaya Y.I. et al. Photodynamic therapy platform based on localized delivery of photosensitizer by vaterite submicron particles // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. Elsevier B.V., 2016. Vol. 146. P. 171–179.
172. Ueno Y. et al. Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery system // *J. Control. Release*. 2005. Vol. 103, № 1. P. 93–98.
173. Volodkin D. V. et al. Matrix Polyelectrolyte Microcapsules: New System for Macromolecule Encapsulation // *Langmuir*. 2004. Vol. 20, № 8. P. 3398–3406.
174. Andreassen J.-P. Formation mechanism and morphology in precipitation of vaterite—nano-aggregation or crystal growth? // *J. Cryst. Growth*. 2005. Vol. 274, № 1–2. P. 256–264.
175. Hostomsky J., Jones A.G. Calcium carbonate crystallization, agglomeration and form during continuous precipitation from solution // *J. Phys. D. Appl. Phys.* 1991. Vol. 24, № 2. P. 165–170.
176. Beck R., Andreassen J.-P. Spherulitic Growth of Calcium Carbonate // *Cryst. Growth Des.* 2010. Vol. 10, № 7. P. 2934–2947.
177. Dupont L., Portemer F., Figlarz the L.M. Synthesis and study of a well crystallized CaCO₃ vaterite showing a new habitus // *J. Mater. Chem.* 1997. Vol. 7, № 5. P. 797–800.
178. Svenskaya Y.I. et al. Ultrasonically assisted fabrication of vaterite submicron-sized carriers // *Adv. Powder Technol.* The Society of Powder Technology Japan, 2016. Vol. 27, № 2. P. 618–624.
179. Bellini D. et al. An in situ gelling system for bone regeneration of osteochondral defects // *Eur. Polym. J.* 2015. Vol. 72. P. 642–650.
180. Robinson G., Manning C.E., Morris E.R. Conformation and Physical Properties of the Bacterial Polysaccharides Gellan, Welan, and Rhamsan // *Food Polymers, Gels and Colloids*. Elsevier, 1991. P. 22–33.
181. Saveleva M.S. et al. Osteogenic Capability of Vaterite-Coated Nonwoven Polycaprolactone Scaffolds for In Vivo Bone Tissue Regeneration // *Macromol. Biosci.* John Wiley & Sons, Ltd, 2021. Vol. 21, № 12. P. 2100266.
182. Savelyeva M.S. et al. Vaterite coatings on electrospun polymeric fibers for

- biomedical applications // *J. Biomed. Mater. Res. Part A*. 2017. Vol. 105, № 1. P. 94–103.
183. Cao H. et al. The topographical effect of electrospun nanofibrous scaffolds on the in vivo and in vitro foreign body reaction // *J. Biomed. Mater. Res. - Part A*. 2010. Vol. 93, № 3. P. 1151–1159.
184. Jiang T. et al. The tissue response and degradation of electrospun poly(ϵ -caprolactone)/poly(trimethylene-carbonate) scaffold in subcutaneous space of mice // *J. Nanomater.* 2014. Vol. 2014. P. 1–8.
185. Tillman B.W. et al. The in vivo stability of electrospun polycaprolactone-collagen scaffolds in vascular reconstruction // *Biomaterials*. Elsevier Ltd, 2009. Vol. 30, № 4. P. 583–588.
186. Martinez-Diaz S. et al. In Vivo Evaluation of 3-Dimensional Polycaprolactone Scaffolds for Cartilage Repair in Rabbits // *Am. J. Sports Med.* 2010. Vol. 38, № 3. P. 509–519.
187. Seyednejad H. et al. In vivo biocompatibility and biodegradation of 3D-printed porous scaffolds based on a hydroxyl-functionalized poly(ϵ -caprolactone) // *Biomaterials*. 2012. Vol. 33, № 17. P. 4309–4318.
188. Ivanov A.N. et al. Biocompatibility of polycaprolactone and hydroxyapatite matrices in vivo // *Cell tissue biol.* 2015. Vol. 9, № 5. P. 422–429.
189. Spiller K.L. et al. The role of macrophage phenotype in vascularization of tissue engineering scaffolds // *Biomaterials*. 2014.
190. Ivanov A.N., Puchin'yan D.M., Norkin I.A. The role of endothelial cells in angiogenesis // *Biol. Bull. Rev.* 2016. Vol. 5. P. 491–505.
191. Parakhonskiy B. V. et al. Tailored intracellular delivery via a crystal phase transition in 400 nm vaterite particles // *Biomater. Sci.* 2013. Vol. 1, № 12. P. 1273.
192. Parakhonskiy B. V. et al. Colloidal micro- and nano-particles as templates for polyelectrolyte multilayer capsules // *Adv. Colloid Interface Sci.* Elsevier B.V., 2014. Vol. 207, № 1. P. 253–264.
193. Haslam E. et al. Polyphenol Complexation // *Phenolic Compounds in Food and*

- Their Effects on Health I. P. 8–50.
194. 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.
 195. 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.
 196. Goutzourelas N. et al. Polyphenolic composition of grape stem extracts affects antioxidant activity in endothelial and muscle cells // *Mol. Med. Rep.* 2015.
 197. 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.
 198. Ivanov A.N. et al. *New Approaches to Scaffold Biocompatibility Assessment // Bionanoscience.* Springer New York LLC, 2019. Vol. 9, № 2. P. 395–405.
 199. Tolba E. et al. High biocompatibility and improved osteogenic potential of amorphous calcium carbonate/vaterite // *J. Mater. Chem. B.* Royal Society of Chemistry, 2016. Vol. 4, № 3. P. 376–386.
 200. Green D.W. et al. Augmentation of skeletal tissue formation in impaction bone grafting using vaterite microsphere biocomposites // *Biomaterials.* Elsevier, 2009. Vol. 30, № 10. P. 1918–1927.
 201. Vuola J. et al. Bone marrow induced osteogenesis in hydroxyapatite and calcium carbonate implants. // *Biomaterials.* 1996. Vol. 17, № 18. P. 1761–1766.
 202. Kolluru P. V et al. Strong and tough mineralized PLGA nanofibers for tendon-to-bone scaffolds // *Acta Biomater.* Elsevier, 2013. Vol. 9, № 12. P. 9442–9450.
 203. Golub E.E., Boesze-Battaglia K. The role of alkaline phosphatase in mineralization // *Curr. Opin. Orthop.* 2007. Vol. 18, № 5. P. 444–448.
 204. Millán J.L. The role of phosphatases in the initiation of skeletal mineralization // *Calcif. Tissue Int.* Springer, 2013. Vol. 93, № 4. P. 299–306.
 205. Pagán A.J., Ramakrishnan L. The formation and function of granulomas // *Annu. Rev. Immunol.* Annual Reviews, 2018. Vol. 36. P. 639–665.
 206. Veisheh O. et al. Size-and shape-dependent foreign body immune response to

- materials implanted in rodents and non-human primates // *Nat. Mater.* Nature Publishing Group, 2015. Vol. 14, № 6. P. 643–651.
207. Kanczler J.M., Oreffo R.O.C. Osteogenesis and angiogenesis: The potential for engineering bone // *European Cells and Materials*. 2008. Vol. 15. P. 100–114.
208. Saran U., Piperni S.G., Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair // *Arch. Biochem. Biophys.* Elsevier, 2014. Vol. 561. P. 109–117.
209. Neagu T.P. et al. The relationship between periosteum and fracture healing // *Rom J Morphol Embryol*. 2016. Vol. 57, № 4. P. 1215–1220.
210. Filipowska J. et al. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning // *Angiogenesis*. Springer, 2017. Vol. 20, № 3. P. 291–302.
211. Hsu S. et al. Evaluation of the growth of chondrocytes and osteoblasts seeded into precision scaffolds fabricated by fused deposition manufacturing // *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* John Wiley & Sons, Ltd, 2007. Vol. 80B, № 2. P. 519–527.
212. 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.
213. 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.
214. Muderrisoglu C. et al. Nanostructured Biointerfaces Based on Bioceramic Calcium Carbonate/Hydrogel Coatings on Titanium with an Active Enzyme for Stimulating Osteoblasts Growth // *Adv. Mater. Interfaces*. 2018. Vol. 1800452. P. 1800452.
215. 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.
216. Schröder R. et al. Particles of vaterite, a metastable CaCO_3 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.
217. Ivanov A.N. et al. Biocompatibility of Polycaprolactone Scaffold Providing Targeting Delivery of Alkaline Phosphatase // *Cell tissue biol.* 2021. Vol. 15, № 3. P. 301–309.
218. Ivanov A.N. et al. Effect of local modulation in enzymatic homeostasis on bone turnover marker dynamics in blood at substituting femur defects with vaterite scaffolds // *Russ. Open Med. J.* 2021. Vol. 9, № 4.
219. Saveleva M.S. et al. Osteogenic Capability of Vaterite-Coated Nonwoven Polycaprolactone Scaffolds for In Vivo Bone Tissue Regeneration // *Macromol. Biosci.* Wiley Online Library, 2021. Vol. 21, № 12. P. 2100266.

БЛАГОДАРНОСТИ

Автор выражает признательность своему научному руководителю Горину Дмитрию Александровичу за чуткое руководство, получение ценного опыта, формирование научного мышления и всестороннюю поддержку и 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, в выполнении экспериментальной работы, за формирование экспериментального опыта и творческого подхода к работе.

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, за приобретение уникальных знаний, ценные советы и помощь.

Автор выражает искреннюю благодарность сотрудникам лаборатории «Дистанционно управляемые системы для тераностики» и лаборатории биомедицинской фотоакустики Саратовского государственного университета им. Н. Г. Чернышевского за дружеский коллектив и всестороннюю помощь и поддержку в течение всего обучения и работы.

Глубокую благодарность автор выражает своей семье за самую искреннюю любовь и поддержку.